



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN

THÈSE

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité: Chimie,
Option : Chimie Organique

Par :

Mme SEBIANE Naima née BOUAZZAOU

Sur le thème

Recherche des Acides Gras Polyinsaturés dans les Pépins de Melon et de courge

Soutenue publiquement le 15 / 06 /2019 à Tlemcen devant le jury composé de :

M ^{lle} NEGADI Latifa	Professeur	Université de Tlemcen	Présidente
Mr KAJIMA MULENGI Joseph	Professeur	Université de Tlemcen	Directeur de thèse
Mr BOUAJILA Jalloul	Maître de conférences	Université de Toulouse-France	Examineur
M ^{lle} BENYOUNES Hassiba	Professeur	Université de l'USTO	Examinatrice
Mr DIB Mohamed Amin	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Mr SELLES Chaouki	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur

*Laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses (COSNA)
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

A mes chers parents

Sans qui je ne serai pas là aujourd'hui

A mon frère et mes sœurs

A mes beaux frères et belles sœurs

A mon cher mari

A mes beaux parents

A mon fils Anis

A ma fille Ines

Et à tous ceux qui me sont chers

Remerciements

*Cette thèse a été réalisée sous la direction du Pr **Joseph Kajima Mulengi** au sein du laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses (COSNA) à la Faculté des sciences. Département de Chimie de l'Université Aboubakr belkaid, Tlemcen, et a été financée par l'organisme ATRSS par le biais de PNR-Santé 2013, rattachés au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.*

Une partie de notre travail a été réalisée dans le Laboratoire Génie Chimique (LGC) de l'Institut National Polytechnique (INP) de Toulouse-France sous la direction du Pr Jean Stéphane Condoret et au laboratoire des interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique de la Faculté de Pharmacie de l'université Paul Sabatier de Toulouse sous la direction de Monsieur Jalloul Bouajila.

Je tiens tous d'abord à remercier Monsieur Joseph Kajima Mulengi Professeur de l'université de Tlemcen, qui a été mon encadreur durant mes années de Magister et qui a continué de m'encadrer pour ses années de thèse. Je l'ai côtoyé durant toutes ces années et j'ai beaucoup apprécié ses qualités humaines et professionnelles. J'aimerais lui adresser mes plus vifs remerciements pour son dynamisme, son soutien, ses conseils et la confiance qui m'a d'emblée accordée et qui a menée à bien ce travail. Qu'il trouve ici ma profonde gratitude pour toutes ses années.

*J'exprime mes remerciements à Melle **Latifa NEGADI**, professeur de l'Université de Tlemcen pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.*

Mes remerciements s'adressent également aux membres de jury, examinateurs pour avoir accepté de juger ce travail :

- ✓ *Mr **DIB**, Professeur de l'Université de Tlemcen et Mr **SELLES** aussi professeur de l'Université de Tlemcen.*

- ✓ *Melle **Hassiba BENYOUNES**, Professeur de l'Université des sciences et technologie d'Oran Mohamed Boudiaf (USTO), je dois également lui exprimer ma profonde gratitude pour son aide à accrocher mon stage à Toulouse. Je la remercie aussi pour sa gentillesse, ses conseils et encouragements.*

- ✓ *Monsieur **Jalloul BOUAJILA**, Maître de conférences à l'Université Paul Sabatier, Toulouse France pour m'avoir honoré en acceptant de juger ce travail. Je souhaite également lui transmettre l'expression de ma reconnaissance et ma plus profonde gratitude pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour la réalisation de tous les tests biologiques et les analyses GC-MS. Je le remercie également pour ces suggestions et conseils.*

*J'exprime ma plus profonde gratitude à Monsieur **Jean-Stéphane CONDORET** Professeur à l'ENSIACET INP Toulouse-France et Mme **Severine CAMY** Maître de conférences à l'ENSIACET pour m'avoir accueilli chaleureusement dans leur Laboratoire et de m'avoir facilité l'accès au matériel disponible pour la réalisation d'une série d'extraction avec la technologie du CO₂ supercritique, je les remercie pour leur disponibilité, leurs conseils et suggestions.*

*Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail, Mr **BENDIABDELLAH Djamel** et Mr **BENARIBA** pour leur disponibilité en analyse GC-MS et IR, Monsieur le directeur et les ingénieurs du laboratoire d'analyse de l'usine **ALZINC** de Ghazaouet pour l'analyse des métaux, mes chères collègues **wassila Drici**, **lemerini wafaa** pour leurs soutien et encouragements durant toutes ses années, ainsi que tous les membres du laboratoire **COSNA**.*

Je ne remercierai jamais assez mes chers parents qui m'ont soutenu et épaulé sans relâche, que ceci soit l'occasion pour moi de leurs exprimer ma plus profonde gratitude et tous mes remerciements pour leur disponibilité, leurs soutien inconditionnel dans tous les étapes de ma vie.

Je remercie également mes beaux parents, qui ont toujours été là pour me soutenir et m'encourager.

Je ne peux oublier, l'aide ci-précieuse de mon cher grand père de m'avoir récolté toute la quantité des graines de courge. Merci grand père, je te souhaite une longue vie et un rétablissement de ta vilaine maladie.

Enfin, mes plus vifs remerciement à mon mari pour son soutien, sa patience, ces encouragements durant cette formation.

Table des matières

Dédicace et Remerciements.....	i
Table des matières	iv
Introduction générale.....	1
Chapitre I: Synthèse bibliographique.....	5
Partie 1 : Les oléagineux, source d'huiles végétales.....	5
I. Introduction	5
II. Définition des huiles végétales.....	6
III. Composition des huiles végétales.....	6
III.1. Les triglycérides	6
III.2. Les acides gras.....	7
III.2.1. Nomenclature des acides gras.....	7
III.2.2. Les acides gras essentiels.....	10
III.2.3. Stéréochimie des acides gras.....	10
III.3. Constituants insaponifiables (Composant mineurs).....	11
III.3.1. Phospholipides.....	12
III.3.2. Les polyphénols.....	12
III.3.3. Tocophérols et tocotriénols (Vitamine E).....	13
III.3.4. Les stéroïdes.....	15
III.3.5. Les stérols et phytostérols.....	16
IV. Classification des huiles végétales.....	17
IV.1. La classification botanique.....	17
IV.2. Classification basée sur les critères chimiques.....	17
V. Utilisation des huiles végétales.....	18
V.1. Huile alimentaire.....	18
V.1.1. Définition de la qualité d'une huile alimentaire.....	18
V.1.2. Critères de contrôle de la qualité d'une huile.....	19
V.2. Applications non-alimentaires des huiles végétales.....	20
V.2.2. Dans la fabrication du savon.....	20
V.2.2. Les pesticides.....	20
V.2.3. Dans les produits de revêtement.....	21
V.2.4. Dans le domaine des lubrifiants.....	21
VI. Production mondiale des graines et huiles végétales.....	21
VII. Production Algérienne des huiles végétales.....	23
Partie II : Méthodes d'extraction des corps gras.....	24
I. Introduction.....	24
II. Le pressage.....	24

Table des matières

III. Extraction par solvant organique (soxhlet).....	25
IV. Extraction par voie enzymatique.....	27
V. Extraction par CO ₂ supercritique.....	27
V.1. Définition et propriétés d'un fluide supercritique.....	27
V.2. Le CO ₂ supercritique.....	29
V.3. Propriétés physico-chimique du CO ₂ supercritique.....	29
V.3.1. La masse volumique.....	30
V.3.2. La viscosité.....	31
V.3.3. La diffusivité.....	31
V.3.4. Le pouvoir solvant.....	31
V.4. Cinétique d'extraction solide-CO ₂ supercritique.....	32
V.5. Choix des conditions opératoire pour l'extraction.....	33
V.5.1. La pression.....	33
V.5.2. Température.....	33
V.5.3. Ajout du co-solvant.....	34
V.5.4. La granulométrie.....	34
V.5.5. Débit du CO ₂	34
V.5.6. La matrice solide.....	34
V.6. Pouvoir solvant du CO ₂ supercritique vis-à-vis des huiles.....	34
V.7. Extraction de composés antioxydants par CO ₂ supercritique.....	36
V.7.1. Tocophérols.....	36
V.7.2. Composés phénoliques.....	37
V.8. Mesure de la solubilité dans le CO ₂ supercritique.....	38
V.8.1. Mesure de solubilité en mode statique.....	39
V.8.2. Mesure de solubilité en mode dynamique.....	39
V.8.3. Mesure de la solubilité.....	39
V.8.3.1. Equation de Chrastil.....	40
V.8.3.2. Equation de Del Valle-Aguilera.....	41
V.8.3.3. Equation d'Adachi et Lu.....	41
V.9. Avantages et inconvénients de l'utilisation du CO ₂ supercritique.....	41
V.10. Applications industrielles.....	43
Partie III : Les Cucurbitacées.....	44
I. Généralités sur les Cucurbitacées.....	44
II. Description botanique.....	44
II.1. les tiges.....	44
II.2. les vrilles.....	45
II.3. Les feuilles.....	45
II.4. Les fleurs.....	46
II.5. Les fruits.....	46
III. Les Cucurbitacées alimentaires.....	47

Table des matières

III.1. Le genre <i>Cucurbita</i>	47
III.1.1. <i>Cucurbita maxima</i>	47
III.1.2. <i>Cucurbita moschata</i>	48
III.1.3. <i>Cucurbita pepo</i>	48
III.1.4. <i>Cucurbita ficifolia</i>	49
III.2. Le genre <i>Cucumis</i>	49
III.2.1. <i>Cucumis sativus</i>	49
III.2.2. <i>Cucumis melo</i>	50
IV. Les graines des Cucurbitacées	51
V. Composition chimique des graines	52
V.1. Protéines	52
V.2. Les minéraux.....	52
V.3. Lipides	52
VI. Propriétés médicinales des Cucurbitacées	53
Chapitre II : Matériels et méthodes	56
I. Composition chimique et analyse de l'huile extraite par soxhlet	56
I.1. Matériel végétal	56
I.2. Analyse chimique des pépins	56
I.2.1. Taux d'humidité	56
I.2.2. Teneur en cendre	57
I.2.3. Teneur en Lipides	57
I.2.4. Teneur en minéraux	57
I.3. Extraction de l'huile par soxhlet	58
I.4. Analyse physico-chimique de l'huile.....	59
I.4.1. Propriétés chimiques.....	59
I.4.1.1. Indice d'acide.....	59
I.4.1.2. Indice de peroxyde	60
I.4.1.3. Indice de saponification.....	60
I.4.1.4. Indice d'iode.....	61
I.4.2. Propriétés physiques.....	62
I.4.2.1. Indice de réfraction.....	62
I.4.2.2. Densité relative.....	63
I.5. Recherche de polyphénols dans les pépins de melon.....	63
I.5.1. Extraction des polyphénols par macération.....	63
I.5.2. Dosage de polyphénols.....	63
I.6. Analyse des acides gras.....	64
I.6.1. Réaction de saponification.....	65
I.6.2. Estérification des acides gras libres.....	65
I.6.3. Analyse des acides gras méthylés (AGME) par GC/FID	66

Table des matières

I.6.4. Analyse des acides gras méthylés (AGME) par GC/MS.....	67
II. Extraction par CO₂ supercritique	69
II.1. la matière végétale.....	69
II.2. Principe de l'extraction.....	69
II.3. Extraction par l'installation pilote SFE 1000.....	70
II.3.1. Mise en fonctionnement.....	71
II.4. Extraction par l'installation pilote SF200.....	74
II.4.1. Mise en fonctionnement.....	76
II.5. Analyse des acides gras	80
II.5.1. Préparation des AGME.....	80
II.5.2. Analyse par GC-MS.....	80
Chapitre III : Résultats et discussions.....	82
Partie I : Analyse chimique des pépins et identification des acides gras.....	82
I. Analyse de la composition chimique des pépins de melon et de courge.....	82
I.1. Pépins de melon	82
I.2. Pépins de courge.....	83
II. Teneur en minéraux.....	83
II.1. Pépins de melon.....	83
II.2. Pépins de courge.....	85
III. Extraction de l'huile et caractérisation des indices physico-chimiques.....	86
IV. Analyse des acides gras des pépins de melon	89
IV.1. Estérification des acides gras	89
IV.2. Analyse par la GC-MS.....	89
V. Analyse des acides gras des pépins de courge.....	94
VI. Dosage de polyphénol de l'extrait alcoolique de pépins de melon.....	95
VI.1. Extraction par macération	95
VI.2. Dosage de polyphénol.....	96
VII. Conclusion partielle.....	97
Partie II : Extraction par CO ₂ supercritique.....	99
I. Les expérimentations sur les pépins de melon.....	99
I.1. la cinétique de l'extraction.....	99
I.2. Influence du temps, de la température et la pression sur le rendement l'extraction...	102
I.2.1. Influence du temps sur le rendement.....	102
I.2.2. Influence de la pression sur le temps et le rendement	102
I.2.3. Influence de la température sur le rendement.....	104
II. Les expérimentations sur les pépins de courge.....	106
II.1. La cinétique de l'extraction.....	106
II.2. Influence du temps sur le rendement.....	107
II.3. Influence de la pression et le co-solvant sur le rendement.....	108

Table des matières

II.3.1. Influence de la pression sur le temps et le rendement.....	109
II.3.2. Influence du co-solvant.....	110
III. Analyse des acides gras par GC-MS.....	111
III.1. Analyse GC-MS des extraits de l'huile de pépins de melon.....	111
III.2. Analyse GC-MS des extraits de l'huile de pépins de courge.....	113
IV. Mesure de la solubilité de l'huile de pépins de melon et de courge dans le CO ₂ supercritique.....	115
IV.1. Calcul expérimental de la solubilité des huiles à partir des isothermes d'extraction.....	116
IV.2. Influence de la pression sur la solubilité de l'huile de pépins de melon et de courge dans le CO ₂ supercritique.....	119
IV.3. Influence de la température sur la solubilité de l'huile de pépin de melon dans le CO ₂ supercritique	120
IV.4. Comparaison de la solubilité de l'huile de pépins de melon et de courge avec les données de la bibliographie.....	122
V. Mesure théorique de la solubilité de l'huile végétale.....	123
VI. Comparaison entre la solubilité calculée expérimentalement et théoriquement.....	125
VII. Conclusion partielle.....	127
Chapitre IV : Activité biologique : Quelques tests.....	130
I. Généralité sur les activités biologiques.....	130
I.1. Activité antioxydante.....	130
I.1.1. Définition.....	130
I.1.2. Mécanisme de défense contre les radicaux libres.....	131
I.1.3. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante.....	132
I.2. Activité anti-inflammatoire.....	133
I.2.1. Généralités.....	133
I.2.2. Les anti-inflammatoires.....	134
I.2.3. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires.....	134
I.2.4. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	135
I.3. Activité anti-Alzheimer.....	135
I.3.1. Généralités.....	135
I.3.2. L'activité anti-acétylcholinestérase (Anti-AChE).....	136
I.4. Activité Cytotoxique.....	139
I.4.1. Généralités.....	139
I.4.2. Test de cytotoxicité.....	140
II. Matériel et méthode.....	141
II.1. Activité anti-radicalaire par inhibition du DPPH.....	141
II.1.1. Principe.....	141
II.1.2. Protocole.....	141
II.2. Activité anti-acétylcholinestérase (anti-AChE).....	142
II.2.1. Principe.....	142

Table des matières

II.2.2. Protocole.....	143
II.3. Activité anti-inflammatoire par inhibition de la lipoxygénase (LOX).....	143
II.3.1. Principe.....	143
II.3.2. Protocole.....	144
II.4. Activité cytotoxique par le test MTT.....	144
II.4.1. Protocole.....	144
III. Résultats et discussion.....	144
III.1. Activité antioxydante	144
III.2. Activité anti-inflammatoire	146
III.3. Activité anticholinestérase.....	148
III.4. Activité cytotoxique.....	149
IV. Conclusion partielle.....	151
Conclusion Générale.....	153
Références bibliographiques.....	156
Liste des Figures et Tableaux.....	175
Liste des abréviations.....	181
Annexe.....	182

Introduction générale

Introduction générale

Ce travail est consacré à l'étude chimique de la fraction lipidique extraite des graines de deux Cucurbitacées de la région nord-ouest de l'Algérie. Les variétés *Cucumis melo* L. *Inodorus*, connue sous le nom de « melon jaune canari » et *Cucurbita moschata* Duch. *Butternut* ont retenu notre attention. Leurs cultures, très anciennes et très intenses en Algérie, sont destinées principalement à l'alimentation. Les fruits de melon sont appréciés crus et ceux de la courge sont cuits tandis que la médecine traditionnelle leur attribue des propriétés curatives.

Les graines et fruits oléagineux occupent une place importante dans le régime alimentaire Algérien. Ils entrent dans la composition de plusieurs plats et sont perçus comme étant des produits traditionnels faisant par conséquent partie des habitudes alimentaires des Algériens.

On considère que les effets bénéfiques de la consommation de noix et graines observés sont dus en premier lieu à leur profil lipidique cardioprotecteur : un rapport acides gras insaturés/saturés favorable aux insaturés définit un profil lipidique recherché en matière de nutrition. Par ailleurs, un taux important en acides gras insaturés, une faible teneur en acides gras saturés par rapport au contenu lipidique total, associés à la présence d'autres constituants bioactifs tels que fibres, cuivre et magnésium, les polyphénols, tocophérols, squalènes, constituent autant d'éléments importants et bénéfiques pour la santé cardiovasculaire [1].

Ces dernières années, les graines des Cucurbitacées ont inspiré de nombreux travaux, en raison de l'importance économique que revêtent les graines oléagineuses comme source de protéines et d'huiles végétales. En effet, les huiles végétales constituent une denrée irremplaçable dont la consommation augmente pour cause de croissance démographique mondiale. Cette demande accrue d'huiles végétales, pour des applications tant industrielles qu'alimentaires, et aussi médicinales met en lumière un besoin de diversifier et de valoriser des sources de substitution tout en améliorant les méthodes d'extraction.

Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits à haute valeur ajoutée provenant du règne végétal. Ces techniques peuvent être considérées soit comme *conventionnelles*, soit *nouvelles* en fonction des périodes de leur développement. Les techniques conventionnelles utilisent des solvants organiques (tels que l'hexane, l'acétone, le méthanol, l'éthanol etc...) ou l'eau et se réalisent, en général, à pression atmosphérique.

Dans le cas des graines oléagineuses, le procédé industriel d'extraction d'huile repose principalement sur le pressage en continu. Les nouvelles techniques utilisent des pressions

et/ou des températures élevées. L'extraction avec un fluide supercritique tel que le CO₂ est une alternative à l'utilisation des solvants chimiques. L'émergence de cette technologie en tant que solvant des huiles végétales date d'une vingtaine d'années. Bien que la qualité (à visée alimentaire) des huiles extraites par CO₂ supercritique soit supérieure à celles obtenues par les procédés usuels (pressage et solvants organiques), l'obtention de rendements élevés requiert de hautes pressions en CO₂.

Notre thèse intitulée « **Recherche des acides gras polyinsaturés dans les pépins de melon et de courge** », a pour objectif de développer les points suivants :

- Une extraction d'huiles de pépins de melon et de courge en utilisant un solvant organique (hexane) par la méthode conventionnelle et l'étude de la composition en acides gras des huiles par la chromatographie phase gazeuse couplée à la masse.
- Une extraction de l'huile de pépins de melon et de courge par la technologie du CO₂ supercritique à différentes conditions de pression et de température et analyse de sa composition en acides gras.
- Une évaluation de quelques activités biologiques des extraits de pépins de melon obtenus par les différentes méthodes.
- Une comparaison entre les deux modes d'extraction en termes de rendement, composition en acides gras et en activité biologique.
- Enfin mener une étude comparative des caractéristiques des extraits des pépins de melon et de courge.

Organisation du manuscrit

Notre travail de thèse est réparti en quatre chapitres.

Le premier chapitre est consacré à l'étude de l'état de l'art à travers une synthèse bibliographique. Elle comprend 3 parties :

- ✓ Une première partie s'intéresse aux graines oléagineuses : leurs compositions et importances.
- ✓ La seconde partie se focalise sur une mise au point des méthodes d'extraction des substances à haute valeur ajoutée en passant par les méthodes conventionnelles et les nouvelles méthodes alternatives.
- ✓ Une troisième partie concerne une étude générale sur les cucurbitacées en mettant l'accent sur leurs classifications botaniques, la composition chimique des graines et

leurs propriétés médicinales.

Un deuxième chapitre expose les protocoles expérimentaux. Il décrit les technologies de traitement, les méthodes et protocoles d'analyses que nous avons été amenés à adopter pour mener à bien l'ensemble de cette étude.

Un troisième chapitre, consacré aux résultats expérimentaux, se subdivise en deux parties :

- ✓ Une première partie expose les résultats de la composition chimique des pépins de melon et de courge, l'identification des acides gras présents dans l'huile extraite par la méthode conventionnelle, ainsi que l'identification en termes de différents indices de l'huile de pépins de melon. Elle s'intéresse également aux résultats d'extraction et de dosage de polyphénol des extraits alcooliques de pépins de melon.
- ✓ Une deuxième partie s'occupe de différents résultats des extractions par la technologie du CO₂ supercritique, l'impact des paramètres sur le rendement de l'extraction et sur la composition en acides gras ainsi que sur la solubilité des huiles obtenues.

Le dernier chapitre, est réservé à l'activité biologique de quelques extraits réalisés dans le Laboratoire de Pharmacologie de Toulouse. Les activités biologiques évaluées sont l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, anti Alzheimer et cytotoxique.

Notre manuscrit se termine par une conclusion générale sur les différents travaux réalisés et les perspectives à développer pour l'avenir.

Les résultats de ces travaux ont donné lieu à trois publications :

Publication 01: Mediterranean Journal of Chemistry (publiée en ligne en 2016)

Fatty acids and mineral composition of melon (*Cucumis melo L. Inodorus*) seeds from West Algeria

Naima Bouazzaoui, Wassila Drici, Wafaa Bouazzaoui, Wafaa Lemerini, Zoheir Arrar, Djamel Bendiabdellah and Joseph Kajima Mulengi

Publication 02: Separation Science and Technology (publiée en ligne en 2018)

Fatty acid Composition, Cytotoxicity and Anti-inflammatory Evaluation of Melon (*Cucumis melo L. Inodorus*) Seeds Oil Extracted by Supercritical Carbon Dioxide

Naima Bouazzaoui, Jalloul Bouajila, Severine Camy, Joseph Kajima Mulengi, and Jean-Stephane Condoret

Publication 03: Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants (publiée en ligne en 2018)

Comparative study of fatty acids and mineral composition of melon (*Cucumis melo* L. *Inodorus*) and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch. *Butternut*) seeds

Naima Bouazzaoui, Joseph Kajima Mulengi

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Partie I : Les oléagineux, source d'huiles végétales

I. Introduction

Par définition, les oléagineux sont les aliments dont on extrait de l'huile. Ces aliments peuvent être des graines et elles sont contenues dans le fruit de la plante et servent à sa reproduction (tournesol, sésame, courge, lin, soja ...), d'autres sont des fruits dont l'enveloppe dure renferme un noyau comestible ou non (noix, amande, noisette, pignon, pistache, arachide, olive, avocat). Certaines autres graines sont constituées d'une pulpe dont on extrait de l'huile, comme l'olive, et la noix de palmier à huile par exemple.

Les noix et graines oléagineuses contiennent une grande quantité de matière grasse, souvent riche en acides gras polyinsaturés. Elles contiennent des oligoéléments indispensables comme le magnésium, le cuivre et le potassium, tout comme quelques vitamines comme la thiamine et l'acide folique. Parfois, on y trouve certains éléments nutritifs à des teneurs variables, comme c'est le cas du fer, l'acide pantothénique et la riboflavine. Les bienfaits de consommation de noix et graines pour la santé sont souvent méconnus du grand public. En effet, leur teneur en acides gras polyinsaturés essentiels, en fibres et un certain nombre de nutriments leur confère des propriétés cardio-protectrices et antioxydantes qui assurent son équilibre et son maintien.

La composition chimique des noix et graines dépend beaucoup de plusieurs facteurs comme la variété, l'origine géographique, les pratiques culturales et la date de récolte. Des différences de composition en acides gras, en protéines, en composition minérale existent entre diverses variétés de sésame [2], pistache [3], cacahuètes [4] mais aussi entre mêmes variétés de provenances géographiques différentes. La composition en acides gras dépend aussi de la période de récolte : pendant les étapes initiales de la fructification, l'acide linoléique est prédominant, alors que la teneur en acide oléique et en antioxydants augmente avec le stade de maturité [5]. Par conséquent, le choix approprié de la période de récolte en fonction du degré de maturité constitue un facteur essentiel qui détermine la qualité ultérieure du produit et sa stabilité au stockage.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

II. Définition des huiles végétales

Les huiles végétales proviennent de la substance dure ligneuse des graines ou des noix et se trouvent enfermées dans les cellules oléifères sous forme de petites gouttes. On les retrouve dans l'enveloppe charnue du fruit. Elles sont présentes dans plusieurs plantes notamment des fruits du palmier, de l'olivier, du coprah, de l'arachide, des fleurs de tournesol ou de colza ou encore du coton ou du soja. Elles sont utilisées dans différents domaines de l'industrie tels que les secteurs agro-alimentaire, cosmétique, pharmaceutique ou chimique.

III. Composition des huiles végétales

Les huiles végétales sont constituées de 98% de triglycérides. Ces derniers sont des triesters d'acides gras et de glycérol. Néanmoins, on observe des constituants mineurs comme par exemple et entre autres des acides gras libres, des phosphatides, des stérides et des cérides ou de triglycérides partiels. Ces constituants mineurs sont souvent présents dans les huiles brutes ou raffinées.

III.1. Triglycérides

Un triacylglycérol est un triester de glycérol et d'acides gras. Il est caractérisé par la nature de chacun des acides gras qui estérifie chacune des trois fonctions alcool du glycérol (**figure I. 1**).

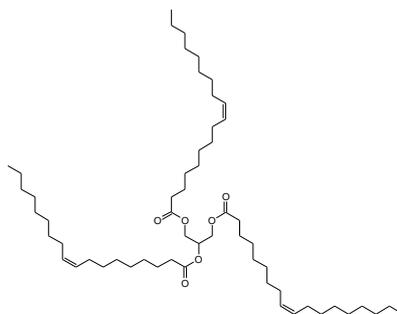


Figure I. 1 : Structure d'un triglycéride issu de la condensation de trois acides gras C18 :1 et le glycérol

Le nombre élevé d'acides gras présents dans un lipide, ainsi que les multiples possibilités de leur combinaison avec le glycérol font des corps gras des mélanges très complexes dont les structures et les propriétés varient de façon significative. Deux corps gras renfermant qualitativement et quantitativement les mêmes acides gras auront des caractéristiques physiques, chimiques ou physiologiques différentes si les acides gras sont répartis de manière différente dans les triglycérides.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Dans un triacylglycérol, les acides gras estérifiant le glycérol peuvent être identiques, différents en partie ou totalement. Ainsi, on distingue :

- Les triacylglycérols de monoacides homogènes, dans lesquels les trois acides gras sont de même nature (triacylglycérols simples). Ils ne présentent pas d'isomère, comme c'est le cas de la trioléine ou trioléoylglycérol.
- Les triacylglycérols diacides, dans lesquels seuls deux acides gras sont différents. (triacylglycérols mixtes), sont constitués d'isomères, selon la position des groupes acyle.
- Les triacylglycérols triacides mixtes dans lesquels les trois acides gras sont différents, sont constitués de six isomères.

III.2. Les acides gras

Les acides gras présents dans les matières grasses alimentaires, principalement les acides gras polyinsaturés (AGPI), servent à combler non seulement une partie de nos dépenses énergétiques, mais également à couvrir nos besoins en acides gras indispensables. Il est aujourd'hui bien admis que les AGPI présents dans notre alimentation, de par leur nature et leur abondance, influencent la santé de l'homme et jouent un rôle dans l'étiologie d'un grand nombre de pathologies (maladies métaboliques, neurodégénératives, cardiovasculaires et inflammatoires, obésité).

III.2.1. Nomenclature des acides gras

Beaucoup d'acides gras portent des noms triviaux qui rappellent l'organisme dans lequel ils ont été primitivement identifiés [6]. C'est ainsi que l'acide palmitique (16 : 0) ou $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CO}_2\text{H}$, rappelle l'huile de palme où il représente 40 % du mélange. Cependant, les dénominations communes et la nomenclature internationale modifiée par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), sont les plus couramment utilisées pour les acides gras. Cette nomenclature systématique prend en compte d'abord le nombre d'atomes de carbone [7]. L'acide palmitique est ainsi systématiquement appelé acide hexadécanoïque, l'acide stéarique ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16} \text{COOH}$), acide octadécanoïque, tandis que l'acide oléique ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7 \text{CH} = \text{CH} (\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$) est appelé l'acide octadécanoïque. Une abréviation conventionnelle simplifiée pour les acides gras s'écrit de la manière suivante:

X : Y n - Z (ou ωz).

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

X = nombre d'atomes de carbone de l'acide gras (n ou ω est le nombre d'atomes de carbone).

Z = numéro de l'atome de carbone portant la première double liaison en comptant à partir du groupe méthyle terminal. Ainsi, l'acide palmitoléique peut s'écrire de la façon suivante 16:1 ω 7 ou 16:1 n-7. Les acides gras les plus abondants dans l'alimentation sont les acides gras à chaîne linéaire comportant un nombre pair d'atomes de carbone. Leur classification se fait selon deux critères :

a) Selon la longueur de la chaîne carbonée

La longueur des chaînes couvre un large éventail, depuis un acide à 4 atomes de carbone contenu dans le lait jusqu'aux acides gras à 30 atomes de carbone qu'on trouve dans certaines huiles de poissons. Ainsi, on distingue:

- Les acides gras à chaînes courtes comportant 4 à 8 atomes de carbone.
- Les acides gras à chaînes moyennes comportant 8 à 12 atomes de carbone.
- Les acides gras à chaînes longues comportant 14 à 18 atomes de carbones.
- Les acides gras à chaînes très longues renfermant 20 atomes de carbones et plus.

Cette classification présente l'avantage de regrouper des différences concernant les caractéristiques physiques, métaboliques et fonctionnelles des acides gras. Ainsi, les acides gras alimentaires à chaînes courtes et moyennes sont directement résorbés vers le sang au cours de la digestion, alors que les acides gras à chaîne longues et très longues devront préalablement emprunter la voie lymphatique. Cette ségrégation est due à des différences de solubilité dans l'eau des acides gras selon la longueur de leurs chaînes. De même, les acides gras alimentaires à chaîne courtes et moyennes constituent uniquement une source d'énergie pour l'organisme humain, alors que les acides gras à chaînes longues et très longues jouent en plus un rôle dans l'élaboration structurale des membranes cellulaires et exercent, pour certains d'entre eux, des fonctions biologiques spécifiques.

b) Selon le degré d'insaturation de la chaîne carbonée

Le nombre de double-liaisons détermine trois groupes d'acides gras

• Les acides gras saturés (AGS)

Dans un acide gras saturé, chaque atome de carbone a ses 4 valences engagées dans des liaisons avec d'autres atomes de carbone ou d'hydrogène. Les principaux acides saturés dans

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

les huiles végétales sont l'acide palmitique (C16) et l'acide stéarique (C18), et accessoirement les acides myristique (C14) et laurique (C12).

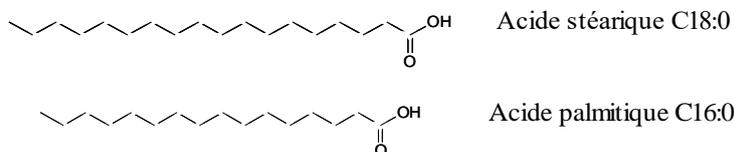


Figure I. 2 : Quelques acides gras saturés (AGS)

- **Les acides gras mono-insaturés (AGMI)**

Il s'agit d'acides gras qui comportent au moins une double liaison dans leur structure. Les principaux acides gras mono-insaturés dans les huiles végétales sont l'acide palmitoléique (C16) et surtout l'acide oléique (C18), qui comble 30 % des besoins de l'organisme en acides gras fournis par l'alimentation. Dans la plupart des acides mono-insaturés alimentaires, la double liaison se situe entre les carbones 9 et 10.

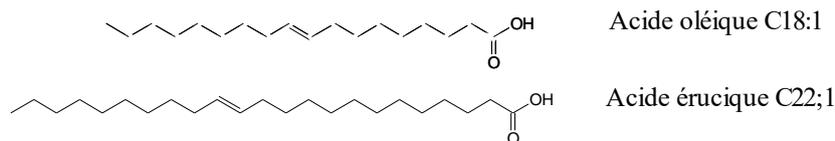


Figure I. 3 : Deux acides gras monoinsaturés (AGMI)

- **Les acides gras polyinsaturés (AGPI)**

Il s'agit des acides gras à 18, 20, 22 atomes de carbone qui présentent dans leurs chaînes deux ou plusieurs double liaisons séparées par un groupement méthylène. Les principaux AGPI sont l'acide linoléique (18 : 2), l'acide linoléique (18 : 3) et l'acide arachidonique (20 : 4).

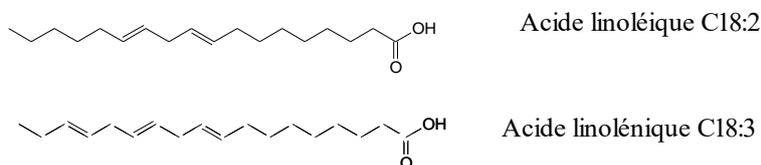


Figure I. 4 : Deux acides gras polyinsaturés

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

III.2.2. Les acides gras essentiels

Les acides gras essentiels (AGE) appartiennent aux groupes des AGPI, sans que tous ne soient considérés comme essentiels. Ceux qui sont essentiels sont indispensables à la croissance normale et à l'activité physiologique de tous les tissus de l'homme mais, ils ne peuvent être synthétisés de *novo* ni par l'animal, ni par l'organisme humain. Ces AGE doivent provenir de l'alimentation, et ils peuvent être illustrés par les acides linoléique, α -linoléique et arachidonique.

Le caractère essentiel de l'acide linoléique a été mis en évidence par Burr *et al* [8]. Cet acide gras a d'ailleurs été considéré pendant longtemps comme étant le seul acide gras essentiel pour l'homme et l'animal. Par la suite, Breton et Ferret [9], Mead [10] et Thomasson [11] ont montré que la position des doubles liaisons sur la chaîne carbonée des acides gras à 18, 20 et 22 atomes de carbone était liée à la notion du caractère essentiel des acides gras. Les acides gras essentiels doivent posséder au moins deux doubles liaisons, en position 6 et 9 (à partir du groupe méthyle) et de configuration *cis*. Un exemple d'acides gras essentiels est celui de l'acide linoléique, et aussi celui de l'acide α -linoléique.

Parmi les nombreux acides gras trouvés dans l'organisme, deux sont essentiels, l'acide linoléique (LA, C18:2 ω -6) et l'acide α -linoléique (ALA ou LNA, C18:3 ω -3). À partir de ces deux acides gras essentiels, notre organisme synthétise les acides gras à chaîne plus longue et/ou à degré d'insaturation plus élevé. Ces derniers sont enfin regroupés en deux séries ω -6 et ω -3. La série ω -6 est pro-inflammatoire et favorise l'agrégation des plaquettes : une forte consommation d'oméga-6 favorise donc à la fois l'inflammation de l'athérome et la formation du caillot sanguin. En revanche, la série ω -3 est anti-inflammatoire et anticoagulante et réduit l'agrégation des plaquettes. Par conséquent, un bon rapport entre oméga-6 et oméga-3 est important pour l'équilibre et le bon fonctionnement de notre organisme. Le rapport idéal entre LA et ALA/LNA est compris entre 3 et 5.

III.2.3. Stéréochimie des acides gras

Dans la plupart des huiles naturelles, les acides gras insaturés possèdent une configuration *cis*, (figure I. 5) [12].

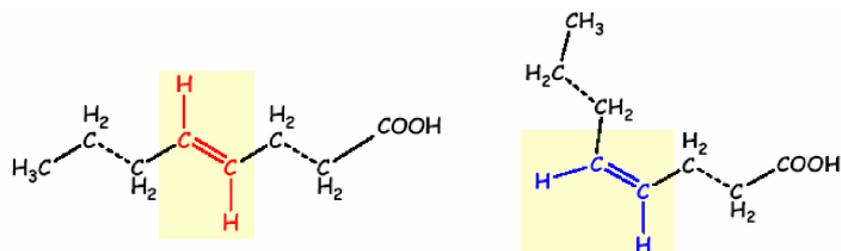


Figure I. 5 : Stéréochimie *cis* et *trans* des acides gras insaturés.

Certains acides gras *trans* se retrouvent dans la nature ; ils sont produits, par exemple, dans l'estomac des ruminants (vaches, moutons) par les bactéries qui y résident. Ces acides gras sont ensuite incorporés dans les graisses corporelles des animaux et dans leur lait. Ils sont par conséquent présents dans la viande, le lait et les produits laitiers. D'autres acides gras *trans* sont d'origine technologique. Ils sont formés par l'intermédiaire des processus industriels comme l'hydrogénation des huiles végétales. Ce type de procédé permet de faire passer des graisses de l'état liquide à l'état solide, ce qui facilite leur utilisation et leur conservation, les rendant moins sensibles à l'oxydation. Ces mêmes acides gras *trans* peuvent également se former lors du chauffage et de la cuisson des huiles végétales à haute température, que ce soit au cours de procédés industriels de transformation ou lors de la cuisson domestique de ces huiles.

Cependant, il est de plus en plus établi que les acides gras de configuration *trans* sont nuisibles, favorisant les maladies coronaires, alors que leurs analogues *cis* sont doués de propriétés bénéfiques. En effet, de nombreuses études d'intervention ou épidémiologiques chez l'homme ont montré que l'augmentation de consommation en AGT était corrélée à l'accroissement des facteurs de risque cardiovasculaire. Pour des niveaux élevés de consommation, les AGT augmentent les LDL-cholestérol, tout en montrant également une tendance à faire baisser les HDL-cholestérol. C'est pourquoi il est recommandé de limiter la consommation des acides gras de type *trans*.

III.3. Constituants insaponifiables (composants mineurs)

On entend par constituants insaponifiables d'un corps gras, l'ensemble des produits présents après saponification de celui-ci par un hydroxyde alcalin, extraction par un solvant spécifique et élimination de ce dernier. Cet ensemble est formé par des constituants naturels importants pour le maintien de la santé, extraits de matières grasses tels les stérols, les tocophérols, les alcools aliphatiques supérieurs, les pigments et les hydrocarbures naturels, les polyphénols,

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

...etc. Ces constituants non dérivés du glycérol des lipides, encore appelés constituants mineurs, ne sont mineurs que du point de vue de leurs concentrations par rapport aux triglycérides.

III.3.1. Phospholipides

Il s'agit de composés naturellement présents dans les huiles végétales. Ils sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée en 1 et 2 par des acides gras et en 3 par un phosphate. Les phospholipides sont des composés polaires, ce qui explique un certain nombre de leurs propriétés telles que la solubilité dans les solvants polaires, l'hygroscopicité, des liaisons avec des cations. Leurs propriétés émulsifiantes et tensio-actives gênent les opérations de raffinage, si bien que leur élimination constitue le premier stade de tous les procédés de raffinage. Ces mêmes propriétés font que les phospholipides sont très employés dans de nombreuses industries et entrent dans la fabrication de produits alimentaires (chocolat, margarine...), pharmaceutiques et cosmétiques.

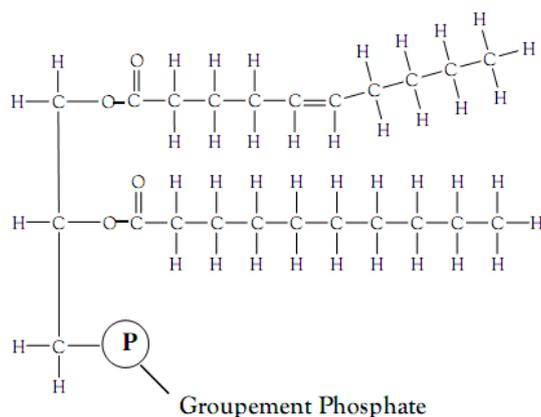


Figure I. 6 : Formule développée d'un phospholipide

III.3.2. Les polyphénols

Si les acides gras représentent la très grande majorité de la composition des huiles végétales en termes de masse, les composés mineurs tels que les composés phénoliques jouent un rôle très important dans la caractérisation des huiles et pour leur intérêt nutritionnel [13,14]. Les composés phénoliques sont classés parmi les produits du métabolisme secondaire des plantes médicinales. Ils correspondent à un vaste ensemble de molécules caractérisées par la présence d'au moins un noyau benzénique (Figure I. 7) portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction.

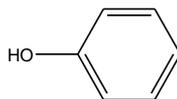


Figure I. 7 : Phénol simple

On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits, ils remplissent beaucoup de fonctions dans les différentes espèces de plantes: défense contre les pathogènes, molécules de dissuasion alimentaire, attraction des pollinisateurs, protection contre les rayonnements UV, molécules qui donnent couleur, arômes, parfums aux plantes, rôle structural (ex : lignine, constituant du bois).

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé en tant qu'antioxydants et delà l'intérêt qu'ils suscitent pour la prévention de cancers et du diabète [15], des maladies inflammatoires [16, 17], cardiovasculaires et neurodégénératives [18]. Ils sont également utilisés comme additifs dans les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

Si des études ont permis de mettre en évidence certaines actions des composés phénoliques, beaucoup de choses sont encore à découvrir car les effets bénéfiques mis en évidence par des études épidémiologiques ne sont toujours pas pleinement explicités. Les composés phénoliques peuvent également présenter des effets synergiques entre eux, ce qui complique la mise en évidence d'effets spécifiques de chacun d'entre eux. Ce qui semble acquis, c'est qu'une ingestion régulière de composés phénoliques comme ceux présents dans l'huile d'olive est fortement corrélée à une diminution des risques de développement de maladies dégénératives, cardiovasculaires ou de cancers.

III.3.3. Tocophérols et tocotriénols (la vitamine E)

La vitamine E est le premier exemple d'une famille de composés appelés tocophérols, nom proposé pour la première fois en 1936 par Evans et collaborateurs [19]. Ce nom provient du grec « τοκος » (tokos) pour progéniture et « πηρειν » (pherein) pour porter. Elle existe sous huit formes, quatre tocophérols et quatre tocotriénols.

Les tocophérols sont des substances constituées par un noyau commun hydroxychromane et une chaîne latérale saturée à 16 carbones.

Le nombre et la position des groupements méthyle sur le noyau hydroxychromane définissent les différentes formes de tocophérols et tocotriénols. La forme la plus active est l' α -tocophérol

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

que l'on rencontre le plus fréquemment dans la nature. Les β et γ tocophérols ont une activité vitaminique réduite respectivement 40 et 15 % environ de l'activité de la forme α , alors que la forme δ est pratiquement inactive.

Les tocotriénols se distinguent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale (**Figure I. 8, Tableau I. 1**). Deux de ces produits possèdent également une certaine activité vitaminique: environ 20% pour l' α -tocotriénol et 5% pour le β -tocotriénol. Les autres sont inactifs.

Tableau I. 1 : Nomenclature de la vitamine E

R1	R2	Nom
CH ₃	CH ₃	α -tocophérol α -tocotriénol
CH ₃	H	β -tocophérol α -tocotriénol
H	CH ₃	γ -tocophérol α -tocotriénol
H	H	δ -tocophérol α -tocotriénol

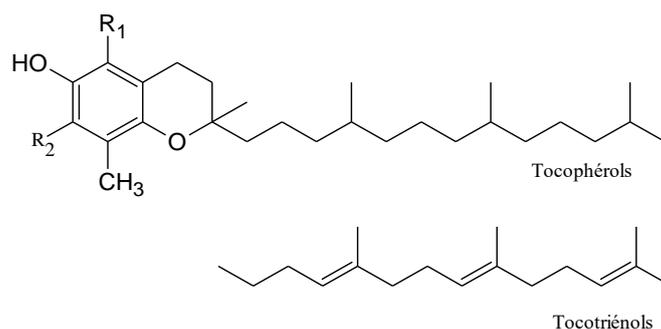


Figure I. 8 : Structure de la vitamine E

Les tocophérols représentent généralement 200 à 1200 mg dans 1 kg d'huile végétale non raffinée [20], l'opération de raffinage peut en éliminer une très forte proportion. Mais les huiles de coprah et de palmiste n'en contiennent que des traces. Cependant, l'huile palmiste contient de fortes proportions de tocotriénols, une autre forme de tocophérols et qui possèdent une activité anti-oxydante supérieure à celle de la vitamine E [21- 25].

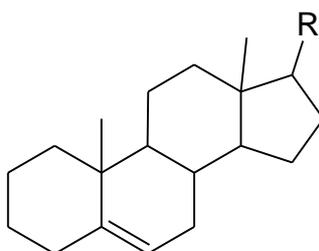
Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Il est important de signaler que la plupart des études menées sur la vitamine E l'ont été *in vitro* ou avec du sang des patients supplémentés par l' α -tocophérol. Ainsi, cette vitamine intervient dans la réponse inflammatoire au sein de globules blancs, module les pulsations cardiaques et assure l'élasticité des vaisseaux par l'intermédiaire de la production d'oxyde d'azote. La vitamine E est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que les fonctions neurologique et immunitaire, mais les mécanismes mis en jeu ne sont pas bien connus. L'effet antioxydant est sans doute crucial pour l'activité biologique de la vitamine E [26]. Mais il semble qu'elle agit également par d'autres mécanismes sur divers aspects du métabolisme cellulaire.

Quant aux tocotriénols, ils sont rarement rencontrés, parce qu'on s'est trop focalisé sur l' α -tocophérol, alors qu'ils sont bien présents dans les huiles de germes de blé et huile de palme. Il en est de même pour le γ -tocophérol. S'agissant de l'huile d'avocat, les tocophérols sont entièrement constitués par l' α -tocophérol et ce dernier se retrouve d'ailleurs à une teneur élevée dans l'huile de coton.

III.3.4. Les stéroïdes

Les stéroïdes constituent un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbone), majoritairement le squalène. Leur squelette est un carbure tétracyclique: le stérane, le cyclopentanoperhydrophénantrène (**Figure I.9**), résultat de la condensation du cyclohexane avec le phénantrène réduit.



R: chaîne latérale (R=0-10)

Figure I. 9 : Squelette des stéroïdes

Habituellement, les carbones C10, C13 sont liés à un groupe méthyle et le carbone C17 à un groupe alkyle. Par extension, les stéroïdes incluent également les lipides dont le noyau cyclopentanophénanthrénique a été modifié par scission d'une liaison et l'ajout ou la suppression d'un atome de carbone.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

III.3.5. Les stérols et les phytostérols

Les stérols sont des stéroïdes comprenant au moins un groupement hydroxyle, dans la plupart des cas sur le carbone. Leur structure est très semblable à celle du cholestérol ou ces homologues. Selon l'origine biologique, on peut classer les stérols en quatre groupes, les stérols animaux, stérols végétaux (Phytostérols), stérols des champignons inférieurs (Mycostérols) et les stérols des algues.

Les phytostérols se distinguent des autres stérols par une modification dans la chaîne latérale, cette dernière peut comporter un groupement méthyle ou éthyle fixé sur le carbone C 24 et parfois, on note la présence d'une double liaison supplémentaire en C 22 [27]. La structure des stérols végétaux (phytostérols) est apparentée à celle du cholestérol et ils jouent dans les membranes végétales le même rôle que le cholestérol dans les membranes animales. Les principaux phytostérols d'origine végétale comprennent le β -sitostérol, le campestérol et le stigmastérol (**Figure I.10**).

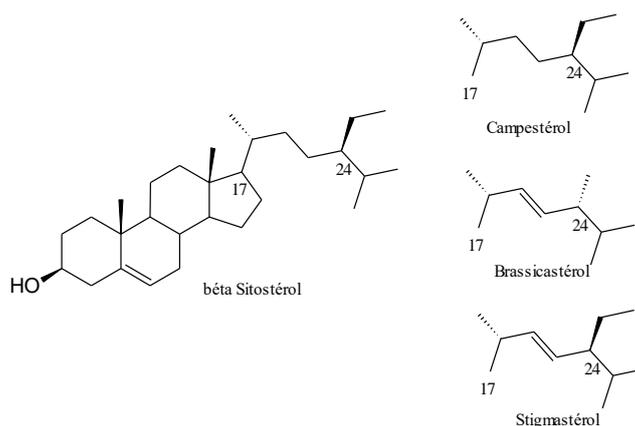


Figure I. 10: Structures des principaux phytostérols d'origine végétale

Les phytostérols sont des composés présents uniquement dans la fraction lipidique des végétaux sous forme libre ou plus couramment sous forme estérifiée avec des acides gras. Les phytostérols ne peuvent être synthétisés ni par les animaux ni par l'homme: seule l'alimentation permet leur apport [28]. Néanmoins, il faut noter que les végétaux contiennent de faibles quantités de phytostérols. En raison de leur rareté, très peu d'études se sont intéressées au recensement des végétaux riches en phytostérols [27,29]. Ainsi, les rares études effectuées sur les produits alimentaires montrent que les meilleures sources de phytostérols sont les huiles végétales de même que les produits élaborés à base d'huiles végétales tels que les margarines [29]. En effet, la majorité des huiles végétales contiennent entre 100 et 500 mg

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

de phytostérols pour 100 g d'huile [29]. Parmi les huiles commercialisées, les huiles de riz et de sésame sont exceptionnellement riches en phytostérols (respectivement 1745 mg /100 g et 1735 mg/ 100 g).

Les phytostérols (β -sitostérol, campestérol et stigmastérol), constituants des membranes cellulaires végétales et analogues au cholestérol animal, peuvent inhiber l'absorption intestinale du cholestérol, réduisant ainsi le taux plasmatique de cholestérol total et LDL [30].

IV. Classification des huiles végétales

Les graisses et huiles animales sont divisées en huiles d'animaux marins et huiles d'animaux terrestres. Pour ce qui est des matières d'origine végétale, les modes de classement utilisés se divisent en deux grandes catégories :

IV.1. La classification botanique

Les matières grasses sont regroupées par familles de plantes avec, comme exemples les Graminées (maïs, riz, blé), les Palmiers (cocotiers), les Malvacées (arachide, soja) et les Composés (carthames, tournesol) [31].

IV.2. Classification basée sur les critères chimiques

Les indices chimiques, devenus critères et caractéristiques commerciaux, ont conduit à des classifications techniques fondées sur les propriétés chimiques des acides gras. Ce modèle de classement permet de regrouper les huiles végétales en trois grands groupes

- **Les huiles siccatives**

L'indice d'iode compris entre 150 et 200. Ces huiles donnent une mince pellicule élastique au séchage à l'air (huile de lin, huile de noix).

- **Les huiles semi-siccatives**

Leur indice d'iode est compris entre 100 et 150 (huile de coton, huile de soja, huile de colza, huile de sésame, huile de pépin de raisin). Elles sont riches en acides gras insaturés.

- **Les huiles non siccatives** Leur indice d'iode est inférieur à 100 (huile d'olive, huile de palmiste, huile de palme, huile de raisin, huile de coco, beurre de cacao). Elles ont la particularité d'être riches en acides gras saturés.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

V. Utilisation des huiles végétales

Les huiles végétales occupent une place importante dans le monde : les trois quarts de la production sont destinés à l'alimentation, le reste se partage entre les applications industrielles, pharmaceutiques et cosmétiques.

V.1. Huiles alimentaires

Dans l'alimentation, certaines huiles végétales apportent à l'organisme des vitamines liposolubles et des acides gras essentiels. Contrairement aux corps gras animaux, les huiles végétales contiennent de teneurs élevées en acides gras saturés, ce qui limite avantageusement le taux du cholestérol sanguin, spécialement chez les personnes qui souffrent d'une hypercholestérolémie génétique.

V.1.1. Définition de la qualité d'une huile alimentaire

De manière générale, la qualité est définie comme étant « la combinaison des attributs ou des caractéristiques d'un produit qui ont une signification en déterminant le degré d'acceptabilité de ce produit par l'utilisateur» [32]. Les huiles végétales alimentaires peuvent être différenciées suivant leur procédé d'obtention et leur degré de raffinage. On distingue ainsi :

Les huiles vierges : elles sont obtenues par pressage combiné éventuellement à un chauffage externe et dont le raffinage est limité à des procédés physiques (décantation, filtration et centrifugation).

Les huiles obtenues par pressage à froid : elles se différencient des huiles vierges uniquement par l'absence de chauffage pendant le procédé d'extraction mécanique.

Les huiles raffinées : Après extraction par un procédé mécanique ou par solvants, l'huile subit un ensemble d'opérations visant à en éliminer les composés indésirables, pour produire une huile correspondant à un cahier des charges.

La qualité des huiles alimentaires est déterminée par leurs propriétés physiques, nutritionnelles, organoleptiques et sensorielles. Cependant, un des principaux aspects qualitatifs d'une huile s'attache à sa composition ainsi qu'à sa stabilité vis-à-vis de l'oxydation. L'oxydation entraîne l'apparition d'odeurs et composés indésirables rendant l'huile impropre à la consommation [33].

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

V.1.2. Critères de contrôle de la qualité d'une huile

Les critères de contrôle de la qualité d'une huile, en termes de composition, incluent le profil en acides gras, la teneur en composés antioxydants (type tocophérols et polyphénols) ainsi que les marqueurs d'altération de l'huile. Les indicateurs fréquemment utilisés pour l'évaluation des altérations de l'huile sont les suivants [34]:

Indice de réfraction

L'indice de réfraction est particulièrement utile car il renseigne sur l'état de dégradation d'une huile. En effet, la présence d'acides gras libres abaisse fortement l'indice de réfraction.

Indice d'acide

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour neutraliser les acides gras libres présents dans un gramme de corps gras [35]. Cet indice permet de mesurer la quantité d'acides gras libres résultant des réactions d'hydrolyse et d'oxydation des triglycérides [36]. Les huiles destinées à la consommation doivent contenir moins de 1% d'acides libres [37]. Le Codex Alimentarius (1999) fixe la valeur de l'indice acide à un maximum de 4 mg KOH/g d'huile pour les huiles vierges et pressées à froid.

Indice peroxyde

L'indice de peroxyde est le nombre de microgrammes d'oxygène actif pour un gramme de matière grasse [35]. Il permet d'apprécier le degré d'oxydation d'une huile. Cet indice permet de suivre l'état de conservation d'une huile ou état d'avancement de l'oxydation [38, 39]. Le Codex Alimentarius (1999) fixe la valeur de l'indice peroxyde à un maximum de 15 méq O₂/kg d'huile pour les huiles vierges et pressées à froid.

Indice d'iode

L'indice d'iode est le nombre de grammes d'iode fixé sur les doubles liaisons de 100 grammes de matières grasses. Il exprime le degré d'insaturation d'un corps gras et ensuite sa prédisposition à l'oxydation [38]. Un corps gras est plus sensible à l'oxygène lorsqu'il est constitué d'un nombre élevé de doubles liaisons.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Masse volumique

La masse volumique d'une huile (ou « densité »), désigne le quotient de la masse de l'huile par son volume. Elle s'exprime en g par ml. Sa mesure est intéressante, à titre indicatif sur le plan commercial, dans la mesure où elle permet de se représenter en poids un volume d'huile transportée en vrac.

V.2. Applications non-alimentaires des huiles végétales

Compte tenu des tendances liées au développement durable et aux législations environnementales (Décret n°2007-446,2007 ; Directives européennes 2003/30/EC), le développement de l'utilisation des produits de l'oléochimie dans différents domaines tels que l'industrie, la cosmétique, les détergents, polymères, biolubrifiants, biocarburants ou pharmaceutique, s'impose. Issus pour la plupart de la biomasse, ces produits s'inscrivent dans la progression et le développement de la chimie verte [40].

L'enrichissement des huiles végétales en triglycérides permet d'obtenir, après hydrolyse ou transestérification, des acides (esters) gras saturés ou des acides (esters) gras insaturés, principalement les acides oléique, linoléique et α -linoléique. Ces acides (ou esters) gras qui disposent d'un groupement acide (ou ester) et d'une ou plusieurs doubles liaisons ont un grand intérêt dans plusieurs domaines industriels parce qu'ils peuvent être exploités pour accéder à divers composés.

V.2.2. Dans la fabrication du savon

La première application industrielle des corps gras est la fabrication du savon. En effet, la fabrication ancienne en cuves par des « maîtres savonniers » a cédé la place à un procédé continu. Actuellement, les savons traditionnels sont préférés aux détergents pétrochimiques tels que les alkylbenzènesulfonates de sodium à longues chaînes non ramifiées (10 à 14 atomes de carbone) en raison de leur biodégradabilité. En pharmacie et en cosmétique, les huiles végétales sont utilisées comme excipients ou comme source de substances actives (amande douce, noisette, avocat, karité...)

V.2.2. Les pesticides

Dans le domaine des pesticides, les esters de méthyle et les hydrocarbures d'origine minérale qui ont une viscosité et une tension de surface comparables à l'acide oléique avaient été décrits comme de bons agents de transport de pesticides à la surface des plantes [41].

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Knowles a montré que les huiles végétales à base de soja, de coton, de lin ou de tournesol adhèrent sur les feuilles des plantes ou sur des insectes après de grandes pluies [42]. Ceci s'explique par leur richesse en acides gras polyinsaturés. La production d'huiles végétales riches en ces acides est actuellement préconisée pour être utilisée comme adjuvant de l'aspersion des phytosanitaires dans la formulation de pesticides.

V.2.3. Dans les produits de revêtement

Deux huiles, l'huile de lin et l'huile de ricin, sont principalement utilisées dans le domaine des produits de revêtements. L'huile de lin est dite siccative, ce qui explique son emploi dans l'industrie des peintures et vernis. Cette propriété est due à la présence des acides linoléique et linoléinique.

V.2.4. Dans le domaine des lubrifiants

Le marché des lubrifiants est en plein essor et la consommation mondiale s'élève à 9 millions de tonnes. Les industries automobiles en sont les principaux utilisateurs. Ces industries se tournent considérablement vers des additifs de lubrifiants d'origine végétale pour leur nature moins nocive pour l'environnement et aussi pour leurs propriétés physico-chimiques prometteuses [43]. Les huiles végétales sont utilisées comme additifs des lubrifiants pour leur bonne viscosité, leur stabilité à l'oxydation et leur faible inflammabilité à température élevée. Elles sont également utilisées comme fluides hydrauliques (machine de fermes, les industries minières, ferroviaires et militaires) [44].

Cependant, leur faible stabilité à l'oxydation est un facteur limitant leur utilisation. Les chercheurs s'intéressent actuellement à des voies chimiques pour améliorer ces propriétés, en modifiant la structure des huiles végétales. De nouveaux additifs efficaces ont été obtenus après époxydation des huiles végétales et ouverture de cet époxyde par des acides carboxyliques ou des alcools en présence de catalyseurs acides [45, 46]. De nombreux autres domaines font appel aux corps gras et à leurs dérivés car ce sont des produits respectant non seulement l'environnement mais s'insèrent également dans une économie durable.

VI. Productions mondiale des graines et huiles végétales

Depuis 1973, la production mondiale des graines oléagineuses a progressé régulièrement, la récolte mondiale des 10 principales graines oléagineuses a représenté environ 400 millions de tonnes en 2007/2008, dont 224 millions de tonnes pour le soja (56%), 52 millions pour le

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

colza (13%), 44 millions pour les graines de coton (11%) et 32 millions pour celle de tournesol (8%). En dehors de l'arachide (24 millions de tonnes), aucune des autres cultures oléagineuses ne dépasse la barre des 6 millions de tonnes [47].

Selon l'USDA, une estimation de la production mondiale des graines oléagineuses pour l'année 2013/2014 est d'un total de 504.30 million de tonnes (Mt), soit une augmentation de 6.46% par rapport à l'année 2012/2013 (**Tableau I. 2**).

Tableau I. 2 : Production mondiale de graines oléagineuse [48]

Mt	2012/2013	2013/2014	Evolution
Soja	267.47	285.43	+ 6.71%
Colza	63.02	70.47	+11.82%
Coton	46.07	44.07	-4.33%
Tournesol	36.39	43.33	+19.07%
Arachide	40.11	39.83	-0.69%
Palmiste	14.85	15.48	+4.26%
Copra	5.80	5.68	-2.14%
Total monde	473.72	504.30	+6.46%

De même, la production mondiale d'huiles végétales a connu un développement extrêmement rapide dans le monde au cours des 20 dernières années. Une progression de plus 270 millions de tonnes depuis 1973 a été observée. Un rapport de PROLEA 2008 relate une nouvelle répartition de la production mondiale d'huiles végétales. Elle a plus que doublé depuis 1986, et atteint 130 Mt en 2007. Sur le marché des huiles, l'huile de soja a longtemps été prépondérante, mais elle partage depuis 2004 la première place avec l'huile de palme (environ 30 % du marché chacun). L'USDA a estimé une production mondiale des huiles végétales au cours de l'année 2012/2013 de 157.76 Mt, soit une augmentation 10.12 Mt par rapport à l'année 2010/11(**Tableau I. 3**)

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Tableau I.3: Production mondiale des principales huiles végétales [49] :

Mt	2010/11	2011/12	2011/13
Huile le palme	47,92	50,70	53,83
Huile de soja	41,29	42,40	43,18
Huile de tournesol	12,29	15,08	13,75
Huile de colza	23,51	24,29	23,80

VII. Production algérienne des huiles végétales [50].

La production de graines oléagineuses en Algérie n'a jamais été importante en raison des conditions climatiques et de la présence accordée à la production de céréales, avec jachère. Comme conséquence, le colza, l'arachide et le tournesol, qui sont les seules graines oléagineuses cultivées, restent cantonnées à quelques milliers de tonnes depuis des décennies. Le colza a été introduit à la fin des années 1970. Sa production est montée à 90 000 t en 1989, puis a fléchi à 30 000 t dans les années 2000-2007 pour atteindre 46 500 t en 2012. L'arachide est à 2800 t et le tournesol, qui a connu un pic de production à 1800 t au milieu des années 1970, a disparu.

En 2012, on recensait 17 000 ha de colza et 2300 ha d'arachides, ce qui donne des rendements de 27.4q/ha en colza et de 12.1q/ha en arachides, niveaux que l'on peut considérer comme tout à fait corrects en zone méditerranéenne, et qui ont sensiblement progressé dans les 20 dernières années.

En 2009, la consommation d'huiles végétales s'établissait à un peu plus de 12kg/personne en Algérie (contre 17kg en Tunisie et 12 au Maroc). L'huile d'olive, produit traditionnel, ne représente que 13% de cette consommation. Elle est largement supplantée aujourd'hui par l'huile de soja (49%), de tournesol (13%), de colza (7%) et d'arachide (5%). Les importations de graines oléagineuses, huiles et tourteaux pour l'alimentation animale ont approché 1.4 milliard de dollars en 2011, dont 61% pour les huiles et 36% pour les tourteaux (facteur multiplicatif de 6 pour les deux produits par rapport à 2000). L'huile et les tourteaux de soja dépassent le milliard de dollars soit les $\frac{3}{4}$ des importations totales d'oléagineux et dérivés.

L'Ukraine est le premier fournisseur d'huiles végétales brutes de l'Algérie (25% en 2012), suivie de l'Allemagne (17%), du Brésil (17%), de l'Espagne (14%) et de l'Indonésie (6%). Les oléagineux et dérivés constituent le 3^e poste des importations agricoles et alimentaires en Algérie, derrière les céréales (4.2 milliard) et les produits laitiers (1.5 milliard).

Partie II : Méthodes d'extraction des corps gras

I. Introduction

Habituellement, on utilise trois procédés pour extraire l'huile à partir des graines oléagineuses, à savoir la pression unique ou double, l'extraction directe par solvants et le procédé mixte, couplant le pressage à une extraction par solvant sur le tourteau [51].

La préparation des graines comprend plusieurs étapes [52]. Afin de faciliter l'extraction de l'huile, les graines peuvent subir différents prétraitements afin de les préparer à l'opération de séparation liquide-solide. Ceux-ci peuvent être de nature physique, thermique ou visent à modifier l'humidité de la matière première. Elles sont préalablement nettoyées et éventuellement séchées (lorsque les graines ont une humidité supérieure à 10%). Les prétraitements les plus fréquemment utilisés avant pressage sont la cuisson, le floconnage ou l'aplatissement des graines. Un dé-pelliculage est parfois utilisé (plus particulièrement pour les graines de tournesol ou soja), soit pour faciliter le pressage [51] ou dans une optique nutritionnelle par exemple, pour l'amélioration de la digestibilité des tourteaux [53].

II. Le pressage.

Le pressage se définit comme le procédé physique permettant l'exsudation de l'huile d'une matière poreuse sous l'effet d'une force de compression [54]. Industriellement, les presses à vis sont utilisées pour permettre un traitement en continu des graines. Ce type de presse est composé d'une vis sans fin, tournant dans un fourreau présentant des barreaux ou perforations (suivant les modèles de presses) pour permettre la sortie de l'huile. Une restriction, nommée filière ou cône obturateur, située à l'extrémité de la vis (ou zone de décharge), permet de générer une pression suffisante pour exsuder l'huile contenue dans les graines [51].

Le pressage est réalisé à froid ou à chaud. Dans le cas où le pressage est réalisé à froid, sans chauffage externe, la température de l'huile extraite peut atteindre jusqu'à 112°C [55]. La température générée durant le pressage provient de la dissipation de chaleur engendrée par les forces de friction mises en œuvre dans la presse [56]. Le pressage peut également être assuré en discontinu par pressage hydraulique ; cependant ce mode de pressage est limité à un certain type d'oléagineux (olives, cacao) [51]. A l'issue de l'étape de pressage, le tourteau obtenu est qualifié de « gras », sa teneur en huile résiduelle étant de l'ordre de 10 à 20% [53].

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

L'huile brute de pressage contient des particules nommées fines ou pieds de presse (particules co-extraites lors du pressage). Ces solides sont séparés de l'huile en deux étapes. La séparation des plus grosses particules est réalisée par sédimentation dans un « *screening tank* ». L'huile de première pression obtenue est ensuite filtrée ou clarifiée dans un décanteur pour éliminer les particules résiduelles plus fines [51]. Les pieds de presses sont récupérés et ajoutés au tourteau gras pour être pressés à nouveau afin de récupérer l'huile résiduelle. A l'issue de ce second pressage, l'huile brute obtenue est qualifiée de seconde pression.

Plusieurs voies de valorisation des tourteaux sont possibles. D'une part, l'huile contenue dans les tourteaux gras peut-être extraite par des solvants organiques, afin d'optimiser le rendement global d'extraction d'huile. D'autre part, les tourteaux conservent des avantages nutritionnels, de par leur teneur en protéines et profil en acides gras de l'huile, ce qui les rend intéressants pour l'alimentation animale. Si l'huile de première pression peut-être vendue en tant que telle, les huiles de seconde pression et extraites par solvant doivent être raffinées. En effet, des composés liposolubles indésirables (phospholipides, métaux...) sont co-extraits avec l'huile.

Parmi les étapes de raffinage, la neutralisation chimique (visant principalement à l'élimination des acides gras libres) est l'opération générant le plus de sous-produits (pâtes de neutralisation, effluents aqueux) dont le retraitement est coûteux. Le raffinage physique est alors une alternative au traitement chimique [57]. Cependant les conditions drastiques de ce traitement ne conviennent pas pour les huiles présentant une instabilité thermique.

III.Extraction par solvant organique (Soxhlet)

L'extraction par soxhlet a été employée depuis longtemps ; il s'agit d'une technique standard ainsi que la référence principale pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide. La conception de cette technique d'extraction a été mise au point pour la première fois par Franz von Soxhlet en 1879 pour la détermination de la teneur lipidique du lait [58, 59].

L'extraction par Soxhlet est une technique générale et bien établie : elle dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction, excepté dans le cas de l'extraction des composés thermolabiles [59]. Un système conventionnel de Soxhlet est montré dans la **figure I.11**.

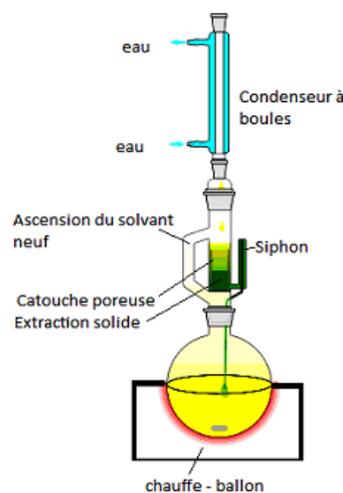


Figure I.11 : Extraction par soxhlet

L'extraction par Soxhlet dépend fortement des caractéristiques de la matrice solide et de la dimension des particules, car la diffusion interne est souvent l'étape limitant pendant l'extraction. Les avantages de l'extraction par Soxhlet incluent :

- Le déplacement de l'équilibre de transfert en mettant à plusieurs reprises le solvant frais en contact avec la matrice solide
- Le maintien d'une température relativement élevée d'extraction avec la chaleur du ballon à distiller.
- Aucune nécessité de filtration après l'extraction. En outre, la méthode de Soxhlet est très simple et bon marché.

Cependant, cette méthode présente des inconvénients :

- Le temps d'extraction est long.
- Il est impossible d'accélérer le processus par agitation,
- La grande quantité de solvant utilisée exige une étape d'évaporation/ concentration
- La possibilité de dégradation thermique des composés cibles ne peut pas être ignorée vu que l'extraction s'opère habituellement au point d'ébullition du solvant pendant un temps assez long.

L'extraction de l'huile par solvants est le procédé le plus utilisé, après l'extraction par pressage. Actuellement, l'hexane est le solvant d'extraction préférentiellement utilisé,

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

cependant l'inflammabilité de ce composé, sa toxicité et son prix indexé à celui du pétrole sont des inconvénients majeurs [60]. Le potentiel d'extraction d'huile par des solvants alternatifs tels que l'éthanol [61], l'isopropanol [62], l'iso-hexane [63] et l'heptane [64] a été étudié au cours des vingt dernières années. Afin de contourner les soucis environnementaux et techniques liées à l'extraction par l'hexane, plusieurs procédés alternatifs pour l'extraction d'huile végétale ont été étudiés.

IV. Extraction par voie enzymatique

L'applicabilité de l'extraction par voie enzymatique à l'extraction d'huile à partir de différentes matrices oléagineuses a été démontrée [65]. On peut citer à titre d'exemple l'extraction d'huile par voie enzymatique à partir de noix de coco [66], d'avocat [67], de cacahuète [68] et de tournesol [69]. Cependant, ce procédé d'extraction n'a pas fait l'objet de réels développements à l'échelle industrielle. Les raisons avancées par [65] sont d'une part d'ordre financier. Le procédé global d'extraction est coûteux et les cocktails enzymatiques restent chers, bien que produits industriellement. De plus, l'extraction par voie enzymatique ayant lieu en milieu aqueux, la séparation liquide-liquide (eau-huile) est un facteur à prendre en compte pour l'évaluation globale du procédé. D'autre part, l'acceptabilité des enzymes est variable, de par leur origine (parfois porcine).

V. Extraction par CO₂ supercritique

Cependant, le CO₂ supercritique est le solvant ayant fait l'objet de recherches intensives ces vingt dernières années car le produit final ne contient aucun solvant résiduel [70]. L'existence d'un état supercritique a été rapportée en 1822 par le Baron Cagniard de la Tour [71]. Celui-ci constata la disparition de la frontière gaz-liquide de certaines substances chauffées en milieu fermé. En 1879, la capacité des fluides supercritiques à solvater des solides fut mise en évidence par [72].

V.1. Définition et propriétés d'un fluide supercritique

Le diagramme de phase pression-température (P,T) d'un corps pur présente les différents états de la matière (solide, liquide et gazeux) en fonction de la pression et de la température (**figure I.12**). Les domaines de ces trois états sont délimités par les courbes d'équilibre (solide-gazeux, solide-liquide et liquide-gazeux).

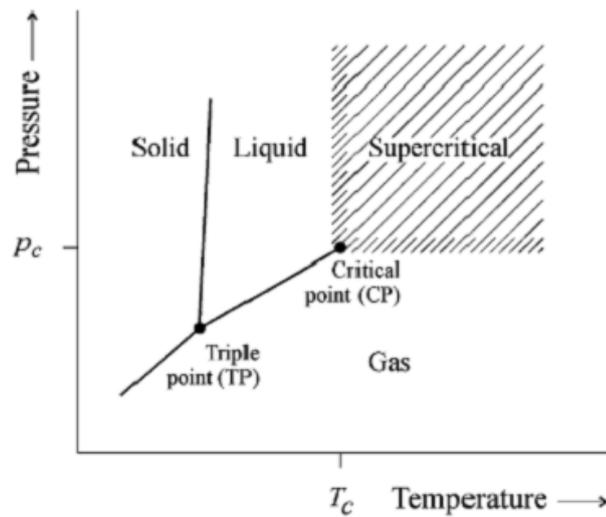


Figure I.12 : Diagramme de phase d'un corps pur

En effet, tout corps pur possède un point critique correspondant à une pression et une température données. Un fluide est dit à l'état supercritique lorsqu'il est chauffé au-delà de sa température critique et lorsqu'il est comprimé au-dessus de sa pression critique. Le comportement d'un fluide supercritique est intermédiaire entre celui de l'état liquide et l'état gazeux. En particulier, il possède une masse volumique élevée comme celle des liquides, un coefficient de diffusivité intermédiaire entre celui des liquides et des gaz, et une viscosité faible comme celle des gaz.

Le **tableau I.4** présente les paramètres critiques (pression et température) pour certains fluides tels que le chlorotrifluorométhane, l'éthane, l'eau ou le CO_2 qui sont les plus étudiés et dont le coût constitue un facteur clé qui guide un choix particulier. Cependant les plus utilisés expérimentalement sont le CO_2 et l'eau. Toutefois cette dernière pose des problèmes quant à son utilisation sous conditions supercritiques du fait que ses coordonnées réduisent son accessibilité expérimentale et son caractère corrosif qui impose un appareillage adapté assez coûteux .

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Tableau I. 4: Paramètres critiques de quelques fluides à l'état supercritique [73].

Fluide	Pression (atm)	Température (°C)	Masse volumique ρ_c (kg/m ³)
CO ₂	73,8	31,1	468
Ethane	48,8	32,2	203
Ethylène	50,4	9,3	200
Propane	42,5	96,7	220
Propylène	46,2	91,9	230
Benzène	48,9	289	302
Toluène	41,1	318,6	290
Chlorotrifluorométhane	39,2	28,9	580
Trichlorofluorométhane	44,1	196,6	554
Protoxyde d'azote	71,0	36,5	457
Ammoniac	112,8	132,5	240
Eau	220,5	374,2	272

V.2. CO₂ supercritique

L'état supercritique du CO₂ a été étudié à la fin des années 1970 et il a été observé expérimentalement pour la première fois en le soumettant à 31,1°C et 74 bars. On distingue les zones où la substance existe sous forme de solide, de liquide ou de vapeur. Les courbes représentent la zone de coexistence entre deux phases gazeux et liquide. Au point triple (-56,4 °C; 5,2 bar) les trois phases coexistent. Si on augmente la température et la pression à partir du point triple, on se déplace vers le haut sur la courbe liquide-vapeur. Le liquide devient moins dense à cause de l'expansion thermique et la vapeur devient plus dense à cause de l'augmentation de la pression. Finalement, au point critique, les masses volumiques des deux phases deviennent identiques et on ne distingue plus la vapeur du liquide. Au-delà de ce point, la substance existe sous forme d'une seule phase, le fluide supercritique.

V.3. Propriétés physico-chimique du CO₂ supercritique

Le dioxyde de carbone supercritique présente des propriétés physico-chimiques intermédiaires entre celles de la phase liquide et celles de la phase gazeuse. Ses propriétés dans les différents états sont rassemblées dans le Tableau I. 5.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Tableau I.5 : Propriétés physiques du CO₂ à l'état gaz, supercritique et liquide [74].

Propriétés	Masse volumique ρ (kg/m ³)	Diffusivité D (m ² /s)	Viscosité $\dot{\eta}$ (Pa.s)
Gaz (30°C et 1 atm)	0,6 à 2	(1 à 4) 10 ⁻⁵	1 à 3. 10 ⁻⁵
CO ₂ supercritique (31.1 °C et 73.8 atm)	200 à 500	0,7. 10 ⁻⁷	1 à 3. 10 ⁻⁵
Liquide (30°C et 1atm)	600 à 1600	(0,2 à 2) 10 ⁻⁹	0,2 à 3. 10 ⁻³

Les fluides supercritiques présentent une particularité du point de vue de l'importante variabilité de leurs propriétés autour du point critique comme la masse volumique, la densité, la solubilité, la viscosité et le facteur de compressibilité, qui sont très sensibles aux variations de pression et de température.

V.3.1. La masse volumique

Les fluides supercritiques ont une densité se rapprochant de celle des liquides, qui varie très sensiblement autour du point critique PC (et pour $P > PC$) pour de faibles variations de la pression et de la température (Figure I.13) : on les qualifie ainsi de fluides « à géométrie variable ». En outre, les valeurs élevées de masses volumiques leur confèrent un bon pouvoir solvant.

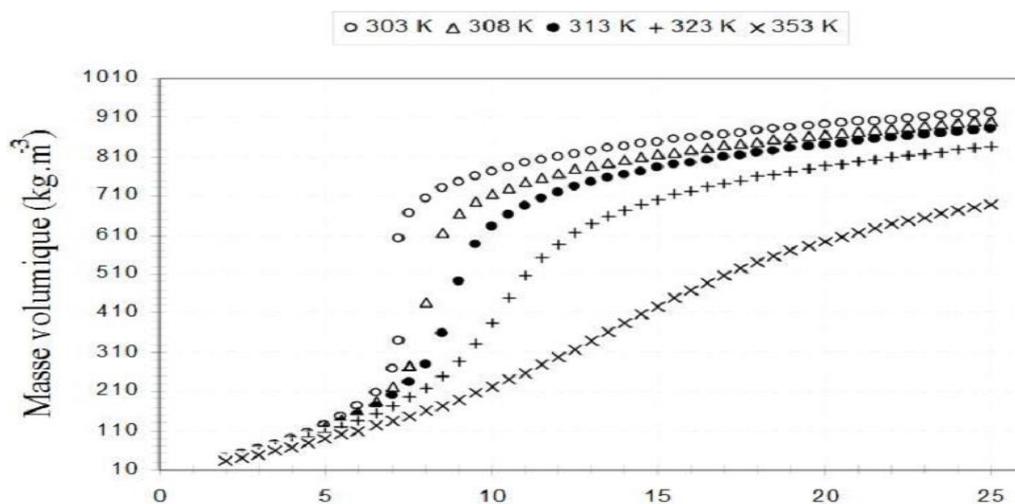


Figure I.13. : Evolution de la masse volumique du CO₂ en fonction de la pression à différentes températures

V.3.2. La viscosité

La viscosité des fluides supercritiques est supérieure à celle des gaz, plus faible que celle des liquides et très variable au voisinage du point critique (Tableau II. 4). Une faible valeur de viscosité permet de favoriser le transfert de matière grâce à une meilleure pénétration dans le solide, permettant de réduire l'apport énergétique pour déplacer le fluide [75]. La **Figure I. 14** montre l'évolution de la viscosité en fonction des paramètres P et T. Cette Figure montre qu'à température constante, une augmentation de la masse volumique avec la pression entraîne un accroissement de la viscosité. Par contre, à pression constante, une augmentation de la température fait décroître la masse volumique du milieu, ce qui provoque une diminution de la viscosité.

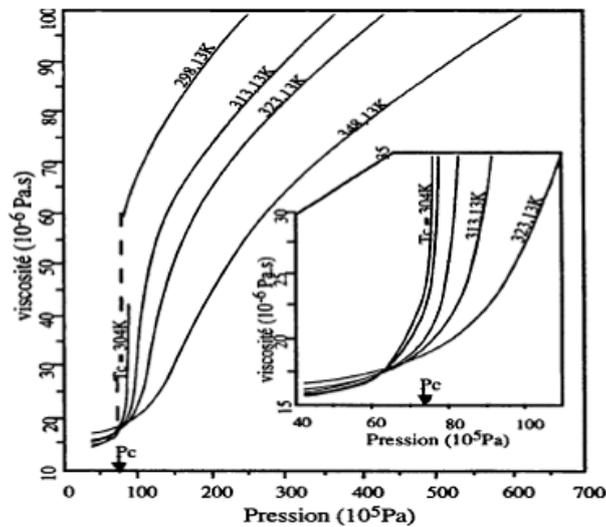


Figure I. 14 : Evolution de la viscosité du CO₂ en fonction de la pression et de la température.

V.3.3. La diffusivité

Le transfert de matière dépend également d'une autre propriété à savoir, la diffusivité. Elle augmente avec la température mais diminue pour une élévation de pression, entraînant ainsi une augmentation de la densité qui limite le transfert de matière. Par ailleurs, en raison de leur faible viscosité et de leur diffusivité plus élevée que celles des liquides, les fluides supercritiques présentent un gros intérêt pour des applications telles que l'extraction, le traitement des solides, les synthèses organiques et la chromatographie.

V.3.4. Le pouvoir solvant

Le pouvoir solvant du CO₂ supercritique dépend exponentiellement de sa masse volumique [76]. Dans le domaine supercritique, la densité des molécules est voisine de celle du liquide,

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

favorisant ainsi les interactions intermoléculaires. Cela confère à cet état un certain pouvoir solvant vis-à-vis de solutés normalement à l'état liquide ou solide dans ces conditions de pression et de température. Le pouvoir solvant dépend également de la nature chimique du soluté, caractérisée par la polarité, l'acidité, la volatilité et d'autres propriétés physico-chimiques.

La polarité du CO₂ supercritique varie entre celle d'un alcane et celle de la pyridine. Par conséquent, le pouvoir solvant est limité aux composés apolaires ou peu polaires. Il est toutefois possible de remédier à cet inconvénient en ajoutant un co-solvant (modificateur ou entraîneur) en faibles quantités (5 à 15%) [73, 77].

V.4. Cinétique d'extraction solide-fluide supercritique

Dans la plupart des cas, la matière première se présente sous forme solide. La cinétique d'extraction dépend des conditions opératoires (pression, température, débit du fluide), de la nature et de la granulométrie du produit à traiter. La Figure I. 15 présente la forme générale de la cinétique d'extraction par fluide supercritique (rendement en extrait en fonction du temps). La courbe présente généralement une partie linéaire en début d'extraction, correspondant à l'extraction de la partie du soluté facilement accessible ; cette étape correspond à la phase pendant laquelle la concentration d'extrait dans le CO₂ est constante et égale à sa solubilité (g d'huile/g de CO₂). La pente de cette droite correspond donc à la solubilité de l'extrait et ne dépend que des conditions opératoires (température et pression). La région non linéaire de la courbe représente l'étape où le processus d'extraction est surtout limité par la diffusion interne, et la dernière partie sous forme d'un plateau correspond à l'épuisement de la plante et à la fin de l'extraction.

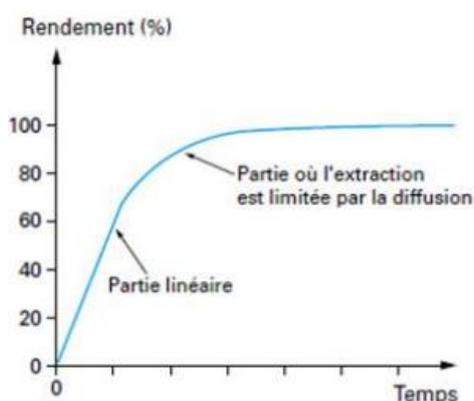


Figure I. 15 : Allure générale des courbes d'extraction par fluide supercritique

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Par conséquent, la majorité des extractions sont complexes et leur efficacité varie en fonction des paramètres thermodynamiques et cinétiques. Ainsi, les substances naturelles, dans certains cas, ne sont pas distribuées de façon homogène dans la plante. En effet, on trouve dans la plante une fraction de solutés facilement accessibles et une fraction non accessible contenue dans les cellules intactes (non endommagées par le pré-broyage) de la plante et dans la plupart des cas, l'extraction est alors limitée par la diffusion [78].

V.5. Choix des conditions opératoire pour l'extraction

Le choix des conditions opératoires pour l'extraction de matrices solides dépend du composé ou du groupe de composés soumis à l'extraction. Il est nécessaire de toujours tenir compte de la masse molaire et de la polarité du constituant à extraire. Toutefois, il faut tenir compte des paramètres suivants :

V.5.1. Influence de la pression

Le paramètre le plus significatif pour le procédé est la pression. Elle peut être utilisée pour ajuster la sélectivité de l'extraction supercritique. La règle générale est la suivante : une pression élevée conduit à une capacité solvant plus élevée mais, en même temps, la sélectivité diminue. Souvent, la capacité solvant aux conditions opératoires données est décrite en fonction de la masse volumique du CO₂, qui dépend de la température et de la pression.

V.5.2. Température

Si l'on extrait des composés thermolabiles, la température doit être maintenue dans la gamme de 35 à 60 °C, c.à.d. supérieure à la pression critique du CO₂ et la plus basse possible afin d'éviter la thermodestruction. Cependant, l'influence de la température sur la solubilité d'une substance dans un solvant supercritique est plus difficile à prédire comparativement à la pression. A pression élevée, le fluide est difficilement compressible et donc la solubilité augmente avec la température suivant ainsi l'augmentation de pression de vapeur du soluté. Par contre, à des pressions intermédiaires proches de la pression critique, le fluide est bien compressible et une faible élévation de la température engendre une forte diminution de la masse volumique et donc la solubilité du composé diminue dans le fluide supercritique. La pression à laquelle s'effectue ce revirement dû l'influence de la température sur la solubilité du composé a été définie comme la pression de croisement (cross-over).

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

V.5.3. Ajout du co-solvant

Lors de l'extraction au CO₂ supercritique, l'augmentation de la polarité du solvant peut être réalisée en ajoutant 5 à 15% de co-solvant polaire [79-82]. Généralement, les co-solvants les plus utilisés sont le méthanol [82, 83], l'éthanol [84,85], l'eau ou des huiles végétales [85]. Ces trois derniers sont non-toxiques et donc plus intéressants.

V.5.4. La granulométrie

La taille des particules joue un rôle déterminant si le procédé est contrôlé par la résistance au transfert de matière interne. Une petite taille de particules diminue la durée de la diffusion du solvant au sein des particules. Cependant, si les particules sont trop petites, des problèmes de passages préférentiels (canalisations) du solvant peuvent apparaître. Dans ce cas, une partie du solvant peut circuler par des canaux formés dans le lit d'extraction sans entrer en contact avec les solutés.

V.5.5. Débit du CO₂

Le débit de CO₂ est un paramètre significatif si le processus est contrôlé par la résistance au transfert de matière externe ou par la solubilité du soluté dans le solvant. Dans ce cas, la vitesse d'extraction est déterminée par la quantité de CO₂ introduite dans l'extracteur.

V.5.6. La matrice solide

La localisation physique de l'huile dans la matrice végétale influence la cinétique et le rendement d'extraction. Pour améliorer l'accessibilité du CO₂ supercritique vis-à-vis de l'huile contenue dans la matrice, l'extraction est systématiquement précédée d'un prétraitement mécanique des graines (broyage ou floconnage). Ces prétraitements ont pour but d'augmenter la surface spécifique de contact entre le CO₂ et l'huile, de libérer les solutés des cellules et de faciliter le passage du CO₂ dans le lit de particules.

V.6. Pouvoir solvant du CO₂ supercritique vis-à-vis des huiles

La solubilité des huiles végétales dans le CO₂ supercritique est fonction de la densité et de la température de ce solvant [89]. Une représentation assez synthétique de l'interaction entre la pression et la température sur la solubilité de substances faiblement volatiles (de type triglycéride) est indiquée sur la figure I. 16 [86].

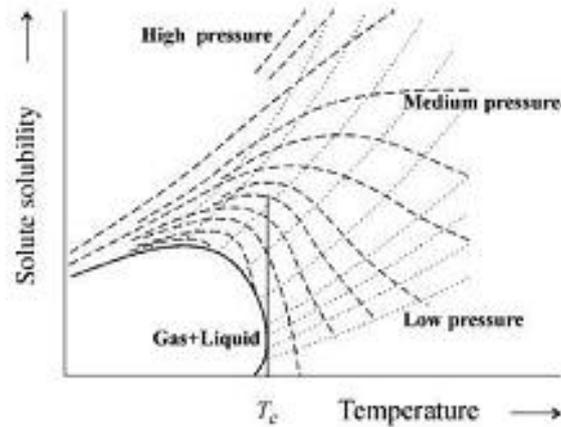


Figure I. 16 : Variation de solubilité d'une substance faiblement volatile (solide ou liquide) dans le CO₂ supercritique.

La figure II. 6 indique que la solubilité du soluté dépend de la pression et de la température du fluide supercritique, ces deux paramètres interagissant de manière non-linéaire sur la solubilité de l'extrait. De plus, la solubilité est directement fonction de la densité du fluide supercritique, et celle-ci est ajustable en modifiant les conditions de pression et température appliquées. Aux pressions de travail supérieures à la pression critique, une augmentation de la pression à température constante a pour effet d'augmenter la densité et donc la solubilité du soluté dans le fluide supercritique [87].

L'effet de la température sur la solubilité des huiles dans le CO₂ supercritique est sous l'influence compétitive de deux phénomènes : lorsque la température augmente, d'une part la tension de vapeur des huiles augmente et d'autre part la densité du fluide supercritique diminue. A la pression critique, la solubilité des huiles diminue lorsque la température augmente, en raison de l'effet prédominant de la densité sur la tension de vapeur du soluté. Au-delà de la pression critique, l'effet de la tension de vapeur est dominant, ce qui a pour effet d'augmenter la solubilité du soluté.

La solubilité passe par un minimum, puis augmente avec la température. Ce changement de solubilité dans le fluide supercritique en fonction de la température est désigné par le terme « pression de croisement ». La solubilité du composé est donc favorisée ou défavorisée par une augmentation de température, selon que la pression est inférieure ou supérieure à la pression de croisement. La sélection des paramètres opératoires (pression et température) dépend de la composition chimique de l'huile à extraire.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Une étude sur l'extraction du romarin pour des pressions allant de 80 à 150 bars et des températures de 35 à 50°C a été menée par Reverchon et Senator [88]. Leurs résultats montrent que les conditions optimales d'extraction de l'huile essentielle sans co-extraction des composés indésirables sont de 100 bars et 40°C. Reverchon *et al* [89] ont étudié l'extraction des huiles volatiles de la concrète de rose. Les résultats ont montré que pour une pression de 100 bars et une température de 40°C une grande quantité de paraffine a été co-extraite avec l'huile essentielle. Ainsi, de basses pressions et températures ont été choisies pour l'extraction de la concrète. Gaspar *et al* [90] ont pu extraire de l'huile essentielle et des produits indésirables tels que les cires, à partir de l'origan pour des pressions allant de 50 à 300 bars et des températures de 27 à 47°C. Aussi à des conditions modérées et des masses volumiques entre 300 et 500 kg/m³, l'extraction de l'huile essentielle est assez efficace.

L'extraction des huiles végétales de poids moléculaires plus élevés que les huiles essentielles, requière des couples pression et températures plus élevés. Il a été démontré que les conditions optimales pour l'extraction de l'huile à partir de graines de lin et de raisin sont comprises entre 35 et 55 MPa pour la pression de 40 bars et 70°C pour la température [91].

V.7. Extraction de composés antioxydants par CO₂ supercritique

V.7.1. Tocophérols

Les molécules apolaires, telles que les tocophérols, peuvent être extraites en utilisant le CO₂ supercritique. De Lucas *et al* [92] ont étudié et montré que l'extraction des tocophérols à partir des feuilles d'oliviers a conduit à une extraction de tocophérols totaux de 7 mg/100g. La quantité de feuilles ne varie pas durant le procédé pour des pressions de 35 à 45 MPa. Les teneurs les plus élevées en tocophérols (9,5 mg/100 de feuilles) étaient obtenues à une pression de 25 MPa.

Martínez *et al* [93] ont mené une étude sur l'extraction de tocophérols de l'huile de noix. Une teneur maximale en tocophérols (820 µg/g d'huile) a été observée pour une température et une pression respectivement de 70°C et 20 MPa. Les autres conditions expérimentales testées, 50°C/20 MPa, 50°C/40 MPa et 70°C/40 MPa, n'indiquent pas de différences significatives au niveau de la teneur en tocophérols obtenus (de 529 à 588 µg/g d'huile).

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

De son côté, Nyam et collaborateurs [94] ont étudié l'optimisation des conditions d'extraction des tocophérols et phytostérols dans l'huile de pépin de melon de Kalahari par la technologie du CO₂ supercritique. Dans ces travaux, la présence de ces substances dans la partie insaponifiable de l'huile était estimée à 274mg /100g d'huile de tocophérol dans les conditions de 29 MPa et 58°C. Par contre, les phytostérols étaient présents dans une concentration de 836,5 mg/100g d'huile obtenue à 30 MPa et 40°C. Selon ces différentes études, il semblerait que les tocophérols aient un maximum de solubilité pour des pressions en CO₂ supercritique relativement faibles. Une augmentation de température, de 30°C à 60°C, semble favoriser la solubilité des tocophérols.

V.7.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont polaires, leur solubilité est faible dans le CO₂ supercritique. Des co-solvants comme le méthanol, ou l'éthanol sont fréquemment ajoutés au CO₂ supercritique pour augmenter leur rendement d'extraction [87]. La solubilité de composés phénoliques de faible poids moléculaire, tels que l'acide protocatéchique, l'acide gallique méthylé et le protocatéchualdéhyde, dans le CO₂ supercritique a été étudiée par Murga *et al* [95]. Les auteurs ont conclu que la solubilité de ces composés était liée à la masse moléculaire des composés ainsi qu'à leur polarité.

L'étude de l'extraction des composés phénoliques seuls est intéressante pour évaluer leur solubilité dans le fluide supercritique. Cependant, les lois d'extraction de ces composés sont différentes lorsqu'ils sont inclus dans une matrice complexe. Pour augmenter la teneur en polyphénols dans l'huile de pépins de raisin, [96] ont utilisé l'éthanol en tant que co-solvant (20%). Les auteurs ont identifié plusieurs flavonoïdes dans les extraits (acide gallique (AG), catéchine (C), épicatechine (EC), épigallocatechine (EGC), épigallocatechine gallate (EGCG)). Une partie de ces molécules est mieux extraite à 50°C qu'à 30°C (AG, EGC et EGC, à des teneurs respectivement de 32,9, 218,8 et 47,1 mg/kg de pépins, tandis que les autres composés sont mieux extraits à 30°C (C et EC, à des teneurs respectivement de 90,3 et 43,1 mg/kg de pépins).

L'effet de la température sur l'extraction des composés phénoliques est controversé. Certains auteurs stipulent que ceux-ci sont dégradés à des températures supérieures à 50°C. D'autres mettent en évidence l'influence positive de la température sur la teneur en polyphénols dans les extraits [97]. Ces auteurs ont étudié l'extraction de polyphénols à partir de feuilles

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

d'olivier, en utilisant le méthanol comme co-solvant. Ils ont montré que pour une pression en CO₂ de 33,4 MPa, une augmentation de la température d'extraction de 80 à 100°C permet l'augmentation de la teneur en polyphénols dans les extraits de 0,12 à 0,51 mg/g. Cet effet peut être expliqué par l'augmentation de solubilité des composés phénoliques due à l'augmentation de température.

L'ajout de co-solvants permet d'améliorer la solubilité des composés phénoliques. Cependant leur utilisation implique l'extraction de composés indésirables (phospholipides) dans le produit final [98]. De plus, le co-solvant est présent dans l'extrait final, et son élimination impose de recourir à des opérations supplémentaires.

En conclusion, la synthèse bibliographique sur l'extraction par CO₂ supercritique a permis de souligner que le rendement d'extraction d'huile peut être optimisé par la sélection de températures et pressions élevées. Cependant la co-extraction des composés antioxydants (polyphénols, tocophérols) n'est pas possible dans les mêmes conditions, à moins d'utiliser des co-solvants.

V.8. Mesure de la solubilité dans le CO₂ supercritique

La connaissance de la solubilité du composé cible dans le solvant ainsi que celle des composés non-désirés dont la co-extraction doit être évitée est une information fondamentale dans le domaine de l'extraction supercritique. En effet, les mesures de solubilité s'avèrent être primordiales pour la détermination des conditions opératoires optimales d'un procédé et pour le développement de modèles thermodynamiques. Il n'existe à ce jour aucun modèle permettant de prédire totalement le comportement d'un mélange lipidique à plusieurs constituants.

Par ailleurs, la revue bibliographique a aussi permis de conclure qu'en dépit du grand nombre de travaux réalisés dans ce domaine, le nombre des techniques de mesure de solubilité des solides dans les solvants supercritiques reste réduit. Généralement, deux grandes catégories peuvent être distinguées: les mesures de solubilité par mode statique et par mode dynamique.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

V.8.1. Mesure de solubilité en mode statique

La mesure de solubilité par la méthode statique repose sur le fait d'avoir les deux composés (solvant/soluté) piégés dans un volume durant tout le temps de mesure. Le principal constituant du dispositif est une cellule transparente supportant les hautes pressions dont le volume est variable et qui peut être thermostatée tout en étant munie d'un système d'agitation. Le point de solubilité d'une quantité donnée du solide à température et pression fixes peut être obtenu de deux manières différentes:

a) méthode visuelle : l'observation du contenu de la cellule, éventuellement grossie, permet de connaître le nombre de phases, et éventuellement de détecter le point de solubilité par variation de la pression tout en maintenant fixe la température.

b) méthode spectroscopique: le point de solubilité est obtenu par le biais d'un spectrophotomètre couplé à la cellule haute pression, où les mesures des absorbances en UV-visible du produit, permet, après stabilité du signal, de détecter le point de solubilité.

V.8.2. Mesure de solubilité en mode dynamique

La mesure de la solubilité en mode dynamique nécessite un équipement à circuit ouvert où le solvant peut circuler durant toute l'expérience. Une installation d'extraction opérant en mode dynamique permet de réaliser principalement les trois parties suivantes:

- La première consiste en la préparation du CO₂ supercritique et comporte une bouteille de CO₂, un échangeur de chaleur et une pompe haute pression.
- La deuxième partie assure le processus de transfert de matière par le biais d'une colonne d'extraction qui assure un bon contact entre le solvant et le soluté.
- La troisième partie concerne la phase de séparation par le biais d'un certain nombre de colonnes, servant à récupérer le produit extrait par le solvant.

V.8.3. Calcul de la solubilité

Le profil de la solubilité du soluté dans le FSC évolue avec la pression et la température. On peut directement accéder à ces paramètres en termes de fugacité, de paramètres de solubilité, de coefficients du viriel et de masse volumique du fluide. C'est cette dernière relation qui a été mise en évidence, et des études menées par plusieurs auteurs ont proposé différentes équations. La plus importante équation est développée par Chrastil 1982 [76], qui a été

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

modifiée par Del Valle Aguilera et Adachi en introduisant d'autres paramètres donnant lieu à deux autres équations [99, 100].

V.8.3.1. Equation de Chrastil

Ce modèle est l'un des premiers modèles de type semi-empirique basé sur la masse volumique à avoir été proposé. Il utilise la théorie selon laquelle à l'équilibre, un complexe de solvation est formé entre les molécules du solvant et celles du soluté (Chrastil (1982)). La théorie de Chrastil a mené au développement d'un modèle qui relie la solubilité du soluté et la masse volumique du solvant pur

$$S = \rho^k \exp\left(b + \frac{a}{T}\right)$$

Où S est la solubilité du soluté en $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$, ρ est la masse volumique du solvant en $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$, b est une fonction du nombre d'association et du poids moléculaire du soluté et du gaz, a est une fonction de l'enthalpie de solvation et de l'enthalpie de vaporisation, et T , la température. La constante d'association k montre la dépendance de la solubilité à la masse volumique et le paramètre b représente la dépendance de la solubilité à la température.

L'expression finale de l'équation de Chrastil montre qu'une élévation de la pression, à température constante, entraîne un accroissement de la masse volumique du fluide, et conduit à une augmentation de la solubilité du soluté. Par contre, l'effet de la variation de température, sur la solubilité reste plus complexe. Il s'accompagne d'une compétition entre deux phénomènes. En effet, l'augmentation de la température à pression constante provoque une baisse de la masse volumique et donc une baisse de la solubilité du soluté. Cet effet est contrebalancé par une augmentation de la pression de vapeur du soluté qui engendre une solubilité plus importante. Par conséquent, l'influence relative des deux phénomènes est difficile à quantifier et elle dépend fortement de la volatilité et de la nature chimique du soluté.

D'après l'équation de Chrastil, un graphique log-log de S en fonction de ρ à température constante devrait produire une droite.

$$I = \frac{a}{T} + b$$

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Cependant, l'équation de Chrastil comporte de nombreuses limitations. Si la solubilité du soluté est très importante (supérieure à 100-200 kg.m⁻³), ou si la plage de température étudiée est trop vaste, l'équation doit être corrigée pour fournir des résultats corrects.

V.8.3.2. Equation de Del Valle-Aguilera

En étudiant la solubilité d'huiles végétales dans le CO₂ supercritique, del Valle et Aguilera ont constaté que lorsque les valeurs de (*I*) obtenues pour une série d'isothermes sont tracées en fonction de 1/T, pour conduire à une droite. La pente de cette droite serait équivalente à (**a**) dans l'équation de Chrastil ; (**a**), comme cela a été mentionné précédemment, est une fonction des enthalpies de solvation et de vaporisation du soluté. Pour mieux prendre en compte la variation de l'enthalpie de vaporisation avec la température, les auteurs proposent la modification suivante à l'équation de Chrastil :

$$S = \rho^k \exp\left(b + \frac{a}{T} + \frac{c}{T^2}\right)$$

V.8.3.3. L'équation d'Adachi et Lu

Adachi et Lu (1983) modifient l'équation de Chrastil pour mieux modéliser la solubilité de triglycérides. Chrastil et del Valle et Aguilera ont considéré le nombre d'association *k* constant et indépendant de la masse volumique ou de la température. Adachi et Lu assimilent le nombre d'association à un polynôme du second ordre de la masse volumique du fluide. L'équation ainsi obtenue est la suivante :

$$S = \rho^{e_0 + e_1\rho + e_2\rho^2} \exp\left(b + \frac{a}{T}\right)$$

Leurs résultats montrent que l'utilisation de cette nouvelle équation permet de réduire significativement les écarts entre les résultats expérimentaux et calculés dans le cas de la solubilité des triglycérides.

V.9. Avantages et inconvénients de l'utilisation du CO₂ supercritique

Le CO₂ supercritique possède plusieurs avantages par rapport aux autres fluides supercritiques, dont les principaux sont les suivants [101]:

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

- ✓ Il est relativement inerte vis-à-vis des composés réactifs, ce qui est un avantage d'un point de vue environnemental et des procédés, dans la mesure où les réactions secondaires avec le CO₂ sont relativement rares.
- ✓ Il ne peut pas être oxydé. Cette impossibilité d'oxydation explique son ininflammabilité.
- ✓ Au-dessus de 31°C, les gaz dont la température critique est basse sont miscibles en toutes proportions avec le CO₂. C'est un avantage important pour la mise en œuvre de procédés chimiques où intervient un contact gaz-liquide.
- ✓ L'extraction aux fluides supercritiques constitue un procédé flexible dans lequel il est possible de contrôler le pouvoir solvant et donc la sélectivité du fluide supercritique en modifiant les conditions de température et de pression.
- ✓ L'extraction supercritique est généralement plus rapide.
- ✓ La température critique est relativement basse (31 °C), ce qui permet d'éviter la thermodestruction éventuelle des composés, de minimiser les risques d'hydrolyse et d'isomérisation des produits [102].
- ✓ Cette méthode permet d'éliminer des manipulations postérieures et coûteuses de purification de l'extrait par élimination des solvants, car il suffit tout simplement de baisser la pression pour éliminer le solvant. On évite aussi l'utilisation d'eau ou de solvants organiques polluants. C'est donc un procédé non-toxique.
- ✓ Le CO₂ est facilement disponible. Il est produit en grande quantité comme sous-produit de la fermentation, la combustion, la synthèse d'ammoniac etc. Il est émis dans l'atmosphère s'il n'est pas utilisé comme fluide supercritique. Ces procédés n'ont pas d'impact négatif supplémentaire en tant que gaz à effet de serre.

Néanmoins, le CO₂ supercritique possède comme inconvénients :

- ✓ Une très faible polarité On est donc souvent amené à travailler sous des pressions très élevées ou alors à accroître le pouvoir solvant par l'ajout d'un co-solvant polaire tel que l'éthanol.
- ✓ L'aspect économique est l'inconvénient majeur de cette technologie, car ces procédés sont considérés comme plus onéreux en investissements par rapport aux procédés d'extraction traditionnels.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

- ✓ Cette technologie exige une consommation d'énergie non-négligeable pour atteindre les pressions et les températures pendant les différentes étapes d'extraction (extraction, séparation et recyclage du solvant).

V.10. Applications industrielles

L'extraction par fluide supercritique constitue le secteur d'application qui prend de plus en plus d'importance par rapports aux techniques conventionnelles pour l'extraction de matrices solides. Parmi les applications industrielles, l'extraction de la caféine des grains de café est la plus connue (Allemagne, Etats-Unis, Italie), extraction du houblon pour la brasserie (Europe), œuf liquide dégraissé (Chine), nettoyage du riz pour élimination de pesticides (Taiwan), Elimination de l'acide trichloracétique des bouchons de liège (Espagne) [103].

Malgré l'abondance des produits qu'il est possible d'obtenir grâce à cette technique notamment l'extraction/isolation des huiles essentielles, l'extraction des huiles végétales, l'extraction des alicament et médicament [104, 105], l'extraction des arômes et parfums [80, 106, 107], l'extraction de principes actifs à partir de plante médicinale, les antioxydants naturels, seule une petite partie est aujourd'hui produite à l'échelle industrielle et la plupart des études portant sur l'extraction supercritique a été réalisée sur des installations à l'échelle laboratoire ou à l'échelle pilote.

Dans le domaine de l'agroalimentaire et pharmaceutique, dont le principal objectif est la production et la purification des produits de qualité naturelle, le CO₂ supercritique peut être considéré comme une des meilleures solutions. Cependant, son marché reste encore limité sans doute par son prix élevé.

Enfin, le développement de la technologie du CO₂ supercritique pour des applications à l'échelle industrielle de l'extraction, la purification et l'isolement de produits dans différents domaines (pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, etc...) est très étudié, mais le coût de son installation reste très élevé.

Partie III : Les Cucurbitacées

I. Généralités sur les Cucurbitacées

Les Cucurbitacées constituent une famille de dicotylédones présentes aussi bien dans les régions tempérées qu'en régions tropicales et subtropicales. Dans les pays tropicaux, les Cucurbitacées revêtent une grande importance économique en raison de la valeur nutritionnelle de leurs fruits et de leur culture aisée. En région tempérée, cette famille est connue particulièrement par ses fruits comestibles parmi lesquels les courges, les citrouilles, les melons, les concombres, les pastèques... ces espèces cultivées côtoient des espèces sauvages envahissantes comme la bryone à fruits toxiques dont les racines sont appelées « navets du diable ». La famille des Cucurbitacées est constituée d'espèces qui sont différentes d'une part, sur le plan botanique et d'autre part, sur leurs compositions chimiques.

II. Description botanique

La botanique, à laquelle incombe la classification des espèces végétales, différencie la famille des Cucurbitacées de la façon suivante:

Embranchement: *Ptéridophytes*

Sous-embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Dicotylédones*

Série : *Gamopétales tétracycliques inférovariées à étamines libre*

Ordre : *Cucurbitales*

Famille : *Cucurbitaceae*

Les Cucurbitacées comprennent environ 90 à 120 genres et 700 espèces. Ce sont généralement des plantes annuelles et prostrées, grimpantes ou rampantes à l'exception de quelques lianes ligneuses (*Ampelocycos*, *Hodgsonia*), d'arbustes épineux (*Acantboscycos*) et d'un arbuste à tronc épais mais mou (*Dendrosycos*) [108].

II.1. Les tiges

Leurs tiges assez grêles, souvent cannelées, peuvent dépasser 10 mètres. Au niveau de chaque nœud, se différencie un « complexe axillaire » se composant d'une ou de plusieurs feuilles, d'une ou plusieurs inflorescences, d'une ramification ou d'une vrille [108,109].



Figure I. 17: Tige d'une Cucurbitacée

II.2. Les vrilles

Les vrilles, simples ou ramifiées, permettent aux tiges de s'accrocher à un support ; certaines ont de petites ventouses adhésives, d'autres se singularisent par l'absence totale de vrilles.

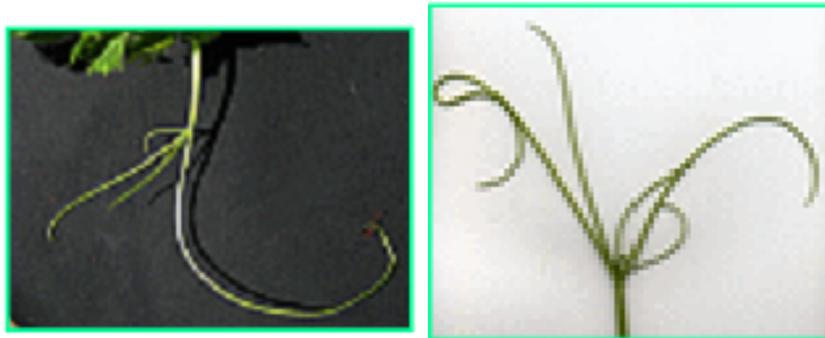


Figure I. 18 : Vrilles d'une Cucurbitacée

II.3. Les feuilles

Les feuilles sont alternes, exstipulées, pétiolées à limbe généralement palmiparti (*Zebneria*, *Luffa*, *Cogniauxia*), plurifoliolées (*Nealsomitra*, *Telfairia*). Des glandes se différencient sur les pétioles (*Lagenaria*), les limbes (*Cayaponia*) ou les bractées (*Telfairia*).



Figure I. 19 : Feuilles des Cucurbitacées

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

II.4. Les fleurs

Les fleurs sont soit solitaires, soit sous forme d'inflorescence de type cimeux. Monoïques ou dioïque, les Cucurbitacées ont des fleurs généralement unisexuées, actinomorphes et pentamères à l'exception du gynécée qui comprend trois carpelles. Le calice est gamosépale, la corolle est souvent gamopétale ; l'androcée est polydelphe c'est-à-dire formé de deux faisceaux, de deux étamines et d'une étamine libre. L'ovaire infère est uniloculaire à placentation primitivement pariétale [108].



Figure I. 20: Fleurs des Cucurbitacées

II.5. Les fruits

Cette famille végétale offre une incroyable diversité de fruits dont la taille varie de celle d'un grain de raisin (*Zehneria*, *Bryonia*), à celle des grosses citrouilles avec une diversité de couleur de leur peau. [108].



Figure I. 21 : Fruits des Cucurbitacées

Cultivées pour leurs fruits ou exclues des potagers à cause de leur toxicité, les Cucurbitacées sont toutes douées de propriétés purgatives. Les Cucurbitacées peuvent se diviser en deux groupes ; les Cucurbitacées alimentaires et celles qui sont toxiques mais douées de propriétés médicinales.

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

III. Les Cucurbitacées alimentaires

Les genres les plus cultivés sont les genres *Cucumis*, *Cucurbita* et *Citrullus*. Plusieurs cultivars issus de manipulations génétiques destinées à améliorer et à mettre en exergue les qualités de chaque fruit sont actuellement cultivées par l'homme. Le genre *Cucumis* et *Cucurbita* font l'objet de notre travail.

III.1. Le genre *Cucurbita*

Le genre *Cucurbita* comprend une douzaine d'espèces désignées couramment sous le terme général de courge. Les espèces sont toutes américaines mais originaires de lieux différents. Elles arrivent en Méditerranée dès la fin du XV^e siècle [111, 112].

Les espèces les plus cultivées de ce genre sont principalement les espèces *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima* ainsi que la *Cucurbita moschata*.

III.1.1. *Cucurbita maxima*

Communément appelé potiron, elle supporte les températures fraîches, d'où sa culture en zone tempérée. Tige cylindrique et molle, le pédoncule est arrondi, d'aspect spongieux sans côtes marquées. Grande feuilles à cinq lobes arrondis. Le potiron se décline sous de multiples formes et couleurs, ce qui fait aussi un élément de décoration. On peut toutefois citer quelques grandes variétés de *Cucurbita maxima* telles que :

Potiron rouge vif d'Etampes : variété creuse et hâtive avec des fruits orangés presque rouges et qui se conserve bien.

Potimarron : c'est une variété qui possède un petit goût caractéristique de châtaigne.



Potimarron



Potiron rouge vif d'Etampes

Figure I. 22 : Deux variétés de *Cucurbita maxima* : Potimarron et potiron rouge vif d'Etampes

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

III.1.2. *Cucurbita moschata*

Communément appelée courge de musquée, elle est largement distribuée, mais on pense qu'elle a été domestiquée au Mexique. Supportant les fortes chaleurs, on la cultive abondamment sous les tropiques des deux hémisphères. Elle se caractérise par des feuilles lisses, lobées à angles aigus, souvent tachetées de blanc et le fruit a une pulpe orange et une odeur de musc [110]. Cette espèce est développée en de nombreuses variétés dont fait partie la Courges doubeurre ou butternut qui fait l'objet de notre travail.



Figure I.23 : La variété *Butternut* du genre *Cucurbita moschata*

III.1.3. *Cucurbita pepo*

Communément appelé Citrouille, la plus anciennement et largement cultivée, est celle qui a donné le plus grand nombre de variétés sous tous les climats. C'est cette espèce qui a donné les innombrables fruits ornementaux mais non comestibles et aux couleurs et formes variant à l'infini. Quelques-unes sont particulièrement remarquables. Ce sont les citrouilles en France qui peuvent atteindre des tailles monstrueuses et qui sont utilisés à Halloween. La courgette fait également partie de cette espèce [113]



Courgette

Citrouille

Figure I.24 : Deux variétés de *Cucurbita pepo*

III.1.4. *Cucurbita ficifolia*

Une quatrième espèce importante en Méditerranée est *C. ficifolia*, la courge à graines noires, "cidra" d'Espagne, particulière à plusieurs titres: elle seule est vivace alors que toutes les autres sont annuelles; son fruit est de conservation très facile jusqu' à deux années. Sa chair est très filandreuse à tel point qu'on en fait des confitures et des gâteaux dits de "cabellos de angel" "cheveux d'ange" en Andalousie et dans le Levant espagnol. En France, où cette courge, autrefois appelée à tort "courge de Siam", est connue depuis 1854 [114].



Figure I. 25: Courge de Siam

III.2. Le genre *Cucumis*

Le genre *Cucumis* comprend 60 espèces présentes principalement dans les régions les plus sèches de l'Afrique. Parmi ce genre, deux espèces dominent et occupent une place importante dans l'alimentation : *Cucumis sativus* ; le concombre et *Cucumis melo* ; le melon et leurs très nombreuses variétés respectives.

III.2.1. *Cucumis sativus*

L'espèce *Cucumis sativus* est cultivée principalement sous la forme de deux variétés plus connues sous les noms de cornichon et de concombre. Le concombre est un cultigène selon Haudricourt [115]. Il est originaire d'Inde tropicale et, selon Purseglove [116], d'une zone sino-himalayenne, ce que reprend Mabberley [117]. Il est un des fruits qui sont arrivés en Méditerranée depuis des temps immémoriaux.

De nombreux cultivars se sont développés donnant des fruits de tailles et de formes différentes : en Méditerranée, on cultive un fruit plus petit et verruqueux que ceux d'Europe tempérée qui sont plus longs et à peau lisse. Le cornichon est un des fruits que l'on conserve

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

dans le vinaigre. On le cueille alors très jeune et très petit, et les Russes conservent à l'eau salée des concombres plus gros et de saveur assez douce.



Figure I. 26 : Concombre et Cornichon

III.2.2. *Cucumis melo*

Les innombrables variétés de melon connus aujourd'hui, ont principalement deux origines : celles originaires de l'Afrique tropicale et australe qui se rapprochent plus de la pastèque et des melons légumes (melon serpent). D'autres, celles originaires de l'Asie, viennent plus précisément de l'Himalaya au cap Cormoran. Les variétés françaises actuelles proviennent du Caucase et d'Arménie où elles furent ramenées par des moines italiens. Tardivement arrivé dans les cultures du bassin méditerranéen, les anciens Égyptiens et les Grecs ignorent *Cucumis melo* et il n'apparaît qu'au milieu de l'empire romain.

Corroborant l'origine africaine du melon est le fait qu'il se trouve à l'état sauvage et avec de nombreuses variétés dans les déserts de l'Afrique du Sud où il constitue une des bases de l'alimentation des Boshimans. Cependant, ce n'est pas d'abord le fruit qui a intéressé les hommes; le melon, comme le navet, le cresson alénois, le lin ont d'abord été cultivés pour leurs graines oléagineuses qui, broyées, donnent une pâte alimentaire douée de propriétés médicinales [115]. *Cucumis melo*, domestiquée depuis longtemps, est fortement polymorphique et il est aujourd'hui encore très difficile de le classer en comprenant environ 400 variétés qui sont rassemblées en groupes dont les principaux sont :

Groupe *Cantalupensis*: le cantaloup

Surtout présent sur les marchés européens, avec une écorce vert-jaune verruqueuse ou lisse, rainurée à la verticale et la chair orange sucrée.

Groupe *Reticulatus* : melon brodé

Présent en général sur les marchés nord-américains, le melon brodé est de forme ronde, avec une écorce liégeuse en relief, chair orangée.

Groupe *Inodorus*: melon jaune-canari

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

De forme ovale et légèrement plus gros que le charentais, moins parfumé mais plus juteux, le melon jaune Canari se consomme de la même façon que les variétés cantaloup.



Figure I. 27 : Cantaloup, Melon jaune-canari et Melon brodé

En Afrique du nord, on distingue le melon mangé encore vert et le melon totalement mûr. Ainsi le melon vert se nomme "jeggus" chez les Chleuh du Sous (Maroc): "c'est un melon de forme allongée qui se mange vert avant maturité, alors qu'il est suffisamment sucré et transportable". Il s'oppose à "betikh" (*Inodorus*), melon allongé mûre et jaune [118], variété que l'on cultive beaucoup en Algérie et qui fait l'objet de notre travail. Ce melon est consommé frais, nature ou sucré, les graines sont appréciées grillées et salées dans les régions méditerranéennes en tant qu'amuse-gueules.

IV. Les graines des Cucurbitacées

Les Cucurbitacées constituent, grâce à leurs fruits, une source d'hydrates de carbone, tandis que leurs graines fournissent une huile qui possède des propriétés similaires à celle des huiles commerciales. Depuis longtemps, le fruit de ces plantes est consommé cru ou cuit. Ces dernières années, ce sont les graines qui ont inspiré de nombreux travaux, en raison de l'importance économique que revêtent toutes les graines oléagineuses comme source de protéines et d'huiles.



Figure I. 28: Graines de melon et de courge

V. Composition chimique des graines

Le nombre considérable de graines contenues dans les fruits des Cucurbitacées, identique à celui de nombreuses plantes oléagineuses commerciales, a conduit à la détermination de la composition lipidique et protéique de ces graines.

Selon de nombreuses études, ces graines se composent de 3 à 4 % de matières minérales, entre 15% et 48% de protéines et de 30 à 50% d'huile [119- 122].

V.1. Protéines

Les graines alimentaires de la famille de Cucurbitacées sont des sources végétales riches en protéines et peuvent ainsi constituer une solution à la malnutrition protéino-calorique. En effet, plusieurs travaux indiquent que la teneur en protéines varie entre 29% et 48% [119- 121]. La composition en acides aminés de la fraction protéinique totale indique que les graines sont riches en arginine, acide aspartique et acide glutamique [123, 124]. L'acide aspartique constitue dans les plantes une réserve d'azote. Cet acide aminé conduit aux autres amino-acides par des réactions de transamination. Il est apparu dans les années 50, que l'acide glutamique possède un rôle fondamental dans la communication cellulaire au sein du système nerveux central des vertébrés. Il est aujourd'hui reconnu comme le principal neurotransmetteur excitateur [125]. De plus, son implication dans la communication cellulaire au niveau périphérique, et au niveau du système immunitaire apparaît de plus en plus évidente [125].

V.2. Les minéraux

En général, la teneur en éléments minéraux de la plante varie d'un sol à l'autre, d'une espèce à l'autre et même d'une variété à l'autre, de l'apport ou non d'agents fertilisants. Des teneurs en quelques éléments minéraux des cucurbitacées sont disponibles dans la littérature. Les éléments qui représentent les teneurs les plus importants sont le potassium, le calcium, le magnésium et le sodium ; le fer et le zinc sont aussi présents avec des teneurs plus faibles [119, 124, 122, 126].

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

V.3. Lipides

Des études menées sur les huiles extraites de plusieurs variétés de melon et courge ont mis en évidence la présence de quatre acides gras majoritaires avec des pourcentages variables. L'acide linoléique est le plus représenté avec un pourcentage qui varie de 34% jusqu'à 65%, suivie de l'acide oléique (entre 14% et 40%). L'acide stéarique a été trouvé avec une teneur de 4 à 10% et enfin un pourcentage de 8 à 17% pour l'acide palmitique [119, 120, 121, 122, 127].

La production qualitative et quantitative des acides gras des huiles sont similaires à celle des huiles commercialisées (huile de soja, tournesol...). Leur richesse en acides gras insaturés ainsi que leur forte teneur en acide linoléique leur confèrent de bonnes propriétés diététiques. De par leur composition, ces huiles sont du type oléique-linoléique [128].

VI. Propriétés médicinales des cucurbitacées

Les cucurbitacées sont reconnues comme source de métabolites secondaires, les cucurbitacines [129]. Appartenant aux groupes des triterpènes tétracycliques, ces composés oxygénés sont constitués de 7 à 9 atomes d'oxygène pour les molécules en C30 ou C32 possédant plusieurs groupes méthyle et souvent un groupe acétyle. Leur présence chez de nombreuses Cucurbitacées engendre une amertume qui, par ailleurs, est responsable des propriétés purgatives de diverses drogues extraites de différents organes de Cucurbitacées (racine de bryone, fruits de coloquinte) [110].

De nombreux travaux sur l'isolation de ces principes actifs ont été menés avec succès. C'est ainsi qu'une douzaine de ces substances ont été isolées et ont été désignées par les lettres de l'alphabet A, B, C, D, E, etc... (**Figure I. 29**)

Les Cucurbitacines sont des substances très toxiques pour les mammifères et sont utilisées à titre préventif pour leur action antitumorale. Ainsi, plusieurs substances se sont montrées actives sur des tumeurs chez l'animal. Cependant, il n'y a pas actuellement d'applications thérapeutiques humaines en raison de leur toxicité trop élevée.

Des cucurbitacines telles que les cucurbitacines A, B, D, E, I, F, O, P, Q et R ont montré des effets cytotoxiques envers plusieurs lignées de cellules cancéreuses mais chacune agit avec un mécanisme et une activité différents. Les cucurbitacines F, O, P, Q et leurs dérivés possèdent

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

des activités plus faibles que les autres cucurbitacines [130]. Toutefois, les dérivés des cucurbitacines de la même catégorie ne présentent pas les mêmes activités. La cucurbitacine D, par exemple, présente des activités anticancéreuses sur plusieurs lignées de cellules humaines tandis que son dérivé le 2-O-glucoside est inactif sur ces mêmes lignées [131].

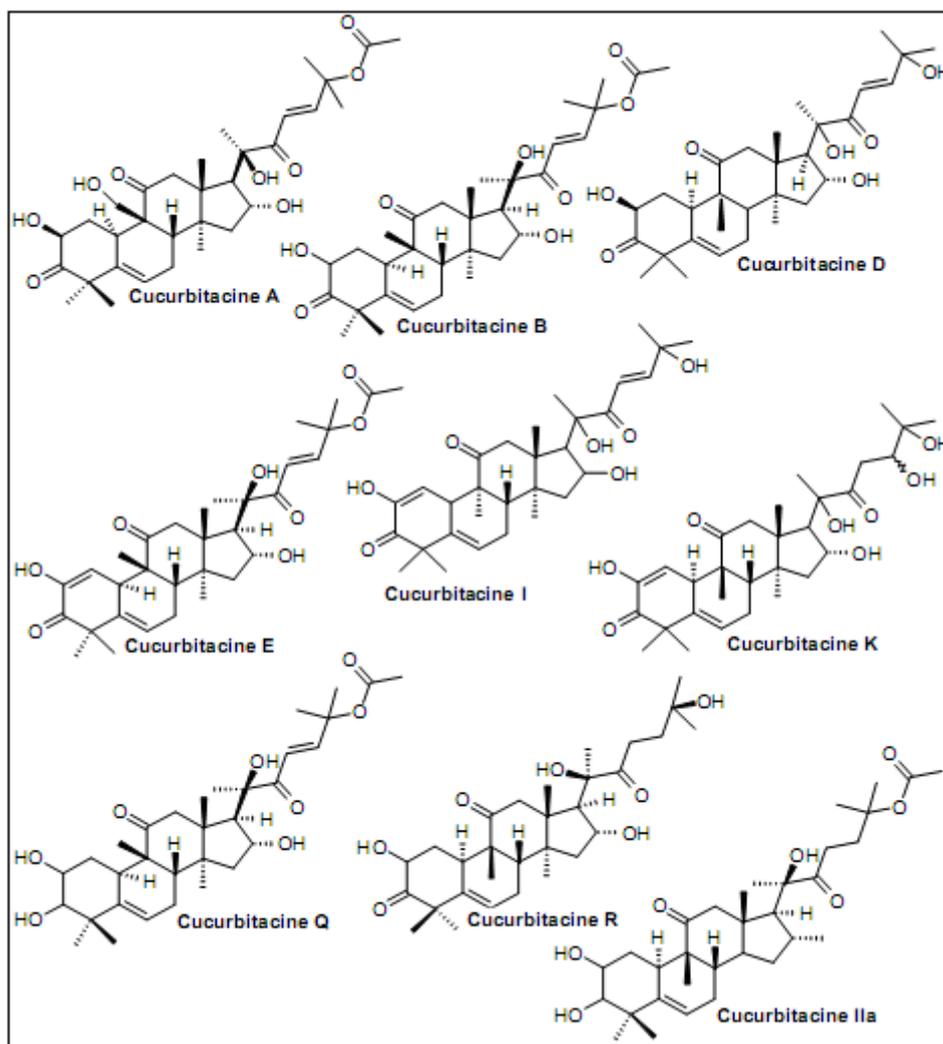


Figure I. 29 : Structure des cucurbitacines les plus abondantes et les plus étudiées.

De nombreuses études *in vitro* ont montré que les cucurbitacines sont des substances anti-inflammatoires qui inhibent la migration des cellules vers le site de l'inflammation ainsi que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. En effet, les extraits au dichlorométhane de la racine de *Wilbrandia ebracteata* Cogn (Cucurbitaceae) sont couramment utilisés au Brésil dans le traitement des maladies rhumatismales [132-135].

Au-delà des vertus nutritionnelles évidentes des graines de Cucurbitacées, des études scientifiques récentes ont révélé que la farine de graines de citrouille, ainsi que son huile pressée, peuvent avoir une grande valeur contre les problèmes cardiovasculaires et les

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

maladies du foie. En effet, un mélange de graines de lin et de citrouille pourrait protéger le cœur et le foie [136].

Des travaux expérimentaux indiquent que les pathologies cardiovasculaires associées à une carence en œstrogènes, telles que des troubles de la pression artérielle et des anomalies lipidiques, peuvent être atténuées avec la prise de l'huile de graines de citrouille [137]. Selon une étude réalisée en 1987 et publiée dans *l'American Journal of Clinical Nutrition*, les enfants avec des calculs rénaux à base d'oxalate de calcium ont répondu favorablement à la supplémentation de leur régime alimentaire avec des graines de citrouille [138].

Les animaux nourris avec de l'huile de graines de citrouille ont permis de répondre mieux par rapport au traitement conventionnel, inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (ECA) et bloqueur de canaux calciques, probablement en raison de ses propriétés antioxydantes bénéfiques [139]. Une autre publication publiée en 2007 dans la *Revue canadienne de physiologie et pharmacologie* a constaté que lorsque des graines de courge déshuilées ont été prises en combinaison avec du glucose, on obtenait un effet clinique similaire à celui du tryptophane de qualité pharmaceutique [140].

Enfin, une cucurbitacée, la coloquinte ou *Citrullus colocynthis* L. Schrader, plante herbacée des régions saharo-arabiennes et du bassin méditerranéen, est utilisée en médecine traditionnelle depuis les temps reculés notamment pour lutter contre le diabète. Dans des travaux récents, Nmila *et al* ont montré que des fractions de la graine de coloquinte possédaient une activité insulino-stimulante [141].

Nous avons passé en revue quelques-unes des propriétés bénéfiques expérimentalement confirmées de graines de cucurbitacée. Comme tous les aliments, la mise à contribution de leurs propriétés innombrables au service de la santé, une consommation raisonnable et en quantité correcte et un bon timing, remplissent la séculaire et intemporelle recommandation d'Hippocrate : « Que ta nourriture soit ton premier médicament ».

Chapitre II : Matériels et méthodes

I. Composition chimique et analyse de l'huile extraite par soxhlet.

I.1. Matériel végétal

Le melon que nous avons utilisé pour réaliser ce travail, est celui de la région de Boukhnaiss à Ghazaouet. La récolte du fruit a été faite au début du mois de juin de l'année 2013.

Le melon de cette région est caractérisé par une couleur jaune-vif et une forme ovale ; sa chair est blanchâtre avec une saveur sucrée.

Par contre, la courge (*Cucurbita moschata* Duch. *Butternut*), autre objet de notre travail, vient de la région de Wled Hamou à Ghazaouet/Wilaya de Tlemcen. La récolte du fruit a été faite en septembre de l'année 2013. Nous nous sommes intéressés uniquement aux pépins qui représentent une partie de leurs déchets dans la mesure où ils sont valorisables. Ces derniers ont été traités en suivant les étapes suivantes :

- Elimination des débris.
- Lavage à l'eau distillée.
- Séchage à l'air libre et à l'obscurité pendant une dizaine de jours.
- Broyage de la substance afin de faciliter l'extraction de l'huile.

I.2. Analyse chimique des pépins

I.2.1. Taux d'humidité

Le taux d'humidité est la teneur en eau de la matière végétale ; elle est déterminée dans les graines de melon broyées selon la méthode de l'Association américaine de la chimie des huiles [142]. Environ 2g de graines sont séchés par étuvage à 103°C pendant 3 h (jusqu'à masse constante), puis refroidis pendant 1h au dessiccateur. La perte de masse observée à la suite de cet étuvage correspond à la masse d'eau contenue dans le produit. Les résultats sont exprimés en g d'eau/100g de graines, et les valeurs données sont une moyenne de trois essais indépendants.

$$H(\%) = [(M2 - M1)/M] * 100$$

- H (%) : taux d'humidité
- M1 : Masse du creuset vide avant étuvage (g) ;
- M2 : Masse du creuset contenant la matière fraîche après étuvage (g) ;
- M : Masse de la prise d'essai (g).

I.2.2. Teneur en cendres

La détermination de la teneur en cendres consiste à calciner l'échantillon à 550 °C dans un four à moufle jusqu'à l'obtention d'une cendre de poids constant [142]. Les cendres obtenues sont pesées et l'on exprime alors le résultat en % du poids de cendres par rapport au poids initial de l'échantillon. L'opération est répétée trois fois et les résultats représentent la moyenne de 3 pesées distinctes. La teneur en cendre est calculée selon la formule suivante :

$$C(\%) = (M1/M2)*100$$

- M1 : Masse de la prise d'essai(g)
- M2 : Masse des cendres (g)

I.2.3. Teneur en lipides

La teneur en lipides (R) est le rendement en huile obtenu après extraction. La technique utilisée pour la détermination de la teneur en lipides est normée, c'est-à-dire l'extraction des lipides s'effectue au *soxhlet* en utilisant l'hexane comme solvant. La teneur R a été calculée par la formule suivante : $R = (M/M_0) \times 100$

- M : représente la masse en grammes de l'huile obtenue.
- M₀ : représente la masse en grammes de la matière végétale.

Les résultats exprimés représentent la moyenne de 3 extractions distinctes.

I.2.4. Teneur en minéraux

La teneur en minéraux a été déterminée au niveau du laboratoire de contrôle de qualité à l'usine d'électrolyse de zinc, ALZINC, située à Ghazaouet. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme (air/acétylène) de type AURORA AI 1200. Il comporte :

- un micro-ordinateur,
- un générateur d'atomes constitué par un dispositif de nébulisation et un brûleur,
- un système de sélection de la longueur d'onde,
- un récepteur.

Préparation de l'échantillon

Les échantillons sont préparés selon le protocole d'Oloyede [143] à savoir 1g de cendres est porté à ébullition dans 10 ml de HCl à 20%. Après filtration dans une fiole de 100 ml, le filtrat est ajusté au trait de jauge avec l'eau distillée. La solution obtenue est ensuite soumise à une analyse des métaux en utilisant un spectromètre d'absorption atomique.

Principe

Cette méthode repose sur un dosage des éléments à l'état atomique. L'échantillon est porté à une température de plusieurs milliers de degrés, pour que les éléments présents dans l'échantillon passent sous forme de gaz à l'état atomique. Les mesures sont faites à longueurs d'ondes fixes, choisies en fonction des éléments recherchés. Le dispositif thermique est constitué d'un brûleur alimenté par un mélange combustible. L'échantillon, qui doit être en solution aqueuse, est nébulisé avant d'être entraîné dans ce mélange. Les éléments présents dans le nébulisat sont excités par la flamme et émettent une longueur d'onde caractéristique, détectée par l'appareil d'analyse. L'intensité de l'absorption est proportionnelle à la concentration de l'élément et évaluée par la relation de Beer-Lambert. Les éléments identifiés et dosés sont les suivants : K, Ca, Mg, Mn, Na, Zn, Cu, Fe, Cd, Pb, Ni.

Les résultats de cette analyse T sont exprimés en mg de l'élément dans 100 mg de cendres, et ces déterminations se font trois fois, répétitives et distinctes. Par la suite, ces résultats sont transformés en teneur des métaux en mg par rapport à 100 g de pépins de melon secs selon la formule suivante :

$$M = 10 * T * C\%$$

- M : teneur du métal en mg dans 100g de pépins secs,
- T : teneur du métal dans 100mg de cendres,
- C% : teneur en cendres des pépins de melon,

I.3. Extraction de l'huile par soxhlet.

L'extraction de la matière grasse a été réalisée avec l'hexane dans un *soxhlet* pendant 6h sur une masse de 16 g de graines de melon sèches broyées. A la fin de l'extraction, le solvant est évaporé dans un évaporateur rotatif sous vide, en chauffant à une température de 40°C. L'huile obtenue est de couleur jaune et d'odeur caractéristique ; elle est récupérée dans un flacon ambré, bien fermé et conservé sous azote anhydre dans un congélateur à une température de -

20 °C. Le rendement en huile est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile obtenue et la masse de la matière végétale sèche.

$$R = (M/M_0) \cdot 100$$

- M : masse en grammes de l'huile obtenue.
- M₀ : masse en grammes de la matière végétale.

I.4. Analyse physico-chimique de l'huile

Les huiles occupent une place importante sur les marchés de la pharmacie, de l'industrie cosmétique ainsi que dans de nombreux secteurs de l'industrie agroalimentaire. Pour le contrôle de leur qualité, on prescrit la détermination d'un certain nombre de constantes physiques parmi lesquelles la densité relative, l'indice de réfraction, ainsi qu'une étude chimique destinée à déterminer des indices clés, notamment l'indice d'acide, ceux de peroxyde, d'iode et de saponification.

I.4.1. Propriétés chimiques

I.4.1.1. Indice d'acide

L'indice d'acide représente la masse d'hydroxyde de potassium, exprimée en milligrammes nécessaires au dosage des acides libres contenus dans un gramme de corps gras. Les huiles contiennent généralement une grande teneur en acides libres. Pour évaluer cette teneur, on utilise l'indice d'acide et, généralement, on recourt au protocole AOAC (1997) [144]. Concrètement, on procède de la manière suivante : dans un erlenmeyer, verser successivement 10 ml d'éthanol, 10 ml d'hexane, 2 gouttes de phénolphthaléine et une masse d'environ 0,4g d'huile. Agiter avec l'agitateur magnétique jusqu'à dissolution et ensuite, réaliser le dosage avec la potasse jusqu'à apparition d'une coloration rose persistante. Le calcul de l'indice d'acide est effectué par la formule suivante :

$$IA = \frac{56,11 \times V \times N}{m}$$

- **56,11** : la masse molaire de KOH (g/mol).
- **V** : volume de KOH au point d'équivalence (ml).
- **N** : normalité de KOH.
- **m** : masse de l'huile dosée (g).

Les résultats exprimés représentent la moyenne de 3 répétitions et l'écart-type associé.

I.4.1.2. Indice de peroxyde

Cet indice est déterminé en se basant sur le principe qui repose sur le traitement d'un corps gras en solution dans l'acide acétique et le chloroforme par une solution d'iodure de potassium. Cette dissolution est suivie d'un titrage de l'iode libéré par une solution titrée de thiosulfate de sodium. Le protocole appliqué est celui de la norme AOAC (1997). Ainsi, on fait circuler l'azote anhydre pur dans un erlenmeyer pendant environ 10 minutes et on ferme le récipient immédiatement. Environ 2,5g du corps gras sont dissous dans 25ml d'un mélange de chloroforme et d'acide acétique (1/1.5, v/v) à l'abri de l'oxygène. Ajouter 1 ml d'iodure de potassium, agiter et abandonner au placard 5 mn. Ajouter rapidement environ 80 ml d'eau pour arrêter la réaction. Ajouter l'empois d'amidon comme indicateur. Si une couleur violacée apparaît après agitation énergique, il y a présence de peroxyde. Titrer immédiatement avec le thiosulfate de sodium 0,02N jusqu'à disparition de la coloration violette. Effectuer un essai à blanc.

Le calcul de l'indice s'effectue de la manière suivante :

$$IP = \frac{(V - V') \cdot N}{E}$$

- **V** : volume de thiosulfate versé à l'essai (ml).
- **V'** : volume de thiosulfate versé à blanc (ml).
- **N** : normalité de thiosulfate de sodium
- **E** : masse de la prise d'essai (Kg)

Les résultats exprimés représentent la moyenne de 3 répétitions et l'écart-type associé.

I.4.1.3. Indice de saponification

L'indice de saponification est la masse de potasse (KOH) en mg nécessaires pour neutraliser les acides gras libres et pour saponifier les acides gras, encore liés dans des fonctions ester, dans un gramme de corps gras. La saponification est la réaction d'hydrolyse alcaline des corps gras qui donne des sels alcalins sous forme de savons et des glycérols. Pour déterminer l'indice de saponification, on fait réagir une solution d'huile avec un excès de KOH 0,5M qui est ensuite dosé avec du HCl à 0,5M selon le protocole AOAC (1997).

Les corps gras étant insolubles dans l'eau, il faut les dissoudre dans un solvant organique approprié. Commencer par peser une masse connue et voisine de 4 g dans un bécher. Ajouter 100 ml de solvant constitué à 50% d'éthanol et de cyclohexane. Agiter pour dissoudre le corps gras. Introduire dans un bécher 10 ml de cette solution. Ajouter 25 ml de potasse alcoolique

Chapitre II : Matériel et méthodes

de concentration 0,5 mol/L. Mettre au bain marie bouillant pendant 45 à 60 minutes. Ajouter 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine. Doser l'excès de potasse par l'acide chlorhydrique à une concentration de 0,5 mol/L en agitant jusqu'à la disparition de la coloration de la phénolphtaléine. Effectuer dans les mêmes conditions un essai à blanc.

Le calcul de l'indice :

$$I.S = \frac{56,11 \times (Vt - Ve) \times C}{m}$$

- **Vt** : Volume versé au témoin en ml
- **Ve** : Volume de l'essai en ml
- **C_{HCl}** : concentration de HCl en mol/l
- **m** : masse d'huile exactement pesée en g.

Les résultats exprimés représentent la moyenne de 3 répétitions et l'écart-type associé.

I.4.1.4. Indice d'iode

Expérimentalement, on peut déterminer l'indice d'iode par la méthode de Wijs, ce réactif s'additionne quantitativement sur les insaturations selon la réaction suivante:



Le réactif de Wijs en excès et qui n'est pas fixé sur les doubles liaisons est détruit lors de l'addition d'une solution d'iodure de potassium pour former le diiode (I₂). Ce dernier est alors titré par une solution de concentration connue de thiosulfate de sodium. Le protocole suivi est celui de la norme (AOAC, 1997).

Introduire dans un erlenmeyer une masse d'huile d'environ 0,15 g, puis ajouter dans l'ordre 25ml de cyclohexane, 10 ml de réactif de **WIJS** 0,1 M (ICl dans l'acide acétique). L'erlenmeyer est bouché, agité et placé à l'obscurité pendant 45 minutes. Ajouter 100 ml d'eau distillée et 15 ml d'iodure de potassium. Agiter à l'obscurité quelques minutes. Ensuite titrer avec le thiosulfate de sodium jusqu'à ce que la coloration devienne pâle. Ajouter 1 ml d'empois d'amidon et continuer le dosage jusqu'à ce que la coloration bleue disparaisse. Effectuer dans les mêmes conditions un essai à blanc.

Le calcul de l'indice :

$$I.I = \frac{C \times (V_t - V_e) \times M \times 100}{2 \times m}$$

- **V_t** : Volume versé au témoin
- **V_e** : Volume de l'essai
- **M** : masse molaire de I₂
- **C** : concentration de la solution de thiosulfate de sodium en mol/l
- **m** : masse d'huile exactement pesée en g.

Les résultats exprimés représentent la moyenne de 3 répétitions et l'écart-type associé.

I.4.2. Propriétés physiques

I.4.2.1. Indice de réfraction

Le réfractomètre est conçu pour donner par lecture directe l'indice de réfraction et ceci après l'avoir étalonné par l'eau distillée, de manière à donner la valeur de : 1,3330 à la température de 20°C.

Protocole

Diriger le réfractomètre vers la lumière. Ouvrir et orienter convenablement le volet d'éclairage de l'échelle des indices. Régler le tirage des oculaires pour avoir une vision nette du réticule et de l'échelle de lecture. Relever le prisme mobile d'éclairage et nettoyer soigneusement les deux faces. Déposer 2 à 3 gouttes de liquide à l'aide d'une pipette sur la face horizontale du prisme de référence. Rabattre doucement le prisme mobile. En regardant dans l'oculaire, agir sur le bouton moleté de droite de façon à amener dans le champ de vision la limite de séparation des deux zones (claire et obscure). Agir sur le bouton moleté de gauche pour rendre nette cette ligne de séparation. Ajuster cette ligne à l'intersection du réticule par action sur le bouton moleté de droite. En regardant dans l'oculaire lire la valeur de l'indice de réfraction. Les résultats exprimés représentent la moyenne de 3 répétitions et l'écart-type associé.

I.4.2.2. Densité relative

La mesure de la densité a été déterminée à l'aide d'un pycnomètre qui doit être rempli par un volume de 5,263 cm³. On le pèse à vide. Remplir avec l'huile et peser de nouveau. Calcul de la densité : $\rho = m/V$

Les résultats exprimés représentent la moyenne de 3 répétitions et l'écart-type associé.

I.5. Recherche de polyphénols dans les pépins de melon

La recherche de polyphénols dans les pépins de melon a été réalisée dans l'extrait alcoolique par la méthode de Folin Ciocalteu

I.5.1. Extraction des polyphénols par macération

La macération est une technique simple d'extraction, qui consiste à soumettre le matériau végétal à un séjour à froid dans un solvant à température ambiante et sous agitation, afin d'extraire les constituants solubles.

Protocole

Une prise d'essai de 11g est mise à macérer dans 150 ml de solvant (méthanol, éthanol) pendant 6 h. Le mélange obtenu est ensuite filtré et évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait brut est stocké dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'au moment du test.

I.5.2. Dosage de polyphénols

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des phénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin Ciocalteu est la plus utilisée [145]. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxydes bleus (oxyde tungstène W₈O₂₃ et de molybdène Mo₈O₂₃). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé.

Protocole:

0,5 ml de l'extrait (0,1mg/ml) est mélangé avec 5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué au dixième avec l'eau distillée et 4 ml de carbonate de sodium (1M). Après incubation de 15 minutes à température ambiante, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 765 nm. La courbe d'étalonnage est obtenue dans les mêmes conditions que précédemment, en utilisant

une gamme de concentrations (de 50 à 250 mg/l) de solution d'acide gallique. La quantité des phénols totaux est calculée par l'équation suivante :

$$C = c \cdot V / m$$

C : contenu total des polyphénols (mg équivalent acide gallique / g d'extrait).

c : concentration d'acide gallique (mg/l).

V : volume de l'extrait (l).

m : masse de l'extrait pur (g).

I.6. Analyse des acides gras

Afin de réaliser l'analyse qualitative et quantitative des extraits lipidiques isolés, la chromatographie en phase gazeuse apparaît comme la méthode la plus appropriée. Cependant, du fait de leur structure, l'étude des acides gras sous forme libre par cette technique est impossible. En effet, les acides peuvent se décarboxyler dans les conditions de la chromatographie en phase gazeuse, ou et en même temps, ils s'accrochent sur la phase stationnaire si bien que des temps de sortie sont tellement longs que la colonne devient souillée par ces substances. Par conséquent, il est indispensable de transformer les différents composés en dérivés spécifiques, généralement des esters, afin de les rendre plus volatils.

Différentes méthodes sont utilisées pour la dérivatisation des acides gras à partir d'une matrice lipidique complexe comme les triglycérides ou les phospholipides. Les esters méthyliques sont couramment préparés par transestérification directe des triglycérides ou des phospholipides en présence d'un catalyseur qui est soit acide (HCl, H₂SO₄, BF₃ dans le méthanol) soit basique (méthanolate de sodium ou de potassium). Par contre, la saponification suivie d'une estérification des acides gras libérés est, de nos jours, une méthode peu utilisée.

Le choix de la méthode de méthylation repose en grande partie sur la présence d'acides gras insaturés avec des doubles liaisons conjuguées dans l'échantillon. En effet, pour les échantillons contenant ce type d'acides gras, les méthodes qui utilisent un catalyseur basique sont recommandées. Carreau et Dubacq [146] utilisent le méthanolate de sodium à température ambiante pour méthyler les lipides complexes. Néanmoins, cette technique ne peut pas être utilisée pour méthyler les acides gras insaturés libres. La méthylation s'effectue alors à température ambiante en présence de BF₃-méthanol pendant 10 minutes. Il est également possible d'utiliser le diazométhane [147, 148].

Pour les échantillons ne contenant pas d'acides gras insaturés, la méthode la plus couramment utilisée est la transestérification à chaud en présence de BF₃-méthanol selon la méthode décrite par Morrison et Smith [149]. L'utilisation d'une solution commerciale de BF₃-méthanol est plus simple que la préparation au laboratoire de solutions de HCl ou de H₂SO₄ dans le méthanol. Pour notre part, nous avons utilisé deux méthodes pour la préparation des esters méthylés de nos huiles à savoir, la saponification suivie d'une estérification des acides gras libres et la transestérification directe en utilisant le BF₃-Méthanol.

I.6.1. Réaction de saponification

Une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 1,0 M (50 ml) est additionnée à l'huile de pépins de melon (3 g) contenu dans un ballon en verre. Le mélange est porté à reflux pendant 1h à 75°C avec agitation. 100 ml d'eau distillée sont ajoutés au milieu réactionnel. La solution ainsi obtenue est extraite par addition d'éther diéthylique (4x 50 ml) dans une ampoule à décanter. Les fractions étherées ainsi obtenues contiennent la partie insaponifiable. La phase aqueuse est acidifiée à pH = 1 par addition d'une solution aqueuse d'HCl à 6.0 M. Les acides gras libérés sont alors extraits avec 3x 50 ml d'hexane dans une ampoule à décanter. La phase organique est ensuite lavée avec l'eau distillée jusqu'à pH neutre et séchée sur sulfate de sodium anhydre. Après filtration et évaporation du solvant sous vide à une température ne dépassant pas 40 °C, une huile jaune est obtenue : elle contient 2,70g d'acides gras libres. Ces derniers sont immédiatement estérifiés en utilisant une solution de BF₃-Méthanol (14% °).

I.6.2. Estérification des acides gras libres

Le mélange des acides gras et 10 mL de BF₃-méthanol (14%) est maintenu sous un reflux de 5 min, ensuite la réaction est arrêtée en plongeant le ballon dans un bain de glace. Les esters méthyliques ainsi obtenus sont extraits trois fois avec 50 mL d'hexane et les fractions combinées sont séchées sur un desséchant à base de sulfate anhydre. Après évaporation du solvant sous vide, les esters méthyliques sont gardés sous azote dans des flacons ambrés au congélateur à une température de -20°C.

L'analyse qualitative des acides gras estérifiés a été faite par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (GC/FID), et aussi par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Les conditions opératoires ont été déterminées et fixées après une recherche expérimentale durant laquelle des paramètres ont été progressivement adaptés pour l'obtention d'un chromatogramme correct ainsi qu'une bonne résolution.

I.6.3. Analyse des acides gras méthylés (AGME) par GC/FID

L'analyse GC/FID nous a servi, comme dans le cas de la CPG, à fixer les conditions expérimentales optimales pour effectuer une analyse tant qualitative que quantitative par GC/MS.

Ces conditions sont les suivantes :

Pour la GC/FID

* appareil : GC-17A de marque SHIMADZU piloté par un logiciel analytique adapté

* gaz vecteur : N₂analytique 99,9994%

* colonne : colonne capillaire type TR-CN100 (Figure II. 1)

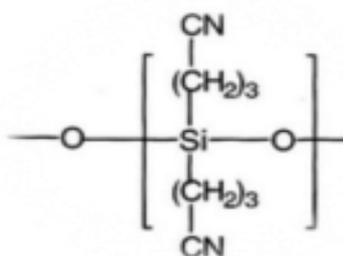


Figure II. 1: Fragment de la structure de la colonne utilisée : Poly (bicyanopropyl) siloxane

- Température maximum de la colonne : 220°C
- Température de l'injecteur : 250°C
- Température du détecteur : 280°C
- Longueur : 30m
- Diamètre intérieur : 0,25 mm
- Epaisseur du film : 0,20µm
- Vitesse du gaz vecteur : 34cm/s
- Débit total du gaz vecteur : 25mL/min
- Débit du gaz vecteur dans la colonne : 1,5 mL/min
- Mode d'injection : Split
- Rapport split : 14 :1
- Débit du gaz dans le split : 20mL/min
- Débit de la purge : 3mL/min
- Pression : 600 kPa

La programmation de la température est faite comme suit :

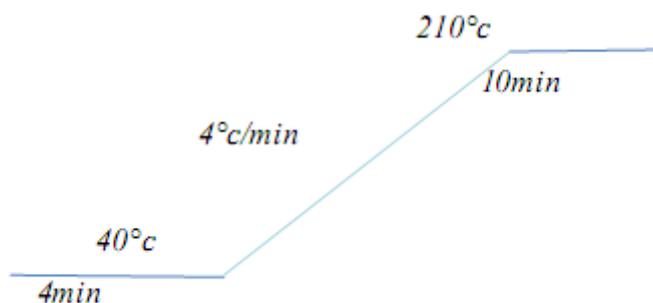


Figure II. 2 : Programme de la température

Le temps total de l'analyse est de 60 min

I.6.4. Analyse des AGME par GC/MS

L'analyse a été effectuée avec une GC/SM de marque Perkin Elmer type auto système XL couplée au spectromètre de masse (Turbomass actualisée à Clarus) assisté par un ordinateur. Les conditions opératoires CPG sont les suivantes:

- Gaz vecteur : Hélium
- Type de colonne : Colonne capillaire Elit-5 avec la phase stationnaire (5% Diphényl) Diméthylpolysiloxane (Figure II. 3)

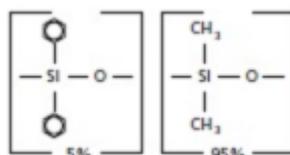


Figure II. 3: Structure de la colonne: (5% Diphényl) Diméthylpolysiloxane

- Longueur : 30m
- Diamètre intérieur : 0,25mm
- Epaisseur du film : 0,25 μ m
- Température de l'injecteur : 250°C
- Split total : 5mL/min
- Vitesse de chauffe : 4°C/min
- Débit du gaz vecteur : 1mL/min

La programmation de la température est faite comme suit :

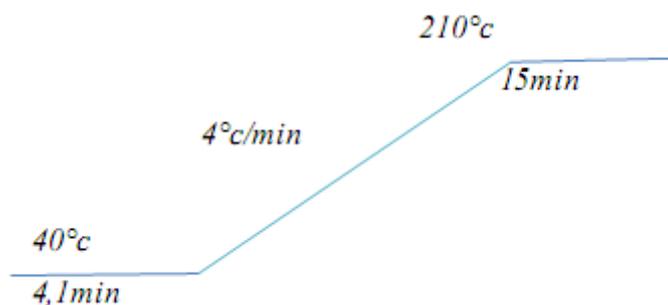


Figure II. 4: La programmation de la température

Conditions opératoires SM :

- Ligne de transfert : 270°C
- Température de la source : 255°C
- Purge du solvant (Arrêt d'analyse du solvant) : 4,1min
- Multiplicateur : 310 Volt
- Courant du filament : 0,08 A
- L'intervalle de balayage : [45-450] uma

Préparation des étalons

L'identification des esters méthyliques d'acides gras est effectuée par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des étalons injectés dans les mêmes conditions opératoires. Si le temps de rétention du standard correspond au temps de rétention du pic choisi du mélange, on conclut que c'est le même composé. Il a aussi été pratiqué la méthode d'incrément d'intensité de pics pour vérifier s'il s'agissait bien du même composé dont le pic augmente lors de l'injection d'un étalon avec le mélange. Un mélange de 37 étalons a été injecté en plus des étalons suivants :

Ester méthylique de l'acide linoléique

Ester méthylique de l'acide oléique

Ester méthylique de l'acide stéarique

Ester méthylique de l'acide palmitique

II. Extraction par CO₂ supercritique

Cette partie de notre travail a été réalisé au laboratoire de Génie Chimique de l'Institut National Polytechnique de l'Université Paul Sabatier de Toulouse sous la direction du professeur Jean Stéphane Condoret et Mme Severine Camy.

II.1. Matière végétale

Nous avons réalisé une extraction de l'huile à partir de deux types de graines oléagineuses : les pépins de melon (*Cucumis melo* L. *Inodorus*) de la région de la wilaya d'Oran et les pépins de courge (*Cucurbita moschata* Duch. *Butternut*) de la région de Wled Hamou à Ghazaouet/Wilaya de Tlemcen. Dans les deux cas, les graines ont été récupérées à partir du fruit et ensuite ont été traitées de la manière suivante :

- Elimination des débris.
- Lavage à l'eau.
- Séchage à l'air libre et à l'obscurité pendant une dizaine de jours.
- Broyage de la substance et tamisage à l'aide d'un tamis de 1,12 mm afin de faciliter l'extraction de l'huile.

Nous avons ensuite entamé l'extraction par deux méthodes : l'extraction par la méthode conventionnelle au soxhlet en utilisant l'hexane comme solvant et par la méthode alternative de CO₂ supercritique. Dans ce dernier cas, l'objectif était de comparer les deux méthodes en termes de rendement, de composition en acides gras et en activité biologique de l'huile issue de chaque processus. Nous avons réalisé une série d'extractions de l'huile de pépins de melon et de courge avec la technologie de CO₂ supercritique en utilisant deux installations pilotes **SFE1000** et **SFE200** qui diffèrent par la capacité de l'extracteur, le nombre de séparateurs et la pression maximale. Le principe de base reste le même.

II.2. Principe de l'extraction

Le CO₂ utilisé est fourni par Air Liquide (Bordeaux, France : pureté à 99,99%). Il sort de la bouteille à l'état gazeux, à température ambiante et à une pression de la bouteille entre 50 et 60 bars. Dans un premier temps, le CO₂ est maintenu à l'état liquide à l'aide du groupe froid, puis est pompé à l'aide de la pompe à la pression de l'extraction. Dans un deuxième temps, à

l'aide d'un échangeur tubulaire, le CO₂ est porté au-delà de sa température critique puis introduit dans l'extracteur en passant par un débitmètre.

Une fois que la pression de travail est atteinte, et après le temps de contact, la vanne entre l'extracteur et les séparateurs est ouverte alors que les autres vannes sont ajustées pour une bonne circulation du CO₂ jusqu'à la sortie, tout en maintenant le débit adopté pour ce travail. Les prélèvements se font toutes les quinze minutes, grâce aux vannes placées en dessous des séparateurs dans des flacons numérotés et tarés auparavant, pour connaître directement la masse de l'huile. L'extraction se poursuit de manière suffisamment lente, jusqu'à ce que la quantité extraite devienne très faible, pratiquement nulle.

II.3. Extraction par l'installation pilote SFE 1000

Le premier appareil est une installation pilote construite par la société Séparex Chimie Fine, France. Le schéma de l'installation est présenté sur la **Figure II. 5**



Figure II.5: Installation d'extraction supercritique «SFE1000 bar»

L'installation Autoclave haute pression A21' (Figure II. 1), est composée d'un extracteur de 225 mL pouvant aller jusqu'à 1000 bars et 200°C. Un seul séparateur est relié à la sortie de l'extracteur. La pression dans l'extracteur est réglée par un régulateur de pression (déverseur). Dans ce travail, l'extracteur a été chargé avec 19g de pépins de melon et 30g de pépins de courge en utilisant deux cellules d'extraction de capacités différentes.

II.3.1. Mise en fonctionnement

Le protocole de mise en fonctionnement est assez délicat, et pour réussir l'extraction sans aucun danger éventuel, il faut suivre les étapes suivantes :

- a. Mettre en fonctionnement l'appareil et régler la température de l'extraction.
- b. Préparer la cellule d'extraction, qui contient les graines à extraire tel que montré sur la figure II.6. Une quantité de graines broyées est directement pesée dans la cellule d'extraction préalablement tarée en utilisant une balance analytique d'une précision 0,1mg).
- c. La cellule est ensuite fermée par un fritté, qui est un filtre métallique fin servant à empêcher l'entraînement de la matière solide et à maintenir l'ensemble (Figure II. 7).
- d. Placer la cellule dans l'extracteur. La fermeture se fait par l'intermédiaire d'une bride métallique munie d'un joint PTFE et de vis (Figure II. 8).
- e. Vérifier que toutes les vannes soient en position fermée.
- f. Amener le CO₂ vers l'extracteur après avoir ajusté la pression et le débit. Ouvrir d'abord la vanne de la bouteille de CO₂, ensuite la vanne d'arrivée du gaz.
- g. Laisser circuler le CO₂ dans l'installation un temps suffisamment long pour saturer l'extracteur (30 min).
- h. Après 30 min d'extraction, la vanne entre l'extracteur et le séparateur est ouverte pour permettre le passage du CO₂ et l'huile dans l'extracteur.
- i. On ouvre le déverseur de l'extracteur et on règle la pression.
- j. Bien surveiller le débit tout au long de l'extraction,
- k. Les prélèvements se font toutes les quinze minutes, grâce aux vannes placées en dessous des séparateurs dans des flacons numérotés et tarés auparavant (Figure II. 9).
- l. L'extraction se poursuit ainsi pour une période de 155 min, jusqu'à ce que la quantité extraite devienne très faible, pratiquement nulle.
- m. Les flacons contenant l'huile sont conservés dans le congélateur à -20°C.



Figure II.6 : Remplissage de la cellule d'extraction



Figure II.7 : Fermeture avec le fritté



Figure II. 8: Mettre la cellule dans l'extracteur



Figure II. 9 : Récupération de l'huile

Calcul du rendement :

Le rendement de l'extraction est calculé comme suit

$$R = (\text{Masse de l'extrait} / \text{Masse de la matière solide}) * 100$$

Nous avons calculé le rendement en tenant compte de la perte de masse de l'huile qui colle à la paroi du séparateur en prenant la masse de la cellule d'extraction avant et après extraction.

Le bilan de matière entre le début et la fin de l'extraction.

Masse de la matière solide : M_{ms}

Masse de l'huile extraite : M_{extrait}

Masse de la cellule remplis avant extraction : MCA_v

Masse de la cellule après extraction : MCA_p

Masse de l'huile extraite réelle : $M(\text{ext,réel}) = MCA_v - MCA_p$

La perte de masse : $M_{\text{perdu}} = M(\text{ext,réel}) - M_{\text{extrait}}$

$$\text{Rendement global de l'extraction } R_{\text{global}} = [(MCA_v - MCA_p) / M_{ms}] * 100$$

Le rendement de nos extraits est calculé en tenant compte de la perte de masse dans toutes les expériences.

II.4. Extraction par l'installation pilote SFE200

La seconde installation est également une installation pilote construite aussi par l'entreprise Separex Chimie Fine, France (série 3417 type SFE200). L'installation comprend un extracteur de 200 mL et trois séparateurs. Le schéma de l'installation est présenté sur la **Figure II. 10**. La pression maximale dans ce pilote est de 300 bars avec un débit maximal de CO₂ supercritique de 5 kg/h.

Dans ce travail, l'extracteur a été chargé avec environ 30 g de pépins séchées et broyées (particules de diamètre inférieur de 1,12 mm). Le principe de l'extraction est le même que pour la première installation sauf que dans ce cas, l'extracteur est connecté en série avec trois séparateurs S1, S2 et S3. L'installation est alimentée par le CO₂ liquide qui se trouve dans une bouteille sous pression **B**. Dans un premier temps, le CO₂ est maintenu à l'état liquide à l'aide du groupe froid **GF** puis est pompé à l'aide de la pompe **P**. Dans un deuxième temps, le CO₂ est porté au-delà de sa température critique à l'aide d'un échangeur tubulaire, puis introduit dans l'extracteur **E** en passant par le débitmètre **FM**.



Figure II. 10 : Photographie de l'installation d'extraction supercritique SFE200

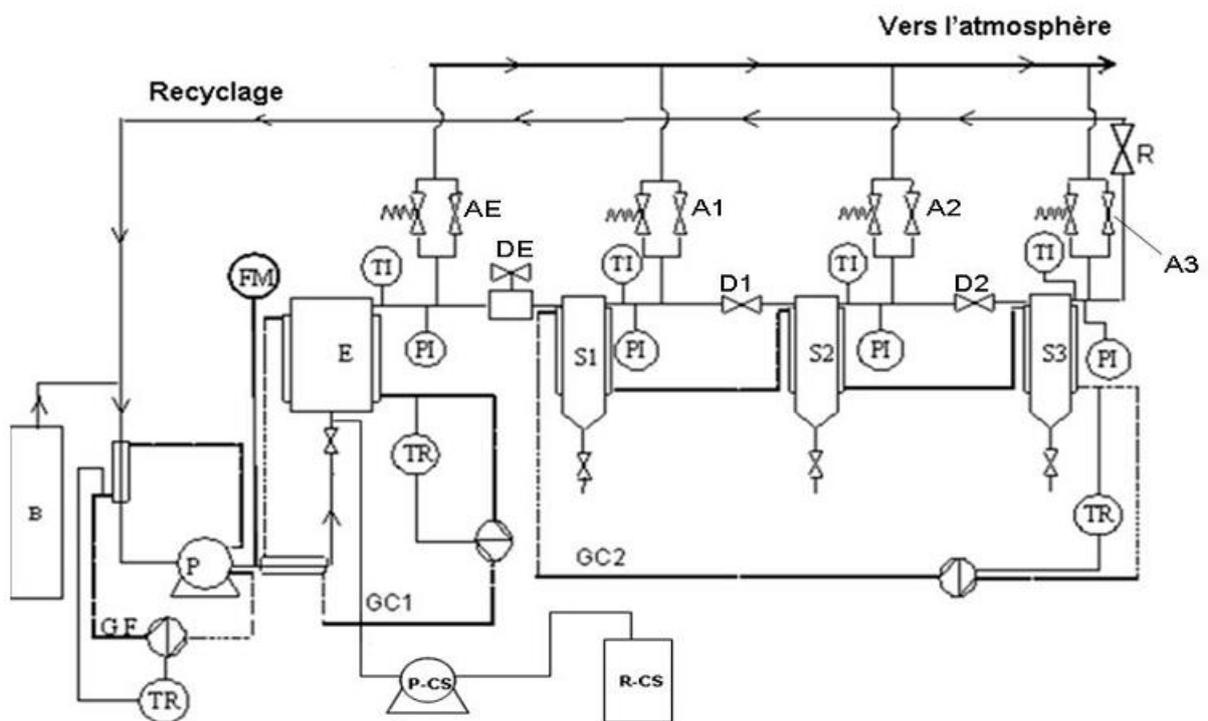


Figure II. 11 : Schéma de l'installation d'extraction supercritique SFE200

Les conditions opératoires (températures, pression et débit de CO₂) sont maintenues constantes. En effet, les températures sont réglées à l'aide d'un système de contrôle de température comprenant les groupes chauds **GC1** et **GC2** et des échangeurs de chaleur « doubles enveloppes » autour de l'extracteur et des trois séparateurs **E**, **S1**, **S2** et **S3**. Deux vannes de contrôle **D1** et **D2** sont utilisées pour contrôler les pressions dans les séparateurs **S1** et **S2**.

Sur la **Figure II. 11**, les symboles **TI** et **PI** représentent respectivement les indicateurs de température et de pression. Ces indicateurs sont reliés à un enregistreur (Endress + Hauser) permettant l'enregistrement du profil de ces grandeurs au cours du temps d'extraction. Les **TR** représentent aussi des régulateurs de la température des groupes chauds et du group froid. Le système peut fonctionner en circuit fermé ou ouvert. En effet, à la sortie de l'extracteur et de chaque séparateur, se trouve une vanne d'évacuation vers l'atmosphère (**AE**, **A1**, **A2** et **A3**, respectivement) permettant de diriger le solvant vers l'évent (circuit ouvert) et de recycler le CO₂ (circuit fermé) en fermant ces vannes et en ouvrant la vanne de recyclage **R**. Dans ce cas le CO₂ passe par une ligne de recyclage.

Cette installation permet également de travailler avec un co-solvant. Il est introduit par la pompe HPLC P-CS à partir du réservoir de co-solvant R-CS, et mélangé avec le CO₂ juste avant l'entrée de l'extracteur. Nous avons utilisé cette installation seulement dans le cas où nous avons eu besoin d'un co-solvant.

II.4.1. Mise en fonctionnement

Le protocole de mise en fonctionnement suit pratiquement les mêmes étapes que pour l'installation précédente sauf que dans ce cas, nous avons utilisé un co-solvant (éthanol). Les étapes se succèdent dans l'ordre suivant :

- a. Mettre en fonctionnement l'appareil et régler la température de l'extraction.
- b. Préparer la cellule d'extraction, qui contient les graines à extraire tel que montré sur la figure II.12 : une quantité de graines broyées est pesée directement dans la cellule d'extraction préalablement tarée en utilisant une balance analytique d'une précision de 0,1mg.
- c. La cellule est ensuite fermée par un fritté et placée dans l'extracteur. La fermeture se fait par l'intermédiaire d'une bride métallique munie d'un joint PTFE et de vis (Figure II. 13).



Figure II. 12 : Remplissage de la cellule d'extraction



Figure II. 13: Mettre la cellule dans l'extracteur

- d. Remplir l'éprouvette avec de l'éthanol et régler le débit à 2 ml/min (Figure II. 14)
- e. Vérifier que toutes les vannes sont en position fermée.
- f. Amener le CO₂ vers l'extracteur après avoir ajusté la pression et le débit. Ouvrir d'abord la vanne de la bouteille du CO₂, ensuite celle d'arrivée du gaz.

Chapitre II : Matériel et méthodes

- g. Ouvrir la vanne d'arrivée du solvant.
- h. Laisser circuler le CO₂ et le co-solvant dans l'installation un temps suffisamment long pour saturer l'extracteur (30 min).
- i. Contrôler le niveau de remplissage de l'éprouvette et rajouter l'éthanol avant qu'elle ne soit complètement vide.
- j. Après 30 min d'extraction, la vanne entre l'extracteur et le séparateur est ouverte pour permettre le passage du CO₂ et l'huile dans l'extracteur.
- k. On ouvre les déverseurs des trois extracteurs et on règle la pression.
- l. Bien surveiller le débit tout au long de l'extraction,
- m. Faire les prélèvements en ouvrant les vannes des trois extracteurs (Figure II. 11)
- n. L'extraction continue jusqu'à éclaircissement de la couleur de l'éthanol traduisant ainsi l'épuisement de la matière végétale (155 min)
- o. L'extrait est récupéré dans un ballon préalablement taré (Figure II. 16), et le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C.
- p. L'huile récupérée est pesée pour calculer le rendement de l'extraction, puis transférée dans des petits flacons pour conservation à -20°C.

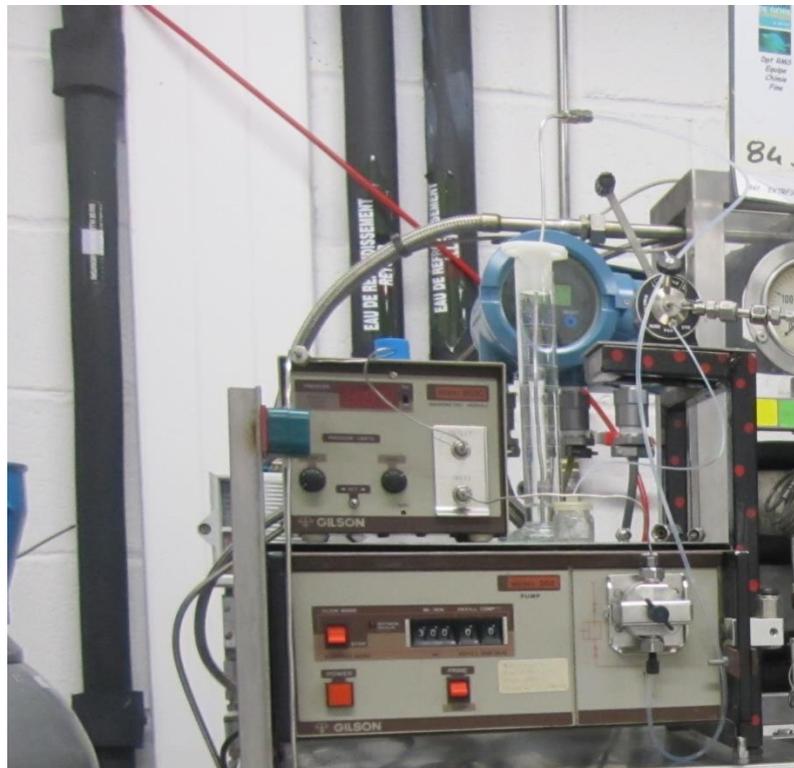


Figure II. 14 : Remplissage de l'éprouvette avec le solvant et réglage du débit



Figure II. 15: Les trois extracteurs



Figure II. 16 : Récupération de l'huile et du solvant

Calcul du rendement :

Le rendement de l'extraction est calculé comme suit

$$R = (\text{Masse de l'extrait} / \text{Masse de la matière solide}) * 100$$

II.5. Analyse des acides gras

II.5.1. Préparation des AGME

La préparation des esters méthylés des acides gras a été réalisée dans notre laboratoire par une transésterification directe selon le protocole suivant : la dérivatisation des acides gras est réalisée selon la méthode de Lange [150] avec quelques modifications. 3 ml de NaOH 0,5 M (dissous dans du méthanol) sont ajoutés à 0,1 g de l'huile. Le mélange est mis à incuber à 100 °C pendant 5 min dans un bain d'eau pour dissoudre les lipides. Après refroidissement à température ambiante, 2ml de BF₃ dans le méthanol (14 % p / v) sont ajoutés et l'échantillon est mis à incuber à 100 °C pendant 30 min dans un bain d'eau.

A la fin de ce temps, le mélange est rapidement refroidi dans un bain de glace avant l'addition de 1 ml d'hexane pour l'extraction. L'échantillon est agité vigoureusement après l'addition de 1 ml de solution de NaCl à 0,6 % p / v. Pour une meilleure séparation des phases, le mélange est placé dans un réfrigérateur. Le surnageant est recueilli et 1,0 ml d'hexane est ajouté au mélange. Après forte agitation suivie d'une décantation, le surnageant obtenu est ajouté à la fraction précédente. L'échantillon est concentré à un volume final de 1,0 ml et stockée à -20°C jusqu'à l'analyse par une analyse par GC-MS.

II.5.2. Analyse par GC-MS

L'analyse des acides gras a été réalisée au Laboratoire des interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique de la Faculté de Pharmacie de l'université Paul Sabatier de Toulouse sous la direction du Professeur Djalloul Bouajila.

L'analyse quantitative et qualitative des acides gras méthylés de l'ensemble des extraits obtenus (huile de pépins de melon et de pépins de courge) a été effectuée par chromatographie phase gazeuse Varian Star 3400 Cx (Les Ulis, France) équipée d'une colonne capillaire de silice DB-5ms (5% phénylmethylpolysyloxane, 30 mm ; 0.25 mm ; 0.25 µm épaisseur de phase). La température de démarrage du four est de 60°C, elle s'élève ensuite à raison de

Chapitre II : Matériel et méthodes

5°C/min jusqu'à 260°C. Puis atteint 340°C à raison de 40°C/min avec un temps total d'analyse de 57 minutes.

Pour l'analyse, 1 µl de l'échantillon est injecté dans le rapport du mode split 1 :10. De l'hélium (pureté 99,999%) est utilisé comme gaz vecteur à 1 mL/min. L'injecteur fonctionne à 200°C et le spectromètre de masse (Varian Saturn CG-SM-SM-4D) est ajusté pour un courant d'émission de 10 mA et la tension de multiplicateur d'électrons entre 1400 et 1500 V. Le piège température était de 220°C et celle de la ligne de transfert était de 250°C ; la numérisation de masse était de 40 à 650 uma.

Les composés ont été identifiés par comparaison de leur RI (indice de rétention) par rapport aux étalons obtenus après leurs injection dans les mêmes conditions. Les étalons injectés sont les esters suivants : palmitate de méthyle, stéarate de méthyle, linoléate de méthyle et un mélange de 37 acides gras méthylés Supelco 37-FAME Mix 47885-U). La composition de chaque extrait en pourcentage est calculée par la méthode de normalisation des aires des pics CG. Les résultats sont calculés en faisant la moyenne des valeurs de deux injections de l'huile.

Chapitre III : Résultats et discussion

Partie I : Analyse chimique des pépins et identification des acides gras

Cette partie est consacrée à la présentation des différents résultats expérimentaux concernant la composition chimique et minérale des pépins de melon de la région de Boukhnaiss et des pépins de courge récoltés dans région d'Ouled Hamou. Les deux régions sont situées dans la wilaya de Tlemcen dans l'extrême nord-ouest de l'Algérie. Nous présenterons également les résultats des analyses de la GC et la GC-MS en rapport avec la composition en acides gras de l'huile obtenue par une extraction conventionnelle au Soxhlet avec l'hexane comme solvant. Une partie de ces résultats a fait l'objet d'une publication dans le journal *Med. J. Chem.*

I. Analyse de la composition chimique des pépins de melon et de courge

I.1. Pépins de melon

L'analyse chimique de la poudre sèche de pépins de melon montre la présence d'un taux d'humidité de 6,03%, tandis que les cendres représentent 4,06%, et les lipides comptent pour 30,7%. Des études sur d'autres espèces de *Cucumis melo* sont citées dans la littérature et ont montré une similitude avec celle que nous avons traitée, *Cucumis melo* L. *Inodorus*. Le tableau ci-dessous regroupe ces résultats.

Tableau III. 1 : Comparaison de la composition chimique des pépins de melon (*Cucumis melo* L. *Inodorus*) avec ceux de la littérature

Composition (%)	Notre travail*	<i>Cucumis melo</i> var. <i>inodorus</i> [151]	<i>Cucumis melo</i> hybrid AF-522 [123]	<i>Cucumis melo</i> var. <i>saccharinus</i> [152]
Humidité	6,0	4,9	7,7	6,0
Cendre	4,0	2,4	4,2	3,9
lipide	30,7	25,0	30,8	32,3

*Les mesures ont été faites trois fois et la moyenne citée est la moyenne de ces mesures.

Les pépins de melon contiennent 30,7 % d'une huile jaune-clair. Des valeurs similaires concernant l'huile ont été rapportées par De Melo 30,8 % [123] et De Mello 32,3% [152] dans les graines de *Cucumis melo* hybride et *Cucumis melo* var. *Saccharinus* respectivement. Une teneur plus faible, donnée par Yanty *et al* [151], est de 25% dans les pépins de melon

Chapitre III : résultats et discussion

(*Cucumis melo var. Inodorus*), par contre la teneur la plus élevée (40 %) a été signalée par Sorho *et al* [153] dans les graines de melon (*amaris Cucumis*).

Les teneurs en humidité et en cendres représentent 6,0% et 4,01 % respectivement ; ces valeurs restent similaires à celles rapportées par De Melo *et al* [123] et De Mello *et al* [152] à savoir 7,7% ; 4,2% ; et 6,0% ; 3,9% respectivement. Des teneurs plus faibles ont été mentionnées par Yanty *et al* [151].

I.2. Pépins de courge

L'analyse chimique de la poudre sèche des pépins de courge (*Cucurbita moschta* Duch. *Butternut*) montre la présence d'un taux d'humidité de 7,23% et les cendres représentent 4,2%. Des études sur d'autres espèces de pépins de courge sont citées dans la littérature et ont montré également une similitude avec celle que nous avons traitée. Le tableau ci-dessous regroupe ces résultats. Ainsi, les lipides comptent pour 37,8%. Cette valeur reste inférieure à celle mentionnée par Olaofe *et al* [124], ainsi que par Salgin et Korkmaz [154] avec des taux de 51,4% et 47,2% respectivement. Ces résultats montrent que l'huile de pépins de courge est plus riche en huile que celle du melon.

Tableau III. 2 : Comparaison de la composition chimique des pépins de courge (*Cucurbita moschta* Duch. *Butternut*) avec les résultats de la littérature.

	<i>Cucurbita moschta</i> <i>Butternut</i> (Notre étude)	<i>Telfairia accidentalis</i> [124]	<i>Cucurbita pepo</i> [154]
Humidité (%)	7,23	6,96	6,93
Lipides (%)	37,8	51,4	47,2
Cendres (%)	4,2	4,95	-

II. Teneur en minéraux

II.1. Pépins de melon

Le tableau III.3 montre la teneur en minéraux dans les pépins de melon (*Cucumis melo L.Inodorus*). La plus élevée des valeurs est celle du potassium avec 509,80 mg/100 g de matière sèche, suivie par le magnésium, le calcium et le sodium avec des teneurs modérées

Chapitre III : résultats et discussion

(respectivement 101,71 ; 55,39 ; et 41,17 mg/100g). Ceci est en accord avec les résultats rapportés par Olaofe *et al* [124] et Milovanovic *et al* [122] sur deux autres variétés de melon. Le manganèse, le cuivre, le fer et le zinc comptent respectivement des teneurs de 1,59; 0,83; 4,90 et 4,65 mg/100g. Ces taux sont comparables à ceux trouvés par Olaofe *et al* [124] et Milovanovic *et al* [122].

Tableau III.3: Comparaison de la composition en minéraux dans les pépins de melon (*Cucumis melo* L. *Inodorus*) avec celle de la littérature

Minéraux	Teneurmg/100g		
	Notre travail	Pépins de melon [124]	Pépins de melon [122]
Cadmium	0,004	-	-
Fer	4,901	5,8	4,2
Cuivre	0,833	2,8	1,78
Plomb	0,107	-	-
Manganese	1,593	3,3	-
Nickel	0,090	-	-
Magnésium	101,715	657,7	210
Calcium	55,392	130,7	103,5
Potassium	509,804	1140,0	770
sodium	41,176	118,0	-
Zinc	4,656	9,6	3,9

D'après les résultats du tableau III.3, les minéraux trouvés dans les pépins de melon sont pratiquement tous des éléments essentiels pour l'organisme, à l'exception du cadmium. Le potassium représente la valeur la plus élevée, ce qui correspond à une teneur considérée comme appropriée pour une nutrition correcte. En effet, cet élément participe au maintien de l'équilibre acido-basique du corps et à la transmission de l'influx nerveux, comme il est essentiel aux contractions musculaires, y compris celles du muscle cardiaque. De plus, il participe au bon fonctionnement des reins et des glandes surrénales.

Vient ensuite le magnésium en une teneur très intéressante : cet élément intervient de manière déterminante dans près de 700-800 mécanismes biochimiques fondamentaux de l'organisme. Ainsi, on le trouve dans la régulation de la tension artérielle en jouant le régulateur de l'ouverture du canal ionique du calcium. A ce niveau, il contrôle l'activité cellulaire en contrôlant la concentration intra cellulaire des ions calcium. Par ailleurs, il intervient dans la production de l'énergie par sa participation à la formation de l'ATP et du coenzyme Q10. A ce titre, cet élément se retrouve en forte concentration dans des organes parmi les plus consommateurs d'énergie comme le cœur, les poumons et le foie.

Depuis quelques années déjà, des preuves expérimentales probantes et de plus en plus nombreuses ont été fournies pour permettre de dire que plusieurs pathologies cardiaques et cardiovasculaires telles que les attaques cardiaques, l'arythmie cardiaque, l'hypertension artérielle, l'angine de poitrine, etc..., sont dues à un déficit de magnésium [155, 156, 157]. Bien évidemment, loin d'avoir l'intention de nous étendre sur les bienfaits du magnésium, dans la mesure où ceci nous éloignerait de l'objet principal de notre thèse.

Le calcium est présent aussi en quantité considérable, ce dernier contribue à la formation des dents et des os, à condition qu'il ne soit pas consommé en excès, dans la mesure où il contribue à l'élimination du magnésium, à la calcification du squelette et des vaisseaux sanguins, à la rigidification du myocarde, etc....

II.2. Pépins de courge

La détermination des teneurs en métaux dans les pépins de courge (*Cucurbita moschata* Duch.*Butternut*) a été réalisée en suivant les mêmes étapes que pour les pépins de melon. Le tableau III.4 donne les résultats comparés à la littérature.

Chapitre III : résultats et discussion

Tableau III.4: Comparaison de la composition en minéraux dans Pépins de courge (*Cucurbita moschata* Duch. *Butternut*) avec celle de la littérature

Les minéraux (mg/100g de pépins)	Pépins de courge <i>Cucurbita moschata</i> <i>Butternut</i> (Notre étude)	Pépins de courge (<i>Cucurbita sp</i>) (PKSY) [126]	Pépins de courge (<i>Cucurbita sp</i>) PKSN [126]
Calcium	7,140	42,9	26,7
Magnesium	246,12	500	400
Potassium	394,80	600	700
Sodium	5,04	~ 20	~ 20
Manganèse	2,184	~ 3,5	~ 3,7
Fer	6,72	~ 12,25	~ 8,2
Cuivre	0,252	~ 1,25	~ 1,25
Zinc	6,72	~ 5,2	~ 7,5

PKSY : graines non décortiquées ; PKSN : graines décortiquées

Les macro-éléments les plus abondants dans les pépins de courge (*Cucurbita moschata* Duch. *Butternut*) sont le potassium et le magnésium avec les teneurs respectives 394,8mg/100g et 246,12mg/100g. Cette observation est en accord avec les travaux de Jumbe *et al* [126] concernant les pépins de courge Tanzanien (*Cucurbita sp*) analysés avec et sans enveloppe (PKSY et PKSN). 7,14 g seulement de calcium sont retrouvés dans 100 g de pépins de courge. Un taux très faible par rapport à celui obtenu dans les graines de courge (PKSY et PKSN).

Les micro-éléments tels que le sodium, le fer et le zinc sont les plus abondants avec des teneurs comparables à ceux obtenus dans les pépins de courge (*Cucurbita sp*, PKSY et PKSN). Tous les éléments sont présents dans les pépins de melon et de courge avec des teneurs comparables à l'exception du calcium et du sodium qui représentent des teneurs plus élevées dans les pépins de melon que dans ceux de la courge.

III. Extraction de l'huile et caractérisation des indices physico-chimiques

L'extraction de l'huile a été réalisée avec le *n*-hexane dans un *soxhlet* pendant 6 h sur une masse de 15g de graines de melon. A la fin de l'extraction, le solvant est évaporé grâce à un évaporateur rotatif sous vide, en chauffant à 40°C. L'huile obtenue est de couleur jaune, elle

Chapitre III : résultats et discussion

est récupérée et conservée dans des flacons ambrés, bien fermés après un barbotage de l'azote, puis stockée dans un congélateur à -20 °C. L'expérience a été refaite plusieurs fois et le rendement moyen en huile de pépins de melon est de 30,77%

Une détermination des paramètres physico-chimiques de l'huile fournit des informations globales sur leur teneur en acides gras libres par la détermination de l'indice d'acide (I.A), sur la masse moléculaire moyenne des acides gras obtenus, par l'indice de saponification (I.S) et sur le nombre de doubles liaisons par la mesure de l'indice d'iode (I.I). Les résultats de ces indices ainsi que l'indice de réfraction et la densité de l'huile sont donnés dans le tableau III.5.

Tableau III.5 : Comparaison des indices physico-chimiques de l'huile de pépins de melon (*Cucumis melo* L. *Inodorus*) avec ceux de la littérature.

Indices	Notre étude	Huile de pépins de Melon [152]	Huile de pépins de Melon [123]	Huile de pépins de Melon [153]
Densité (25°C, g/mL)	0,897±0,001	0,949±0,002	0,900±0,001	0,90±0,002
Indice de réfraction (25°C)	1,4707±0,003	1,478±0,0015	1,482±0,0120	1,47±0,002
Indice d'acide (mg KOH/g oil)	4,01±0,02	1,8±0,10	2,06±0,15	6,06±0,02
Indice de peroxyde (meq/Kg)	2,25±0,05	4,0±0,03	4,96±0,10	34,4±0,04
Indice d'iode (g I ₂ /100g d'huile)	104,52±0,48	109,6±0,55	112±1,82	117,2±0,71
Indice de saponification (mg KOH/g d'huile)	193,6±0,85	191,4±0,90	210,62±0,53	192,3±0,95

Les expériences sont faites trois fois

Nous avons comparé nos résultats avec ceux de la littérature, et avons observé une similitude dans les différents indices. En effet, la densité de notre huile est de 0,897 g/ml, légèrement inférieure à celle donnée par De Mello [152], de Melo [123] et Sorho [153] avec 0,949g/ml, 0,9g/ml et 0,9g/ml respectivement. Ceci correspond aux valeurs de *Cucumis melo hybrid*,

Chapitre III : résultats et discussion

Cucumis melo var. saccharinus et *Cucumis melo amariss* respectivement. Les mêmes auteurs ont montré une similitude dans l'indice de réfraction qui donne une valeur de 1,4707. La valeur élevée de l'indice de réfraction indique la présence d'acides gras à double liaisons conjuguées [158].

L'indice de saponification (193mg KOH/g) révèle que cette huile a une composition prépondérante en acides gras à 18 atomes de carbone [128]. Elle est en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature dont l'indice de saponification est compris entre 191,404mg KOH/g et 210,62mg KOH/g d'huile.

L'indice d'iode (104,52 g I₂/100g d'huile) est légèrement inférieur aux valeurs indiquées par De Mello [152], de Melo [123] et Sorho [153] qui sont comprises entre 109,606 g I₂/100g et 117,02 g I₂/100g d'huile. Selon la classification de Jamieson, notre huile est définie comme étant semi siccative, car son indice d'iode est compris entre 101,5 g I₂/100g et 121,1 g I₂/100g d'huile [159].

Les indices d'acide et de peroxyde acceptables selon les critères de qualité pour les huiles et graisses comestibles provenant du codex standard 19-1981 sont indiqués dans le tableau ci-dessous (Tableau III.6).

Tableau III.6 : Critères de qualité des graisses et huiles alimentaires (indices d'acide et de peroxyde) selon le codex standard, 1981.

Indices	Teneurs acceptables
Indice d'acide	
Huiles raffinées	0,6 mg KOH/g d'huile
Huiles obtenues par pression et huile vierge	4,0 mg KOH/g d'huile
Indice de peroxyde	
Huiles vierge et huiles pressées à froid	Jusqu'à 15 Meq (O ₂)/kg d'huile

L'indice d'acide de notre huile est de 4,01 mg KOH/g d'huile, une valeur supérieure à celle obtenue par De Mello et De Melo (1,8 et 2,06 respectivement) et inférieure à celle trouvée chez Sorho (6,06 mg KOH/g). Cette valeur montre que l'huile contient très peu d'acides gras libres et correspond bien aux critères de qualité pour les huiles et graisses comestibles provenant du codex standard 19-1981 (Tableau III.6).

L'indice de peroxyde vaut 2,25 Meq (O₂)/kg, valeur inférieure aux valeurs trouvées par De Mello et De Melo (4,00 et 4,96 Meq (O₂)/kg) ; il reste acceptable selon les critères de qualité pour les huiles comestibles du codex standard, 1981 [160].

IV. Analyse par chromatographie phase gazeuse de l'huile des pépins de melon

IV.1. Estérification des acides gras

Les lipides sont tout d'abord saponifiés par l'action d'une solution d'hydroxyde de potassium dans du méthanol, puis estérifiés par une solution de BF₃ dans un excès de méthanol selon le protocole cité dans la partie expérimentale. Avant de procéder à l'analyse par CPG, l'estérification a été préalablement confirmée par une analyse IR qui a montré la disparition de la bande d'absorption dans la région 3200-2500 cm⁻¹, caractéristique de la fonction carboxylique et la présence de la bande d'absorption caractéristique de la fonction carbonyle C=O à 1744,21 cm⁻¹, tout comme les bandes de vibration de C-O à 1170,19 cm⁻¹, 1195,56 cm⁻¹, et à 1242,03 cm⁻¹. Le groupe méthyle est observé à 2926,64 cm⁻¹ et à 2854,83 cm⁻¹ (Figure III.1).

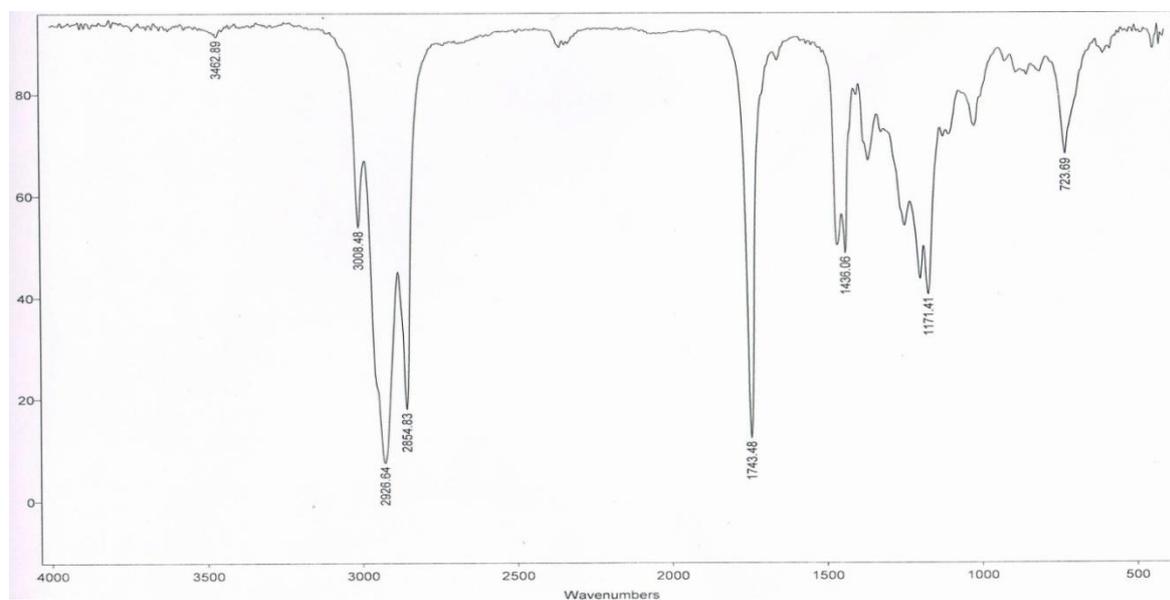


Figure III.1 : Spectre IR des esters méthylique d'acides gras de l'huile de pépins de melon

IV.2. Analyse par la GC-MS

Après plusieurs essais durant lesquels nous avons modifié le gradient de température, dans le but d'améliorer la séparation chromatographique des acides gras, nous avons pu avoir le chromatogramme suivant (Figure III.2)

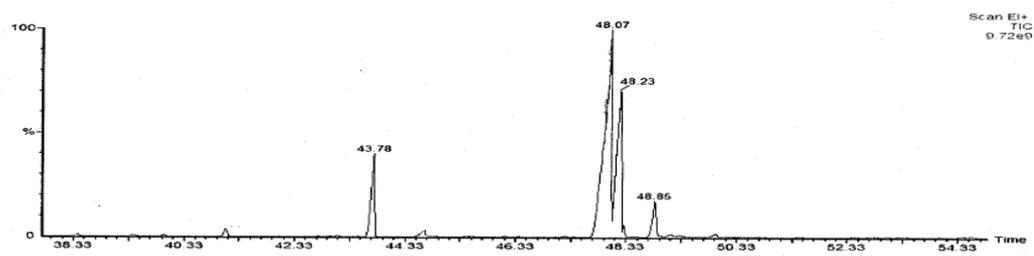


Figure III.2 : Chromatogramme GC-MS des acides gras estérifiés de l'huile de pépin de melon

Le chromatogramme montre la présence de quatre acides gras majoritaires. Leur identification a été effectuée par comparaison des temps de rétention des étalons de référence à ceux de l'échantillon (figure III.3).

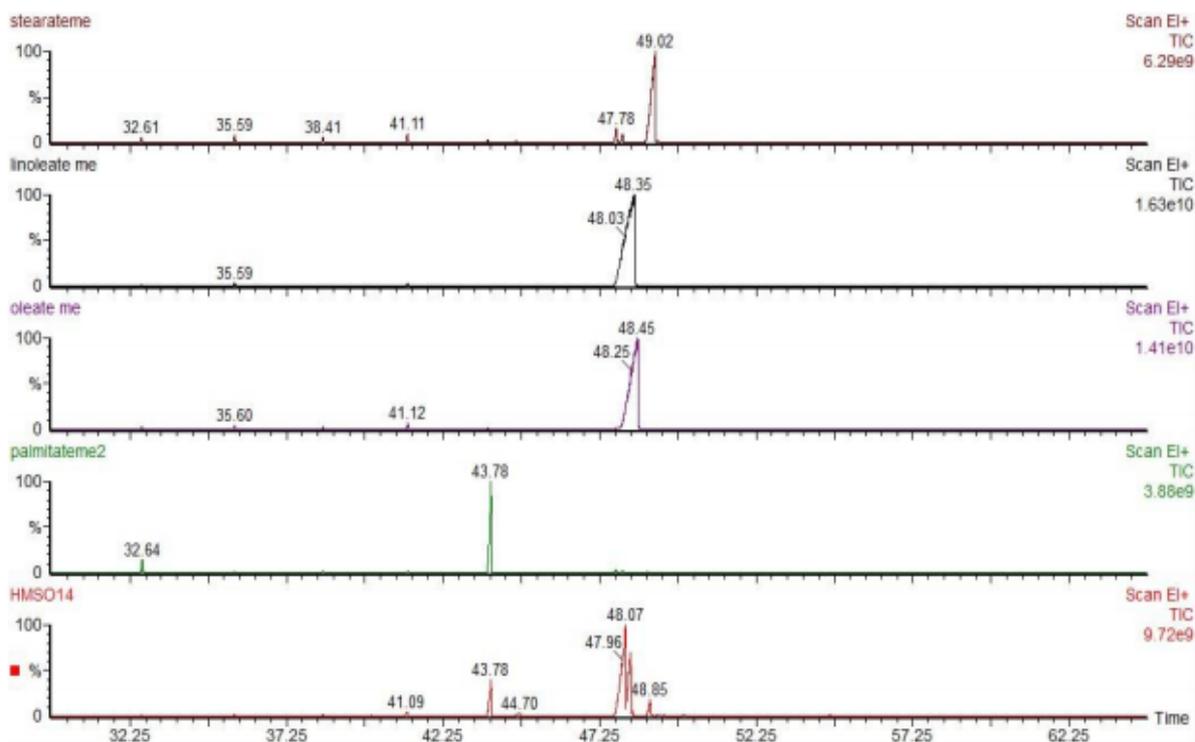


Figure III.3 : Chromatogrammes GC/MS des étalons et de l'échantillon

Chapitre III : résultats et discussion

Les pics identifiés dans l'extrait de l'huile de pépins de melon sont les suivants :

- Palmitate de méthyle, temps de rétention (TR) =43,78 min.
- Linoléate de méthyle, temps de rétention (TR) =47,96 min.
- Oléate de méthyle, temps de rétention (TR) =48,07 min.
- Stéarate de méthyle, temps de rétention (TR) = 48,85 min.

Ce résultat a été confirmé par les spectres de masses de la base de données créée au laboratoire. Cette dernière a été confectionnée à partir des injections en GC/MS des étalons commerciaux (Supelco) existant au laboratoire COSNA, dont les temps de rétention sont indiqués dans le tableau III.7.

La quantification des acides gras a été effectuée en calculant l'aire de chaque pic, et les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau III.7 : Identification des acides gras estérifiés.

	Acides gras	Masse moléculaire	Temps de rétention (min)	%
A	Palmitate de méthyle C16:0	270,45	43,80	10,1
B	Linoléate de méthyle C18:2	294,47	48,19	60,1
C	Oléate de méthyle C18:1	296,48	48,36	25,3
D	Stéarate de méthyle C18:0	298,50	48,92	4,5

Les spectres de masse de quatre esters d'acides gras majoritaires identifiés sont représentés dans la figure III.4.

Chapitre III : résultats et discussion

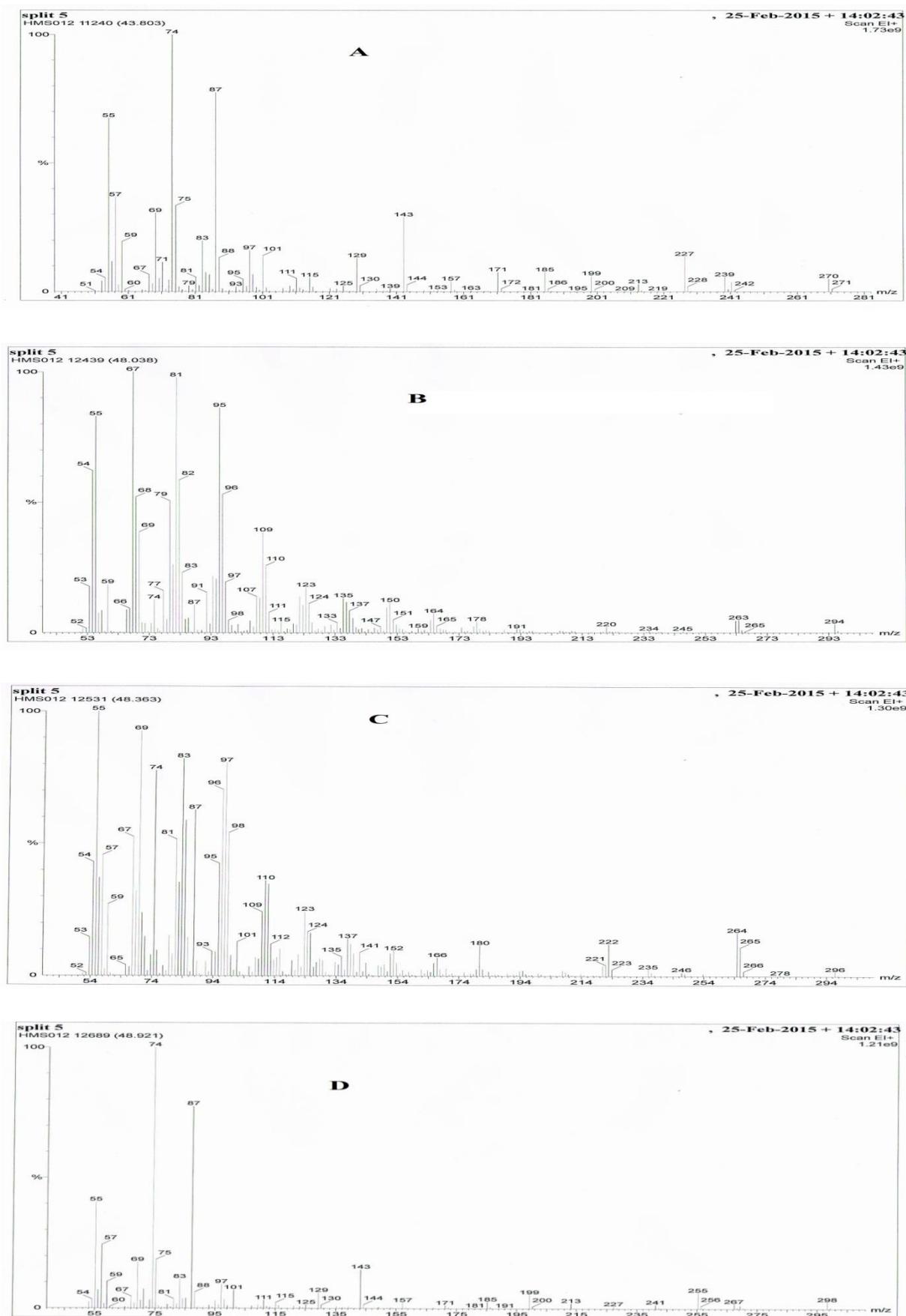


Figure III.4 Spectres de masse des quatre acides gras majoritaires.

Le pic de base dans les spectres de masse des esters méthyliques des acides gras saturés (stéarate **D** et palmitate de méthyle **A**) est observé à $m/z = 74$ et correspond au fragment $\text{CH}_3\text{OC}(=\text{OH}^+)\text{CH}_2$ résultant du réarrangement de McLafferty, suivi d'une fragmentation alpha [161].

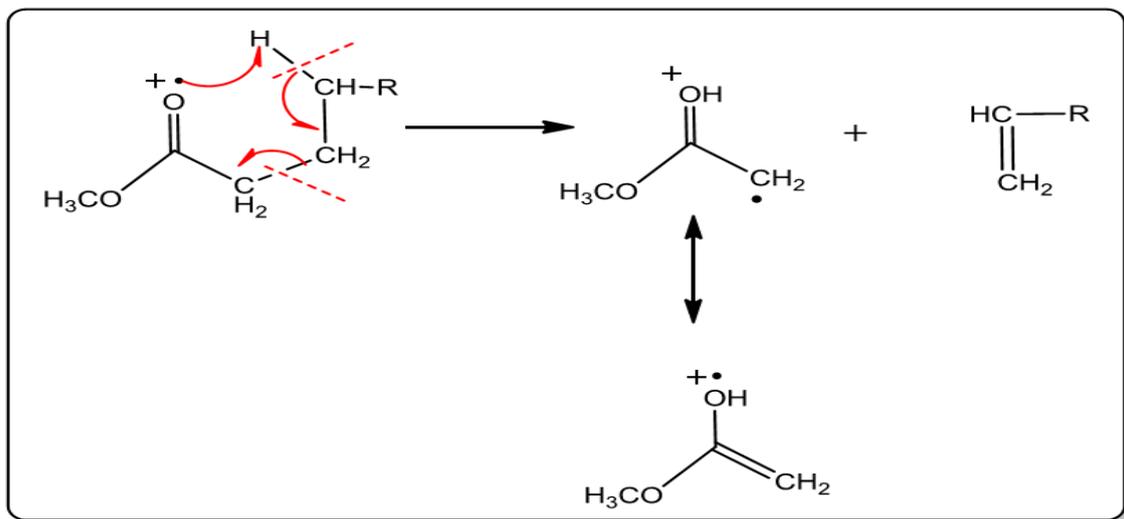


Figure III.5 : Réarrangement de McLafferty

Pour l'ester d'acide gras monoinsaturé (oléate de méthyle **C**), le pic de base est observé à $m/z = 55$. L'ion moléculaire est clairement visible, il correspond à $m/z=297$ et l'ion $m/z=264$, correspond à M-32 (perte de la molécule de méthanol). Le fragment $m/z=222$, correspond à M-74. Par ailleurs, les fragmentations du linoléate de méthyle (**B**), acide gras polyinsaturé, sont identifiées par un pic de base à $m/z = 67$, correspondant au fragment $[\text{C}_n\text{H}_{2n-3}]^+$ avec $n=5$. L'ion $m/z= 220$, correspond à M-74 (réarrangement de McLafferty) tandis que le fragment $m/z=263$ correspond à M-31 résultant de la perte du groupe méthoxy.

L'huile de pépins de melon que nous avons étudiée comporte un nombre important d'insaturations. Ces dernières se retrouvent principalement dans les acides linoléique et oléique qui comptent dans le mélange pour 60,1% et 25,3% respectivement. Les acides palmitique et stéarique représentent respectivement 10,1% et 4,5%. Nous avons comparé dans le tableau suivant cette composition avec les huiles provenant d'autres types de melon et avec d'autres huiles végétales telles que l'huile de palme, l'huile de tournesol, l'huile de courge et l'huile de soja (Tableau III.8) :

Chapitre III : résultats et discussion

Tableau III.8 : Comparaison de la composition en acides gras avec d'autres huiles.

Acides gras	Notre étude	Huile de melon [152]	Huile de melon [123]	Huile de courge (<i>Cucurbita maxima Amazonka</i>) [127]	Huile de palme [162]	Huile de tournesol [162]	Huile de soja [162]
Myristique	-	0,073	0,04	-	1,1	-	0,1
Palmitique	10,1	8,51	9,52	13,1	44,0	-	11,0
Stéarique	4,5	6,089	4,89	6,10	4,5	4,5	4,0
Oléique (25,3	31,5	19,42	35,9	39,2	21,1	23,4
Linoléique	60,1	51,6	64,13	42,6	10,1	66,2	53,2
Linoléinique	-	0,190	0,20	0,25	0,04	-	7,8
AGS	14,6	15,36	15,2	20,3	49,9	11,3	15,1
AGMI	25,3	32,10	20,1	36,8	39,2	21,1	23,4
AGPI	60,1	51,79	64,3	43,0	10,5	66,2	61,0

AGS : Acide Gras Saturé, **AGMI** : Acide Gras Mono-Insaturé, **AGPI** : Acide Gras Poly-Insaturé

Nous avons constaté que la composition de l'huile de pépins de melon (*Cucumis melo L. Inodorus*) est semblable à celle de l'huile des deux autres variétés de melon. Elle varie entre 15,2% et 15,36% pour les acides gras saturés, entre 20,1% et 25,3% pour les monoinsaturés et entre 51,79% et 64,3% pour les polyinsaturés.

Nous pouvons aussi signaler que la teneur en acides gras saturés de notre huile est légèrement supérieure à celle du tournesol (11,3%) tout en restant inférieure à celle du soja et de la courge. Pour sa part, l'huile de palme présente une teneur en acides gras saturés de 49,9%, ce qui est compréhensible par sa forte teneur principalement en acide palmitique, d'où son nom.

Pour les acides monoinsaturés, la teneur de notre huile est de 25%, légèrement supérieure à celle de l'huile de soja et de tournesol mais inférieure à celle de la courge et celle de palme. Cependant, la teneur en acides gras polyinsaturés est supérieure de celle de la courge et celle de palme ; par contre, elle est semblable à celle de soja et de tournesol.

V. Analyse des acides gras dans les pépins de courge

Nous avons étudié la composition en acide gras de l'huile des graines de courge de la même façon que pour les pépins de melon. Les résultats de la GC-MS ont conduit à la composition représentée dans le tableau III.9.

Tableau III.9: Identification des acides gras dans l'huile des pépins de melon (*Cucumis melo*L. *Inodorus*) et de courge (*Cucurbita moschata* *Butternut*).

Acides gras (%)	Melon (<i>Cucumis melo</i> L. <i>Inodorus</i>)	Courge(<i>Cucurbita moschata</i> <i>Butternut</i>)
Palmitic C16:0	10,1	15,01
Linoleic C18:2	60,1	50,75
Oleic C18:1	25,3	31,02
Stearic C18:0	4,5	3,22
AGS	14,6	18,23
AGMI	25,3	31,02
AGPI	60,1	50,75

Nous avons remarqué que l'huile de pépins de courge contient plus d'acides gras polyinsaturés, représentés par l'acide linoléique 50,75%, suivis par l'acide oléique avec 31,02%. Les acides gras saturés sont présents à hauteur de 18,23%.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Nawirska-Olszanska *et al* [127] qui ont étudié la composition en acides gras de 12 variétés de courge : ils ont trouvé l'acide linoléique majoritairement avec une teneur se situant entre 42,0% et 59,2%. L'acide oléique se retrouve avec une teneur comprise entre 22,1% et 36,2%, l'acide palmitique entre 10,7% et 13,3% et l'acide stéarique, le moins abondant, avec une teneur variant entre 5,28% et 6,99%.

Dans le tableau, il se trouve que l'huile de pépins de melon contient une teneur plus élevée en acide linoléique que celle de pépins courge. Toutefois, les deux huiles restent très riches en acides gras polyinsaturés, comparables à d'autres huiles végétales.

VI. Dosage de polyphénols de l'extrait alcoolique de pépins de melon

VI.1. Extraction par macération

L'extraction a été faite à température ambiante pendant 6h avec deux solvants différents, le méthanol et l'éthanol. Les rendements ainsi que l'aspect de l'extrait sont représentés dans le tableau III.10 suivant :

Chapitre III : résultats et discussion

Tableau III.10 : Rendement de l'extraction par macération

	Ethanol	Méthanol
Rendement (g/100g de MS)	16,8	16
Aspect	une pâte jaune	une pâte jaune

Nous avons obtenu un rendement de 16g/100g de matière sèche pour une extraction dans le méthanol, un taux similaire à l'extraction par l'éthanol avec 16,8g/100g de matière sèche. L'extrait obtenu est une pâte jaune.

VI.2. Dosage des polyphénols

Les teneurs en composés phénoliques totaux dans les extraits ont été déterminées par spectrométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Pour estimer ces teneurs, nous avons établi une courbe d'étalonnage de l'acide gallique à différentes concentrations à l'aide d'un programme Excel. La teneur des polyphénols est exprimée en μg équivalents d'acide gallique par g de l'extrait brut (μg EAG/g d'extrait).

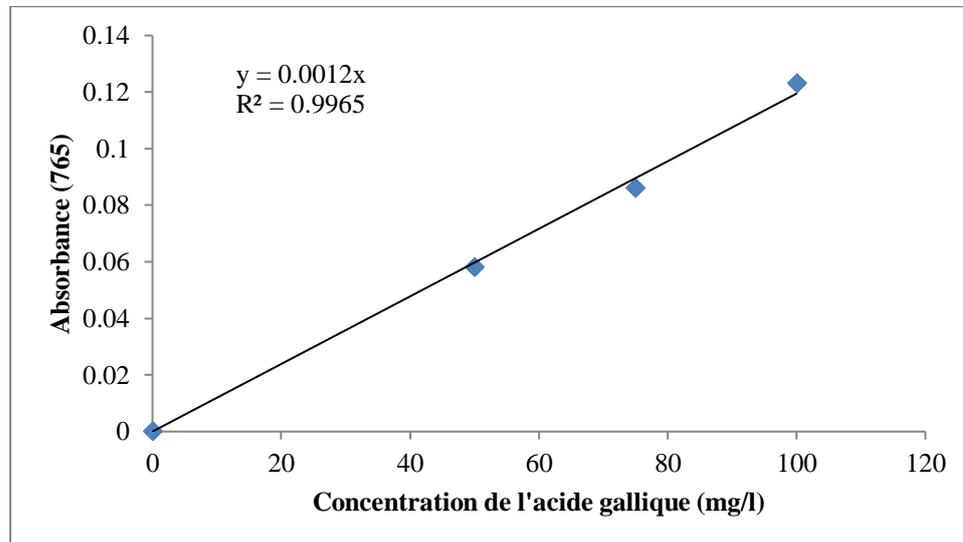


Figure III.6: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les résultats du dosage de polyphénols de nos extraits sont représentés dans le tableau III.11.

Chapitre III : résultats et discussion

Tableau III.11 : Dosage des polyphénols des extraits alcooliques de pépins de melon

	Ethanol	Méthanol
Teneur des phénolstotaux ($\mu\text{g/g}$)	364,82	238,93

Nous remarquons que la valeur la plus élevée a été obtenue avec l'extrait éthanolique (364,82 $\mu\text{g AG/g}$). L'extrait méthanolique donne une teneur de (238,93 $\mu\text{gAG/g}$). Ceci peut être lié à une solubilité des polyphénols des pépins de melon dans chacun des solvants. Il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature en raison d'un manque de données bibliographiques concernant le dosage des polyphénols dans les pépins de melon (*Cucumis melo Inodorus*). Cependant, nous avons constaté que nos résultats ne concordent pas avec ceux de Ismai *et al*[163] ayant obtenu une teneur en polyphénols de 2850 $\mu\text{g AG/g}$ d'extrait de pépins de melon Cantaloupe (*Cucumis melo*) et ceux de Lei Chen *et al* [164] qui ont obtenu une teneur de 1712 $\mu\text{g AG/g}$ de l'extrait éthanolique des pépins de melon oriental (*Cucumis melo L.var MakuwaMakino*).

Ces différences dans la littérature peuvent être attribuées principalement à la variété de la matière végétale, en plus de plusieurs facteurs à savoir la méthode d'extraction et la méthode de quantification. Par ailleurs, les facteurs climatiques et environnementaux (la zone géographique et la sécheresse), la période de la récolte et le stade de développement de la plante peuvent également influencer sur l'estimation de la teneur en polyphénols.

Généralement, les lipides, les protéines, les résines et les cires constituent une partie majoritaire dans les graines. Ainsi, plusieurs auteurs ont déjà montré que les métabolites secondaires les plus abondants dans les graines de cucurbitacées sont les tocophérols et les stérols [165].

VII. Conclusion partielle

Dans ce chapitre, nous avons étudié la composition chimique des pépins de melon et de courge en termes de pourcentage d'humidité de cendres, de lipides ainsi que la teneur des métaux. Nous avons ensuite étudié la composition de l'huile de pépins des deux cucurbitacées en acides gras en utilisant la chromatographie phase gazeuse couplée à la masse. Les différents résultats ont été comparés à ceux de la littérature.

Chapitre III : résultats et discussion

Nous avons constaté que l'huile de pépins de melon (*Cucumis melo L. Inodorus*) et celle de la courge (*Cucurbita moschata Butternut*) constituent une source très importante en minéraux notamment le potassium et le magnésium, lesquels jouent des rôles majeurs dans l'organisme humain.

Les teneurs en lipides des pépins de melon et courge sont respectivement 30,77% et 37,8% ; ils constituent de ce fait une source non négligeable d'huiles végétales contenant une teneur en acides gras polyinsaturés de 60,1% pour le melon et 50,7% pour la courge, dont principalement l'acide linoléique, de la famille des oméga-6. Ce dernier est un acide gras essentiel car il participe à une multitude de processus importants, entre autres, la constitution et l'intégrité des membranes cellulaires, le bon fonctionnement des systèmes cardiovasculaire, cérébral, hormonal et inflammatoire, etc. La consommation et l'absorption d'oméga-6 permettent au corps de fabriquer des substances primordiales pour son bon fonctionnement.

Cependant, ces pépins qui sont souvent négligés et considérés comme des déchets alimentaires peuvent être valorisés en tant que compléments alimentaires, à des fins nutritionnelles, pharmaceutiques ou encore cosmétiques.

Partie II : Extraction de l'huile des deux Cucurbitacées, le melon et la courge avec le CO₂ supercritique

Cette partie est consacrée à la présentation de différents résultats obtenus suite à l'extraction de l'huile de pépins de melon et de pépins de courge avec la technologie du CO₂ supercritique. Dans cette partie, nous avons étudié l'influence de quelques paramètres à savoir le temps, la pression, la température, et l'ajout du co-solvant sur le rendement ainsi que sur la composition en acides gras des huiles obtenues.

Nous avons également déterminé la solubilité de l'huile de pépins de melon et celle de pépins de courge dans le CO₂ supercritique. Les résultats obtenus sont comparés avec la solubilité théorique de l'huile déterminée selon la théorie de Chrastil, de Del Valle-Aguilera, d'Adachi et avec la solubilité de quelques huiles végétales. Tout ceci permet une comparaison entre les résultats des pépins de courge et ceux du melon.

I. Les expérimentations sur les pépins de melon

Cette étude a été réalisée sur le melon (*Cucumis melo L. Inodorus*) récolté dans une autre région de l'Algérie, à proximité d'Oran. L'installation pilote (SFE 1000 bar) a été utilisée pour ces extractions.

I.1. La cinétique d'extraction

Afin de déterminer le temps nécessaire pour l'extraction de l'huile de pépins de melon par le dioxyde de carbone supercritique, une expérience permettant d'évaluer la cinétique d'extraction a été réalisée. Lors de cette étude, 12g de pépins de melon (*Cucumis melo L. Inodorus*) séchés, broyés et tamisés ont été utilisés. L'extraction a été réalisée à un débit de CO₂ de 15g/min. La taille des particules est de l'ordre de 1,12 mm. La pression et la température sont maintenues constantes à 400 bar et 40°C respectivement.

La matière première est chargée dans une cellule d'extraction qui est ensuite pesée avant d'être positionnée dans l'extracteur. Ce dernier est alors fermé et le CO₂ est admis avec un débit constant. La pression et la température dans l'extracteur et dans le séparateur sont maintenues également constantes. En fin d'extraction, la cellule est à nouveau pesée afin d'estimer la perte de masse, qui représente la masse de l'huile. Lors des expériences servant à établir la cinétique d'extraction, l'extrait obtenu est pesé toutes les 10 minutes. A partir de ces mesures nous avons construit la courbe cinétique d'extraction.

Les résultats concernant la cinétique d'extraction sont présentés en traçant l'évolution de la fraction de masse extraite (g extrait/100g matière solide) en fonction du temps d'extraction estimé à 155 min (Figure III.7).

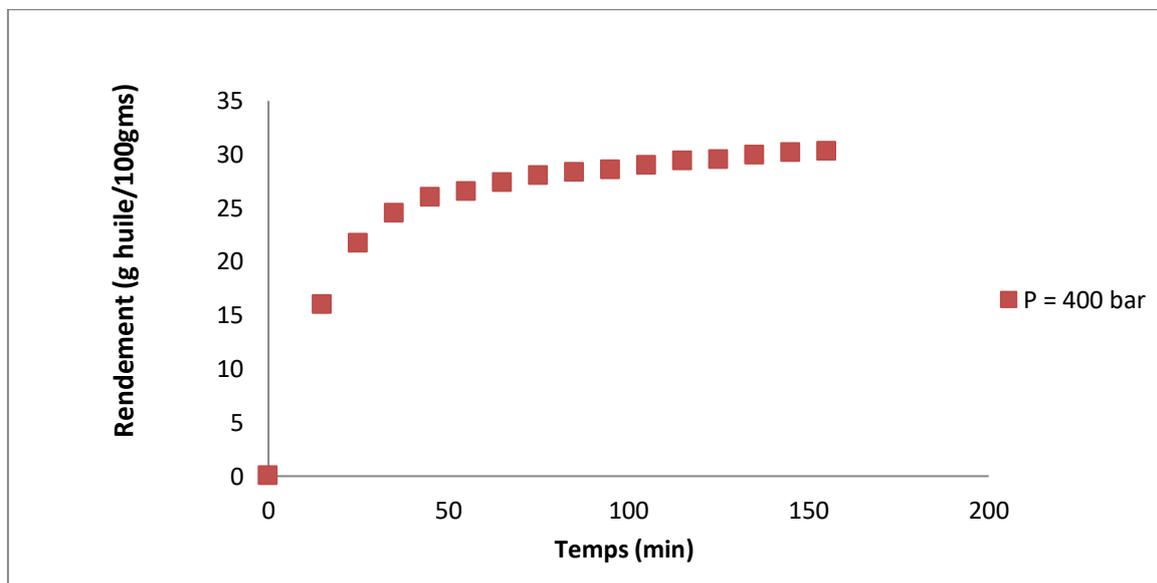


Figure III.7 : Rendement d'extraction de la fraction lipidique du melon (*Cucumis melo* L. *Inodorus*) en fonction du temps d'extraction, T = 40°C, P = 400 bars

La courbe montre que l'extraction ralentit fortement au bout d'environ 55 minutes. Cependant, 100 minutes supplémentaires d'extraction ont été ajoutées pour s'assurer de l'épuisement de la matière extractible. Pour les quinze premières minutes qui correspondent à la première partie de la courbe, l'huile est aisément disponible sur la surface du solide et par conséquent elle est facilement extraite par le fluide supercritique avec une vitesse rapide et constante. Pour cette étape, le processus d'extraction est dominé par la solubilité de l'huile dans le CO₂ ou la résistance externe au transfert de matière.

Après cette étape, le rendement en extrait d'huile augmente beaucoup plus lentement jusqu'à une valeur pratiquement constante à la fin du processus d'extraction. La deuxième partie de la courbe peut être expliquée par le fait que l'huile superficielle était épuisée et, à partir de ce moment, elle est extraite à partir des couches plus profondes du substrat remplies par le solvant. En ce moment, la diffusion et les résistances internes de transfert de masse dominent le processus d'extraction. Afin de mettre plus clairement en évidence le régime d'extraction, la vitesse de l'extraction (mg huile/min) a été tracée en fonction de la quantité de CO₂ consommée (Figure III.8)

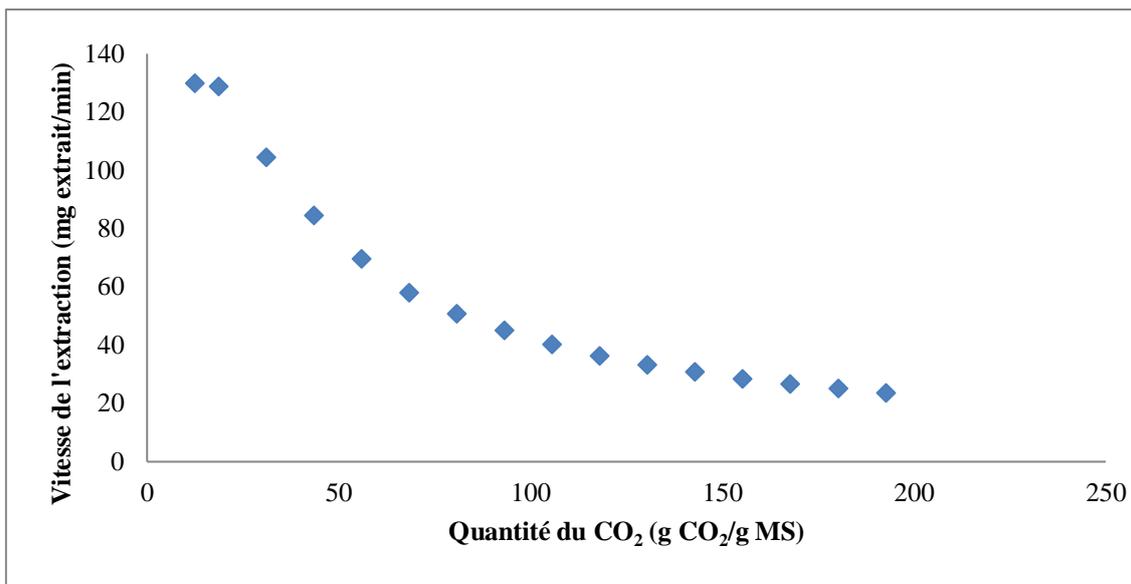


Figure III.8 : Vitesse moyenne d'extraction en fonction de la quantité du CO₂ par g de la matière première, T= 40 °C, P=400 bars

La figure I.2 montre une courbe typique d'extraction supercritique, sur laquelle on peut distinguer trois périodes. Pendant la période initiale, relativement courte, la vitesse d'extraction est élevée et constante. Cela correspond à l'extraction du soluté facilement accessible se trouvant à la surface des particules. Pendant cette période, le processus est essentiellement contrôlé par la solubilité des solutés dans le CO₂ et/ou le transfert de matière externe autour de la particule.

Pendant la deuxième période, la vitesse d'extraction commence à diminuer. Cette période correspond à une extraction simultanée des substances se trouvant à la surface, mais aussi à l'intérieur des particules (c.à.d. certaines zones dans la cellule sont en limitation de la solubilité/transfert externe et d'autres en limitation diffusionnelle). La troisième période est caractéristique d'une vitesse d'extraction diminuant plus faiblement par rapport à la période précédente. Le soluté sur la surface est déjà consommé et le processus continue à faible vitesse, déterminée par le transfert à partir des cellules internes (contrôlé par la résistance interne). Notre système d'extraction correspond donc à un système de cinétique standard.

I.2. Influence du temps, de la température et de la pression sur le rendement de l'extraction.

Dans le but d'étudier l'influence du temps, de la pression et de la température sur le rendement de l'extraction, nous avons établi la cinétique d'extraction de l'huile de pépins de melon en variant la pression de 250 à 700 bars à température constante (40°C). Ensuite, nous avons varié la température de 40°C et 70°C avec une pression à 550 bars et 40°C et 57°C à 700 bars. Le tableau III.12 ci-dessous donne l'ensemble des expériences réalisées avec leurs rendements respectifs après 155 min.

Tableau III.12 : Rendement (g huile/100 g de MS) de différentes expériences après 155 min

	T (°C)	P (bar)	Rendement (g huile/100g MS)
A	40	250	22,6
B	40	400	30,4
C	40	550	32,3
D	40	700	33,8
C	40	550	32,4
E	70	550	33,2
D	40	700	33,8
F	57	700	34,1
-	Soxhlet (n-hexane)	-	34,5

MS : matière sèche

I.2.1. Influence du temps sur le rendement

L'effet du temps d'extraction dynamique sur l'extraction des fractions lipidiques des pépins de melon a été étudié en traçant la courbe cinétique d'extraction pour des pressions de 250, 400, 550 et 700 bars tout en gardant la température et le débit constants à 40°C et 15g/min respectivement (figure III.9).

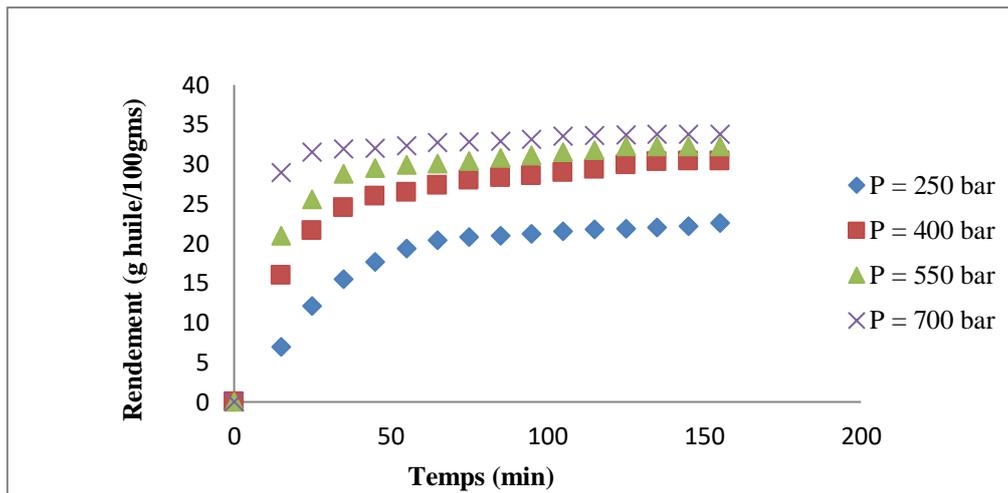


Figure III.9: Cinétique d'extraction de l'huile de pépins de melon par le CO₂ supercritique à différentes pressions à 40°C, Durée d'extraction = 155 min, débit = 15g/min

La figure I.3 montre comment l'allongement du temps d'extraction accroît l'efficacité de l'extraction de l'huile et après un certain temps dynamique, le rendement continue à augmenter légèrement pour les différentes pressions.

I.2.2. Influence de la pression sur le temps et le rendement

Dans le but d'étudier l'effet de la pression sur le temps et le rendement de l'extraction de l'huile de pépins de melon, nous avons tracé un histogramme qui donne le rendement de l'extraction en fonction de la pression à des temps de 25, 45, 75 et 155 min. Les résultats sont représentés dans la figure III.10

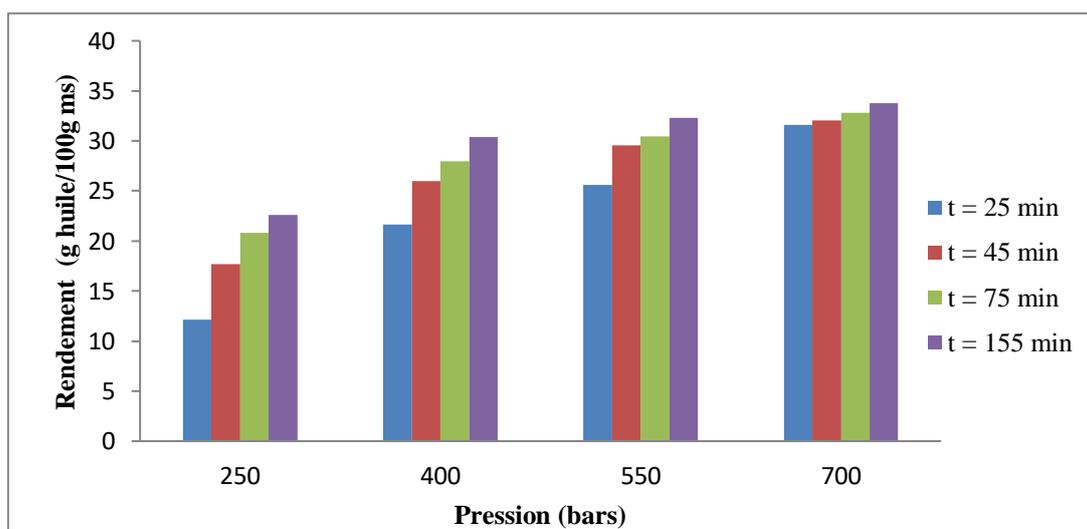


Figure III.10 : Rendement de l'extrait total supercritique à différentes pressions à 40 °C. Durée d'extraction = 35, 45, 75 et 155 min

L'histogramme montre une augmentation du rendement avec la pression pour atteindre une valeur maximale similaire à celle obtenue par la méthode conventionnelle (34,1%) à 700 bar après les 155 min. On remarque qu'à 25 min le rendement atteint 12,12% à 250 bar et après 155 min, on obtient 22,6% de rendement. Cependant, la valeur de 21,67% est obtenue après 25 min à 400 bar. Or à 700 bar, la quasi-totalité de l'extrait est obtenue après 45 min. Ceci peut être attribué à l'augmentation de la solubilité avec le pouvoir solvant du CO₂ à haute pression en raison de l'augmentation de sa masse volumique. Donc, l'augmentation de la pression augmente le rendement en diminuant le temps d'extraction.

Cependant, une pression d'extraction élevée favorise l'extraction des composés lourds tels que lipides ou les cires. Ces conditions sont mentionnées à plusieurs reprises dans la littérature [91, 87]. Ainsi, dans le cas de l'extraction de substances naturelles et spécialement les fractions volatiles, une basse pression est préférable pour assurer une extraction sélective envers les fractions volatiles [88, 90, 93].

I.2.3. Influence de la température sur le rendement

Pour étudier l'influence de la température sur le rendement de l'extraction, nous avons tracé deux histogrammes qui représentent les rendements en huile en fonction de la température, à 25, 45, 75, et 155 minutes pour une pression de 550 et de 700 bar. Les résultats sont représentés dans les Figures III.11 et III.12.

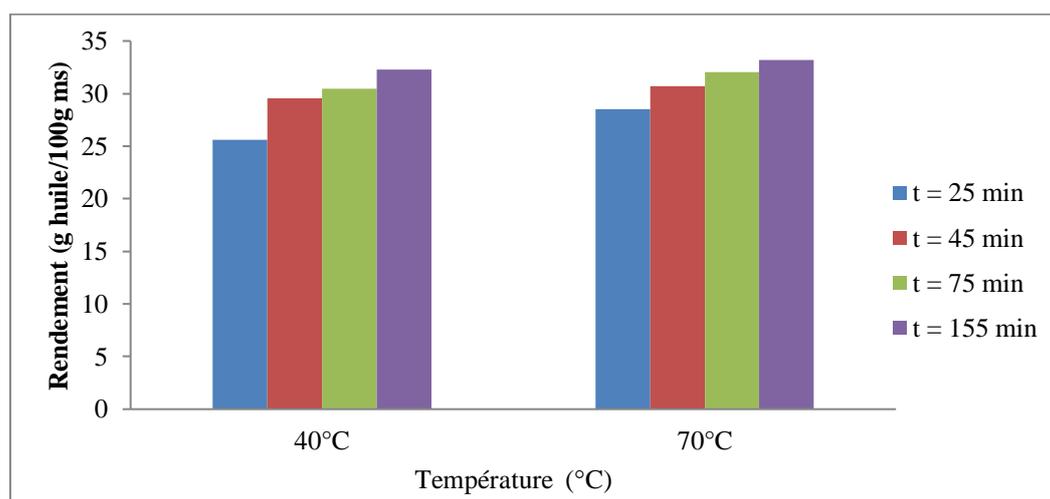


Figure III.11 : Rendement de l'extrait total supercritique à 40 et 70°C. Pression 550 bar, durée d'extraction = 35, 45, 75 et 155minutes

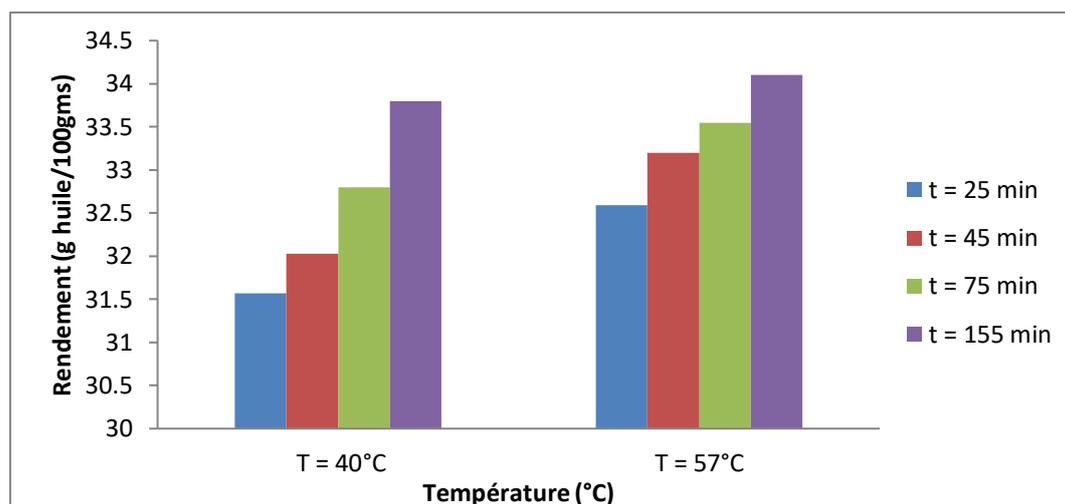


Figure III.12 : Rendement de l'extrait total supercritique à 40 et 57°C ; durée de l'extraction = 35, 45, 75 et 155 minutes

L'histogramme de la **figure I.5**, montre qu'une augmentation de la température de 30°C n'influe pas significativement sur le rendement global de l'extraction (32,3% à 40°C et 33,2% à 70°C). Cependant, pour la pression de 550 bar, on obtient un rendement de 30,45% après 75 min à 40°C, alors que ce même rendement 30,73%, est obtenu après 45 min à 70°C. Pour une pression de 700 bar, le rendement global de l'extraction est de 33,8% à 40°C. Une augmentation de la température à 57°C modifie légèrement le rendement pour atteindre 34,1%. Par contre, on note une légère augmentation du rendement par suite d'une augmentation de la température, avec réduction de la durée de l'extraction. L'effet de la température sur le rendement de l'extraction est lié à l'effet de la solubilité rétrograde bien connu où, lorsque la température augmente, l'augmentation de la tension de vapeur n'est pas suffisante pour compenser la perte de pouvoir solvant en raison de la diminution de la densité du CO₂.

Cependant, d'autres travaux concernant l'effet de la température du processus sur le rendement global montrent que l'augmentation de la température à basse pression diminue le rendement global de l'extraction, alors qu'une augmentation de la température à haute pression accélère le transfert de masse, ce qui améliore le rendement [166, 167]. Par conséquent, il est difficile de prédire l'effet de la température. En outre, il doit être souligné que l'extraction à haute température peut avoir un effet néfaste sur la qualité de l'extrait en raison d'une possible dégradation de molécules sensibles à la température. Ainsi, la possibilité de procéder à l'extraction des composés volatils à basse température est l'un des principaux avantages de la technologie CO₂-SC.

II. Les expérimentations sur les pépins de courge

Cette étude a été réalisée sur les pépins de courge (*Cucurbita moschata* Duch. *Butternut*) de la région de Ouled hamou à Ghazaouet wilaya de Tlemcen. Dans cette étude, nous avons utilisé les deux installations SFE1000 et SFE200 pour l'extraction de l'huile et avons étudié l'influence de la pression et de l'ajout de co-solvant sur le rendement et la composition en acides gras ainsi que sur la solubilité de l'huile dans le CO₂-SC.

II.1. Cinétique de l'extraction

De la même manière que pour l'extraction de l'huile de pépins de melon, nous avons déterminé le temps nécessaire pour l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique. Pour cela, des expériences sur la cinétique d'extraction ont été réalisées. Lors de cette étude, 19g de pépins de courge séchés, broyés et tamisés ont été utilisés. L'extraction a été réalisée à un débit de CO₂ de 15g/min. La taille des particules est de l'ordre de 1,12 mm, tandis que la pression et la température sont maintenues constantes à 400 bar et 40°C respectivement.

L'expérience a été menée de la même manière que pour les pépins de melon et les résultats de la cinétique d'extraction sont présentés en traçant l'évolution de la masse extraite en fonction du temps d'extraction estimé à 155 min. La figure III.13 présente le rendement global d'extrait obtenu par CO₂-SC exprimé en g d'huile/100g de matière sèche (MS) en fonction du temps d'extraction (min).

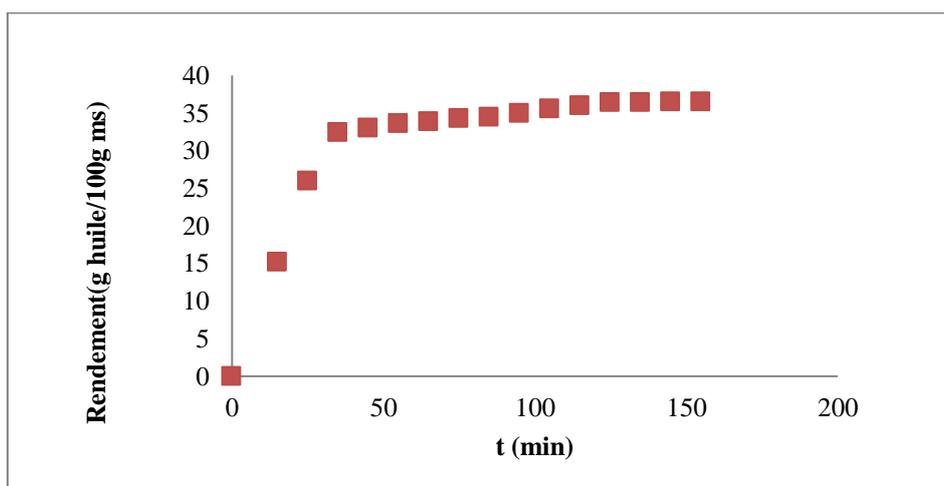


Figure III.13 : Rendement de l'extraction de la fraction lipidique de la courge en fonction du temps ; T = 40°C, P = 400 bar

Comme le montre la courbe, l'extraction semble presque complète au bout de 55 minutes, et dans ce cas aussi, 100 minutes supplémentaires ont été ajoutées pour s'assurer de l'épuisement de la matière extractible. Comme la forme de la courbe le suggère (pseudo-linéarité initiale), l'extraction est principalement limitée par la solubilité de la fraction lipidique dans le CO₂ ou par l'équilibre solide-fluide de la fraction lipidique (solubilité apparente). Nous avons ensuite tracé la courbe de la vitesse de l'extraction en fonction de la quantité de CO₂ consommée (figure III.14). De la même manière que pour les pépins de melon, la courbe est une courbe typique d'extraction supercritique, sur laquelle on peut distinguer trois périodes.

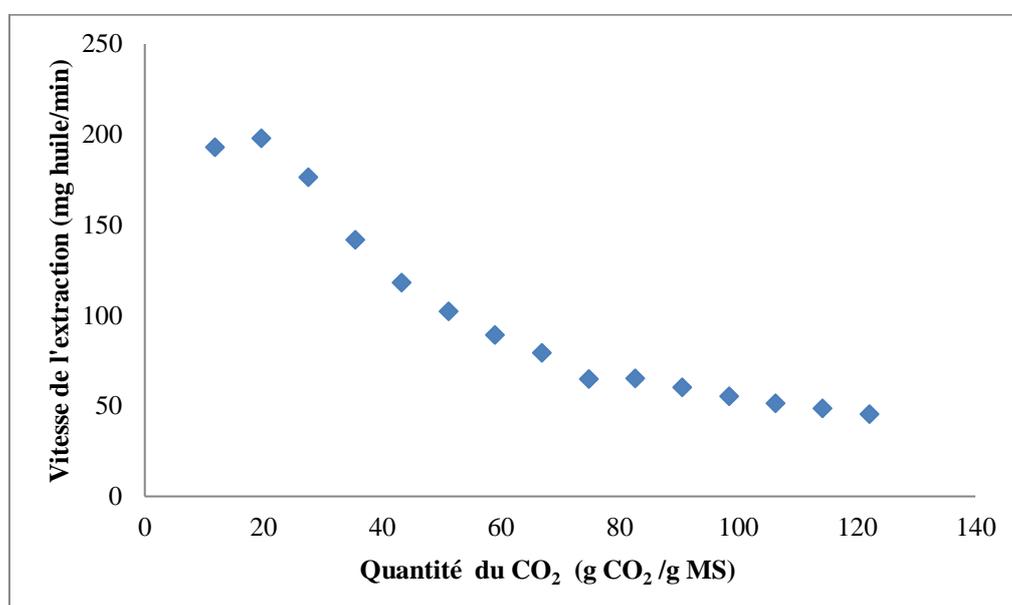


Figure III.14 : Vitesse moyenne d'extraction en fonction de la quantité du CO₂ par g de la matière première, T= 40 °C, P=400 bars

La période initiale, relativement courte, où la vitesse d'extraction est élevée et constante, est contrôlée par la solubilité des solutés dans le CO₂. Dans la deuxième période, la vitesse d'extraction commence à diminuer et la troisième période est caractéristique d'une vitesse d'extraction diminuant plus faiblement par rapport à la période précédente.

II.2. Influence du temps sur le rendement

L'effet du temps d'extraction dynamique sur le rendement d'extraction des fractions lipidiques des pépins de courge a été étudié en traçant la courbe cinétique d'extraction pour

des pressions de 250, 400, 600 et 800 bars tout en gardant la température et le débit fixes à 40°C et 15g/min respectivement. La figure III.15 montre comment un temps plus long accroît l'efficacité de l'extraction de l'huile et, après un certain temps dynamique, le rendement devient constant pour les différentes pressions.

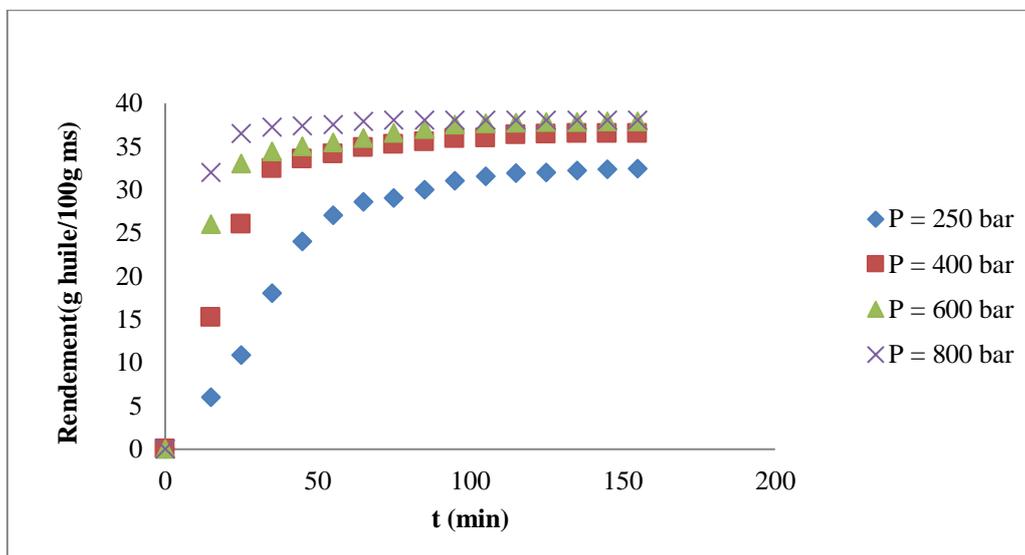


Figure III.15 : Rendement d'extraction de la fraction lipidique de la courge en fonction du temps et de la pression, T = 40°C

II.3. Influence de la pression et du co-solvant sur le rendement

Dans le but d'étudier l'influence de la pression sur le rendement de l'extraction, nous avons varié la pression de (250 à 800 bar) à température constante (40°C). Ensuite nous avons étudié l'influence du co-solvant sur le rendement en utilisant l'éthanol avec un débit de 2mL/min et les expériences ont été menées à 100 et 250 bar. La température est maintenue constante à 40°C et le débit du CO₂ de 15g/min. Le tableau III.13, ci-dessous donne l'ensemble des expériences réalisées avec leurs rendements respectifs.

Tableau III.13 : Rendements des extractions de l'huile de pépins de courge sous différentes conditions.

	P (bar)	T (°C)	Co-solvant	Rendement (g huile/100g MS)
A	100	40	sans	5,5
B	250	40	sans	32,45
C	400	40	sans	36,5
D	600	40	sans	37,89
E	800	40	sans	38,01
F	100	40	Ethanol	14,6
G	250	40	Ethanol	36
	Soxhlet (n-hexane)			37,8

II.3.1. Influence de la pression sur le temps et le rendement

L'influence de la pression sur le temps et le rendement de l'extraction a été évaluée grâce à l'historique relatif au rendement de l'extraction en fonction de la pression et du temps. Les temps appliqués au processus sont respectivement de 25, 45, 75 et 155 min (figure III.16).

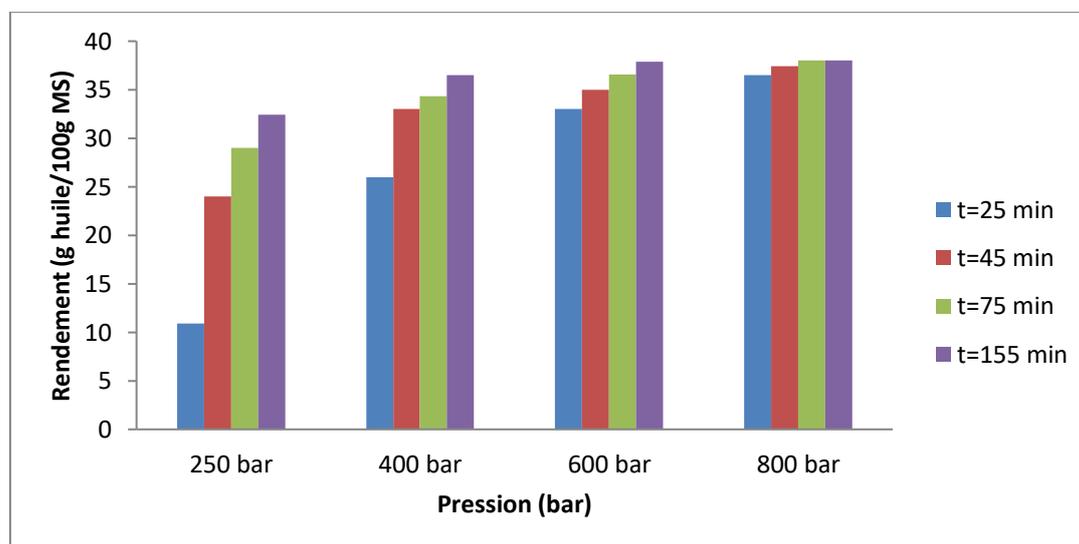


Figure III.16 : Rendement de l'extrait total supercritique à différentes pressions à 40 °C ; durée de l'extraction : 25, 45, 75 et 155 min

Les résultats montrent une augmentation du rendement avec la pression pour atteindre une valeur similaire à l'extrait obtenue par la méthode conventionnelle. L'histogramme montre qu'après 25 min, le rendement est de 10,89% à 250 bar. Après 45 min, il s'élève à 24 %. Par contre, à 400 bar, on obtient 26% de l'extrait après 25 min et 34,32% à 75 min. Un rendement de 35%, légèrement plus élevé, est obtenu après seulement 25 min à 600 bar. A 800 bar, l'extraction est complètement terminée après 75 min avec un rendement de 38%.

Ceci peut être clairement attribué à l'augmentation de la solubilité de l'huile extraite avec l'augmentation du pouvoir solvant du CO₂ à haute pression en raison de l'augmentation de sa masse volumique. On constate qu'une pression de 600 bar est suffisante pour extraire la totalité des huiles de pépin de courge après environ 100 min. Une augmentation de la pression permet l'obtention du même rendement en un temps plus réduit.

II.3.2. Influence du co-solvant.

Pour évaluer l'influence du co-solvant sur le rendement de l'extraction, nous avons mené des extractions à 100 et 250 bars avec et sans co-solvant. Les résultats sont représentés dans les histogrammes des figures III.17 et III.18 suivantes :

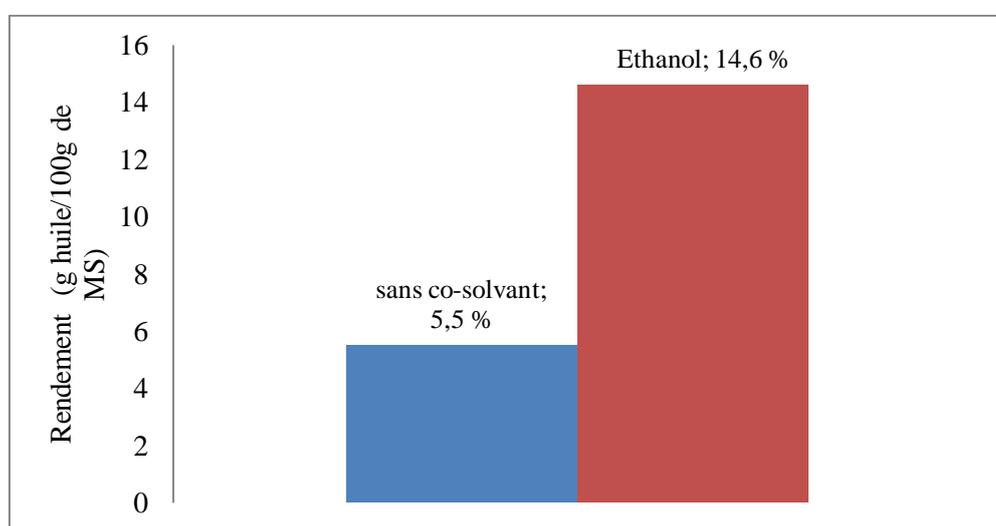


Figure III.17 : Rendement d'extraction global de l'huile de pépins de courge par CO₂ SC avec co-solvant à 100 bars et 40°C.

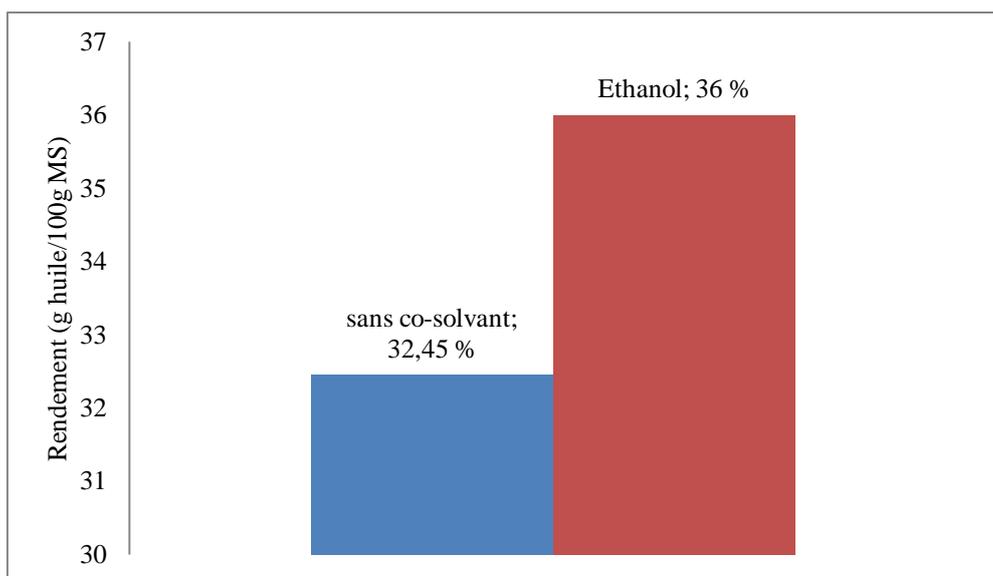


Figure III.18 : Rendement d'extraction global de l'huile de pépins de courge par CO₂ SC avec co-solvant à 250 bar et 40°C.

A 100 bars, le rendement de l'extraction est de 5.5%. Nous avons remarqué que ce rendement augmente de 9.1% avec ajout d'éthanol (passant de 5.5% à 14.6%) et à 250 bars, une augmentation plus faible (de 32.45% à 36%) est observée. Par conséquent et pour les deux pressions utilisées, l'ajout d'un co-solvant améliore nettement le rendement global de l'extrait de pépins de courge. Cependant, bien que l'utilisation de l'éthanol comme co-solvant favorise la solubilité d'autres composants tels que les polyphénols, elle affecte la non-toxicité de la technologie du CO₂-SC, la rendant moins propre, dans la mesure où des traces de solvants souillent l'huile obtenue.

III. Analyse des acides gras par CPG-MS

La dérivation des acides gras en esters méthyliques est la technique la plus utilisée pour l'analyse des lipides par chromatographie en phase gazeuse. Nous avons préparé les esters méthyliques par transestérification selon la méthode de Lange *et al*, décrite dans la partie expérimentale. L'analyse des acides gras a été effectuée au laboratoire des interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique de l'université Paul Sabatier de Toulouse.

III.1. Analyse GC-MS des extraits de l'huile de pépin de melon

Les chromatogrammes GC-MS de tous les extraits obtenus sous différentes conditions d'extraction par CO₂ supercritique ont révélé la présence de quatre acides gras majoritaires (Figure III.19).

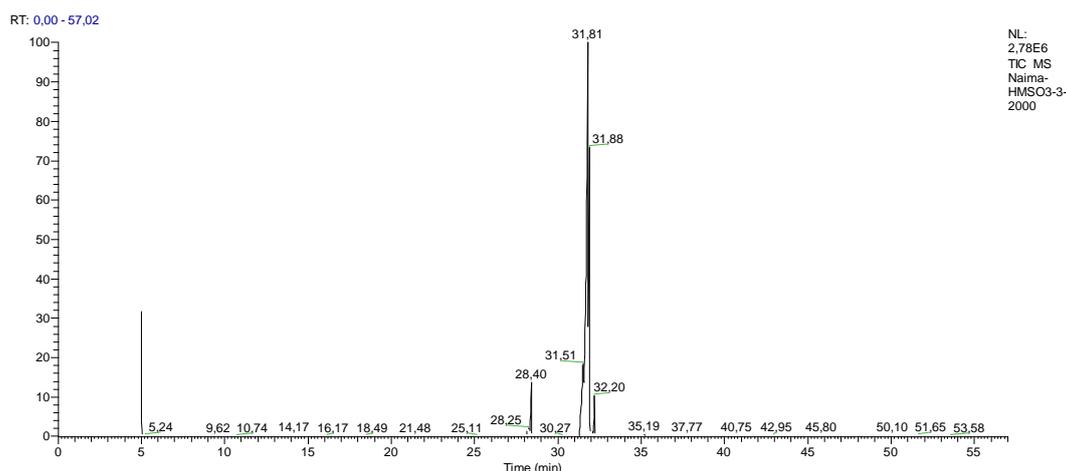


Figure III.19 : Chromatogramme GC-MS des esters méthyliques des acides gras de l'huile de pépins de melon

Tous les extraits présentent le même profil chimique majoritaire, à savoir la présence des acides linoléique, oléique, palmitique et stéarique. La quantification de chaque acide a été effectuée et les résultats sont représentés dans le tableau III.14. Nous n'avons pas constaté de différences significatives de la composition en acides gras de l'huile de pépins de melon (*Cucumis melo L.Inodorus*) extraite sous différentes conditions et elle contient majoritairement l'acide linoléique (teneur variant entre 67.06 et 68.22%), suivi de l'acide oléique entre 21.23% et 22.49%. L'acide palmitique et l'acide stéarique sont présents avec des teneurs qui varient entre (5.57% et 6.23%) et (2.98% et 3.67%) respectivement.

Nous avons comparé ces résultats avec la composition en acides gras de l'huile de pépins de melon de la même région, obtenue par extraction au soxhlet en utilisant l'hexane. Les résultats sont représentés dans le tableau, et nous n'avons constaté aucune différence significative entre les deux compositions.

Tableau III.14 : La composition en acides gras estérifiés de l'huile de pépins de melon extraite par CO₂ supercritique à différentes conditions.

Acide gras	RI (min)	Extrait de Soxhlet (%)	Extraits de SC-CO ₂ (%)					
			A	B	C	D	E	F
Palmitate de méthyle	28,40	5,95	6,10	6,23	5,74	6,21	5,57	6,17
Linoléate de méthyle	31,81	68,22	67,56	67,06	68,07	67,98	68,11	67,87
Oléate de méthyle	31,88	21,95	21,96	22,45	22,10	21,23	21,63	22,49
Stéarate de méthyle	32,20	2,87	2,98	3,07	2,99	3,55	3,67	3,14
AGS		8,82	9,08	9,30	8,73	9,76	9,24	9,31
AGMI		21,95	21,96	22,45	22,10	21,23	2,63	22,49
AGPI		68,22	67,56	67,06	68,07	67,98	68,11	67,87

L'extraction par CO₂ supercritique a été effectuée à haute pression (de 250 à 700 bars), ce qui donne un pouvoir solvant très important au CO₂ supercritique pour les triglycérides. Cette technique reste aussi efficace que l'utilisation d'un solvant organique tel que l'hexane. De nombreuses études ont été menées durant ces vingt dernières années sur l'extraction et le fractionnement de lipides assistés par fluide supercritique [168] comme l'extraction d'huile de colza [169], celles de tournesol, de soja [170], le bœuf haché [171], huile de pépins de raisin [172], de l'huile de palme [173], huile de sardine [174]. Ces études ont montré l'efficacité de cette technologie de par la grande pureté des produits finaux obtenus et dont la nature chimique n'a pas été modifiée par le processus.

III.2. Analyse GC-MS des extraits de l'huile de pépins de courge

Les chromatogrammes GC-MS de tous les extraits obtenus sous différentes conditions d'extraction par CO₂ supercritique ont révélé la présence de quatre acides gras majoritaires (Figure III.20) : les acides linoléique, oléique, palmitique et stéarique pour tous les extraits.

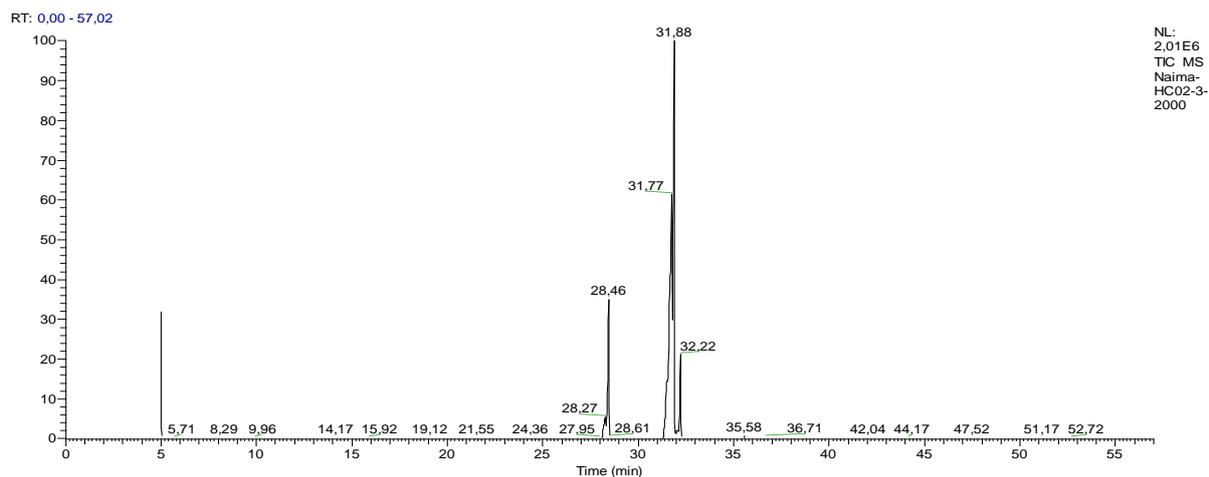


Figure III.20 : Chromatogramme GC-MS des esters méthyliques des acides gras de l'huile de pépins de courge (*Cucurbita moschata* Duch. *Butternut*)

La quantification de chaque acide a été effectuée et les résultats sont représentés dans le tableau III.15

Tableau III.15 : Composition en acides gras estérifiés de l'huile de pépins de courge extraite par CO₂ supercritique sous différentes conditions.

Acides gras	RT (min)	Extraits de SC-CO ₂ (%)						
		Soxhlet	B	C	D	E	F	G
Palmitate de méthyle	28,46	14,74	14,76	14,50	14,07	15,17	14,63	14,76
Linoléate de méthyle	31,77	50,33	50,57	48,34	48,03	48,87	51,68	52,19
Oléate de méthyle	31,88	30,71	30,77	31,95	32,32	31,03	29,66	29,49
Stéarate de méthyle	32,22	4,22	3,90	5,21	5,58	4,94	4,03	3,98
AGS		18,96	18,66	19,71	19,65	20,12	18,66	18,74
AGMI		30,71	30,77	31,95	32,32	31,03	29,66	29,49
AGPI		50,33	50,57	48,34	48,03	48,87	51,68	52,19

Dans ce cas aussi, nous n'avons noté aucune différence significative de la composition en acides gras de l'huile de pépins de courge, extraite sous différentes conditions. Elle contient majoritairement l'acide linoléique avec une teneur qui varie entre 48,03% et 52,68%, suivi de l'acide oléique entre 29,66% et 32,32%. L'acide palmitique et l'acide stéarique sont présents avec des teneurs qui se situent entre (14,07% et 15,17%) et (3,90% et 5,58%) respectivement.

Nous avons comparé ces résultats avec ceux de la composition en acides gras de l'huile de pépins de courge de la même région extraite par soxhlet en utilisant l'hexane. Les résultats sont représentés dans le tableau III.12, et là aussi, nous n'avons constaté aucune différence significative entre les deux compositions.

L'utilisation de l'éthanol comme co-solvant a significativement augmenté le rendement de l'extraction mais ceci n'a pas influé sur la composition de l'huile obtenue en acides gras. Ce résultat est en accord avec les résultats de la littérature qui confirment l'efficacité de la technologie de l'extraction par la technologie du CO₂ supercritique des triglycérides en raison de leurs solubilités importantes à haute pression [167, 175]. Dans le but de mieux comprendre le processus d'extraction par le CO₂ supercritique, nous avons tenté une évaluation de la solubilité de nos extraits dans ce fluide sous différentes conditions.

IV. Mesure de la solubilité de l'huile de pépins de melon et de pépins de courge dans le CO₂ supercritique

La mesure de la solubilité s'avère être primordiale pour la détermination des conditions opératoires optimales d'un procédé dans le but de cibler la composition de l'extrait. Dans cette partie de notre travail, nous avons évalué expérimentalement la solubilité de nos extraits à partir des pentes des courbes qui représentent la masse de l'huile extraite en fonction de la quantité de CO₂ consommée dans les différentes conditions d'extractions. Afin de valider nos résultats expérimentaux, nous les avons comparés à ceux relatifs à la solubilité des huiles végétales, calculée dans les mêmes conditions de pression et température, en utilisant trois équations empiriques développées par Chrastil, Del valle aguilera et Adachi. Une comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature a également été établie.

IV.1 Calcul expérimental de la solubilité des huiles à partir des isothermes d'extraction

Les figures III.21, III.22, et III.23 présentent des isothermes d'extraction sous différentes conditions pour l'huile de pépins de melon et la figure III.24 pour l'huile de pépins de courge. Sur chacune de ces figures, on remarque une période initiale pendant laquelle le rendement d'extraction évolue linéairement en fonction de la quantité de CO₂. Cette phase correspond à un processus contrôlé par la solubilité. La pente de la partie linéaire de l'isotherme peut servir à la détermination d'une valeur approximative de la solubilité apparente de la substance extraite dans le fluide supercritique. La masse du CO₂ est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Quantité du CO}_2(\text{gCO}_2/\text{g MS}) = (D \times t)/M_{\text{MS}}$$

D: Débit de l'expérience (15g/min)

M_{MS}: masse de la matière sèche

t: temps de l'extraction

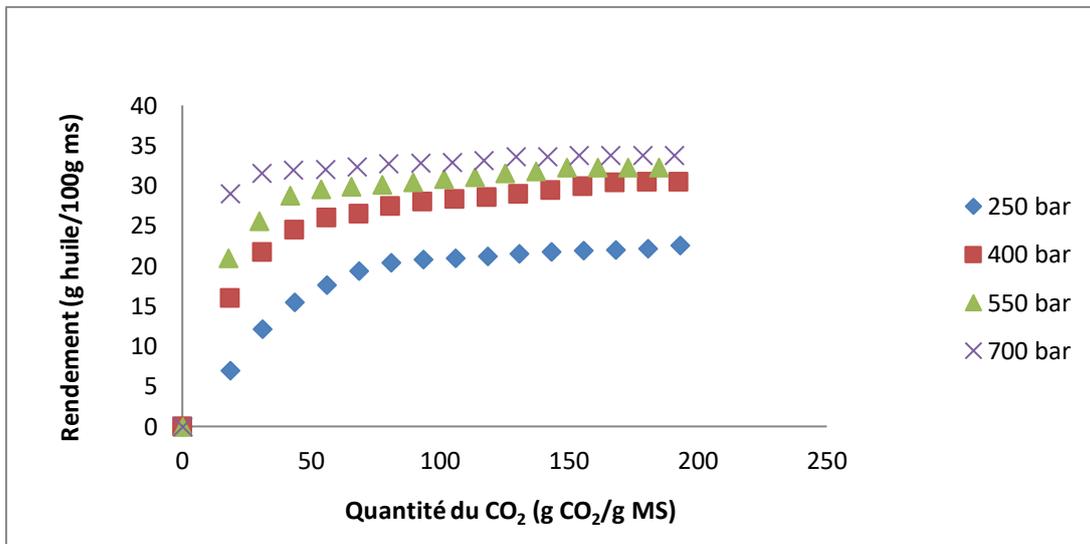


Figure III.21 : Courbes cinétiques à pressions différentes pour les pépins de melon ; température 40°C

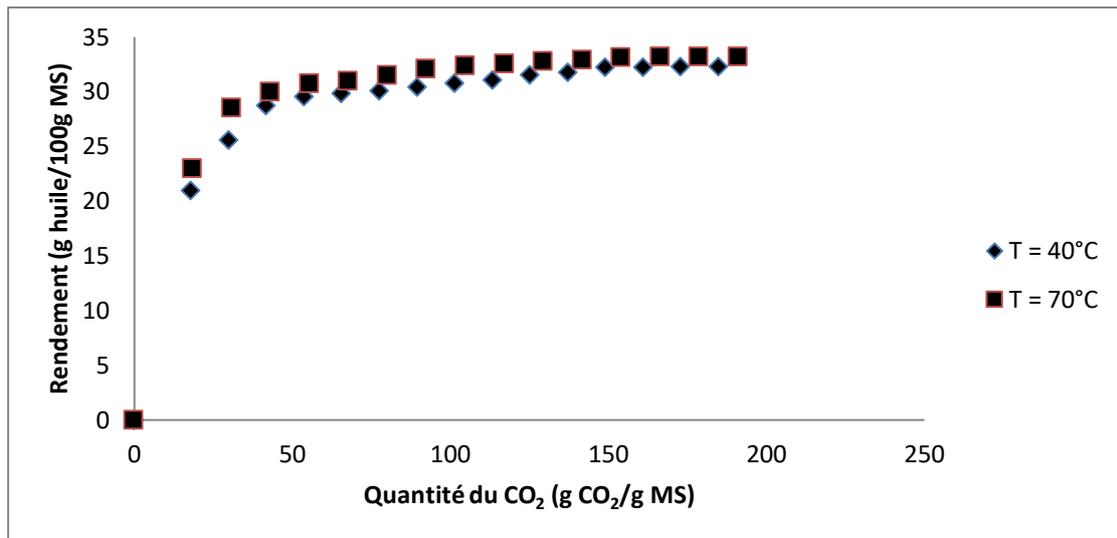


Figure III.22 : Courbes cinétiques à températures différentes pour les pépins de melon : pression de 550 bars.

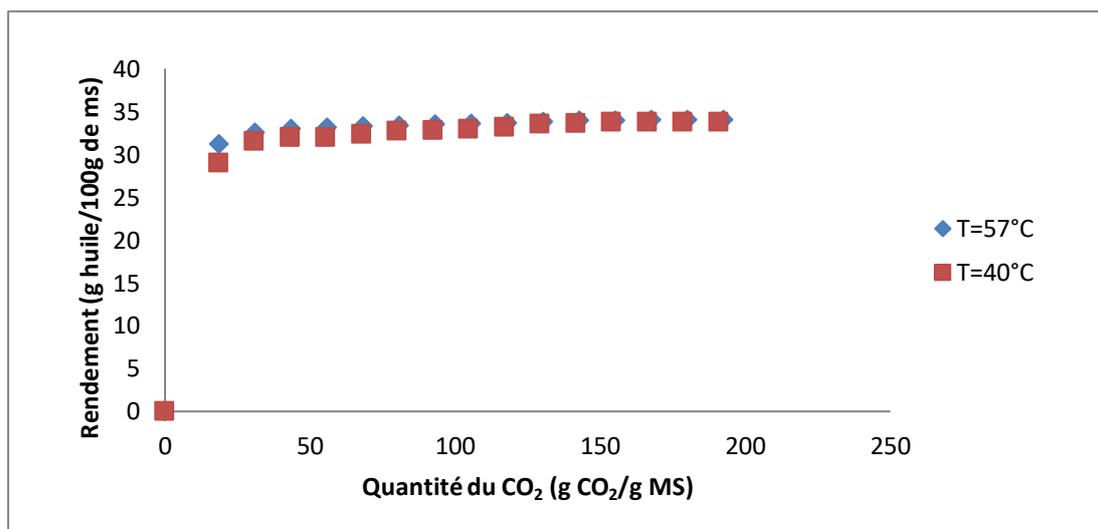


Figure III.23 : Courbes cinétiques à températures différentes pour les pépins de melon : pression de 700 bars.

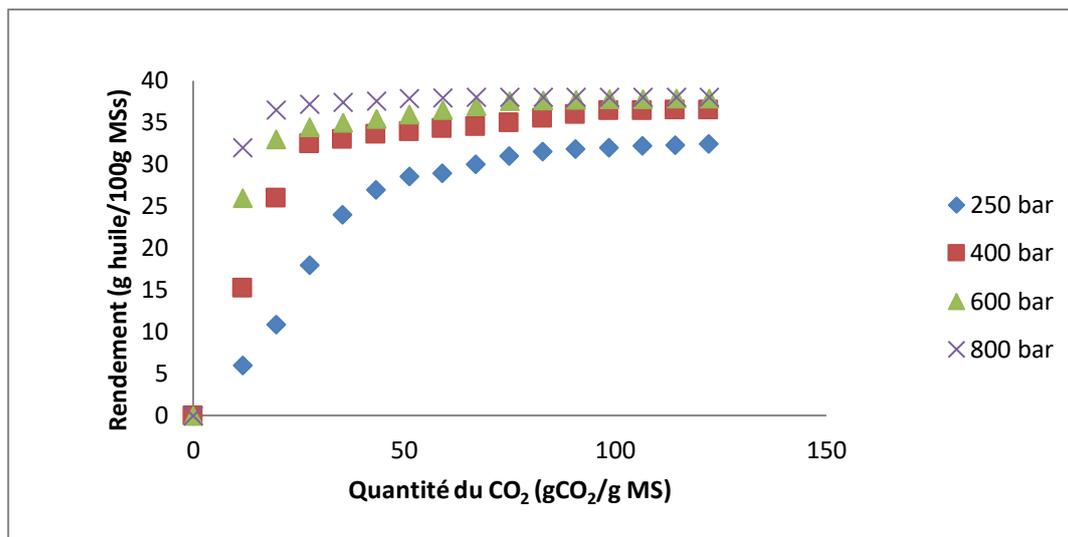


Figure III.24 : Courbes cinétiques à pressions différentes pour l'huile de pépins de courge :
température 40°C

A partir de la phase initiale, nous avons calculé la pente de chaque partie initiale des courbes qui correspond à la solubilité apparente de l'huile de pépins de melon et de courge dans le CO₂ supercritique en fonction des pressions et de température. Les résultats sont regroupés dans le tableau III.16.

Tableau III.16 : Solubilité apparente de l'huile de pépins de melon et de courge dans le CO₂ supercritique

Extraits	Température (°C)	Pression (bar)	Solubilité apparente (mg huile/CO ₂)
Melon	40	250	3,75
	40	400	8,58
	40	550	11,73
	40	700	15,70
	57	700	16,77
	70	550	12,43
Courge	40	250	5,07
	40	400	12,87
	40	600	21,95
	40	800	27,02

IV.2. Influence de la pression sur la solubilité de l'huile de pépins de melon et de courge dans le CO₂ supercritique.

La solubilité de l'huile de pépins de melon et de courge dans le fluide supercritique est mesurée et les résultats montrent une augmentation de la solubilité, résultant d'une augmentation de la pression (Figure III.25) à 40°C.

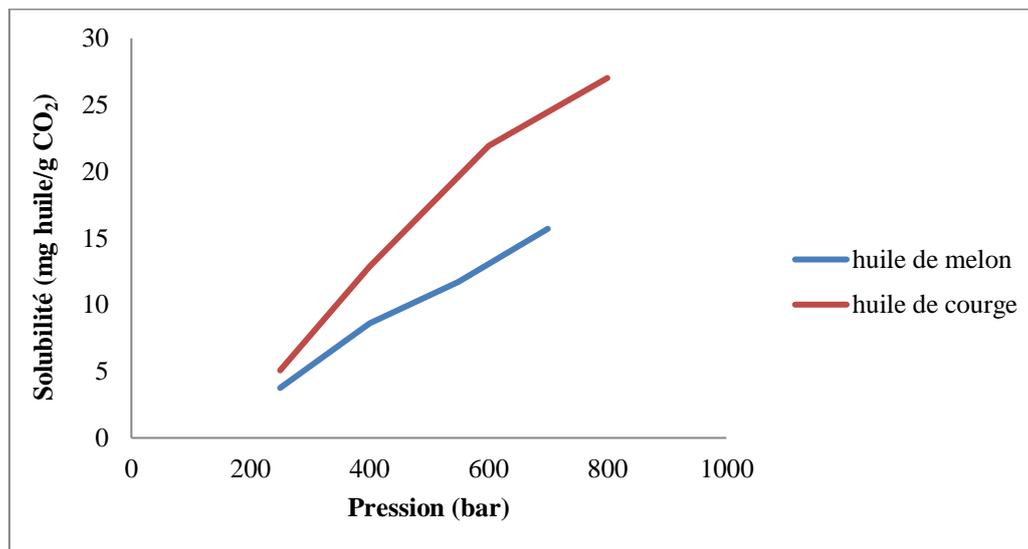


Figure III.25 : Influence de la pression sur la solubilité de l'huile de pépins de melon et de courge dans le CO₂ supercritique à 40°C

A 250 bar, la solubilité apparente de l'huile de pépins de melon est de 3,75mg huile/g CO₂, et il en découle qu'une augmentation de la pression induit une augmentation de ce paramètre, atteignant une valeur de 12,70 mg huile/g CO₂ à 700 bar. L'huile de pépins de courge, présente une solubilité de 5,07 mg huile/g CO₂ à une pression de 250 bar. Une augmentation de la pression induit une augmentation concomitante de la solubilité qui atteint une valeur de 27,02 mg huile/g CO₂ à 800 bar. Ceci est en accord avec la littérature qui explique cette augmentation par l'augmentation du pouvoir solvant du CO₂ supercritique suite à l'augmentation de sa densité. En effet, la solubilité d'une substance dans le CO₂ supercritique dépend de la masse volumique du fluide. Compte tenu de la compressibilité de ce fluide supercritique, la température et la pression de travail influencent la masse volumique et par conséquent la solubilité des composés.

Nous avons observé que la solubilité de l'huile de pépins de courge est plus importante que celle de l'huile de pépins de melon. Ceci est probablement dû au taux plus élevé des

substances lipidiques dans les pépins de courge que dans les pépins de melon. Ce genre de substances lipidiques sont notamment les acides gras libres ainsi que les mono et les diglycérides.

IV.3. Influence de la température sur la solubilité de l'huile de pépins de melon dans le CO₂ supercritique.

Nous avons réalisé des extractions de l'huile de pépins de melon à 40 et 70°C pour une pression de 550 bar et aussi à 40 et 57°C pour une pression de 700 bar. La partie linéaire de la courbe de leurs cinétiques respectives nous a permis de calculer la solubilité apparente de l'huile de pépins de melon dans ces conditions. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.1 et nous avons observé qu'il y a une légère augmentation de la solubilité de 11,73 à 12,43 mg huile/g CO₂, avec l'augmentation de température de 40 à 70°C et à une pression de 550 bar. A 700 bar, l'augmentation de la température n'a pas affecté la solubilité de l'huile de pépins de melon. Cette dernière a donné une valeur de 15,70 mg huile/g CO₂ à 40°C et de 16,77 mg huile/g CO₂ à 57°C.

L'influence de la température sur la solubilité d'une substance dans un solvant supercritique est difficile à prédire. A pression élevée, le fluide est difficilement compressible et donc la solubilité augmente avec la température suivant ainsi l'augmentation de pression de vapeur du soluté. Par contre, à des pressions intermédiaires proches de la pression critique, le fluide est bien compressible et une faible élévation de la température engendre une forte diminution de la masse volumique, ce qui fait que la solubilité du composé diminue dans le fluide supercritique dans le même temps.

La pression à laquelle s'effectue ce revirement de l'influence de la température sur la solubilité du composé a été définie comme la pression de croisement (cross-over). La solubilité du composé est favorisée ou défavorisée par une augmentation de la température, selon que la pression est en dessous ou au-dessus de la pression de croisement. Cependant, pour tirer une conclusion cohérente sur l'influence de la température, et sur le rendement de l'extraction de l'huile de pépins de melon, nous devons réaliser plus d'expériences en variant la température à différentes pressions.

Il a été montré, dans des travaux figurant dans le tableau III.17, qu'à basse pression (entre 100 et 300 bars), la solubilité de l'huile de pépins *Sacha inchi* (*Plukenetia volubilis* L.) [167] dans le CO₂ supercritique diminue lorsque la température augmente de 40 à 60°C en raison de

Chapitre III : résultats et discussion

l'effet prédominant de la diminution de masse volumique du fluide devant l'augmentation de la pression de vapeur du soluté. Au-delà de 300 bars, le dernier effet devient prédominant alors que la solubilité passe par un minimum, puis augmente avec la température.

Tableau III.17 : La solubilité de l'huile de pépin de *Sacha inchi* dans le CO₂SC [167]

Température (°C)	Pression (bars)	Densité du CO ₂ (g/mL)	Solubilité (g huile/kg CO ₂)
40	100	0,629	0,5 ± 0,16
60		0,290	0,27 ± 0,25
40	200	0,840	4,39 ± 0,35
60		0,725	1,67 ± 0,58
40	300	0,910	9,16 ± 0,55
60		0,830	7,95 ± 0,69
40	400	0,956	14,67 ± 0,63
60		0,890	16,64 ± 0,53

Tomita et al., [166] ont également constaté la même chose dans leurs travaux qui montrent une diminution de la solubilité de l'huile des pépins de chanvre indien (*Cannabis sativa* L.) avec une augmentation de la température à 200 et 300 bars (Tableau III.18). Cependant une augmentation du pouvoir solvant a été observée avec l'augmentation de la température à 400 bars.

Tableau III.18 : La solubilité de l'huile de pépins du chanvre indien dans le CO₂SC [166].

Température (°C)	Pression (bars)	Solubilité (g/L)
40	200	0,0115
60		0,0074
80		0,0029
40	300	0,0230
60		0,0177
80		0,0143
40	400	0,0269
60		0,0309
80		0,0326

IV. 4. Comparaison de la solubilité de l'huile de pépins de melon et de courge avec les données bibliographiques

Les valeurs de la solubilité de nos huiles sont comparées aux données de la bibliographie de quelques huiles végétales dans le tableau suivant (Tableau III.19): nous avons constaté que la solubilité expérimentale de l'huile de pépins de courge varie de 5,07 et 27,02 mg d'huile /g de CO₂, et est comparable à la solubilité expérimentale de certaines huiles végétales telles que l'huile de graines de pavot (entre 3,90 et 24,1 mg huile/g CO₂), l'huile de pépins de tournesol (entre 1,70 et 30,6 mg huile/g CO₂) et l'huile de sach inchi (entre 4,39 et 14,67 mg huile/g CO₂). La solubilité de l'huile de pépins de melon donne des valeurs qui restent inférieures à celles de l'huile de pépins de courge et celles des huiles végétales trouvées dans la littérature. Ceci est probablement dû à la composition de cette huile qui est sans doute moins riche en composés lipidiques solubles dans le CO₂ supercritique que les autres huiles. Ou bien au fait que l'huile est plus liée à la matrice (solubilité apparente < solubilité thermodynamique)

Tableau III.19 : Comparaison de la solubilité de nos huiles avec la solubilité de quelques huiles végétales

Références	Huile végétale	T (°C)	P (bar)	Solubilité (mg huile/g CO ₂)
[176]	tournesol	25	160-660	1,70-30,6
[177]	Pépin de raisin	39,8	280-550	10,1-25,5
[178]	tournesol	40-80	200-700	0,55-165,3
[179]	Graine de pavot	50-70	210-550	3,90-24,1
[180]	Ucuuba oil	40-80	200-350	3,2-38
[167]	Huile Sacha inchi	40	200-400	4,39-14,67
Notre étude	huile de pépins de melon	40-70	250-700	3,74-16,77
Notre étude	huile de pépins de courge	40	250-800	5,07-27,02

V. Mesure théorique de la solubilité d'une huile végétale

Le modèle de Chrastil établit une équation qui relie la solubilité des huiles végétales avec la densité et la température du CO₂ supercritique.

$$C = \rho^a \exp(b/T + c)$$

Les paramètres a, b, et c sont obtenus expérimentalement. Sovova et al [175], ont ajusté ces paramètres pour estimer la solubilité, et la corrélent avec la solubilité expérimentale de l'huile des graines de cassis.

$$C = \rho^{12.6} \exp(-5270/T - 67.07) \quad (1)$$

Les huiles végétales sont principalement constituées de triglycérides, triacylglycérols d'acides gras. Les triglycérides sont caractérisés par leur nombre de carbones, qui est le nombre total d'atomes de carbone dans les trois acides gras constitutifs. Klein et Schulz [181], ont calculé le nombre de carbones effectifs de quelques huiles végétales : 53,3 pour l'huile de maïs, 53,4 pour l'huile des graines de colza, 53,5 pour l'huile de soja et l'huile de sésame, et 53,6 pour l'huile de tournesol et l'huile de carthame. La différence dans la composition en acides gras n'affecte pas significativement la solubilité de l'huile dans le CO₂, cependant la solubilité est influencée par la composition en acides gras libres, mono et diglycérides présents dans les huiles végétales et qui sont plus solubles que les triglycérides [182, 183].

En dépit de la différence de solubilité due aux différents composants de l'huile végétale, del Valle et Aguilera ont développé une équation générale qui prédit la solubilité de l'huile dans le CO₂ supercritique. Ils ont modifié l'équation de Chrastil en introduisant des constantes et en se basant sur les données de la solubilité de l'huile de soja [176, 184], de tournesol [176], graines de coton et de maïs [184].

$$C = \rho^{10.724} \exp(-18708/T + 40.361 + 2186840/T^2) \quad (2)$$

Cette équation est validée pour des températures entre 20 et 80°C et une pression entre 150 et 880 atm, et une solubilité inférieure à 100 kg.m⁻³. Adachi et Lu ont modifié l'équation de Chrastil pour mieux modéliser la solubilité et obtiennent cinq paramètres qui sont ajustés selon Sovova *et al* [175].

$$C = \rho^{1.4 + 0.0048d - 0.000002d^2} \exp(-5000/T - 10.14) \quad (3)$$

Chapitre III : résultats et discussion

L'équation d'Adachi et Lu doit être appliquée pour le calcul des solubilités dans le CO₂, pour les huiles végétales raffinées avec un nombre de carbones effectif entre 53,4 à 53,6 dans la plage de température 20-100 ° C, pour une pression maximale de 60 MPa et pour les solubilités supérieures à 0,5 mg d'huile/g CO₂. Nous avons utilisé ces trois équations pour corréler nos résultats expérimentaux.

$$C = \rho^a \exp b/T + c \quad (1)$$

$$C = \rho^a \exp (b/T^2 + c/T + d) \quad (2)$$

$$C = \rho^{a + bp + cp^2} \exp (d/T + e) \quad (3)$$

Dans les trois équations, la température est exprimée en K, et la densité ρ est en kg m⁻³. Les valeurs des constantes des trois équations représentées dans le tableau III.20 sont caractéristiques pour les huiles végétales [175]. Nous avons calculé la concentration de l'huile C en kg. m⁻³ qui a été convertie en solubilité S_{calc} exprimée en fraction massique d'huile par masse de CO₂ selon la relation suivante :

$$S_{\text{calc}} (\text{mg huile/g CO}_2) = C/\rho$$

ρ : représente la densité du CO₂ exprimé en (kg m⁻³)

Tableau III.20 : Constantes des équations [175]

Constantes	a	b	c	d	e
Chrastil (1)	12,6	-5270	-67,07		
Del valle- Aguilera (2)	10,724	2186840	-18708	40,361	
Adachi (3)	1,4	0,0048	-0,000002	-5000	-10,14

Les calculs sont réalisés en utilisant le programme Excel, et les résultats sont représentés dans le tableau III.21.

Tableau III.21 : La solubilité déterminée selon les équations de Chrastil, Del valle-Aguilera et Adachi

P (bar)	T (°C)	ρ (kg/m ³)	S(mgg ⁻¹)	S(mgg ⁻¹)	S _{calc} (mgg ⁻¹)	S _{calc} (mgg ⁻¹)	S _{calc} (mgg ⁻¹)
			huile de melon	Huile de courge	Chrastil	Del valle	Adachi
250	40	891.212	3,74	5,07	5,36	6	5,27
400	40	966.884	8,58	12,87	14,97	13	12,93
550	40	–	11,73	–	–	–	–
600	40	1030	–	21,95	33,21	25	23,96
700	40	–	15,7	–	–	–	–
800	40	1076	–	27,02	57,6	38	33,26

VI. Comparaison entre la solubilité calculée expérimentalement et théoriquement

Pour mieux interpréter les résultats, nous avons tracé les courbes qui représentent la solubilité en fonction de la pression pour les trois équations ainsi que pour les deux huiles étudiées. Les résultats sont représentés dans la figure suivante (Figure III.26) :

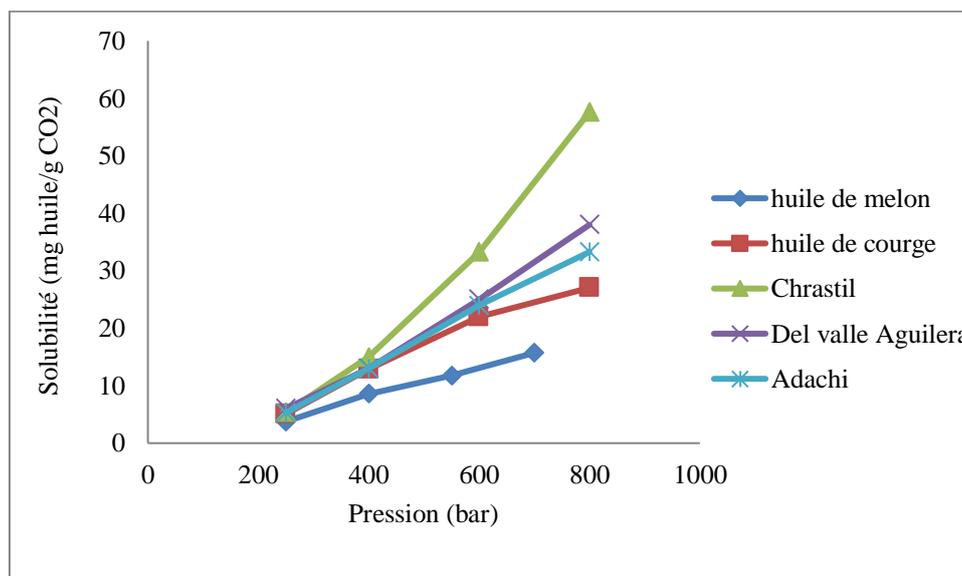


Figure III.26 : Comparaison de la solubilité expérimentale et la solubilité calculée selon l'équation de Chrastil, Del Valle Aguilera et Adachi.

Chapitre III : résultats et discussion

La figure III.26 montre qu'il y a une bonne corrélation entre la solubilité expérimentale de l'huile de pépins de courge et la solubilité calculée selon l'équation de Del Valle Aguilera et d'Adachi à une pression inférieure à 600 bars. Au-delà de cette valeur, il se produit une déviation des deux courbes traduisant une mauvaise corrélation. Nous avons constaté aussi que l'équation de Chrastil donne une bonne corrélation avec la solubilité de l'huile de pépins de courge à une pression inférieure à 400 bars ; au-delà de cette valeur, la déviation est plus importante par rapport à celle des deux autres équations.

La solubilité expérimentale de l'huile de pépins de melon ne donne pas de bonnes corrélations avec la solubilité calculée selon les trois équations. Cependant, la corrélation la plus proche est celle de l'équation d'Adachi. Nous avons comparé nos résultats avec la corrélation de certaines huiles végétales avec l'équation de Del valle Aguilera et celle d'Adachi. Pour cela, nous avons exprimé la différence entre les valeurs de la solubilité expérimentale S_i et les valeurs de la solubilité calculée $S_{calc,i}$ avec la moyenne du pourcentage de déviation MD% calculé comme suit : $MD\% = 100 \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k (S_{calc,i} - S_i)/S_i$

K est le nombre d'expériences. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant III.22.

Tableau III.22 : Comparaison de la moyenne de déviation calculée dans notre étude avec la littérature.

Référence	huile	Del valle-Aguilera	Adachi	P (bar)	T (°C)
		MD %	MD %		
Notre étude	Huile de melon	55,9	45,5	250-400	40
Notre étude	Huile de courge	16,6	4,5	250-600	40
[184]	Huile de soja	8,3	-0,5	210-690	50-60
[187]	Huile de pépins de raisin	-3,5	-1,7	280	40
[181]	Huile de colza	31,8	3,6	100-820	40-100
[185]	Huile de colza	10,9	-9,0	110-280	20-60
[186]	Huile de tournesol	-40	-40,4	280	40
[188]	Huile de soja	-7,3	-19,0	340-690	70
[175]	Huile de pépins de raisin	-45,6	-48,4	150-290	40
[175]	Huile de graine de cassis	24,1	-0,6	120-280	40-60

De la moyenne des pourcentages de déviation des solubilités des huiles trouvées dans la littérature, il ressort que l'équation d'Adachi donne une meilleure corrélation pour l'huile de soja [184], huile de pépins de raisin [187], huile de colza [181], huile de pépins de cassis [175] avec des déviations comprises entre -9% et 3,6%. Cependant, la solubilité expérimentale de l'huile de colza [185], de pépins de raisin [185] et de tournesol [186] donne la même corrélation avec les deux équations et reste importante pour le tournesol et les pépins de raisin.

Les valeurs de solubilités expérimentales de l'huile de soja [188], donnent une meilleure corrélation avec l'équation de Del Valle Aguilera que celle d'Adachi, avec des moyennes de déviations respectives de -7,3% et -19,0%. La solubilité expérimentale de l'huile de nos pépins de courge a donné une meilleure corrélation avec l'équation d'Adachi avec une moyenne de déviation de 4,5%, similaire à la corrélation de l'huile de colza (3,6%) [181]. Avec l'équation de Del Valle Aguilera, la corrélation est de 16,6%, moins importante qu'avec l'équation d'Adachi, mais reste meilleure que les corrélations obtenues avec les deux équations pour l'huile de nos pépins de melon. En effet, les moyennes de déviations sont de 45,53% pour l'équation d'Adachi et 55,97 pour celle de Del Valle Aguilera.

La mesure de solubilité est primordiale pour la détermination des conditions opératoires optimales d'un procédé et pour le développement de modèles thermodynamiques. La solubilité des huiles végétales dépend principalement de leurs compositions en substances solubles dans le CO₂ supercritique. Il n'existe à ce jour aucun modèle permettant de prédire totalement le comportement d'un mélange lipidique à plusieurs constituants. Cependant une bonne corrélation est obtenue avec l'équation d'Adachi avec la solubilité expérimentale de l'huile de pépins de courge tandis que la corrélation avec la solubilité expérimentale de l'huile de pépins de melon n'est pas très satisfaisante avec les trois équations.

VII. Conclusion partielle

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'extraction de l'huile de pépins de courge et de pépins de melon avec la technologie du CO₂ supercritique en variant les conditions opératoires. Nous avons constaté que l'augmentation de la pression induisait une augmentation du rendement de l'huile tout en réduisant le temps d'extraction.

L'effet de la variation de la température d'extraction est complexe du fait de l'influence simultanée de la masse volumique du solvant et de la tension de vapeur des composés de l'huile. En général, des températures entre 40 à 50°C suffisent pour l'extraction des huiles par le CO₂ supercritique. L'ajout du co-solvant améliore nettement le rendement d'extraction de l'huile de pépins de courge et favorise l'extraction d'autres substances telles que les polyphénols ; en même temps, il affecte négativement l'innocuité de la technologie du CO₂ supercritique.

Afin d'étudier l'effet de ces conditions opératoires sur la sélectivité de l'extraction, nous avons déterminé la composition en acides gras de ces huiles par la chromatographie phase gazeuse couplée à la masse. Les résultats ont montré que dans les conditions appliquées, le taux des acides gras n'a pas été modifié. Ceci est en accord avec la littérature, puisque nous avons travaillé à haute pression ; ce qui favorise la solubilité des triglycérides. Ces derniers représentent jusqu'à 98% de la composition des huiles végétales. Cependant, il est important de noter que les huiles étudiées contiennent un pourcentage très faible de composés non saponifiables, caractéristique dominante de l'huile. L'identification de ces composés dans les extraits obtenus donne une meilleure connaissance de l'effet des conditions étudiées sur la sélectivité de l'extraction et donc la qualité de l'huile extraite par la technologie du CO₂ supercritique. Malheureusement, ceci n'a pas été possible dans le cadre de cette étude par faute de moyens d'analyse.

Dans le but de mettre en exergue le phénomène de solubilité de l'huile végétale dans le CO₂ supercritique, nous avons déterminé la solubilité de l'huile de pépins de melon et ceux de courge en fonction des conditions opératoires, à partir des courbes qui représentent le rendement d'extraction en fonction de la quantité du CO₂ consommée. Les résultats ont donné des valeurs comparables à celles de la littérature ; ces dernières varient entre 3,74 et 16,77 mg huile/g CO₂ dans le cas des pépins de melon et entre 5,07 et 27,02 mg huile/g CO₂ dans le cas de pépins de courge. Nous avons corrélé ces résultats avec la solubilité des huiles végétales, calculées selon trois équations développées par Chrastil, Del Valle Aguilera et Adachi.

La solubilité expérimentale de l'huile de pépins de courge a donné une meilleure corrélation avec l'équation d'Adachi à des pressions inférieures à 600 bars, et cela est en accord avec la littérature. En effet, la littérature a limité la validité de cette équation à des pressions inférieures à 600 bars et à un intervalle de température situé entre 20 et 100°C. La solubilité

de l'huile de pépins de melon n'a donné de bonnes corrélations avec aucune des trois équations et ces valeurs restent inférieures à la solubilité de l'huile de pépins de courge. Cela signifie que la composition de l'huile comporte sans doute un taux moins élevé des substances solubles dans le CO₂ supercritique par rapport à l'huile de pépins de courge.

En conclusion et d'après tous les résultats obtenus, il peut être avancé que la pression et la température sont deux paramètres physiques très déterminants pour l'extraction avec un fluide supercritique ayant des incidences théoriques et pratiques sur le processus. En effet les deux paramètres ont une grande influence sur le rendement et la qualité de l'huile. Cependant, il est nécessaire de mener une étude d'optimisation des conditions d'extraction pour améliorer le rendement et la qualité de l'huile avant de développer tout procédé à l'échelle industrielle.

Les procédés d'extraction par CO₂ supercritique permettent de répondre à l'exigence principale de l'industrie alimentaire et pharmaceutique qui consiste à diminuer ou éliminer les résidus de solvants organiques dans les produits finaux ; de plus, l'extraction au dioxyde de carbone supercritique peut être menée dans des conditions «douces», évitant ainsi la dégradation des produits dont le seul handicap réside dans le coût très élevé de l'installation.

Chapitre IV :Activité biologique

Dans la partie bibliographique, nous avons parcouru et exposé l'importance de la famille des cucurbitacées en termes d'activité biologique de leurs graines. Ceci nous a encouragés à tenter une évaluation de quelques activités biologiques de nos huiles. Les activités biologiques testées sont l'activité antioxydante, anti inflammatoire, cytotoxique et anticholinestérase.

Toutes ces activités ont été réalisées dans le *laboratoire des interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique de la faculté de pharmacie de l'université Paul Sabatier de Toulouse sous la direction du Professeur Djalloul Bouajila*. Avant d'exposer les résultats de nos tests, nous passons en revue dans ce chapitre quelques généralités sur les activités en question ainsi que les principes des protocoles utilisés à cet effet.

I. Généralité sur les activités biologiques

I.1. Activité antioxydante

I.1.1. Définition

Le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre entre les anti-oxydants et les oxydants en faveur de ces derniers. Les origines du stress oxydant sont multiples et résultent d'une formation des espèces oxygénées réactives (EOR). Les espèces oxygénées réactives (EOR) sont définies comme étant toute espèce réactive compte tenu de l'existence d'au moins un électron libre sur son orbitale électronique externe [189]. Ces espèces regroupent l'ensemble des espèces radicalaires de l'oxygène comme RS^\bullet (thiyl); $O_2^{\bullet-}$ (anion superoxyde); RO^\bullet (radical alkoxy); ROO^\bullet (radical peroxyde avec R = substrat organique); mais également d'autres composés non radicalaires très réactifs (chimiquement instables) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'hydroperoxyde (ROOH) ou l'oxygène singulet ($1O_2$).

Au sein de la cellule, tous les processus utilisant de l'oxygène dans les différents compartiments subcellulaires sont capables de produire des EOR. Lorsque ces EOR ne sont pas contrôlés, et sont produites en quantité très importante, elles ont des effets néfastes en induisant un phénomène d'apoptose dans des cellules saines ou en activant divers gènes codant pour l'expression de cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion. Par ailleurs, les EOR, de par leur nature instable, sont particulièrement réactionnelles et sont capables de provoquer des dégâts cellulaires importants.

En effet, elles peuvent :

Chapitre IV : Activité biologique

- inactiver des protéines et des enzymes,
- oxyder les sucres,
- provoquer des cassures et des mutations au sein de l'ADN,
- induire des processus de peroxydation lipidique au sein des acides gras polyinsaturés des lipoprotéines ou de la membrane cellulaire [190].

Ainsi, les EOR peuvent potentiellement réagir avec chaque composant cellulaire et provoquer son oxydation. Les cibles préférentielles des EOR sont les lipides, les protéines et les bases constitutives du matériel génétique.

Dans les systèmes biologiques, un antioxydant est une substance qui, en faible concentration, comparativement à la quantité des substances oxydables telles les espèces oxygénées réactives (EOR), retarde significativement ou prévient l'oxydation des substrats comme les lipides, les protéines, les DNA et les hydrates de carbone. Son rôle est d'intercepter les radicaux libres avant qu'ils ne réagissent avec le substrat [191].

Les antioxydants biologiques sont repartis en deux classes selon Ziyatdinova *et al* [192] :

- Les composés à faible poids moléculaire (tocophérols, acide ascorbique, β -carotène, glutathion, acide urique, bilirubine, ...).
- Les protéines (albumine, transferrine, le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, caeruloplasmine, ferritine).

Les antioxydants incluent le système de réparation, les enzymes antioxydants, les facteurs affectant l'homéostasie vasculaire, le signal de la transduction et l'expression des gènes [191].

Les antioxydants empêchent globalement l'apparition du stress oxydatif.

I.1.2. Mécanisme de défense contre les radicaux libres

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des EOR est particulièrement fragile. Les mécanismes de défense contre la toxicité des EOR sont nombreux et proviennent de sources diverses [189, 193]. Notre organisme possède un certain nombre de moyens de défense contre les atteintes des radicaux libres mettant en jeu le système immunitaire et des enzymes.

Dans le système enzymatique, il existe deux niveaux de défenses, les défenses primaires où interviennent la SOD (Super Oxyde Dismutase), la glutathion peroxydase (GPx) (Se) et

Chapitre IV : Activité biologique

certaines catalases (EC 1.11.1.6). Dans les défenses secondaires interviennent la glutathion transférase et la glutathion réductase qui constituent une source endogène. D'autres protéines comme la ferritine, la transferrine, la céruléoplasmine et l'albumine interviennent dans l'activité antioxydante [193].

Les antioxydants tels que les vitamines (A, E et C), les β -carotènes, lycopène, ubiquinol-10, bilirubine, les oligo-éléments comme le zinc, le sélénium, le cuivre, le manganèse, certains polyphénols (les flavonoïdes, les acides phénols, les coumarines, les quinones), les alcaloïdes et certaines huiles essentielles, constituent la seconde source de défense de l'organisme contre les radicaux libres. Les parties les plus actives de ces molécules sont les hydroxyles libres, les noyaux aromatiques, les doubles liaisons éthyléniques souvent conjuguées, qui permettent de donner des électrons et de rester stables par mésomérisation [190, 194]. La formation de radicaux libres dans l'organisme est constante et nécessaire à la vie, mais les excès dépendent de facteurs extérieurs tels que le stress, la fatigue et les exercices physiques intensifs.

I.1.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées dans les différents laboratoires pour la détermination de l'activité antioxydante. Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un composé sont regroupées selon leur principe :

- Evaluation de produits résultant de l'oxydation

Comme exemples nous avons l'évaluation des peroxydes et le dosage d'hydroperoxydes.

- Evaluation de l'aptitude du composé à piéger des radicaux libres:

La capacité du produit à piéger les radicaux libres implique la création d'autres radicaux, plus stables. On peut citer les méthodes DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) [195], ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) [196]. Des méthodes électrochimiques ont été développées pour la mesure de l'activité antioxydante des fluides biologiques [190]. Comme exemples, nous pouvons citer la voltamétrie cyclique qui est utilisée pour quantifier les antioxydants de faible poids moléculaire dans le plasma, et la mesure de la capacité antioxydante totale du plasma, la détermination de l'activité de la catalase. Elle est basée sur la mesure du complexe stable du radical peroxyde avec le molybdène d'ammonium [190]. Il

Chapitre IV : Activité biologique

existe d'autres méthodes qui permettent par exemple d'évaluer la capacité réductrice des composés, comme c'est le cas de la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) [197].

I.2. Activité anti-inflammatoire

I.2.1. Généralités

L'inflammation est une réaction des tissus vivants à une lésion ou une stimulation cellulaire excessive ou normale due à une agression d'origine mécanique, chimique ou immunologique. L'inflammation est impliquée dans de nombreuses maladies incluant non seulement des pathologies articulaires mais aussi les maladies cardio-vasculaires ou les cancers. L'inflammation est caractérisée par des niveaux élevés de métabolites de l'acide arachidonique qui sont produits à travers deux voies enzymatiques différentes, celles des cyclo-oxygénases (COX) et des lipoxygénases. A partir de l'acide arachidonique, les COX permettent la production des prostaglandines et de thromboxanes, tandis que les lipoxygénases (LOX) synthétisent les leucotriènes, les lipoxines et les acides eïcosatétraénoïques. Les leucotriènes sont de puissants médiateurs inflammatoires liés aux allergies ; ils interviennent également dans l'ischémie, les accidents cérébro-vasculaires ou la maladie d'Alzheimer [198].

Il existe deux types d'inflammation:

L'inflammation primaire, de cause immédiate et localisée, et la secondaire est celle qui se développe à distance sous l'influence d'un agent pathogène. La réaction inflammatoire comporte une succession coordonnée d'événements:

- La phase précoce ou phase vasculaire, caractérisée par une vasodilatation artériolaire, conduit à un érythème, une chaleur locale, une hyperesthésie, et un œdème.
- La phase secondaire ou phase cellulaire, caractérisée par la migration extra vasculaire (diapédèse) et la libération de cytokine est à l'origine de l'activation cellulaire. Il se forme alors des tissus de granulation (granulome).
- La phase terminale ou phase de régénérescence, correspond à la sclérose du tissu par élimination des débris cellulaires et tissulaires par un mécanisme de phagocytose et de pinocytose.

I.2.3. Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des médicaments ou substances capables d'atténuer ou de supprimer le processus inflammatoire. On distingue deux grands groupes d'anti-inflammatoires :

- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) [199].

C'est une classe pharmaceutique de produits qui possèdent des propriétés antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. On y trouve l'aspirine, l'ibuprofène, l'indométacine. Ces substances constituent le traitement le plus prescrit au monde contre la douleur et l'inflammation. Toutefois, les AINS peuvent causer de sérieux effets secondaires tels que des ulcères et des saignements gastro-intestinaux. Dans certains cas, leur utilisation peut provoquer la mort. Il a été démontré que les AINS exercent leurs actions anti-inflammatoires en partie par l'inhibition de la COX.

- Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou glucocorticoïdes (AIS).

Les glucocorticoïdes constituent une classe thérapeutique qui possède des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et immunosuppressives. Ils sont représentés par la cortisone et l'hydrocortisone, produits naturels sécrétés par la corticosurrénale et obtenus également par synthèse organique. En plus des anti-inflammatoires connus, l'utilisation d'inhibiteurs naturels de ces enzymes, comme des extraits de plantes, peut aider à réduire le risque de développement de ces pathologies.

I.2.4. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires

De par leur action thérapeutique, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) se ressemblent entre eux quant à l'inhibition de la synthèse des prostaglandines. Ils bloquent la synthèse de la cyclo-oxygénase (COX) qui catalyse la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Ils entraînent une diminution de la migration cellulaire et des actions des tissus conjonctifs (glycoprotéine, collagène).

Pour leur part, les anti-inflammatoires stéroïdiens ou glucocorticoïdes empêchent la formation de glycérophospholipides membranaires en acide arachidonique par la production d'enzyme lipocortine. Ils diminuent la migration des polynucléaires, monocytes, macrophages vers les sites de l'inflammation et la production de médiateurs comme la sérotonine, l'histamine et les cytokines.

Chapitre IV : Activité biologique

I.2.5. Méthode d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire

- **Inflammation locale de l'oreille**

Ce principe consiste à provoquer une inflammation au niveau de l'oreille du rat, par application locale d'huile de croton. Cette inflammation peut être réduite par application locale de substance anti-inflammatoire [200].

- **Arthrite à l'adjuvant de Freund**

Elle consiste à réduire l'arthrite chronique provoquée au niveau de la patte du rat, par injection de *Mycobacterium butyricum* par certaines substances anti-inflammatoires.

- **Œdème de la patte à la carrhagénine**

Cette méthode consiste à vérifier l'action inhibitrice des médicaments anti-inflammatoires préventifs sur l'œdème provoqué par injection de carrhagénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure d'une souris [201].

- **Méthodes enzymatiques**

Il s'agit généralement de méthodes exécutées "*in vitro* " : elles sont basées sur l'inhibition des certaines enzymes liées à l'inflammation. C'est l'exemple de la 12-lipoxygénase (12-LOX), la cyclooxygénase-1 (COX-1) et la cyclooxygénase-2 (COX-2) [202, 203].

I.3. Activité anti Alzheimer

I.3.1. Généralités

Au début du 20^e siècle, la maladie l'Alzheimer (MA) a été découverte par le neuropsychiatre Allemand Aloïs Alzheimer (1864-1915). Il a étudié le cas d'une femme d'une cinquantaine d'années qui présentait des troubles de la mémoire et du comportement, des problèmes d'orientation, des hallucinations et des signes de paranoïa (trouble mentale se manifestant par des difficultés relationnelles et surtout un délire de la persécution).

En général, un patient atteint de MA présente des difficultés à se souvenir des noms, des faits récents, à trouver ses mots et à mettre en place ses idées. De plus, il rencontre des problèmes de motricité et d'orientation dans l'espace et dans le temps. A des stades avancés, le sujet finit par avoir des difficultés à accomplir les tâches simples de la vie quotidienne. Il présente aussi

des troubles psycho-comportementaux tels que l'agressivité, l'anxiété, la dépression, les hallucinations ou paranoïa [204].

A ce jour, la MA reste incurable. Cependant, l'une des approches les plus prometteuses pour le traitement de cette maladie consiste à améliorer le niveau d'acétylcholine dans le cerveau en utilisant des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase [205]. En effet, la plupart des médicaments anti-Alzheimer disponibles sur le marché agissent sur cette activité cholinergique en inhibant la dégradation de l'acétylcholine telle que la donepezil, la rivastigmine et la galantamine [206].

I.3.2. L'activité anti-acétylcholinestérase (anti-AChE)

L'acétylcholinestérase (AChE) est un neurotransmetteur synaptique qui, en se fixant au récepteur cholinergique membranaire, permet la dépolarisation de la membrane et la transmission de l'influx au niveau des jonctions neuromusculaires. L'AChE joue un rôle primordial dans la régulation de l'influx nerveux. Elle assure la libération de la fente synaptique en vue d'une nouvelle transmission par dégradation de l'acétylcholine résiduelle issue d'une neurotransmission. Chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, le taux d'acétylcholine est particulièrement faible, ce qui explique les troubles cognitifs observés. La solution pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste alors à diminuer sa dégradation, ceci en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase [207].

En se basant sur l'hypothèse que l'inhibition de l'action de l'AChE permettrait de mieux traiter la MA, il est apparu sur le marché plusieurs inhibiteurs de cette enzyme [208]. Le premier inhibiteur de l'AChE à avoir été testé est la physostigmine, issu de *Physostigma venenosum*. Cette plante est connue par sa forte toxicité, majoritairement due à la physostigmine. Cette dernière présente une affinité pour l'AChE d'environ 10 000 fois supérieure à celle de l'acétylcholine, ce qui en fait un parasymphomimétique très puissant, capable d'induire une bradycardie, des vomissements et même une paralysie respiratoire [209]. Les essais cliniques ont montré une action positive légère de la physostigmine sur la mémoire [210], mais elle a été par la suite abandonnée au profit d'analogues synthétiques à cause de sa courte demi-vie et de sa toxicité [211, 212].

En 1993, la tacrine a été le premier inhibiteur commercialisé dans le cadre du traitement de la MA. Cependant, elle a été abandonnée à cause de ses nombreux effets secondaires tels que les nausées, les vomissements, la diarrhée, les maux de tête, les étourdissements, ainsi que l'augmentation des niveaux de l'alanine amino-transférase (ALT). Cette enzyme est un bio

Chapitre IV : Activité biologique

marqueur de la une toxicité hépatique [213]. De plus, la tacrine est connue par sa demi-vie courte, imposant plusieurs prises par jour, ce qui est problématique pour des personnes souffrant de perte de mémoire [214].

La donepezil, approuvée en 1997 [215], montre une meilleure spécificité pour le tissu cérébral que la tacrine [216]. Les essais cliniques ont montré qu'elle ne présente pas de toxicité hépatique et qu'elle montre surtout une demi-vie plus longue, ce qui en facilite la prise [217]. Par contre, certains effets secondaires ont été enregistrés tels que les nausées, les vomissements, les étourdissements, l'anorexie et la fatigue [218].

La rivastigmine, approuvée en 1998, est un dérivé de la physostigmine ; elle a été utilisée dans le traitement symptomatique des formes légères à modérément sévères de la MA [219]. Elle est connue par sa bonne sélectivité pour le cholinestérase cérébral ainsi que pour son métabolisme indépendant du système enzymatique hépatique qui permet une action ciblée [220]. Quelques effets secondaires ont été enregistrés tels que les nausées et les vomissements [221]. La figure IV.1 présente la structure chimique de ses quatre molécules présentant l'activité Anti-AChE.

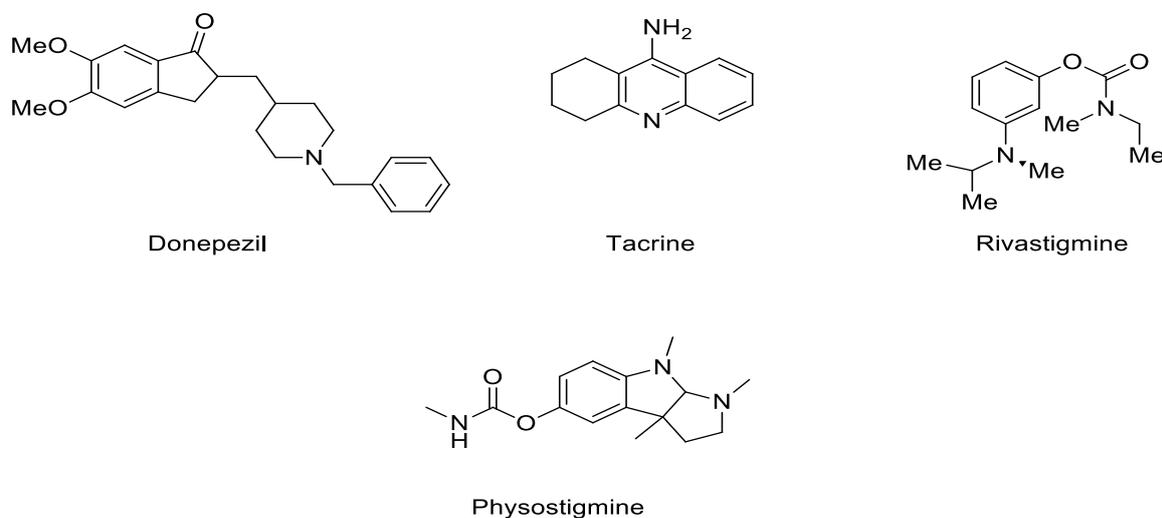


Figure IV.1 : Structures de quelques inhibiteurs connus d'AChE.

En 2000, la galantamine, un alcaloïde naturel, issue de l'espèce *Galanthus nivalis* L. de la famille des Amaryllidaceae (Figure IV.2), fit irruption sur le marché. Cet alcaloïde des autres inhibiteurs par son mécanisme à double action : en plus d'inhiber l'AChE, il provoque une modulation allostérique des récepteurs présynaptiques nicotiques, ce qui augmente la libération de neuromédiateurs [222]. D'autres propriétés telles que sa demi-vie longue, son action sélective, réversible et compétitive, favorisent son utilisation comme meilleur

Chapitre IV : Activité biologique

inhibiteur de l'AChE [223]. La galantamine est largement utilisée comme substance de référence dans les tests *in vitro* du fait de son fort pouvoir inhibiteur de l'AChE. Aujourd'hui, elle est autorisée dans plusieurs pays Européens comme un des traitements de la MA à des stades avancés [224].

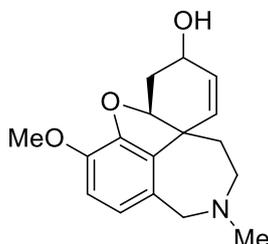


Figure IV.2 : Structure de la galantamine.

Bien que la plupart des inhibiteurs connus de l'enzyme AChE soient des alcaloïdes, récemment, plusieurs études ont été faites pour identifier d'autres molécules naturelles différentes des alcaloïdes, pouvant avoir une activité anti-AChE importante. Ainsi, selon Houghton *et al* [207] plusieurs composés, notamment des terpénoïdes, des composés phénoliques, les flavonoïdes et les iso-coumarines, présentent une grande capacité d'inhiber l'enzyme AChE. Dans le même cadre, Ge *et al* [225] ont montré que l'hopeahainol, un nouveau phénol isolé de l'espèce *Hopeahainensis*, est un inhibiteur réversible de l'AChE. L'isoorientine et l'isovitexine sont les flavones identifiés comme composés responsables de l'activité anti-AChE causée par les extraits des fleurs et des rhizomes de l'*Iris pseudopumila* (Iridaceae) [226].

Une autre étude, réalisée par Jung *et al* [227], a montré que les flavanols tels que la sophoflavescenol, l'icaritine, le deméthylanhydroicaritine, le 8 C-lavandurylkaempferol et le kaempferol, isolés à partir de *Sophora flavescens* (Fabaceae), présentent une activité anti-AChE importante. Par ailleurs, Nag et De [228] ont montré aussi que des dérivés phénoliques simples tels que l'acide gallique et l'acide ellagique sont de bons inhibiteurs de l'AChE. De leur côté, Mack *et al* [229] se sont intéressés à quantifier les composés phénoliques puis les flavonoïdes présents dans quelques espèces de la famille des Anacardiaceae et de tester leurs activités biologiques. Les résultats de leur étude ont montré que les extraits des plantes qui sont riches en composés phénoliques et en flavonoïdes présentent en premier lieu une activité anti-oxydante importante puis un grand pouvoir inhibiteur de l'AChE.

Chapitre IV : Activité biologique

Dans le même registre, Ryu *et al* [230] ont isolé, à partir des extraits éthanoliques des racines de *Broussonetia papyrifera*, trois flavonols à savoir le 8-(1,1-diméthylallyl)-5'--(3-méthylbut-2-enyl)-3',4',5,7-tétrahydroxy-flavonol, le papyriflavonol et le brousoflavonol. Ces derniers ont montré un pouvoir inhibiteur de l'AChE important. Aderogba *et al* [231] ont isolé, à partir des extraits des feuilles de *Croton penduliflorus*, quelques composés phénoliques tels que la quercetin-3-O-rhamnoside, le kaempferol-3-O-rhamnoside, le protocatchualdehyde et l'acide p-hydroxybenzoïque. L'étude de leur activité anti-AChE a montré que ces composés phénoliques sont des inhibiteurs puissants de l'AChE. L'étude réalisée par Xian *et al.* [232] a montré que les extraits de plusieurs fougères originaires du Chine, riches en flavonoïdes, présentent une activité anti-AChE intéressante.

I.4. Activité cytotoxique

I.4.1. Généralités

L'individu est constitué "d'unités cellulaires" morphologiquement individualisées, mais intégrées dans un ensemble "pluricellulaire" dynamique : l'organisme. Ce dernier, résultat de l'agencement de cellules en tissus, de tissus en organes, d'organes en systèmes, présente de nombreuses relations avec son environnement. L'organisme est un système ouvert qui réagit via des réactions complexes, ordonnées mais coordonnées, afin de se maintenir dans un "état stationnaire" normal : l'état homéostatique. Toute cellule de l'organisme est à même de maintenir, adapter, renouveler, supprimer, de manière programmée, tout ou partie de ses constituants tant structuraux que fonctionnels, ceci dans le but de réguler et de coordonner ses métabolismes et métabolites, en les adaptant à ses besoins comme à ceux de l'individu.

La capacité de se diviser, de se spécialiser mais aussi de mourir est inscrite dans le génome de chacune des cellules qui composent l'organisme humain. Le déclenchement et l'arrêt de la prolifération cellulaire, l'entrée dans un processus de différenciation ou dans un programme de mort cellulaire (apoptose) résultent de l'intégration au niveau cellulaire de multiplessignaux, les uns positifs, les autres négatifs.

Au niveau tissulaire, l'équilibre entre ces diverses destinées cellulaires est sous le contrôle de multiples boucles de régulations enchevêtrées. Mais ces systèmes de régulation permettant un maintien de l'homéostasie sont parfois, comme c'est le cas pour les cancers, déficients. En effet, suite à l'agression de facteurs de l'environnement tels que le tabac, les rayons ionisants [233], certains agents chimiques [234] ou physiques, certains virus, ou spontanément [235], le génome humain subit constamment des lésions qui sont réparées [236] ou non. En effet, les

Chapitre IV : Activité biologique

systèmes de réparation sont parfois défectueux ou "débordés", la cellule conservant alors certaines altérations qui touchent parfois les systèmes de régulation de la prolifération.

Ne répondant plus correctement aux signaux environnants, elle échappe à toute régulation. La cellule s'engage alors dans un processus anarchique qui conduit, par accumulation successive d'anomalies génétiques, au développement d'une cellule cancéreuse. La biologie moléculaire et la génétique ont permis d'établir que les altérations génétiques surviennent précisément sur les éléments de régulation de la différenciation, de la division et de la mort cellulaire.

L'apparition d'un cancer s'effectue selon un processus en plusieurs étapes au cours desquelles l'accumulation d'anomalies sur différents gènes, au fil des divisions cellulaires, confère un avantage sélectif au clone malin. Les cellules, toutes issues d'une première cellule mutée (clone), forment une tumeur. Celle-ci devient de plus en plus agressive pour son environnement et échappe progressivement à tout contrôle. Néanmoins des questions demeurent. Il est désormais acquis que le cancer est dû à une grave perturbation de la communication cellulaire. Il se caractérise par une prolifération cellulaire anarchique et indéfinie d'un clone cellulaire, une perte de la différenciation et une absence de mort cellulaire. Cette prolifération conduit à la destruction du tissu originel, ainsi que des tissus environnants. Sans traitement, l'envahissement conduit à la mort de l'individu.

I.4.2. Test de cytotoxicité

De nos jours de nombreuses firmes de biotechnologie et des scientifiques, par leurs publications, ont recours aux tests de cytotoxicité afin de valider de nouvelles molécules. Le test de cytotoxicité *in vivo*, consiste à réaliser des tumeurs expérimentales chez l'animal (souris, rat) par inoculation de cellules tumorales (Leucémies, sarcomes) et à estimer l'activité antitumorale du produit à tester. Signalons que les droits des animaux commencent à être sérieusement pris en compte de par le monde. Il est bon néanmoins de signaler que l'animal sera pour le moment toujours nécessaire lors des tests ultimes avant le passage à l'homme.

Les tests de cytotoxicité *in vitro* ont été mis au point comme méthode alternative à la manipulation sur les animaux (rongeurs, lapin, cochon,...). Ils ont pour but de mesurer l'activité cytotoxique des substances supposées être antitumorales sur des cultures de cellules cancéreuses animales ou humaines (cellule P- 388 • cellule leucémique lymphocytaire de souris; cellule KB cellule cancéreuse du nasopharynx). La cytotoxicité est généralement déterminée par l'ED₅₀ L'ED₅₀ est la dose qui, *in vitro*, donne une inhibition de 50% de la croissance par rapport à la croissance de contrôle.

II. Matériel et méthode

II.1. Activité anti-radicalaire par inhibition du DPPH

II.1.1. Principe

Le test DPPH est un test très simple et rapide, qui ne nécessite qu'un spectromètre d'absorption UV-Vis. Ce test est basé sur la capacité du radical stable 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle de réagir avec des molécules donneuses d'hydrogène présentes dans les composés phénoliques. Les antioxydants réduisent le diphénylpicrylhydrazyle ayant une couleur violette en un composé jaune, la diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. Ainsi l'équation de réaction avec une molécule réductrice RH peut s'écrire:

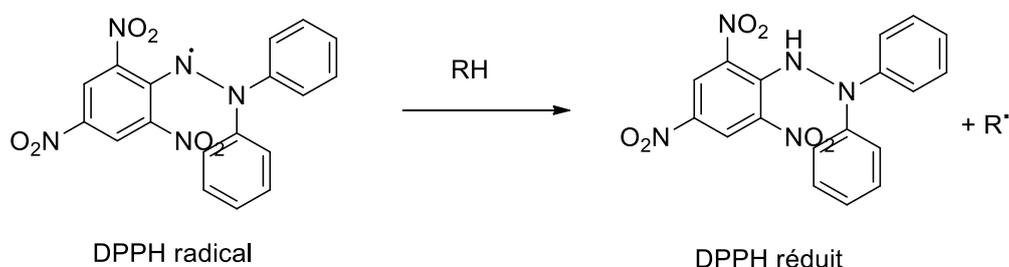


Figure IV.3: Réduction du DPPH

II.1.2. Protocole

La capacité de l'extrait à inhiber le radical DPPH a été déterminée par la méthode spectrophotométrique décrite par Blois [238] avec quelques modifications. Concrètement, 0,5 mg de l'extrait de nos huiles a été dissous dans 10 mL de méthanol pour obtenir une solution de (50 mg/L). 20 μ L de la solution ont été ajoutés à 180 μ L de la solution méthanolique de DPPH (0,2 mM). Après une incubation de 30 min à l'obscurité et 25°C, les absorbances ont été lues à 520 nm, le méthanol étant utilisé comme échantillon blanc. La Vitamine C (VIT C, 4mg/L) a été utilisé comme référence. Toutes les mesures ont été réalisées en trois essais. Le pourcentage de l'inhibition du radical DPPH a été calculé selon la formule :

$$\% \text{ inhibition} = 100 (A_{(\text{blanc})} - A_{(\text{échantillon})}) / A_{(\text{blanc})}.$$

Où: $A_{(\text{blanc})}$ est l'absorbance du blanc et $A_{(\text{échantillon})}$ l'absorbance de l'échantillon,

Chapitre IV : Activité biologique

II.2. Activité anti-acétylcholinestérase (anti-AChE) :

L'évaluation des activités anti-AChE d'un produit peut se réaliser selon plusieurs méthodes dont la plupart sont des méthodes colorimétriques telles que la méthode d'Ellman, celle que nous avons choisie l'évaluation de nos extraits.

II.2.1. Principe

Ce test est appelé aussi méthode de la détermination quantitative des peptides par sulfhydryle (-SH). Il s'agit d'un protocole standard pour la détermination des thiols libres. Le test d'Ellman est basé sur le clivage de l'acétylthiocholine par l'AChE pour produire de la thiocholine. Cette dernière réagit avec le 5,5'-dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un anion de couleur jaune [239] (Figure IV.4). En présence d'un inhibiteur enzymatique, cette réaction permet d'étudier les paramètres cinétiques et par la suite de quantifier l'inhibition exprimée par son IC₅₀ (concentration diminuant l'activité enzymatique de moitié).

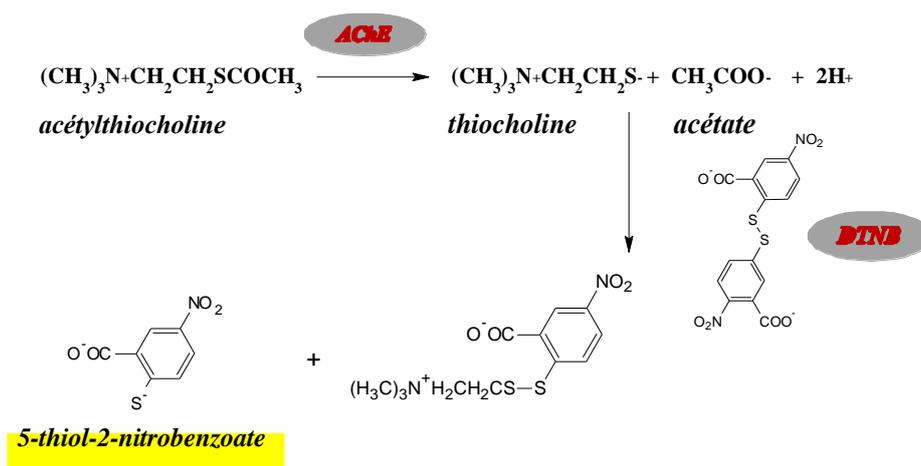


Figure IV.4 : Réaction colorimétrique d'Ellman.

II.2.2. Protocole

L'étude de l'activité anti-AChE est menée selon la méthode d'Ellman, avec quelques modifications. Dans cette étude, 50 µl d'une solution tampon de phosphate de sodium (0,1 M à pH = 8), 25 µl de solution d'enzyme (AChE), 25 µl de l'extrait de nos huiles à une concentration de 50 mg/L et 125 µl de DTNB sont placés dans des microplaques à 96 puits et sont incubés pendant 15 min à 25°C. Tous les extraits ont été remis en suspension dans le DMSO suivi par une dilution dans le tampon de sorte que le DMSO ne dépasse pas 1%. La

Chapitre IV : Activité biologique

réaction a ensuite été initiée avec l'addition de 25 µl d'iodure d'acétylthiocholine (ou chlorure de butyrylthiocholine). L'hydrolyse de l'iodure d'acétylthiocholine (ou chlorure de butyrylthiocholine) a été suivie à 412 nm par la formation de l'anion jaune 5-thio-2-nitrobenzoate par suite de la réaction de DTNB avec la thiocholine catalysée par des enzymes.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé à partir de la formule :

$$(1 - S / E) \times 100, \text{ où}$$

E et S sont les activités enzymatiques respectives sans et avec l'échantillon.

La galanthamine a été utilisé comme témoin positif. Les résultats obtenus présentent les moyennes avec les écarts types de trois répétitions.

II.3. Activité anti-inflammatoire par inhibition de la lipoxigenase (LOX)

II.3.1. Principe

La méthode consiste à inhiber le cycle de la LOX donc à empêcher la production de leucotriènes (LT) et la lipoxine (LX). Les leucotriènes générés par la LOX sont inflammatoires et sont connus pour être de puissants médiateurs jouant un rôle important dans les réactions allergiques. Ils peuvent aussi intervenir dans l'ischémie et l'athérosclérose. L'accident cérébro-vasculaire, les lésions cérébrales traumatiques et la maladie d'Alzheimer ont également été reliés à l'activité des LOX surtout à la LOX-5 et des leucotriènes. Il a été montré que la lipoxigénase produite dans l'organisme joue un rôle important dans les désordres tels que l'asthme, l'inflammation. Inhiber la LOX est donc une voie de blocage des désordres ou de traitement de ces maladies.

II.3.2. Protocole

L'activité inflammatoire de tous les extraits a été déterminée sur la lipoxigénase de soja comme décrit par Bekir *et al* [240], avec quelques modifications. 20 µl d'extrait de nos huiles à 50 mg / L a été mélangée avec un tampon phosphate de sodium (pH 7,4) contenant du 5-LOX et 60 µl d'acide linoléique (3,5 mM), pour avoir un volume final de 1 ml. Toutefois, la solution à blanc ne contient pas le substrat, mais sera ajouté à 30 µl de solution tampon. Tous les extraits ont été remis en suspension dans le DMSO suivis par une dilution dans le tampon de sorte que le DMSO ne dépasse pas 1 %. Le mélange a été mis à incuber à 25 ° C pendant 10 minutes et l'absorbance a été déterminée à 234 nm. Le changement d'absorption avec la

Chapitre IV : Activité biologique

conversion de l'acide linoléique en 13-hydropéroxyoctadéca-9,11-diénoate (caractérisée par l'apparition du diène conjugué à 234 nm) est observé après 10 min à 25 ° C. L'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) a été utilisé comme témoin positif.

$$\% \text{ inhibition} = 100 (A_{(\text{blanc})} - A_{(\text{échantillon})}) / A_{(\text{blanc})}.$$

Où: $A_{(\text{blanc})}$ est l'absorbance du blanc et $A_{(\text{échantillon})}$ l'absorbance de l'échantillon,

II.4. Activité cytotoxique par le test MTT

II.4.1. Protocole

La cytotoxicité des différents extraits a été évaluée en fonction de deux lignées de cellules tumorales (OVAR) et (IGROV) selon le procédé de Bekir *et al* [240]. En bref, les lignées de cellules tumorales humaines ont été ensemencées dans une plaque 96 puits à 3×10^4 cellules/puits dans 100 μ l et de milieu de culture contenant l'échantillon à la concentration de 50 μ g/mL ont été ajoutés. La croissance cellulaire a été estimée par le MTT (bromure de 3-(4,5- diméthyl thiazol-2-yl) -2,5- diphényltétrazolium) ; dosage basé sur le clivage du sel de tétrazolium par les déshydrogénases mitochondriales dans les cellules viables. Le produit formazan Blue résultant peut être mesuré par spectrophotométrie. Les extraits testés ont été remis en suspension dans du DMSO suivi par une dilution dans le tampon de sorte que le DMSO ne dépasse pas 1 %. Le test a été réalisé en triple.

$$\% \text{ inhibition} = 100 (A_{(\text{blanc})} - A_{(\text{échantillon})}) / A_{(\text{blanc})}.$$

Où: $A_{(\text{blanc})}$ est l'absorbance du blanc et $A_{(\text{échantillon})}$ l'absorbance de l'échantillon,

Chapitre IV : Activité biologique

III. Résultats et discussions

III.1. Activité anti-oxydante

Les résultats de l'activité anti-oxydante de différents extraits de pépins de melon et de courge obtenus par les différents modes d'extraction sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau IV.1 : Résultats de l'activité anti-oxydante des extraits de pépin de courge et de melon

Extrait	Code	Conditions d'extraction	% d'inhibition
Pépins de melon	HMS	n-hexane	4,0 ± 0,5
	EM	Ethanol	5,5 ± 1,3
	HM04	CO ₂ : 700 bars à 57°C	5,96 ± 0,9
	HM05	CO ₂ : 550 bars et 70°C	6,81 ± 0,7
Pépins de courge	HCS	n-hexane	35,4 ± 4,3
	HC06	CO ₂ : 800 bars et 40°C	5,5 ± 0,5
	HC11	CO ₂ : 100 bars, 40°C, Ethanol (co-solvant)	9,1 ± 0,6
	HC12	CO ₂ : 250 bars, 40°C Ethanol (co-solvant)	6,3 ± 0,5
VIT C, 4 mg/L			96,03%

L'histogramme des résultats de l'activité antioxydante est représenté dans la figure IV.5. Nous avons constaté que les extraits des pépins de melon obtenus par les différentes méthodes d'extraction donnent un pourcentage d'inhibition qui varie entre 4,0% pour l'extraction avec l'hexane et 6,8% obtenu par le CO₂ SC à 550 bars et 70°C. Ces pourcentages restent très faibles par rapport à l'extrait de référence (VIT C, 4 mg/L) qui donne un pourcentage d'inhibition de 96,03%.

Pour les extraits de pépin de courge, le pourcentage d'inhibition le plus élevé est observé avec l'huile obtenue par extraction dans l'hexane en utilisant le soxhlet et qui atteint les 35,4%. Des pourcentages très faibles sont observés avec les extraits obtenus par le CO₂ SC et qui

Chapitre IV : Activité biologique

varient entre 5,5% et 9,1%. Ce résultat s'explique évidemment par la très faible présence des substances responsables de l'activité anti-oxydante tels que les polyphénols.

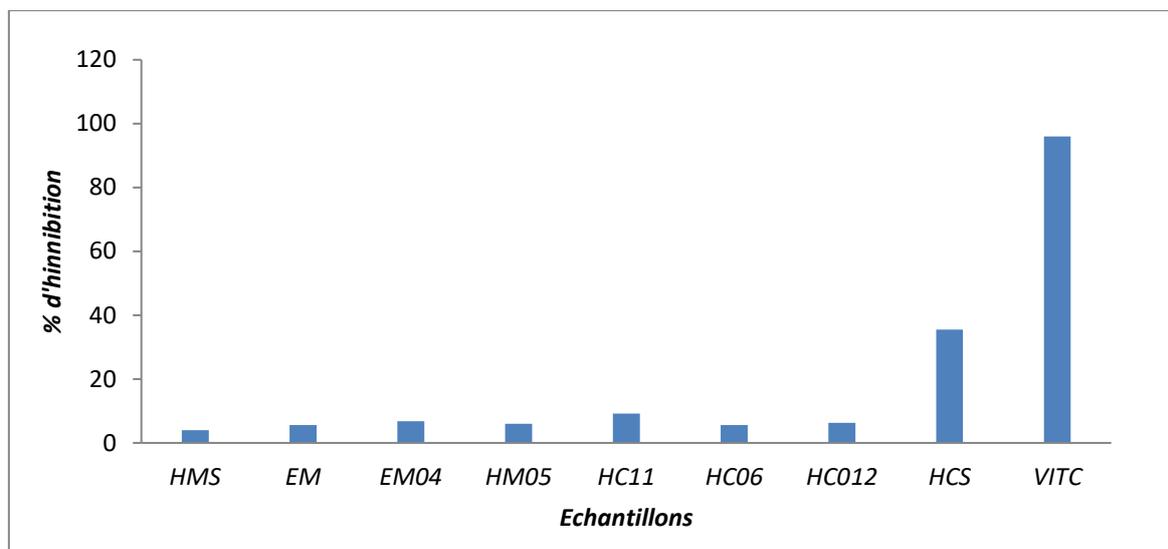


Figure IV.5 : Histogramme de l'activité antioxydante de l'huile de pépins de courge et de melon

III.2. Activité anti-inflammatoire

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire de différents extraits de pépins de melon et de courge obtenus par les différentes méthodes d'extraction sont représentés dans le tableau IV.2.

Pour les pépins de melon, le pourcentage le plus élevé 18,7% est observé dans l'extrait obtenu avec l'hexane et celui obtenu par le CO₂ SC à 550 bars et 70°C. L'extrait éthanolique donne un pourcentage de 10,7% et l'extrait obtenu par le CO₂ SC à 700 bars donne un pourcentage d'inhibition de 11,3%. Le reste des extraits conduit à des pourcentages faibles et qui varient entre 4,1 et 7,5%.

L'extrait de pépins de courge obtenu avec l'hexane représente un pourcentage d'inhibition le plus élevé à 33,1%. L'extrait obtenu par le CO₂ SC à 800 bars donne un pourcentage d'inhibition le plus faible de 6,37%, par contre à 100 bars et 250 bars en utilisant l'éthanol comme co-solvant les pourcentages d'inhibition sont de 12,8% et 10,6% respectivement. Cela signifie que le co-solvant entraîne un peu de produits phénoliques dans les extraits.

Chapitre IV : Activité biologique

Cependant, on constate donc que les extraits qui possèdent le plus grand pourcentage d'inhibition pour les pépins de melon et ceux de courge correspondent aux extraits obtenus avec l'hexane comme solvant en utilisant le soxhlet dans les deux types de graines. Il est évident que ce pourcentage reste faible par rapport à l'extrait de référence (NDGA, 0,26 mg/L) qui est de 52,4% mais on ne peut pas négliger la présence de substance actif même à faible quantité et qui peut correspondre à la partie insaponifiable de l'huile dont beaucoup d'études ont révélé la présence d'une quantité importante de phytostérols et de tocophérols. Ces derniers peuvent être à l'origine de certaines activités biologiques, d'où l'importance de faire une étude plus approfondie de la partie insaponifiable de ces huiles.

Tableau IV.2 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire des extraits de pépins de courge et de melon.

Extrait	Code	Conditions d'extraction	% d'inhibition
Pépins de melon (50mg/L)	HMS	n-hexane	18,7 ± 1,6
	EM	Ethanol	10,7 ± 1,1
	HM01	CO ₂ : 400 bars et 40°C	05,9 ± 0,6
	HM02	CO ₂ : 700 bars et 40°C	04,1 ± 0,1
	HM03	CO ₂ : 550 bars et 40°C	04,1 ± 0,7
	HM04	CO ₂ : 700 bars à 57°C	11,3 ± 0,2
Pépins de courge (50mg/L)	HM05	CO ₂ : 550 bars et 70°C	18,7 ± 1,1
	HM06	CO ₂ : 250 bars et 40°C	07,5 ± 0,2
	HCS	n-hexane	33,1 ± 2,3
	HC06	CO ₂ : 800 bars et 40°C	06,3 ± 0,6
	HC11	CO ₂ : 100 bars à 40°C, Ethanol (co-solvant)	12,8 ± 1,2
	HC12	CO ₂ : 250 bars et 40°C Ethanol (co-solvant)	10,6 ± 1,0
NDGA 0,26mg/L			52,41

L'histogramme des résultats de l'activité anti-inflammatoire est représenté dans la figure IV.6.

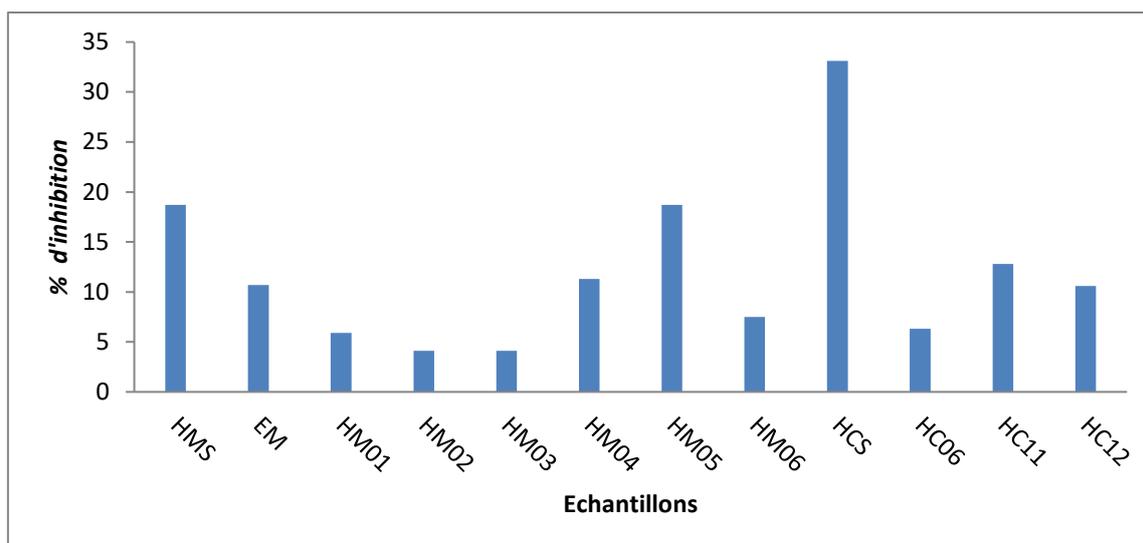


Figure IV.6 : Histogramme de l'activité anti-inflammatoire de l'huile de pépins de courge et de melon

III.3. Activité anticholinestérase

Les résultats de l'activité anti-cholinestérase de différents extraits de pépins de melon et ceux de courge obtenus par les différents modes d'extraction sont représentés dans le tableau IV.3 suivant :

Tableau IV.3 : Résultats de l'activité anticholinestérase des extraits de pépin de courge et de melon

Extrait	Code	Conditions d'extraction	% d'inhibition
Pépins de melon	HMS	n-hexane	0,00
	EM	Ethanol	0,00
	HM04	CO ₂ : 700 bars à 57°C	0,00
	HM05	CO ₂ : 550 bars et 70°C	0,00
Pépins de courge	HCS	n-hexane	15,0 ± 1,2
	HC06	CO ₂ : 800 bars et 40°C	13,1 ± 1,2
	HC11	CO ₂ : 100 bars, 40°C, Ethanol (co-solvant)	6,4 ± 1,9
	HC12	CO ₂ : 250 bars, 40°C Ethanol (co-solvant)	14,0 ± 1,8
		Galantamine 1,5 mg/L	73,47

L'histogramme des résultats de l'activité anti-inflammatoire est représenté dans la figure IV.7.

Chapitre IV : Activité biologique

L'activité anti-cholinestérase dans tous les extraits de pépins de melon est pratiquement nulle, ce qui explique l'absence de substance douée de cette activité dans les graines de melon. Un pourcentage très faible par rapport à l'extrait de référence (Galantamine, 1,5 mg/L à 73,47%) est observé dans les extraits de pépins de courge variant entre 6,4% et 15,0%. Là aussi, on pourrait peut-être attribuer cette faible activité à la faible teneur de substance active présente dans la partie insaponifiable de l'huile végétale de courge.

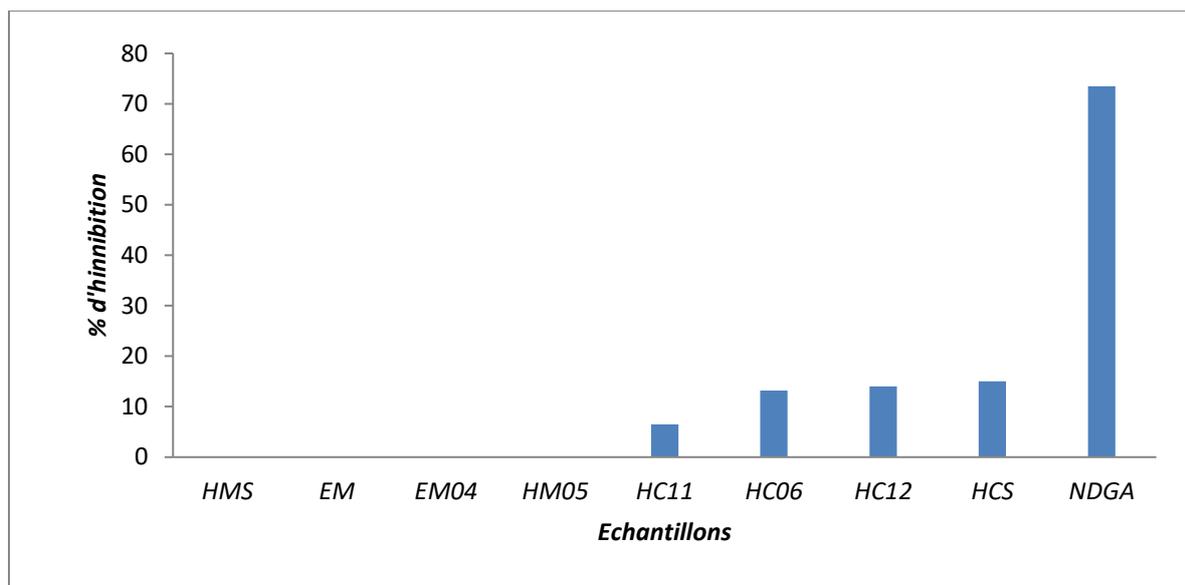


Figure IV.7 : Histogramme de l'activité anticholinestérase des extraits des pépins de courge et de melon

III.4. Activité cytotoxique

Les résultats de l'activité cytotoxique des extraits de pépins de melon et ceux de courge sont représentés dans les tableaux IV.4 et IV.5 respectivement. L'activité cytotoxique a été réalisée sur deux lignées de cellules tumorales IGROV et OVAR, pour les extraits de pépins de melon et ceux de courge obtenus seulement avec le CO₂ SC dans les différentes conditions d'extraction.

Chapitre IV : Activité biologique

Tableau IV.4 : Résultats de l'activité cytotoxique de pépins de melon

Conditions d'extraction	Code	% d'inhibition	
		IGROV	OVAR
CO ₂ : 400 bars et 40°C	HM01	21,7 ± 1,6	14,3 ± 1,4
CO ₂ : 700 bars et 40°C	HM02	22,3 ± 1,5	14,7 ± 0,9
CO ₂ : 550 bars et 40°C	HM03	18,7 ± 2,1	11,2 ± 2,1
CO ₂ : 700 bars et 57°C	HM04	19,4 ± 1,0	11,4 ± 0,4
CO ₂ : 550 bars et 70°C	HM05	19,4 ± 1,3	12,0 ± 2,2
CO ₂ : 250 bars et 40°C	HM06	11,9 ± 0,1	11,3 ± 3,0
Soxhlet (hexane)	HMS	23,7±0,1	12,8±0,1
Macération (Ethanol)	EM	29,9±0,1	21,6±0,1

Dans les extraits de pépins de melon, le pourcentage d'inhibition le plus élevé dans le cas des cellules tumorales IGROV est de 29,9%, correspondant à l'extrait obtenu par macération dans l'éthanol. Le pourcentage le plus faible est de 11,9% et qui correspond à l'extrait obtenu à 250 bars, à 40°C. Dans le cas des cellules tumorales OVAR, les pourcentages d'inhibition varient entre 11,2% et 21,6%, dont le plus élevé correspond aussi à l'extrait obtenu par macération dans l'éthanol.

Chapitre IV : Activité biologique

Tableau IV.5 : Résultats de l'activité cytotoxique de pépins de courge

Conditions d'extraction	Code	% d'inhibition	
		IGROV	OVAR
CO ₂ : 250 bars et 40°C	HC01	21,4 ± 0,8	18,7 ± 3,2
CO ₂ : 400 bars et 40°C	HC02	18,6 ± 1,4	16,0 ± 0,2
CO ₂ : 620 bars et 40°C	HC05	32,3 ± 1,1	13,1 ± 2,4
CO ₂ : 800 bars et 40°C	HC06	16,2 ± 0,6	11,6 ± 0,3
CO ₂ : 100 bars à 40°C, Ethanol (co-solvant)	HC11	16,9 ± 2,5	16,0 ± 0,4
CO ₂ : 250 bars et 40°C Ethanol (co-solvant)	HC12	26,9 ± 3,4	11,9 ± 1,4

Dans les extraits de pépin de courge, nous avons remarqué que le pourcentage d'inhibition des cellules tumorales est de même ordre de grandeur que celui des pépins de melon. Ils varient entre 16,2% et 32% pour les cellules tumorale IGROV dont le plus élevé correspond à l'extrait obtenu à 600 bars et 40°C et le plus faible correspond à l'extrait obtenu à 800 bars et 40°C.

Dans le cas des cellules tumorales OVAR, les pourcentages d'inhibition varient entre 11,6% et 18,7% dont le plus important correspond à l'extrait obtenu à 250 bars et 40°C et le plus faible pourcentage correspond à l'extrait obtenu à 800 bars et 40°C. Bien que ces pourcentages restent faibles, on ne peut pas négliger la présence de faible quantité de la substance active dans nos extraits qui peut correspondre à la partie insaponifiable de l'huile.

IV. Conclusion partielle:

L'huile de pépins de melon et de courge contient principalement des triglycérides. Un pourcentage très faible représente la partie insaponifiable de l'huile et qui constitue des phytostérols, des tocophérols ou autre substances pouvant être à l'origine d'une activité anti oxydante. Nyam *et al* [94] ont étudié la composition en tocophérols et phytostérols dans l'huile de pépins de melon de Kalahari par la technologie du CO₂ supercritique. Dans ses travaux, la présence de ces substances dans la partie insaponifiable de l'huile était estimée à

Chapitre IV : Activité biologique

274mg/100g d'huile de tocophérol dans les conditions de 290 bars et 58°C. Les phytostérols sont présents avec une concentration de 836,5 mg/100g d'huile obtenue à 300 bars et 40°C.

Une large quantité de tocophérol a également été observée dans l'huile des graines de melon (*Cucumis melo*) de trois variétés, *Dessert 5*, *hybrid1* et *honeydew* avec des teneurs respectives de 43,2, 73,1 et 82,8 mg/100g d'huile) dont le γ -tocophérol représente la teneur la plus importante pour les trois variétés [241].

L'analyse des tocophérols dans l'huile extraite des graines de citrouille (*Cucurbita pepo*) cultivée en Algérie montre une forte prédominance des isomères β + γ -tocophérol, avec des teneurs de 1551mg/100g d'huile, une teneur plus faible en δ -tocophérol (391mg/100g) est observée [242]. Une autre étude publiée par Rabrenovic *et al* en 2014 [243], montre que l'huile de pépins de six variétés de citrouille (*Cucurbita pepo*) est une source riche en tocophérols (entre 38,03 et 64,11 mg/100g d'huile), stérol (entre 718,1 et 897,8 mg/100g d'huile), squalène (entre 559,6 et 747,0 mg/100g d'huile) ;

Au-delà des vertus nutritionnelles évidentes des graines de Cucurbitacées, des études scientifiques récentes ont révélé que les graines d'une certaine variété de courge, ainsi que son huile pressée, peuvent présenter un grand intérêt contre les problèmes cardiovasculaires, tout en ayant d'autres propriétés bénéfiques sur la santé : antioxydante, antiinflammatoire, analgésique, insulino-stimulante [136-141, 244].

Cependant et en général, les résultats de nos tests biologiques *in vitro* ont révélé une faible activité anti-oxydante, anti-inflammatoire, anti-cholinestérase et cytotoxique. Cela s'explique par la faible ou l'absence des substances responsables de ces activités dans tous les extraits. Toutefois, il nous semble intéressant de faire une étude sur la composition de la partie insaponifiable de l'huile de ces pépins dans le but de caractériser de façon précise l'origine de son ou ses activités biologiques.

Conclusion générale

Conclusion générale

Notre travail est une contribution à l'étude de la composition en acides gras polyinsaturés des graines de deux cucurbitacées très cultivés en Algérie à savoir, le melon (*Cucumis melo Inodorus*) et la courge (*Cucurbita moschata butternut*). Le premier, dégusté cru et la deuxième, consommée cuite, alors que les pépins qu'ils contiennent en quantité importante sont jetés par les consommateurs en ignorant leurs valeurs nutritives et médicinales.

De ce fait, nous nous sommes intéressés à une valorisation de ces graines en étudiant leur composition chimique en minéraux et en acides gras. Ces derniers, ont été obtenus par extraction classique au soxhlet ainsi que grâce au CO₂ supercritique, puis analysés. Nous avons ensuite tenté une évaluation de quelques activités biologiques afin de compléter un tableau tant soit peu complète, compte tenu de leurs structures.

Les travaux réalisés ont permis de constater, d'une part, que les pépins de melon (*Cucumis melo L. Inodorus*) et ceux de la courge (*Cucurbita moschata Butternut*) constituent une source très importante en minéraux bénéfiques notamment, le potassium et le magnésium, lesquels jouent des rôles majeurs dans le maintien de paramètres biologiques de l'organisme humain. Les teneurs en lipides des pépins de melon et de la courge sont respectivement de 30,77% et 37,8% ; ils constituent de ce fait une source non négligeable en acides gras polyinsaturés de 60,1% pour le melon et 50,7% pour la courge, dont principalement l'acide linoléique, de la famille des oméga-6.

En effet, l'analyse de la composition de l'huile de ces deux cucurbitacées a révélé la présence des acides gras couramment présents dans les huiles végétales à savoir les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique. Les teneurs obtenues suite à l'extraction au soxhlet avec l'hexane sont respectivement de 5,95%, 2,87%, 21,95 et 69,24% dans le melon et de 14,74%, 4,22%, 30,71% et 50,33% dans la courge.

D'autre part, l'extraction des huiles avec la technologie du CO₂ supercritique en variant les conditions opératoires nous a permis de constater que l'augmentation de la pression induisait une augmentation du rendement de l'huile tout en réduisant le temps d'extraction. Cependant, l'effet de la variation de la température d'extraction est complexe du fait de l'influence simultanée de la masse volumique du solvant et de la tension de vapeur des constituants de

Conclusion générale

l'huile. L'ajout du co-solvant lors de l'extraction au CO₂ supercritique améliore nettement le rendement d'extraction et favorise l'extraction d'autres substances telles que les polyphénols tout en offrant en même temps, des produits démunis de solvants toxiques.

Les conditions opératoires impactent sur la sélectivité de l'extraction et montrent que dans les conditions appliquées, le taux des acides gras n'a pas été modifié et reste très semblable au taux obtenus par la méthode conventionnelle. Ceci est en accord avec la littérature et confirme l'efficacité de la technologie de l'extraction par CO₂ supercritique des triglycérides en raison de leurs solubilités importantes à haute pression. Dans le but de mettre en lumière la solubilité de l'huile végétale dans le CO₂ supercritique, nous avons calculé expérimentalement la solubilité de nos huiles à partir des pentes des courbes qui représentent la masse de l'huile extraite en fonction de la quantité de CO₂ consommée dans les différentes conditions. Les résultats ont donné des valeurs comparables aux valeurs de la littérature et varient entre 3,74 et 15,17 mg huile/g CO₂ dans le cas des pépins de melon et entre 5,07 et 27,02 mg huile/g CO₂ dans le cas de pépins de courge.

Nous avons corrélé ces résultats avec la solubilité des huiles végétales calculées selon trois équations développées par Chrastil, Del Valle Aguilera et Adachi. La solubilité expérimentale de l'huile de pépins de courge a donné une meilleure corrélation avec l'équation d'Adachi à des pressions inférieures à 600 bars, alors que la solubilité de l'huile de pépins de melon n'a donné de bonnes corrélations avec aucune des trois équations. De plus, sa solubilité reste inférieure à celle de l'huile de pépins de courge. Cela signifie que la composition de l'huile de pépins de melon ne comporte pas autant de substances solubles dans le CO₂ supercritique.

L'utilisation de la technologie du CO₂ supercritique apparaît comme une meilleure solution alternative permettant de répondre à l'exigence des industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires. Elle permet de diminuer ou d'éliminer les résidus de solvants organiques dans les produits finaux. Il est bon de signaler que la présence de ces résidus intervient négativement sur la qualité du produit final, spécialement en ce qui concerne le critère de l'innocuité du produit vis-à-vis de la santé humaine et animale.

Les résultats de l'activité biologique, bien que mitigées, varient en fonction de la méthode d'extraction. Cette dernière conditionne la polarité des substances extraites. Néanmoins, et à l'issue de ces travaux, nous pouvons conclure que la composition en acides gras polyinsaturés

Conclusion générale

de l'huile de pépins de melon et de courge cultivés en Algérie confère à ces huiles de bonnes propriétés nutritionnelles et diététiques.

En guise de perspectives, il nous semble intéressant de mener une étude plus approfondie sur la composition et la quantification de la partie insaponifiable de l'huile obtenue par les deux méthodes d'extraction, en optimisant les conditions opératoires. L'objectif ultime serait d'obtenir et de fournir de plus amples informations sur la meilleure façon d'obtenir une huile de qualité nutritionnelle optimale.

Références bibliographiques

1. Rimm, E. M., Stampfer, M. J. (1997). The role of antioxidants in preventive cardiology. *Curr Opin Cardiol*, 12, 188-194.
2. Johnson, L. A., Suleiman, T. M., Lusas, E. W. (1979). Sesame protein: A review and prospectus. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 6, 463-468.
3. Shokraii, H. E. (1977). Chemical composition of the pistachio nuts (*Pistachia vera L.*) of Kerman, Iran. *J. Food Sci*, 42 (1), 244-245.
4. Khalil, J. K., Chughtai, M. I. D. (1983). Chemical composition and nutritional quality of five peanut cultivars grown in Pakistan. *Plant Food Hum Nutr*, 33 (1), 63-70.
5. Koyuncu, M. A., Koyuncu, F., Bostan, S. Z., Islam, A. (1996). Change of fat content and fatty acid composition during the fruit development period in the hazelnuts Tombul and Palaz cultivars grown in Ordu. *Acta Horticulturae*, 445, 229-233.
6. Barnathan, G. (1993). Thèse de Doctorat en science de la vie et de la Santé. Acides gras et stéroïdes d'Eponges Marines du Sénégal et de Nouvelle Calédonie. Nantes France.
7. Ackman, G. (1989). Fatty acids in "Marine Biogenetic Lipids; Fats, and oils R.G. ACKMAN Ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, pp 103 - 137.
8. Burr, O., Burr, M. M. (1929). A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol. Chem*, 82, 345-367.
9. Bretonne, E., Ferret, S. (1960). Recherche sur les acides gras polyéniques essentiels et indispensables des lipides des organes du rat. *Arch. Sc. Physiol*, 14, 175-215.
10. Mead, J. F. (1961). Synthesis and metabolism of Polyunsaturated fatty acids. *Feds Proc Fed Am Soc Exp Biol*, 20, 952-955.
11. Thomasson, H. J. (1962). Les acides gras essentiels. *Rev. Fr. Corps Gras*, Numéro Spécial des journées d'information sur les corps gras alimentaires.
12. Adrian, J., Potus, J., Frangne, R.. (1999). La Science Alimentaire de A et Z. Lavoisier TEC & DOC éd, Paris.
13. Brenes M., Garcia A., Rios J. J., Garcia P., Garrido A. (2002) Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *IJFST*. 37 (6), 615-625.
14. Visioli, F., Galli, C. (1998). The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Res*, 56 (5), 142-147.
15. Ficarra, P., Ficarra, R., De Pasquale, A., Monforte, M. T., Calabro, M. L. (1991) HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of *Olea europaea L.* *Farmaco*, 46 (6), 803-809.

16. Rotondo, S., De Gaetano, G. (2000). Protection from cardiovascular disease by wine and its derived products. Epidemiological evidence and biological mechanisms. *World Rev Nutr Diet*, 87, 90-113.
17. Kohyama, N., Nagata, T., Fujimoto, S., Sekiya, K. (1997). Inhibition of arachidonate lipooxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci Biotech Bioch.* 61 (2), 347-350.
18. Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Servili, M., Montedoro, G. F. & Galli, A. (1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb Res*, 78 (1), 151-160.
19. Evans, H. M., Emerson, O. H., Emerson, G. A. (1936). The isolation from wheat-germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having the properties of vitamin E. *J. Biol. Chem*, 113, 319-332.
20. Feinberg, M., Favier, J. C., Ireland-Ripert, J. (1987) – Répertoire général des aliments. Table de compositions des corps gras. Technique et documentation. Lavoisier. Paris.
21. Zou, L., Akoh, C. C. (2013). Identification of Tocopherols, Tocotrienols, and Their Fatty Acid Esters in Residues and Distillates of Structured Lipids Purified by Short-Path Distillation. *J. Agric. Food Chem*, 61, 238-246.
22. Weng-Yew, W., Leigh C, W., Chee Wai, F., Wei Ney, Y., Lindsay, B. (2017). Anti-inflammatory γ - and δ -tocotrienols improve cardiovascular, liver and metabolic function in diet-induced obese rats. *Eur J Nutr*, 56, 133-150.
23. Kordsmeier, M., Howard, L. R., Brownmiller, C., Proctor, A., Hauer-Jensen, M. (2015). Isolation of Gamma and Delta Tocotrienols from Rice Bran Oil Deodorizer Distillate Using Flash Chromatography. *J Am Oil Chem Soc*, 92, 1243–1252.
24. Ahsan, H., Ahad, A., Waseem A. Siddiqui, W. A. (2015). A review of characterization of tocotrienols from plant oils and foods. *J Chem Biol*, 8, 45–59.
25. Fu, J.Y., Che, H.L., Tan, D.M.Y., Teng, K.T. (2014). Bioavailability of tocotrienols: evidence in human studies. *Nutr and Metab*, 11, 1.
26. Feki, M., Souissi, M., Mebazaa, A. (2001). La vitamine E : structure, métabolisme et fonctions. *Ann. Med. Interne*, 152, 384-391.
27. Piironen V., Lindsay D. G., Miettinen T. A., Toivo J., Lampi A.M. (2000). Review. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric*, 80, 939-966.

28. Nigon, F., Serfaty-Lacrosniere, C., Chauvois, D et al. (2000). Les phytostérols : une nouvelle approche diététique de l'hypercholestérolémie. *S T V, 12*, 483-490.
29. Weihrauch, J., Gardner, J. (1978). Sterol content of foods of plant origin. *J. Am. Diet. Assoc, 73*, 39-47
30. De Jong, N., Plat, J., Mensink, R. P. (2003). Metabolic effects of plant sterols and stanols. *J. Nutr. Biochem, 4*, 362-369
31. Grinard, V., Dupont, G., Locquin and R. Baud. (1947). traité de chimie organique. Tome Diacide –polyacide –corps gras –dérivés sulfuré ou sélénés. Masson et Cie Editeurs. Paris.
32. Gould, W. A. (1992). Total quality management for industries Baltimore.USA:CTI Publications INC.
33. Choe, E., Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr Rev Food Sci F, 5*, 169-186.
34. Ollé, M. (2002). Analyse des corps gras. Techniques de l'ingénieur, dossier P3325, pp 15.
35. Njussa, M. (1999). Etude des propriétés physico-chimiques des huiles végétales camerounaises. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du D.I.P.E.S.II, 50 P.
36. Ndeye, A. K. (2001). Etude de la composition chimique et de la qualité d'huiles végétales artisanales consommées aux SENEGAL. Thèse pour l'obtention du grade de docteur en pharmacie.
37. Mambap, S. R. (1989). Etude chimique et valorisation des graines de soja. Mémoire de fin d'études. ENS université de Yaoundé. Page 8
38. Djom, J. H. (1993). Suivi de la palmisterie du processus de fabrication de l'huile de palme et contrôle de qualité des produits finis. Mémoire de fin d'étude. ENSIAAAC .Université de Ngaoundéré. 52 P.
39. Brühl, L., Matthäus, B., Fehling, E., Wiege, B., Lehmann, B., Luftmann, H., Bergander, K., Quiroga, K., Scheipers, A., Frank, O., Hofmann, T. (2007). Identification of bitter off-taste compounds in the stored cold pressed linseed oil. *J. Agric. Food Chem, 55*, 7864-7868.
40. Corma, A., Iborra, S., Velty, A. (2007). Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals. *Chem. Rev, 107*, 2411-2502
41. Krogh K. A., Halling-Sorensen B., Mogensen B. B., Vejrup. K.V. (2003). Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere, 50*, 871–901

42. Knowles, A. (2008). Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *Environmentalis*, 28, 35–44.
43. Ting, C. C., Chen, C. C. (2011). Viscosity and working efficiency analysis of soybean oil based bio-lubricants. *Measurement*, 44, 1337–1341.
44. Erhan, S. Z., Asadauskas, S. (2000). *Ind. Crops Prod*, 11, 277–282.
45. Salimon, J., Salih, N., Yousif, E. (2011). Chemically modified biolubricant basestocks from epoxidized oleic acid: Improved low temperature properties and oxidative stability. *J Saudi Chem Soc*, 15, 195–201
46. Campanella A., Rustoy E., Baldessari A., Baltanás M. A. (2010). Lubricants from chemically modified vegetable oils. *Bioresour Technol*, 101, 245–254
47. PROLEA 2008, «Statistiques des oléagineux et protéagineux».
48. USDA, numéro 01/ mars 2014/ Marché des oléo-protéagineux.
49. USDA, Oil seeds: World Market and Trade (mars 2013).
50. Rastoin, J. L., Benabderrazik, E. H. Céréales et oléoprotéagineux au Maghreb, institut de Prospective Economique du Monde Méditerranée, Mai 2014.
51. Dijkstra, A., Segers, J. (2007) Production and refining of oils and fats. dans: The Lipid Handbook with CD-ROM, Third Edition. Eds Harwood, J. L., Gunstone, F.D., Dijkstra, A. D., CRC Press, pp 143-262
52. Anderson, D. (2005). A primer on oils processing technology. dans: Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Eds Shahidi, F., John Wiley & Sons, volume 5, pp 1-56
53. Matthäus, B. (2012). Oil technology dans: Technological Innovations in Major World Oil Crops, volume 2. Eds Gupta, S. K., Springer, New York, USA, pp 23-92
54. Schwartzberg, H. G. (1997). Expression of fluid from biological solids. *Sep. Purif. Rev*, 26, 1-213
55. Vadke, V. S., Sosulski, F. W. (1988). Mechanics of oil expression from canola. *J. Am. Oil Chem.' Soc*, 65, 1169-1176
56. Kemper, T. G. (2005). Oil extraction. dans: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Edible Oil and Fat Products: Processing Technologies. Eds Shahidi, F., John Wiley & Sons, Inc., 5, pp 57-98
57. Pagès-Xatart-Parès, X. (2008) Technologies des corps gras (huiles et graisses végétales) Techniques de l'ingénieur, dossier F6070, pp 19
58. Soxhlet, F. (1879). *Dinglers' Polyt.* 232, 461

59. Luque de Castro, M. D., Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J. Chromatogr. A*, 1217, 2383–2389
60. Johnson, L. (2002). Recovery, refining, converting, and stabilizing edible fats and oils. dans: *Food Lipids*. Eds Akoh, C., Min, D., Marcel Dekker, New York, USA pp 206-241
61. Ferreira-Dias, S., Valente, D. G., Abreu, J. M. F. (2003). Comparison between ethanol and hexane for oil extraction from *Quercus suber* L. fruits. *Grasas Aceites*, 54, 378-383
62. Zhang, F., Rhee, K. C., Koseoglu, S. S. (2002) Isopropyl alcohol extraction of cottonseed collets: efficiency and performance. *J Food Lipids*, 9, 147-160
63. Wan, P. J., Hron, R. J., Dowd, M., Kuk, S., Conkerton, E. J. (1995). Isohexane as an alternative hydrocarbon solvent. *Oil Mill Gaz*, 100, 28-32
64. Gandhi, A. P., Joshi, K. C., Jha, K., Parihar, V. S., Srivastav, D. C., Raghunadh, P., Kawalkar, J., Jain, S. K., Tripathi, R. N. (2003) Studies on alternative solvents for the extraction of oil - I soybean. *J. Food Sci. Technol*, 38, 369-375
65. Dijkstra, A. J. (2009). Recent developments in edible oil processing. *Eur J Lipid Sci Tech*, 111, 857-864
66. Che Man, Y., Suhardiyono, S., Asbi, A., Azudin, M., Wei, L. (1996) Aqueous enzymatic extraction of coconut oil. *J Am Oil Chem' Soc*, 73, 683-686
67. Buenrostro, M., López-Munguia, A. C. (1986) Enzymatic extraction of avocado oil. *Biotechnol Lett*, 8, 505-506
68. Sharma, A., Khare, S., Gupta, M. (2002). Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil. *J Am Oil Chem Soc*, 79, 215-218
69. Latif, S., Anwar, F. (2009) Effect of aqueous enzymatic processes on sunflower oil quality. *J Am Oil Chem Soc*, 86, 393-400
70. Dunford, N. T. (2004). Utilization of supercritical fluid technology for oil and oilseed processing. dans: *Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing*. Eds Dunford N.T. and Dunford H. B., AOCS Publishing, Champaign, Illinois, USA, pp 100-116
71. Cagniard de la Tour, C. (1822). Exposé de quelques résultats obtenu par l'action combinée de la chaleur et de la compression sur certains liquides, tels que l'eau, l'alcool, l'éther sulfurique et l'essence de pétrole rectifiée. *Annal Chimi Phys*, 21, 127-132
72. Hannay, J. B., Hogarth, J. (1879). On the solubility of solids in gases. *Proc Roy Soc*, 29, 324-326

73. Mukhopadhyay, M. (2000). Natural extracts using supercritical carbon dioxide, CRC Press. Taylor & Francis Group.
74. McHugh, M.A., Krukonis, V.J. Supercritical fluid extraction: principles and practice, 2nd edition, 1994.
75. Rantakylä, M. (2004) Particle production by supercritical antisolvent processing techniques, *Plant Design Report Series. Tehdassuunnittelun raporttisarja 76, p141*.
76. Chrastil, J. (1982). Solubility of Solids and Liquids in Supercritical Gases. *J Phys Chem*, 86, 3016-3021
77. Oakes, R.S., Clifford, A.A., Rayner, C.M. (2001). The use of supercritical fluids in synthetic organic chemistry. *J Chem Soc*, 1, 917-941.
78. Perrut, M. (1999) Extraction par fluides supercritiques. Techniques de l'ingénieur, dossier J2770, pp 12
79. Angela, M., Meireles, A. (2003). Supercritical extraction from solid: process design data (2001–2003). *Curr Opin Solid ST M*, 7, 321–330.
80. Senorans, F. J., Ibanez, E., Cavero, S., Tabera, J., Reglero, G. (2000). Liquid chromatographic mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants. *J. Chromatogr. A*, 870, 491–499.
81. Vaher, M., Koel, M. (2003). Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 990, 225–230.
82. King, J. W. (1989). Fundamentals and applications of supercritical fluid extraction in chromatographic science. *J. Chromatogr. Sci*, 27, 355-364.
83. Chafer, A., Fornari, T., Berna, A., Ibanez, E., Reglero, G. (2005). Solubility of solid carnosic acid in supercritical CO₂ with ethanol as a co-solvent. *J Supercrit Fluids*, 34, 323–329.
84. Grigonis, D., Venskutonis, P. R., Sivik, B., Sandahl, M., Eskilsson, C. S. (2005). Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloe odorata*). *J Supercrit Fluids*, 33, 223–233.
85. Shi, J., Yi, C., Jun Xue, S., Jiang, Y., Ma, Y., Li, D. (2009). Effects of modifiers on the profile of lycopene extracted from tomato skins by supercritical CO₂, *J Food Eng*, 93, 431-436.
86. Brunner, G. (2005) Supercritical fluids: technology and application to food processing. *J Food Eng*, 67, 21-33.

87. Pereira, C., Meireles, M. (2010). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food Bioprocess Tech*, 3, 340-372
88. Reverchon, E., Senatore, F. (1992). Isolation of Rosemary Oil: Comparison between Hydrodistillation and Supercritical CO₂ Extraction, *Flavour. Fragr. J*, 7, 227-230.
89. Reverchon, E., Della porta, G., Gorgoglione, D. (1997). Supercritical CO₂ extraction of volatile oil from rose concrete. *Flavour Fragr. J*, 12, 37-41.
90. Gaspar, F. (2003) *Agric. Food Chem*, 51, 6604.
91. Rombaut Natacha. (2013) Etude comparative de trois procédés d'extraction d'huile : aspects qualitatifs et quantitatifs : application aux graines de lin et aux pépins de raisin. Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Technologie de Compiègne (UTC)
92. De Lucas, A., Martinez de la Ossa, E., Rincón, J., Blanco, M. A., Gracia, I. (2002) Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *J Supercrit Fluids*, 22, 221-228
93. Martínez, M. L., Mattea, M. A., Maestri, D. M. (2008). Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil. *J Food Eng*, 88, 399-404.
94. Nyam, K. L., Tan, C. P., Karim, R., Lai, O. M., Long, K, Che Man, Y. B. (2010). Extraction of tocopherol-enriched oils from Kalahari melon and roselle seeds by supercritical fluid extraction (SFE-CO₂). *Food Chem*, 119, 1278–1283
95. Murga, R., Sanz, M. a. T., Beltrán, S., Cabezas, J. L. (2002). Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids*, 23, 113-121
96. Yilmaz, E. E., Özvural, E. B., Vural, H. (2011). Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis Vinifera*) using supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids*, 55, 924-928
97. Le Floch, F., Tena, M. T., Rios, A., Valcárcel, M. (1998). Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta*, 46, 1123-1130
98. Temelli, F. (2009). Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *J Supercrit Fluids*, 47, 583-590.
99. Del Valle, J. M., J. M. Aguilera. (1988). An improved equation for predicting the solubility of vegetable oils in supercritical CO₂. *Ind. Eng. Chem. Res*, 27, 1551-1553.
100. Adachi, Y., B. C.-Y. Lu. (1983) "Supercritical fluid extraction with carbon dioxide and ethylene. *Fluid Ph. Equilibria*, 14, 147-156.

101. Poux, M., Cagnet, P., Gourdon, C. Génie des procédés durables-Du concept à la concrétisation industrielle, Paris, 2010.
102. Rozzi, N. L., Phippen, W., Simon, J. E., Singh, R. K. (2002). Supercritical Fluid Extraction of Essential Oil Components from Lemon-Scented Botanicals, *Lebensm. Wiss. Technol*, **35**, 319–324.
103. Zacchi, P., Pietsch, A., Voges, S., Ambrogic, A., Eggers, R., Jaeger, P. (2006). Concepts of phase separation in supercritical processing. *Chem Eng Process*, **45**, 728–733.
104. Wang, L., Waller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol*, **17**, 300–312.
105. Reverchon, E., De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J Supercrit Fluids*, **38**, 146–166.
106. Moldao-Martins, M., Palavra, A., Beiro da Costa, M. L., Bernardo-Gil, M. G. (2000). Supercritical CO₂ extraction of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* aroma. *J Supercrit Fluids*, **18**, 25-34.
107. Perakis, A., Louli, V., Magoulas, K. (2005). Supercritical fluid extraction of black pepper oil. *J Food Eng*, **71**, 386-393.
108. Gaussen, H., Leroy, J. F., Ozenda, P. (1982) « Précis de botanique », 2, Masson, Paris, p. 300.
109. Walter, S., Judd, Christopher S. Campbell, Elizabeth A. Kellogg, Peter Stevens, (2002). Botanique systématique : une perspective phylogénétique, De Boeck Supérieur, p. 306
110. Paris, R. R., Moyse, H. « Précis de matière médicale », 3, Masson, Paris, 1971, 307.
111. De Wit, H. (1963). « Les plantes du monde », 1, Ed. Hachette, Paris, p. 239.
112. Ghaleb-Pelissier, M. L. (1990). Composition chimique de quelques graines de cucurbitacées », Thèse de Doctorat, I.N.P. de Toulouse.
113. Aubaille Sallenave, F. (2001). The Cucurbitaceae in Mediterranean from Babylonian to present days: the courgette and al-faqqiis case. *Bocconea*, **13**, 239-250.
114. Bois, D. (1927). Les plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les âges. Histoire, utilisation, culture. - Les phanérogames légumières. - Paris.
115. Haudricourt, A. G. & Hédin, L. (1943). L'homme et les plantes cultivées. - Paris.
116. Purseglove, I. W. (1968). Tropical Crops. Dicotyledons. 2 vol. - London & Harlow.
117. Mabberley, D. J. (1987). The Plant-Book, Cambridge University press, Cambridge.
118. Destaing, E. (1937), Textes arabes en parler des Chleuhs du Sous. Paris.

119. Sabo, H., Sadou, H., Saadou, M., Leger, C. L. (2005). Composition chimique des graines et caractéristiques physico-chimiques des huiles de *Luffa Aegyptiaca* et *Luffa Cylindrica* du Niger. *J. Soc. Ouest-Afr.Chim*, 20, 119-133
120. Kouadio, N., Lingane, M., Kamenan, A. (1996). Etude des potentialités nutritionnelles des graines de *Cucumeropsis mannii*. UFR Sciences et Technologie des Aliments-Université Abobo Adjamé, Côte d'Ivoire, 14pp.
121. Enzonga-Yoca, J.A., Nitou, J.G., Allou Kippré, V., Niamayoua, R. K. , Mvoula-Tsieri, M., Silou, T. (2011). Caractérisation chimique et évaluation de la température de conservation du lait des graines de cucurbitacées : *Cucumeropsis mannii* et *Citrullus lanatus*. *J Anim Plant Sci*, 10, 1232- 1238.
122. Milovanović, M., Pićurić-Jovanović, K. (2005). Characteristic and Composition of Melon Seed Oil, *J Agric Sci*, 50, 41-47.
123. De Melo, M. L. S., Narain, N., Bora, P. S. (2000). Characterisation of somme nutritional constituents of melon (*Cucumis melo hybrid AF-522*) seeds, *Food Chem*, 68, 411-414.
124. Olaofe, O., Adeyemi, F. O., Adediran, G. O. (1994). Amino Acid and Mineral Compositions and Functional Properties of Some Oil seeds, *J Agri Food Chem*, 42, 878-881.
125. Courtois, J. E., Perles, R. (1981). « Précis de chimie biologique », 2 Masson, Paris.
126. Jumbe, T. J., Pickens, C. A., Valentini, K., Adjepong, M., Li, W., Kinabo, J. L., Fenton, J. I. (2016). Evaluation of fatty acid and mineral content of Tanzanian seeds and oils. *J. Food Compos. Anal*, 50, 108-113.
127. Nawirska-Olszanska, A., Kita, A., Biesiada, A., Sokol-Letowska, A., Kucharska, A. Z. (2013). Characteristics of antioxidant activity and composition of pumpkin seed oils in 12 cultivars, *Food Chem*, 139, 155-161.
128. Karlesking, A. « Manuel des corps gras », 1, Ed. Tec. & Doc., Lavoisier, Paris, 1992.
129. Ng, T, J. (1993). « New opportunities in the Cucurbitaceae », Ed, New Crops. Wiley, New-York, 538.
130. Lee, D. H., Iwanski, G. B., Thoennissen, N. H. (2010). Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. *Sci. World J*, 10, 413-418.
131. Chen, J. C., Chui, M. H., Nie, R. L., Cordell, G. A., Qui, S. X. (2005). Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep*, 22, 386-399.

132. Peters, R. R., Farias, M. R., Ribeiro-do-Valle, R. M. (1997). Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. *Planta Med*, 63, 525-528.
133. Peters R. R., Saleh, T. F., Lora, M., Patry, C., de Brum-Fernandes, A. J., Farias, M. R., Ribeiro-do-Valle, R. M. (1999). Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. *Life Sci*, 64, 2429-2437.
134. Peters, R. R., Krepsky, P. B., Siqueira-Junior, J. M., da Silva Rocha, J. C., Bezerra, M. M., de Albuquerque Ribeiro, R., de Brum-Fernandes, A.J., Farias, M. R., da Rocha, F. A. C., Ribeiro-do-Valle, R. M. (2003). Nitric oxide and cyclooxygenase may participate in the analgesic and anti-inflammatory effect of the cucurbitacins fraction from *Wilbrandia ebracteata*. *Life Sci*, 73, 2185-2197.
135. Siqueira, J. M., Peters, R. R., Gazola, A. C., Krepsky, P. B., Farias, M. R., Rae, G. A., de Brum-Fernandes, A. J., Ribeiro-do-Valle, R. M. (2007). Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Life Sci*, 80, 1382-1387.
136. Makni, M., Fetoui, H., Gargouri, N. K., Garoui el, M., Jaber, H., Makni, J., Boudawara, T., Zeghal, N. (2008). Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in omega-3 and omega-6 fatty acids in hypercholesterolemic rats. *Food Chem Toxicol*, 46 (12): 3714-20
137. Gossell-williams, M., Lyttle, K., Clarke, T., Gardner, M., Simon, O. (2008). Supplementation with pumpkin seed oil improves plasma lipid profile and cardiovascular outcomes of female non-ovariectomized and ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Phytother Res*, 22(7), 873-7
138. Suphakarn, V. S., Yarnnon, C., Ngunboonsri, P. (1987). The effect of pumpkin seeds on oxalocrystalluria and urinary compositions of children in hyperendemic area. *Am. J. Clin Nutr*, 45(1), 115-21.
139. Zuhair, H. A., Abd EL Fattah, A. A., Elsayed, M. I. (2000). Pumpkin-seed oil modulates the effect of felodipine and captopril in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res*, 41(5):555-63
140. Hudson, C., Hudson, S., Mackenzie, J. (2007), Protein-source tryptophan as an efficacious treatment for social anxiety disorder: a pilot study. *Can J Physiol Pharmacol*, 85(9), 928-32

141. Nmila, R., Rachid, H., Manteghetti, M., Ribes, G., Petit, P., Tijane, M., Sauvaire, Y. (2002). Mise en évidence d'un effet insulino-stimulant de fractions de graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis* L. Schrader). *Biologie & Santé*, 2(2), 88-99
142. AOAC (1990). *Official Methods of Analysis*, 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
143. Oloyede, O.I. (2005). Chemical profile of unripe pulp of *Carica papaya*, *P J N*, 4, 379-381.
144. AOAC (1997). *Official Methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society* (5th ed.) .Champaign. USA: AOAC Press.
145. Folin, O., Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem*, 73, 627.
146. Carreau, J. P.; Dubacq, J. P. (1978). *J Chromatogr*, 151, 384-390.
147. Banni, S., Day, B. W., Evans, R. W., Corongiu, F. P., Lombardi, B. J. (1994). *Am. Oil Chem. Soc*, 71, 1321-1325.
148. Schlenk, H., Gellerman, J. L. (1960). *Anal. Chem*, 32, 1412-1414.
149. Morrison, W. R., Smith, L. M. (1964). *J. Lipid. Res*, 5, 600-608.
150. Lange, E. (2000) German standard methods for the analysis of fats and other lipids. Stuttgart: German Society for Fat Science (DGF): Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
151. Yanty, N. A. M., Lai, O. M., Osman, A., Ghazali, H. M. (2008). Physicochemical properties of *Cucumis melo* Var. *Inodorus* (Honeydew Melon) seed and seed oil. *J. Food Lipids*, 15, 42-55.
152. De Mello, M. L. S., Bora, P. S., Narain, N. (2001). Fatty and Amino Acids Composition of Melon (*Cucumis melo* Var. *saccharinus*) Seeds, *J Food Comp Anal*, 14, 69-74.
153. Sorho, S., Yaya, S., Augustin, A. A., Laurent, L. (2006). Multivariate calibration by variable selection for blends of raw soybean oil/ biodiesel from different sources using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) spectra data, *J Appl Sci*, 15, 3167-3169.
154. Salgin, U., Korkmaz, H. (2011). A green separation process for recovery of healthy oil from pumpkin seed. *J Supercrit Fluids*, 58, 239-248.
155. Levine, B. S., Coburn, J. W. (1984). Magnesium, the mimic/antagonist of calcium, *N Engl. J Med*, 310, 1253-1255.

156. Iser, L. T., French, J. H. (1984). Magnesium: nature's physiologic calcium blocker, *Am. Heart J*, 108, 188–193.
157. Seelig, M.S. (1994). Cardiovascular reactions to stress intensified by magnesium deficit inconsequences of magnesium deficiency on the enhancement of stress reactions; preventive andtherapeutic implications: a review, *J. Am. Coll. Nutr*, 13, 429–446.
158. Grompone, M.A. (1988). *Fat Sci. Technol.* 90, 487.
159. Larsson, K. « Lipid-Molecular organization, physical function and technical application », The Oily press, 5, Ed, Bell & Bain, Glasgow, 1994.
160. Codex stan 19-1981, Norme pour les graisses et les huiles comestibles non visées par des norme individuelles.
161. McLafferty, F. W. (1959). Mass spectrometric analysis, molecular rearrangement, *Anal Chem*, 31, 82-87.
162. Edem, D. O. (2002). Palm oil: biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: a review, *Plant Foods Hum Nutr*, 57, 319–341.
163. Ismail, H. I., Chan, K.W., Mariod, A.A., Ismail, M. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chem.*, 119,643–647
164. Chen, L., Kang, Y. H. (2013). In vitro inhibitory effect of oriental melon (*Cucumis melo L. var . makuwa Makino*) seed on key-enzyme linked to type 2 diabetes, *J Funct Foods*, 5, 981 – 986
165. Pulechérie Rosane Armougom (1998). Etude de la fraction lipidique des graines de Cucurbitacées tropicales des genres *Lagenaria*, *Luffa*, *Momordica*. Thèse présentée pour l'obtention du grade de docteur en science. Université de la réunion.
166. Tomita, K., Mavchmudah, S., Quitain, A. T., Sasaki, M., Fukuzato, R., Goto, M. (2013). Extraction and solubility evaluation of functional seed oil in supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids*, 79, 109-113.
167. Follegatti-Romer, L. A., Piantino, C. R., Grimaldi, R., Cabral, F. A. (2009). Suparcritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *J Supercrit Fluids*, 49, 323-329.
168. Sahena, F., Zaidul, I.S. M., Jinap, S., Karim, A. A., Abbas, K. A., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2009). Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review, *J Food Eng*, 95, 240-253

169. Bruhl, L., Matthanus, B. (1999). Extraction of oil seeds by SFE- a comparison with other methods for the determination of the oil content. *Fresenius J Anal Chem*, 364, 631-634.
170. Han, X., Cheng, L., Zhang, R., Bi, J. (2009). Extraction of safflower seed oil by supercritical CO₂, *J Food Eng*, 92, 370–376.
171. King, J. W., Eller, F. J., Snyder, J. M., Johnson, J. H., McKeith, F. K., Stites, C. R. (1996). Extraction of fat from ground beef for nutrient analysis using analytical supercritical fluid extraction. *J Agric Food Chem*, 44, 2700-2704.
172. Fiori, L., Lavelli, V., Duba, K. S., Sri Harsha, P. S. C., Ben Mohamed, H., Guella, G. (2014). Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents, *J Supercrit Fluids*, 94, 71-80.
173. Zaidul, I. S. M., Norulaini, N. N. A., Omar, A. K. M., Smith Jr., R. L. (2007). Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of palm kernel oil from palm kernel. *J Food Eng*, 79, 1007-1014.
174. Létisse, M., Rozieres, M., Hiol, A., Sergent, M., Comeau, L. (2006). Enrichment of EPA and DHA from sardine by supercritical fluid extraction without organic modifier. Optimization of extraction conditions. *J Supercrit Fluids*, 38, 27-36.
175. Sovova, H., Zarevucka, M., Vacek, M., Stransky, K. (2001). Solubility of two vegetable oils in supercritical CO₂. *J Supercrit Fluids*, 20, 15-28.
176. Stahl, E., Schutz, E., Mangold, H. K. (1980). Extraction of seed oils with liquid and supercritical carbon dioxide, *J Agric Food Chem*, 28, 1153–1157.
177. Fiori, L. (2007). Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: critical approach and modeling, *J Supercrit Fluids*, 43, 43–54.
178. Andrich, G., Balzini, S., Zinnai, A., De Vitis, V., Silvestri, S., Venturi, F., Fiorentini, R. (2001) Supercritical fluid extraction in sunflower seed technology, *Eur J Lipid Sci Technol*, 103, 151–157.
179. Bozan, B., Temelli, F. (2003). Extraction of poppy seed oil using supercritical CO₂. *J. Food Sci*, 68, 422–426.
180. Soares, B. M. C., Gamarra, F.M. C., Paviani, L. C., Goncalves, L. A. G., Cabral, F.A. (2007). Solubility of triacylglycerols in supercritical carbon dioxide, *J Supercrit Fluids*, 43, 2531.

181. Klein, T., Schulz, S. (1989). Measurement and model prediction of vapor–liquid equilibria of mixtures of rapeseed oil and supercritical CO₂, *Ind. Eng. Chem. Res*, 28, 1073.
182. Gonçalves, M., Vasconcelos, A. M. P., Gomes de Azevedo, E. J. S., Chaves das Neves, H.J., Nunes da Ponte, M. (1991). On the application of supercritical fluid extraction to the deacidification of olive oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 474.
183. Esqui´vel, M. M., Bernardo-Gil, G. (1993). Extraction of olive husk oil with compressed CO₂, *J Supercrit Fluids*, 6, 91.
184. Friedrich, J. P. (1984). Supercritical CO₂ extraction of lipids from lipid-containing materials, *US Patent* 4, 446, 923.
185. Lack, E. A. (1985). Kriterien zur Auslegung von Anlagen für die Hochdruckextraktion von Naturstoffen, Ph.D. thesis, TU Graz.
186. Perrut, M., Clavier, J. Y., Poletto, M., Reverchon, E. (1997). Mathematical modeling of sunflower seed extraction by supercritical CO₂, *Ind. Eng. Chem. Res*, 36, 430.
187. Sovova, H., Kucera, J., Jez, J. (1994). Rate of vegetable oil extraction with supercritical CO₂- II. Extraction of grape oil. *Chem. Eng. Sci*, 53, 3711.
188. King, J. W., Johnson, J. H., Eller, F. J. (1995). Effet of supercritical CO₂ pressurized with helium on solute solubility during supercritical fluid extraction. *Anal. Chem*, 67, 2288.
189. Govindarajan R., Vijayakumar M., Pushpangadan P. (2005). Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. *J. Ethnopharmacol*, 92(2), 165-178.
190. Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem*, 13, 572-584.
191. Tiwari A. K. (2004). Antioxidants: New-generation therapeutic base for polygenic disorders. *Curr. Sci.*, 86(8), 1092-1102.
192. Ziyatdinova G., Gilâmetdinova D., Budnikov G. (2005). Reactions of superoxide anion radical with antioxidants and their use in voltammetry. *J Anal Chem*, 60(1), 49-52.
193. Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutr Clin Metab*, 16, 233 – 339.

194. Raj Narayana K., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., Krishina D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian. J. of pharmaco*, 33, 2-16.
195. Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., Evstatieva, L.N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study of three testing methods. *Phytochem Anal*, 13, 8-17.
196. Villano D., Fernández-Pachón M. S., Troncoso A. M., Parrilla, G. (2004). The antioxidant activity of wines determined by the ABTS method: influence of sample dilution and time, *Talanta*, 64, 501-509.
197. Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L. and Byrne H. D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Ana*, 19, 669-675.
198. Lopez S., Batisda J., Viladomat F., Codina C. (2002). Acetylcholine inhibitory activity of some Amarayllidaceae alkaloids and anrcissus extracts. *Life Sci*. 71, 251-2529
199. Editorial (2005). Le blocage simultané des cyclo-oxygénases et de la 5-lipoxygénase: une nouvelle voie pour traiter l'inflammation? *Revue du Rhumatisme* 72, 379–382
200. Colot M. (1972). Notions techniques de pharmacologie générale. Masson et Cie Paris-VI, 137 p.
201. Ozbek H. (2005). The inflammatory activity of *Foeniculumvulgare* L. Essential oil and investigation of its median lethal dose in rats and mice. *Int. J. Pharacol.*, 1(4), 329-231.
202. Wangensteen H., Samuelsen A.B., Malterud K. E. (2004). Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem*, 88, 293-297.
203. Ziakas G.N., Reka E.A., Gavalas A.M., Eleftheriou P.T. and Kourounakis P.N. (2006). New analogues of butylatedhydroxytoluene as anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorg. Med. Chem*, 14, 5616–5624.
204. Lanari, A., Amenta F., Silvestrelli, G., Tomassoni, D., Parnetti, L. (2006). Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev*, 127, 158-165.
205. Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., & Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J. Ethnopharmacol*, 89, 261-264

206. Etienne, J. (2008). Observer l'acétylcholine en action pour mieux traiter Alzheimer, Futura-Sciences.
207. Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors of plant and fungi. *Nat.Prod. Rep*, 23, 181-199.
208. Grossberg, G.T. (2003). Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. *Curr. Ther. Res.*, 64, 216-235.
209. Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie -Phytochimie, Plantes Médicinales, 3ème édition, (Ed.) Tec et Doc Lavoisier, p 1120.
210. Shu, Y.Z. (1998). Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.*, 61, 1053-1071.
211. Iijima, S., Greig, N.H., Garofalo, P., Spangler, E.L., Heller, B., Brossi, A., Ingram, D.K. (1993). Phenserine: a physostigmine derivative that is long-acting inhibitor of cholinesterase and demonstrates a wide dose range for attenuating a scopolamine-induced learning impairment of rats in a 14-unit Tmaze. *Psychopharmacology*, 112, 415-420.
212. Al-Jafari, A.A., Kamal, M.A., Greig, N.H., Perry, E.R. (1998). Kinetics of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by a novel derivative of physostigmine: phenserine. *Biochem. Bioph. Res. Co*, 248, 180-185.
213. Knapp, M. J., Knopman, D. S., Solomon, P. R. (1994). The tacrine study group. A 30-week randomized controlled trial of high dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. *J. Am. Med. Assoc.*, 271, 985-991.
214. Augry, F., Darchy, A., Rotrou, J., Guelfi, M. C., Forette, F. (1997). Réponse à la tacrine: bilan de deux ans de prescription. *J. Pharm. Clin.*, 16, 183-188.
215. Nordberg, A., Svensson, A.L. (1998). Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology. *Drug Safety*, 19, 465-480.
216. Small, G.W. (1998). Treatment of Alzheimer's disease: current approaches and promising developments. *Am. J. Med*, 104, 32-38.
217. Rogers, S.L., Friedhoff, L.T. (1997). Donepezil provides long-term clinical benefits for patients with Alzheimer's disease (AD). *J. Neurol. Sci.*, 150, 296.
218. Rogers, S.L., Farlow, M.R., Doody, R.S. (1998). Donepezil study group. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, 50, 136-145

219. Agid, Y., Dubois, B., Anand, R., Gharabawi, G. (1998). Efficacy and tolerability of rivastigmine in patients with dementia of the Alzheimer type. *Curr. Ther. Res.*, 59, 837-845.
220. Polinsky, R.J. (1998). Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Ther.*, 20, 634-647.
221. Corey-Bloom, J., Anand, R., Veach, J. (1998). A randomised trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psych.*, 1, 55-56.
222. Maelicke, A., Samochocki, M., Jostock, R., Fehrenbacher, A., Ludwig, J., Albuquerque, E. X., Zerlin, M. (2001). Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiat.*, 49, 279-288.
223. Woodruff-Pak, D.S., Vogel, R.W., Wenk, G.L. (2001). Galantamine: effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 (4), 2089-2094.
224. Sramek, J.J., Frackiewicz, E.J., Cutler, N.R., 2000. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert Opin. Inv. Drug*, 9, 2393-2402.
225. Ge, H.M., Zhu, C.H., Shi, D.H., Zhang, L.D., Xie, D.Q., Yang, J., Ng, S.W., Tan, R.X. (2008). Hopeahainol A: An acetylcholinesterase inhibitor from *Hopeahainanensis*. *Chemistry*, 14, 376-381.
226. Conforti, F., Rigano, D., Menichini, F., Loizzo, M.R., Senatore, F. (2009). Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudo pumila* extracts and their constituents. *Fitoterapia*, 80, 62-67.
227. Jung, H.A., Jin, S.E., Park, J.S., Choi, J.S. (2011). Antidiabetic complications and anti-alzheimer activities of sophoflavescenol, a prenylated flavonol from *Sophora flavescens*, and its structure-activity relationship. *Phytother. Res.*, 25, 709-715.
228. Nag, G., De, B. (2011). Acetylcholinesterase inhibitory activity of *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica* and *Emblica officinalis* and some phenolic compounds. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3, pp 121-124.
229. Mack, M., Ashwell, R.N., Jeffrey, F.F., Johannes, V.S. (2010). Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of

- Sclerocaryabirrea and Harpephyllumcaffrum (*Anacardiaceae*) extracts. *Food Chem*, 123, 69-76
230. Ryu, H.W., Curtis-Long, M.J., Jung, S., Jeong, I.Y., Kim, D.S., Kang, K.Y., Park, K.H. (2012). Anticholinesterase potential of flavonols from paper mulberry (*Broussonetiapapyrifera*) and their kinetic studies. *Food Chem*, 132, 1244-1250.
231. Aderogba, M. A., Ndhlala, A. R., Van Staden, J. (2013). Acetylcholinesterase inhibitory activity and mutagenic effects of *Croton penduliflorus* leaf extract constituents. *S. Afr. J. Bot.*, 87, 48-51.
232. Xian, X., Jianguo, C., Yunxia, Z., Quanxi, W., Jianbo, X. (2014). Flavonoid concentrations and bioactivity of flavonoid extracts from 19 species of ferns from China. *Ind. Crop. Prod*, 58, 91-98.
233. Hall, J., Angele, S. (1999). Radiation, DNA damage and cancer. *Molecular Medecin Today*, 5, 157-164.
234. Miller, J.A., Miller, E.C. (1975). Metabolic activation and reactivity of chemical carcinogens. *Mutat. Res*, 33, 25-26.
235. Lindahl, T., Nyberg, B. (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 11, 3610-3618.
236. Frosina, G. (2000). Over expression of enzymes that repair endogenous damage to DNA. *Eur J Biochem*, 267, 2135-2149.
237. Dimitri Moreau. (2006). Etude de nouvelles cibles moléculaires de cancer bronchopulmonaire non à petites cellules pharmacomodulées par des substances originales naturelles et synthétiques. Thèse pour l'obtention de grade de Docteur de l'Université de Nantes.
238. Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.
239. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95.
240. Bekir, J., Mars, M., Vicendo, P., Ftterich, A., Bouajila, J. (2013) Chemical composition and antioxidant, anti-Inflammatory, and anti-proliferation activities of pomegranate (*Punicagranatum*) Flowers. *J. Med. Food*, 16(6), 544-550.
241. Petkova, Z., Antova, G. (2015). Proximate composition of seeds and seed oils from melon (*Cucumis melo L.*) cultivated in Bulgaria. *Cogent Food Agric*, 1: 1018779

242. Benalia, (2016). Etude de la fraction lipidique de quelques graines de cucurbitacées. Thèse pour l'obtention du grade de docteur en chimie organique. Université Kasdi Merbah-OUARGLA, Algérie.
243. Rabrenovic, B. B., Dimic, E. B., Novakovic, M.M., Tesevic, V.V., Basic, Z.N. (2014). The most important bioactive components of cold pressed oil from different pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *Food Sci Technol*, 55, 521-527.
244. Arora, R., Kaur, M., Gill, N. S. (2011). Antioxidant activity and pharmacological evaluation of *Cucumis melo* var. *agrestis* methanolic seed extract. *Res J Phytochemistry*, 5, 146-155

Liste des figures

Figure I. 1 : Structure d'un triglycéride issu de la condensation de trois acides gras C18 :1 et le glycérol.....	6
Figure I. 2 : Quelques acides gras saturés (AGS).....	9
Figure I. 3 : Deux acides gras monoinsaturés (AGMI).....	9
Figure I. 4 : Deux acides gras polyinsaturés.....	9
Figure I. 5 : Stéréochimie <i>cis</i> et <i>trans</i> des acides gras insaturés.....	11
Figure I. 6 : Formule développée d'un phospholipide.....	12
Figure I. 7 : Phénol simple.....	13
Figure I. 8 : Structure de la vitamine E.....	14
Figure I. 9 : Squelette des stéroïdes.....	15
Figure I. 10: Structures des principaux phytostérols d'origine végétale.....	16
Figure I.11 : Extraction par soxhlet.....	26
Figure I.12 : Diagramme de phase d'un corps pur.....	28
Figure I.13. : Evolution de la masse volumique du CO ₂ en fonction de la pression à différentes températures.....	30
Figure I.14 : Evolution de la viscosité du CO ₂ en fonction de la pression et de la température.....	31
Figure I.15 : Allure générale des courbes d'extraction par fluide supercritique	32
Figure I.16 : Variation de solubilité d'une substance faiblement volatile (solide liquide) dans le CO ₂ supercritique.....	35
Figure I.17: La tige d'une Cucurbitacée.....	45
Figure I.18 : Les vrilles d'une Cucurbitacée.....	45
Figure I.19 : Les feuilles des Cucurbitacée.....	45
Figure I.20: Fleurs des Cucurbitacées.....	46
Figure I.21 : Les fruits des Cucurbitacées.....	46
Figure I.22 : Deux variétés de <i>Cucurbita maxima</i> : Potimarron et potiron rouge vif d'Etampes.....	47
Figure I.23 : La variété <i>Butternut</i> du genre <i>Cucurbita maschata</i>	48
Figure I.24 : Deux variétés de <i>Cucurbita pépo</i>	48

Figure I.25: Courge de Siam.....	49
Figure I.26 : Concombre et Cornichon.....	50
Figure I.27 : Le cantaloup, Melon jaune-canari et Melon brodé.....	51
Figure I.28: Graine de melon et de courge.....	51
Figure I.29 : Structure des cucurbitacines les plus abondantes et les plus étudiées.....	54
Figure II. 1: Fragment de la structure de la colonne utilisée : Poly (bicyanopropyl) siloxane.....	66
Figure II. 2 : Programme de la température.....	67
Figure II. 3: Structure de la colonne: (5% Diphényl) Diméthylpolysiloxane.....	67
Figure II. 4: La programmation de la température.....	68
Figure II. 5: Installation d'extraction supercritique «SFE1000 bar».....	70
Figure II. 6 : Remplissage de la cellule d'extraction.....	72
Figure II. 7 : Fermeture avec le fritté.....	72
Figure II. 8: Mettre la cellule dans l'extracteur.....	73
Figure II. 9 : Récupération de l'huile.....	73
Figure II. 10 : Photographie de l'installation d'extraction supercritique SFE200.....	75
Figure II. 11 : Schéma de l'installation d'extraction supercritique SFE200.....	75
Figure II. 12 : Remplissage de la cellule d'extraction.....	77
Figure II. 13: Mettre la cellule dans l'extracteur.....	77
Figure II. 14 : Remplissage de l'éprouvette avec le solvant et réglage du débit.....	78
Figure II. 15: Les trois extracteurs.....	79
Figure II. 16 : Récupération de l'huile et le solvant.....	79
Figure III.1 : Spectre IR des esters méthyliques d'acides gras de l'huile de pépins de melon.....	89
Figure III.2 : Chromatogramme GC-MS des acides gras estérifiés de l'huile de pépins de melon.....	90
Figure III.3 : Chromatogrammes GC/MS des étalons et de l'échantillon.....	90
Figure III.4 Spectres de masse des quatre acides gras majoritaires.....	92
Figure III.5 : Réarrangement de McLafferty.....	93
Figure III.6: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	96
Figure III.7 : Rendement d'extraction de la fraction lipidique du melon (<i>Cucumis melo</i>)	100

<i>L. Inodorus</i>) en fonction du temps d'extraction, T=40°C, P=400 bar.....	
Figure III.8 : Vitesse moyenne d'extraction en fonction de la quantité du CO ₂ par g de la matière première, T= 40 °C, P=400 bars,.....	101
Figure III.9: Cinétique d'extraction de l'huile de pépins de melon par le CO ₂ supercritique à différentes pressions à 40°C.....	103
Figure III.10 : Rendement de l'extrait total supercritique à différentes pressions à 40 °C. Durée d'extraction = 35, 45, 75 et 155 min.....	103
Figure III.11 : Rendement de l'extrait total supercritique à 40 et 70°C. Pression 550 bar ; durée d'extraction = 35, 45, 75 et 155minutes.....	104
Figure III.12 : Rendement de l'extrait total supercritique à 40 et 57°C ; pression 700bars ; durée de l'extraction = 35, 45, 75 et 155 minutes.....	105
Figure III.13 : Rendement de l'extraction de la fraction lipidique de la courge en fonction du temps ; T = 40°C, P = 400 bars.....	106
Figure III.14 : Vitesse moyenne d'extraction en fonction de la quantité du CO ₂ par g de la matière première, T= 40 °C, P=400 bars	107
Figure III.15 : Rendement d'extraction de la fraction lipidique de la courge en fonction du temps et de la pression, T = 40°C.....	108
Figure III.16 : Rendement de l'extrait total supercritique à différentes pressions à 40 °C ; durée de l'extraction : 25,45,75 et 155 min.....	109
Figure III.17 : Rendement d'extraction global de l'huile de pépins de courge par CO ₂ SC avec co-solvant à 100 bars et 40°C.....	110
Figure III.18 : Rendement d'extraction global de l'huile de pépins de courge par CO ₂ SC avec co-solvant à 250 bars et 40°C.....	111
Figure III.19 : Chromatogramme GC-MS des esters méthyliques des acides gras de l'huile de pépins de melon.....	112
Figure III.20 : Chromatogramme GC-MS des esters méthyliques des acides gras de l'huile de pépins de courge (<i>Cucurbita moschata Butternut</i>).....	114
Figure III.21 : Courbes cinétiques à pressions différentes pour les pépins de melon ; température de 40°C.....	116
Figure III.22 : Courbes cinétiques à températures différentes pour les pépins de melon : pression de 550 bar.....	117
Figure III.23 : Courbes cinétiques à températures différentes pour les pépins de melon : pression de 700 bars.....	117

Figure III.24 : Courbes cinétiques à pressions différentes pour l'huile de pépins de courge : température 40°C	118
Figure III.25 : Influence de la pression sur la solubilité de l'huile de pépins de melon et de courge dans le CO ₂ supercritique.....	119
Figure III.26 : Comparaison de la solubilité expérimentale et la solubilité calculée selon l'équation de Chrastil, Del Valle Aguilera et Adachi.....	125
Figure IV.1 : Schéma de quelques inhibiteurs connus d'AChE.....	137
Figure IV.2 : Structure de la galantamine.....	138
Figure IV.3: Réduction du DPPH.....	141
Figure IV.4 : Réaction colorimétrique d'Ellman.....	142
Figure IV.5 : Histogramme de l'activité antioxydante de l'huile de pépins de courge et de melon.....	146
Figure IV.6 : Histogramme de l'activité antiinflammatoire de l'huile de pépin de courge et de melon.....	148
Figure IV.7 : Histogramme de l'activité anticholinestérase des extraits des pépins de courge et de melon.....	149

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Nomenclature de la vitamine E.....	14
Tableau I.2 : Production mondiale de graines oléagineuse.....	22
Tableau I.3 : Production mondiale des principales huiles végétales.....	23
Tableau I.4 : Paramètres critiques de quelques fluides à l'état supercritique.....	29
Tableau I.5 : Propriétés physiques du CO ₂ à l'état gaz, supercritique et liquide.....	30
Tableau III.1 : Comparaison de la composition chimique des pépins de melon (<i>Cucumis melo L. Inodorus</i>) (notre étude) avec ceux de la littérature.....	82
Tableau III.2 : Comparaison de la composition chimique des pépins de courge (<i>Cucurbita moschata Buutternut</i>) (notre étude) avec ceux de la littérature.....	83
Tableau III.3 : Comparaison de la composition en minéraux dans les pépins de melon (<i>Cucumis melo L. Inodorus</i>) avec celle de la littérature.....	84
Tableau III.4 : Comparaison de la composition en minéraux dans Pépins de courge (<i>Cucurbita moschata Buutternut</i>) avec celle de la littérature.....	86
Tableau III.5 : Comparaison des indices physico-chimiques de l'huile de pépins de melon (<i>Cucumis melo L. Inodorus</i>) avec ceux de la littérature.....	87
Tableau III.6 : Critères de qualité des graisses et huiles alimentaires (indices d'acide et de peroxyde) selon le codex standard, 1981.....	88
Tableau III.7 : Identification des acides gras estérifiés.....	91
Tableau III.8 : Comparaison de la composition en acides gras avec d'autres huiles.....	94
Tableau III.9 : Identification des Acides gras dans l'huile des pépins de melon (<i>Cucumis meloL. Inodorus</i>) et de courge (<i>Cucurbita moschata Butternut</i>).....	95
Tableau III.10 : Rendement de l'extraction par macération.....	96
Tableau III.11 : Dosage des polyphénols des extraits alcoolique de pépins de melon...	97
Tableau III.12 : Rendement (g huile /100 g de MS) de différentes expériences après 155 min.....	102
Tableau III.13 : Rendements des extractions de l'huile de pépins de courge sous différentes conditions.....	113
Tableau III.14 : La composition en acides gras estérifiés de l'huile de pépins de melon extraite par CO ₂ supercritique à différentes conditions.....	113
Tableau III.15 : Composition en acides gras estérifiés de l'huile de pépins de courge	114

(<i>Cucurbita moschata Butternut</i>) extraite par CO ₂ supercritique sous différentes conditions.....	
Tableau III.16 : Solubilité de l'huile de pépins de melon et de courge dans le CO ₂ supercritique.....	118
Tableau III.17 : La solubilité de l'huile de pépins de <i>Sacha inchi</i> dans le CO ₂ supercritique.....	121
Tableau III.18 : La solubilité de l'huile de pépins du chanvre indien dans le CO ₂ supercritique.....	121
Tableau III.19 : Comparaison de la solubilité de nos huiles avec la solubilité de quelques huiles végétales.....	122
Tableau III.20 : Constantes des équations.....	124
Tableau III.21 : La solubilité déterminée selon les équations de Chrastil, Del valle-Aguilera et Adachi.....	125
Tableau III.22 : Comparaison de la moyenne de déviation calculée dans notre étude avec la littérature.....	126
Tableau IV.1 : Résultats de l'activité anti-oxydante des extraits de pépins de courge et de melon.....	145
Tableau IV.2 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire des extraits de pépins de courge et de melon.....	147
Tableau IV.3 : Résultats de l'activité anticholinestérase des extraits de pépins de courge et de melon.....	148
Tableau IV.4 : Résultats de l'activité cytotoxique de pépins de melon.....	150
Tableau IV.5 : Résultats de l'activité cytotoxique de pépins de courge.....	151

Liste des abréviations

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
I.A	Indice d'acide
I.P	Indice de peroxyde
I.S	Indice de saponification
I.I	Indice d'iode
AGS	Acide gras saturé
AGMI	acide gras monoinsaturé
AGPI	acide gras polyinsaturé
AGME	acide gras méthylé
GC/FID	Chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme.
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
SFE	Extraction par le fluide supercritique
IR	infrarouge
MS	Matière sèche
CO ₂ SC	CO ₂ supercritique
DPPH	2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle
AChE	acétylcholinestérase
LOX	lipoxygénase
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
DMSO	diméthylsulfoxyde
VIT C	Vitamine C
NDGA	Acide nordihydroguaiarétique
IGROV	Lignées de cellules tumorales ovariennes
OVAR	Lignées de cellules tumorales ovariennes

Annexes

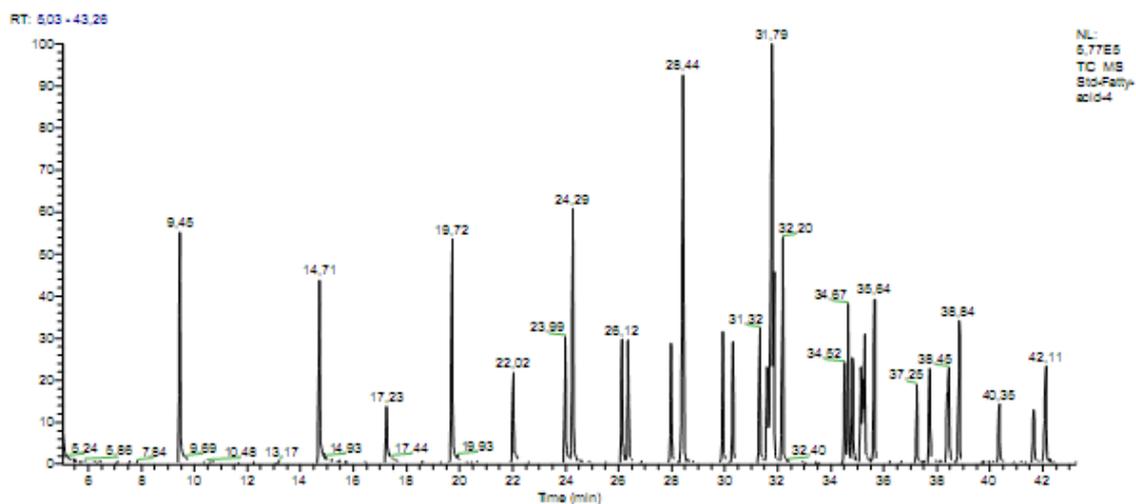


Fig.1. Chromatogramme des 37 étalons

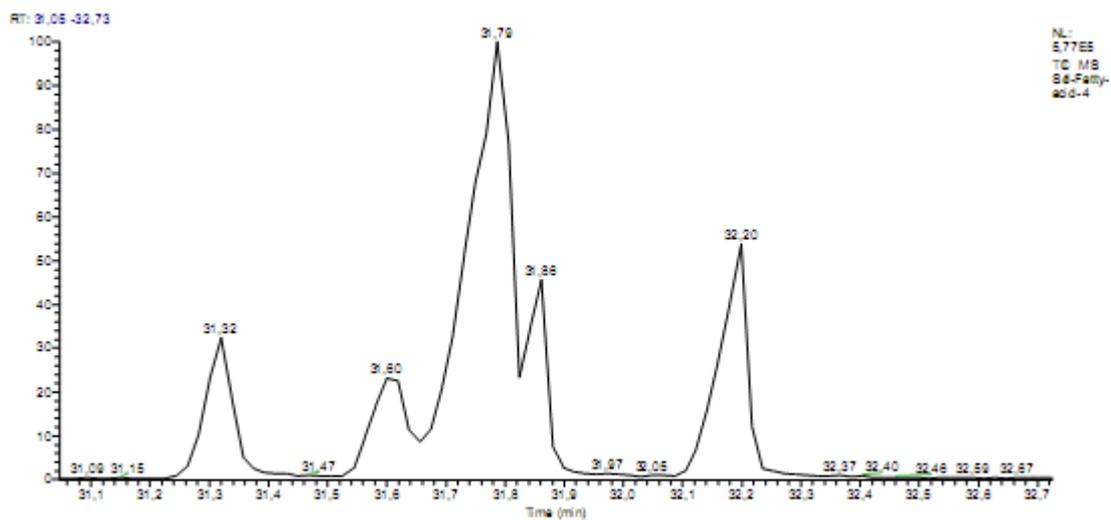


Fig.2. Chromatogramme agrandi des acides gras qui sortent entre 31 et 32.40 min

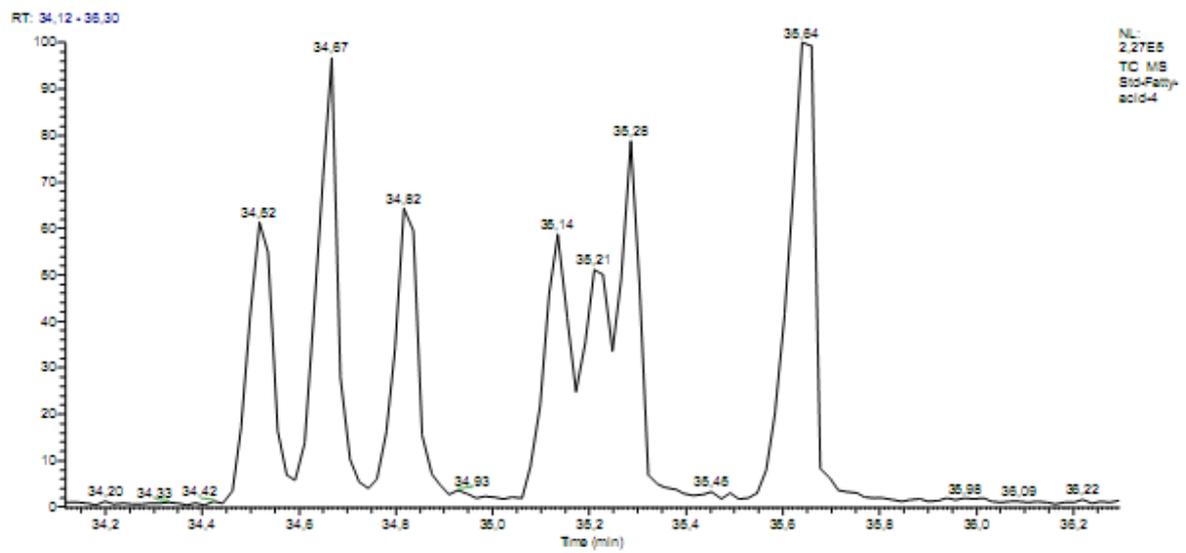
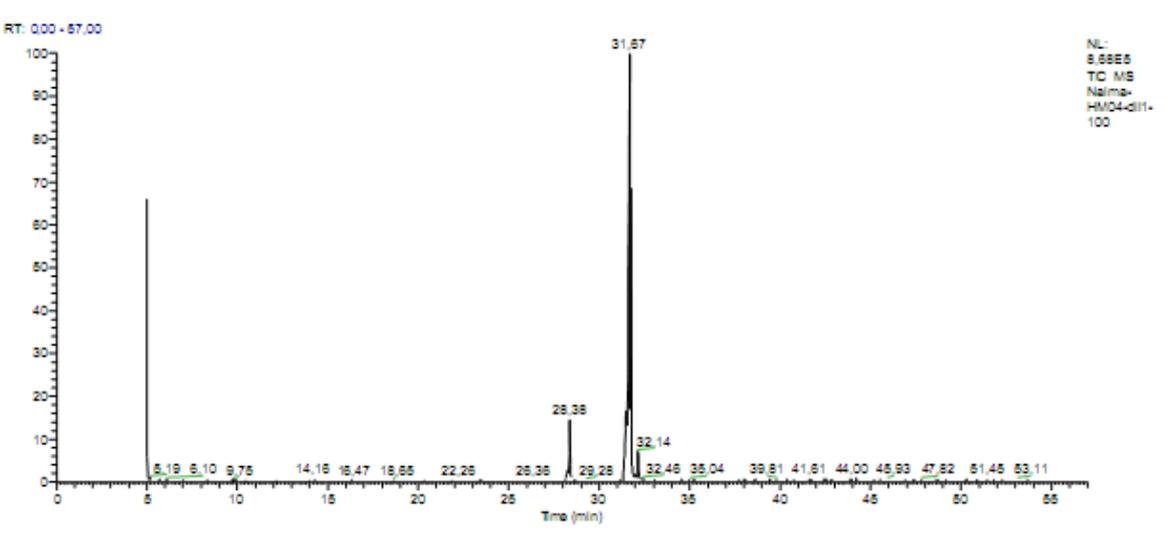
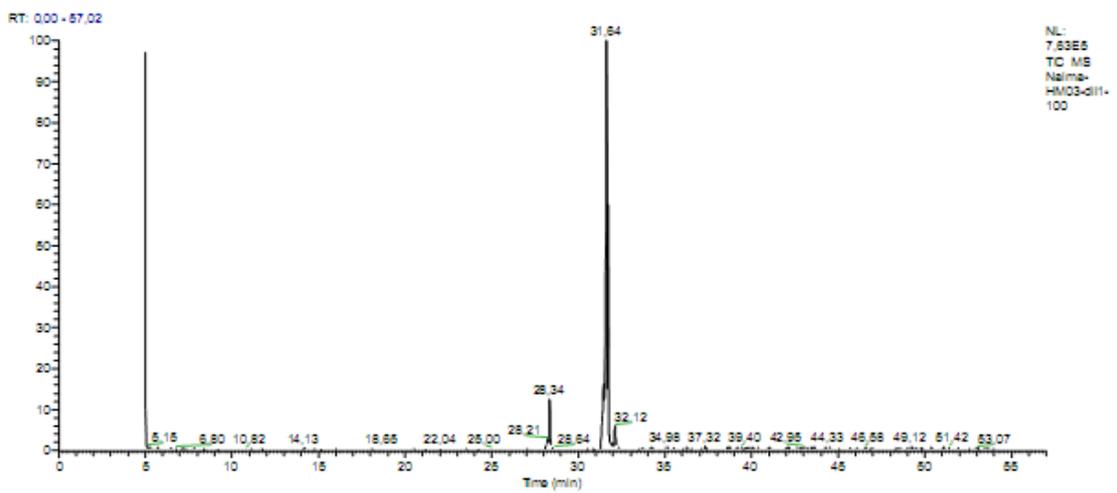
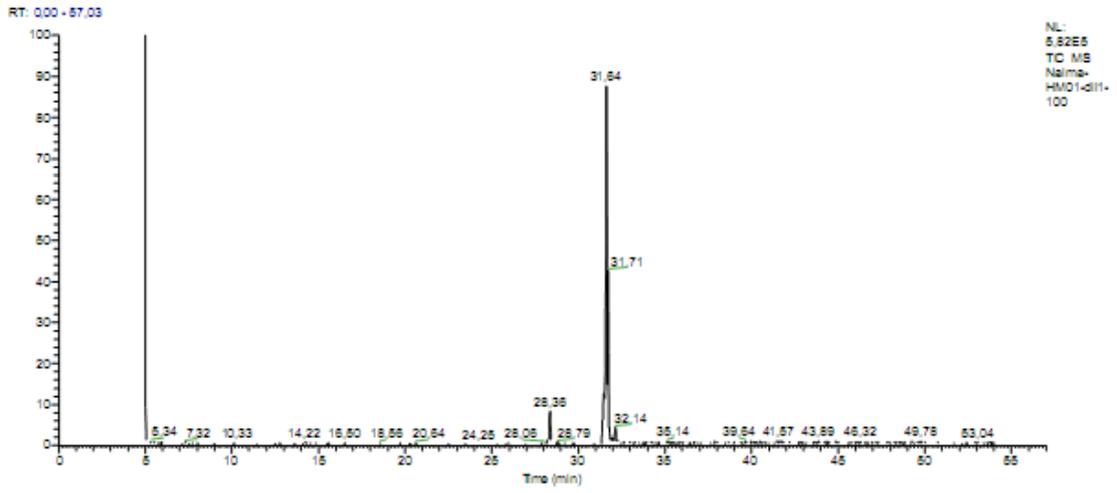
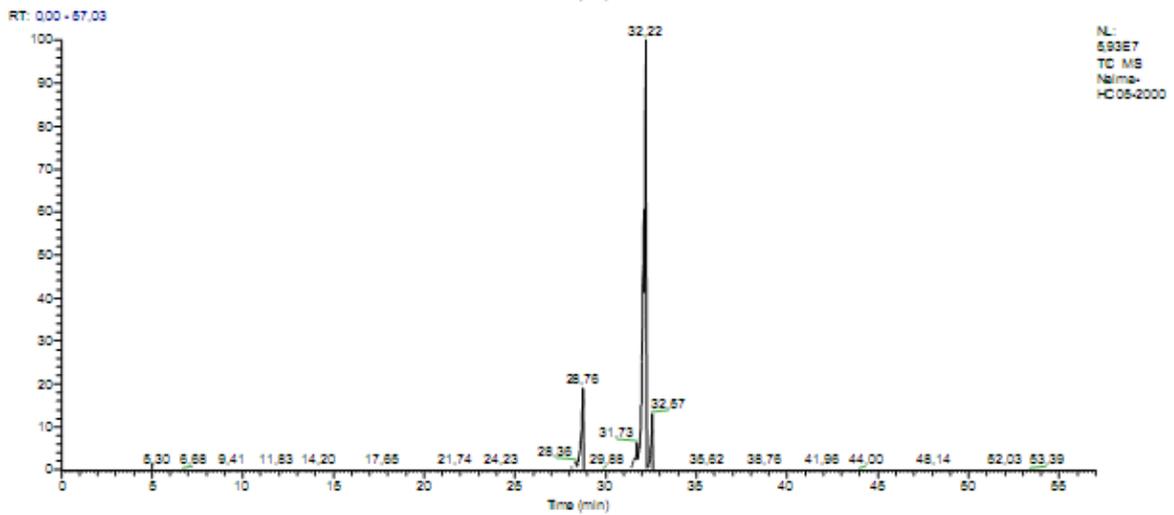
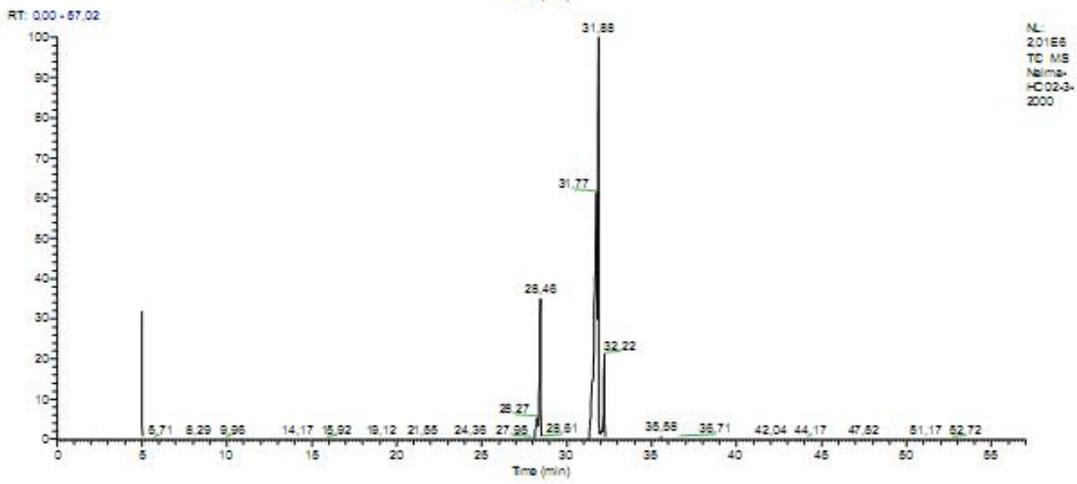
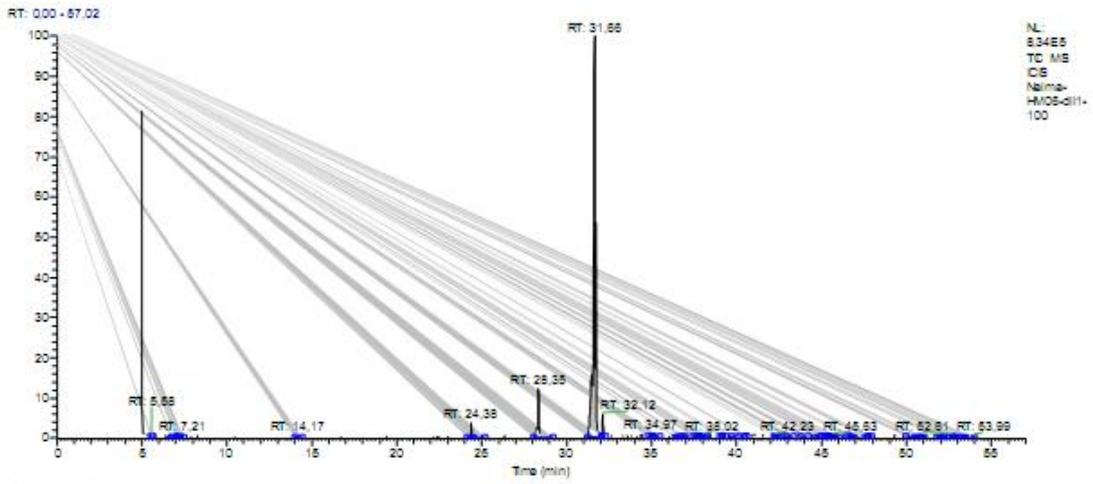


Fig.3. Chromatogramme agrandi des acides gras qui sortent entre 34 et 36 min

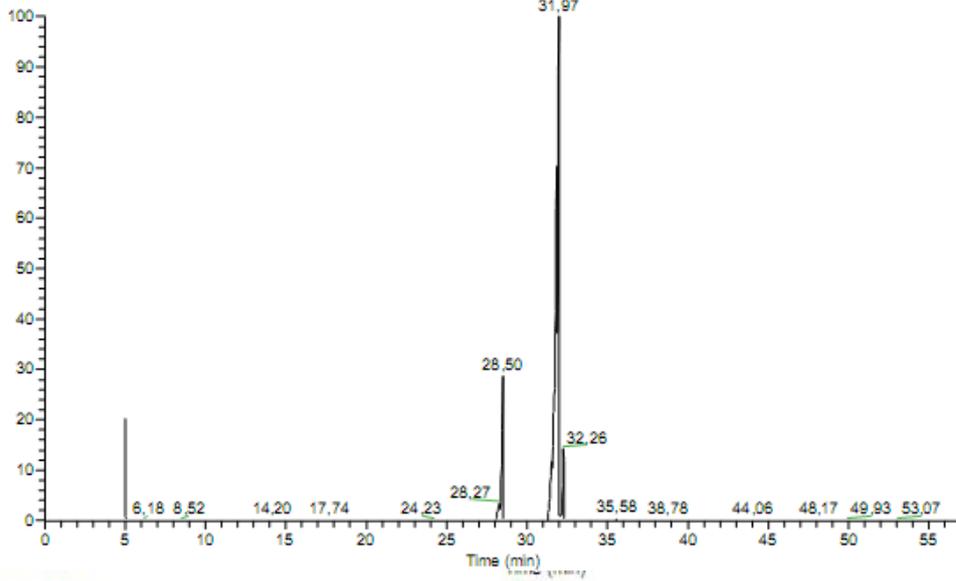
Tableau qui représente le temps de rétention des 37 étalons

Fatty acids		RT (min)
1	Butyric Acid mmMethyl Ester	C4:0 -
2	Caproic Acid Methyl Ester	C6:0 -
3	Caprylic Acid Methyl Ester	C8:0 9.45
4	Capric Acid Methyl Ester	C10:0 14.71
5	Undecanoic Acid Methyl Ester	C11:0 17.23
6	Lauric Acid Methyl Ester	C12:0 19.72
7	Tridecanoic Acid Methyl Ester	C13:0 22.02
8	Myristic Acid Methyl Ester	C14:0 24.29
9	Myristoleic Acid Methyl Ester	C14:1 23.99
10	Pentadecanoic Acid Methyl Ester	C15:0 26.36
11	Cis-10-Pentadecenoic Acid Methyl Ester	C15:1 26.12
12	Palmitic Acid Methyl Ester	C16:0 28.44
13	Palmitoleic Acid Methyl Ester	C16:1 27.94
14	Heptadecanoic Acid Methyl Ester	C17:0 30.28
15	Cis-10Heptadecenoic Acid Methyl Ester	C17:1 29.94
16	Stearic Acid Methyl Ester	C18:0 32.20
17	Oleic Acid Methyl Ester	C18:1n9c 31.86
18	Elaidic Acid Methyl Ester	C18:1n9t 31.66-31.82
19	Linoleic Acid Methyl Ester	C18:2n6c 31.60
20	Linolelaidic Acid Methyl Ester	C18:2n6t 31.66-31.82
21	Γ-Linolenic Acid Methyl Ester	C18:3n6 31.32
22	Α-Linolenic Acid Methyl Ester	C18:3n3 31.66-31.82
23	Arachidic Acid Methyl Ester	C20:0 35.64
24	Cis-11-Eicosenoic Acid Methyl Ester	C20:1n9 35.21
25	Cis-11, 14-Eicosadienoic Acid Methyl Ester	C20:2 35.14
26	Cis-8, 11, 14-Eicosatrenoic Acid Methyl Ester	C20:3n6 34.82
27	Cis-11, 14, 17-Eicosatrienoic Acid Methyl Ester	C20:3n3 35.28
28	Arachidonic Acid Methyl Ester	C20:4n6 34.52
29	Cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic Acid Methyl Ester	C20:5n3 34.67
30	Heneicosanoic Acid Methyl Ester	C21:0 37.25
31	Behenic Acid Methyl Ester	C22:0 38.84
32	Erucic Acid Methyl Ester	C22:1n9 38.45
33	Cis-13, 16-Docosadienoic Acid Methyl Ester	C22:2 38.39
34	Cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-Docosahexaenoic Acid Methyl Ester	C22:6n3 37.72
35	Tricosanoic Acid Methyl Ester	C23:0 40.35
36	Lignoceric Acid Methyl Ester	C24:0 42.11
37	Nervonic Acid Methyl Ester	C24:1n9 41.64



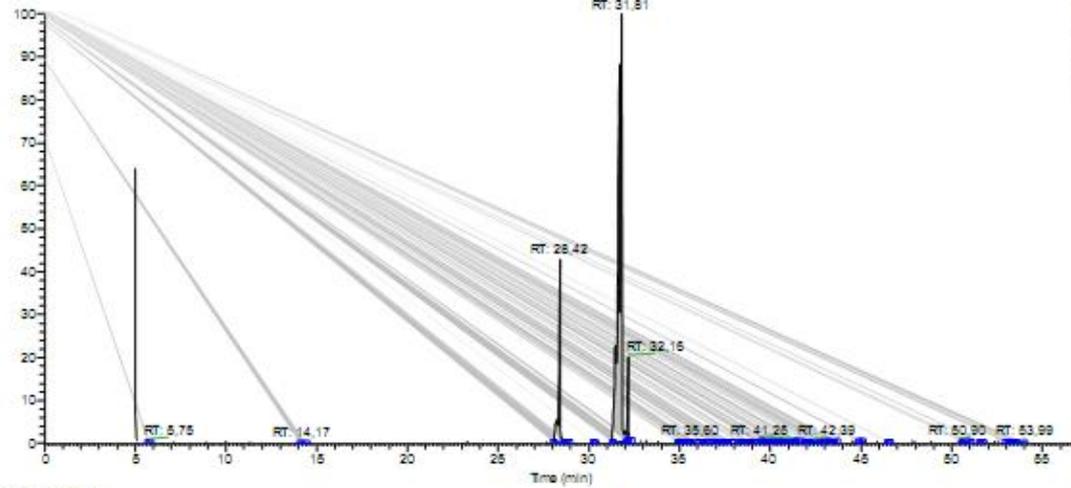


RT: 0.00 - 57.00



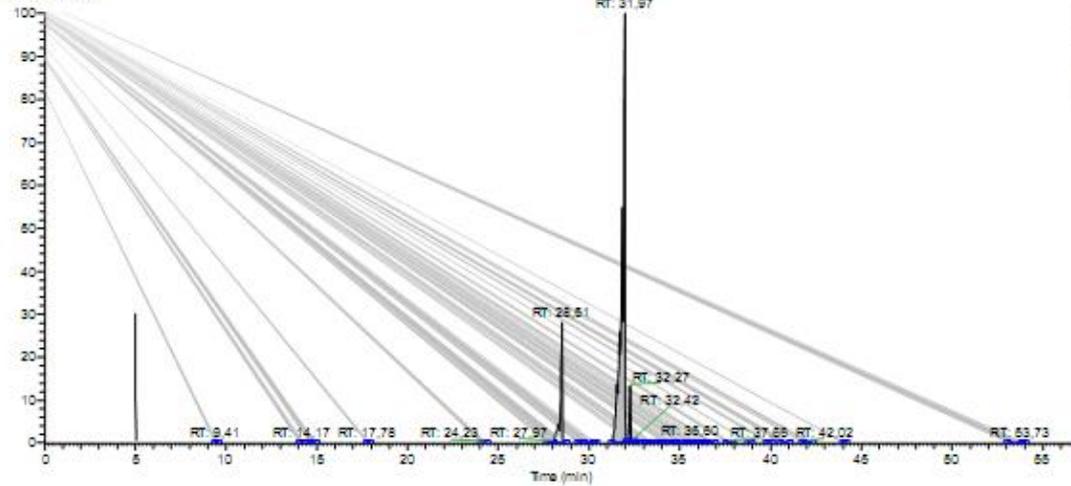
NL:
4.38E6
TC MS
Nalima-
HCSO2-3-
2000

RT: 0.00 - 57.02

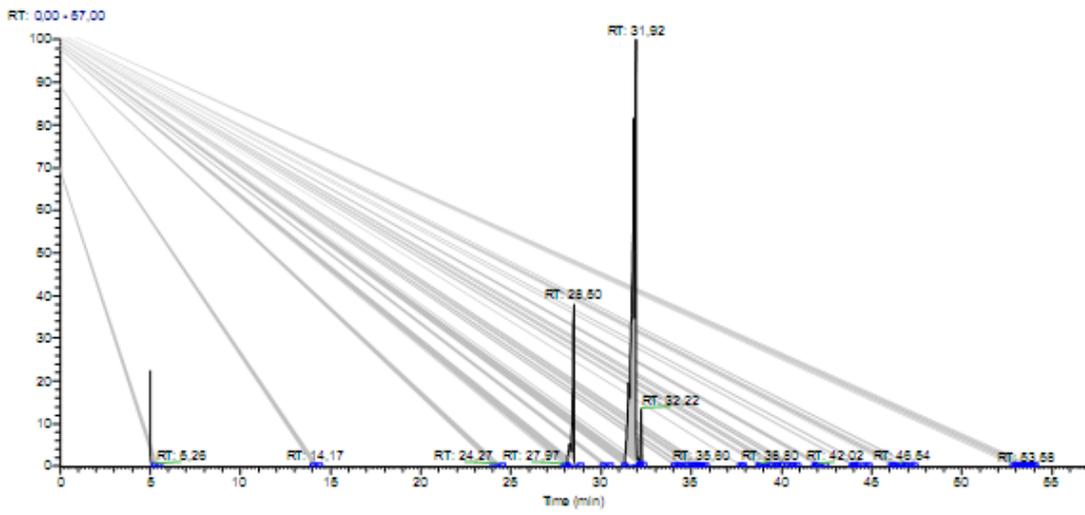


NL:
1.05E6
TC MS
CS
Nalima-
HC11-d111-
100

RT: 0.00 - 57.00



NL:
4.83E6
TC MS
CS
Nalima-
HC01-8F3-
3-2000



NL:
280E8
TC MB
CS
Nirma-
HC 12-dil-
100



UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCEM

Résumé

Ce travail est une contribution à l'étude de la composition en acides gras polyinsaturés des graines de deux cucurbitacées très cultivés en Algérie, le melon (*Cucumis melo L. Inodorus*) et la courge (*Cucurbita moschata Duch. butternut*). L'huile a été extraite par le soxhlet dans l'hexane et par la technologie de CO₂ supercritique en variant les conditions de pression et de température. Une évaluation de l'activité anti-oxydante, anti-inflammatoire, cytotoxique et anti-cholinestérase des huiles ainsi obtenues a été réalisée. Les résultats ont montré que les pépins de melon et de courge sont riches en lipides (respectivement 34% et 37%) et les acides gras dominants trouvés dans les huiles sont l'acide palmitique, stéarique, oléique et linoléique avec les taux respectifs de 5,95%, 2,87%, 21,95 et 69,24% dans l'huile de pépins de melon et de 14,74%, 4,22%, 30,71% et 50,33% dans l'huile de pépins de courge (extraction avec l'hexane en utilisant le soxhlet). L'extraction des mêmes huiles au CO₂ supercritique a conduit à des résultats similaires à ceux obtenus avec le soxhlet. La composition chimique des huiles augure un futur prometteur en termes de nutrition. Les résultats de l'activité biologique ont révélé en général un faible pourcentage d'inhibition pour les différents extraits.

Mot clés : *Cucumis melo L. Inodorus*; *Cucurbita moschata Duch. butternut* ; huile végétale ; extraction par CO₂ supercritique ; acides gras polyinsaturés ; activité biologique.

Abstract

This work is devoted to a survey of the chemical content of polyunsaturated fatty acids of the seeds of two Cucurbitaceae grown in Algeria, namely melon (*Cucumis melo L. Inodorus*) and pumpkin (*Cucurbita moschata Duch. butternut*). The oil was extracted by soxhlet using hexane and by supercritical CO₂ technology operating under a set of pressures and temperatures. Antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic and anti-cholinesterase activities were carried out. The results showed that the melon and pumpkin seeds were rich in lipids (respectively 34% and 37%) and major fatty acids were palmitic, stearic, oleic and linoleic acid with the respective percentages of 5,95%; 2,87%; 21,95 and 69,24% in melon seeds oil and 14,74%, 4,22%, 30,71% and 50,33% in pumpkin counterpart (extraction with hexane using the soxhlet; extraction by supercritical CO₂ technology gave same results as compared to soxhlet as regards oils. The results of the biological activity revealed a low percentage inhibition for the different extracts. The oil content gave an interesting nutritional profile that might be taken advantage of.

Keywords: *Cucumis melo L. Inodorus*; *Cucurbita Duch. moschata butternut*; seeds oil; supercritical fluid extraction; polyunsaturated fatty acids, biological activity

المخلص

الهدف من هذه الأطروحة هو دراسة التركيب الكيميائي من الأحماض الدهنية غير المشبعة لبذور نوعين من cucurbitacées المزروعة بشكل كبير في الجزائر، البطيخ (*Cucumis melo L. Inodorus*) و القرعة (*Cucurbita moschata Duch. butternut*). تم استخراج الزيوت من البذور باستعمال جهاز السوكسلي وبواسطة ثاني أكسيد الكربون في حالته فوق الحرجة، ثم عرضت المستخلصات لتقييم الفعالية المضادة للأكسدة، للإلتهابات، للخلايا السرطانية وكذا النشاط المضاد للأستيل كولينستراز. أظهرت النتائج أن البذور غنية نسبيا بالدهون (34% للبطيخ و 37% للقرعة)، وأن الأحماض الدهنية السائدة هي حمض البالمتيك، حمض الستياريك، حمض الأوليك و حمض اللينوليك بالنسب التالية على التوالي 5,95%، 2,87%، 21,95% و 69,24% بالنسبة لبذور البطيخ و 14,74%، 4,22%، 30,71% و 50,33% بالنسبة لبذور القرعة و هذا في حالة استعمال السوكسلي. لقد أدى استخراج نفس الزيوت مع ثاني أكسيد الكربون في حالته فوق الحرجة إلى نتائج مماثلة لتلك التي تم الحصول عليها باستخدام سوكسلي، حيث أن التركيب الكيميائي للزيوت يبشر بمستقبل واعد فيما يتعلق بالتغذية. وكشفت نتائج النشاط البيولوجي عموما عن نسبة تثبيط منخفضة لمختلف المستخلصات.

الكلمات المفتاحية : زيت نباتي ؛ ثاني أكسيد الكربون في حالته فوق الحرجة؛ الأحماض الدهنية غير المشبعة؛ النشاط البيولوجي؛ البطيخ
(*Cucumis melo L. Inodorus*)؛ القرعة (*Cucurbita moschata Duch. butternut*).

Laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses (COSNA)
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie