

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



N° Réf.....

Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF-Mila

Institut des Sciences et de la technologie

Département des sciences de la nature et de la vie

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de

Master

Domaine: sciences de la nature et de la vie

Filière: Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie végétale

Thème:

**Caractérisation biochimique et évaluation des activités
biologiques des extraits phénoliques et des huiles fixes de
l'espèce *Linum usitatissimum* L.**

Présenté par : -BIRI Kenza

-LEZBACHE Warda

Devant le jury composé de :

Présidente : BOUGUERIA Hassiba

(MCB)

Centre universitaire de Mila.

Examineur : YAHIA Abdelouahab

Professeur

Centre universitaire de Mila.

Promoteur : BOUKERIA Sabah

(MCB)

Centre universitaire de Mila.

Année Universitaire : 2018/2019

REMERCIEMENT

Nous remercions tout d'abord DIEU le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail. Car l'homme propose mais DIEU dispose.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à :

M^{lle} **BOUGUERIA Hassiba**, enseignante au Centre Universitaire de Mila, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance. Nous tenons à signaler que sa présence en tant que présidente nous honore.

Monsieur **YAHIA Abdelouahab**, enseignant au Centre Universitaire de Mila, d'avoir accepté de juger ce travail et de nous avoir honorés par sa présence. Qu'il trouve ici toute notre gratitude.

Nous remercierons "Mme **BOUKERIA Sabah**" d'avoir accepté de nous encadrer et de nous diriger, pour son soutien, pour ses encouragements ainsi que pour la confiance qu'elle nous a accordée pour la réalisation de ce travail. Nous la remercions profondément pour sa compréhension, sa patience et sa politesse incomparable.

Nous voudrions exprimer nos vifs remerciements au « Docteur **MIROUH** » de nous avoir éclairées par ses conseils, de nous avoir motivées par ses encouragements, de ne pas lésinée dans ces efforts et sa gentillesse avec nous.

Nos remerciements vont aussi à tout le personnel du laboratoire d'analyses médicales du : Dr. **Mirouh.H** à FERDJIOUA.

Comme nous ne pouvons pas oublier à remercier tous les enseignants de la filière Biologie au Centre Universitaire de Mila.

Merci pour toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail par un soutien moral ou matériel, qu'elle trouve ici l'expression de nos très vifs remerciements.

DEDICACE

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, ce symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère **Rahima**.*

*A mon père **Youcef**, cette école de mon enfance, qui a veillé tout au long de mon enfance à m'encourager à me donner aide et protection.*

*A mes frères : **Koussay, Rayan, Bayan** et **ouijdane**.*

*A **Houssam**, merci pour ton soutien et que Dieu te garde et te bénisse.*

*A **Aya, Rofaida et Abir** merci d'être toujours à côté de moi...*

*A mes grand-mères **Louiza** et **Oum Elkheir**.*

*A ma grande famille (**Biri Abdelmadjid**)...*

A tous mes amis.

KENZA

DEDICACE

Avec le temps et la patience, la feuille du murier devient de la soie.

*Je dédie ce travail à mes Parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude Pour
leur soutien tout le long de mes études.*

*Que dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de
bonheur.*

*A mes chère **Sœurs** et ses **oiseaux** et mes **Frères**, pour leurs encouragements
tout au long de la réalisation de ce travail.*

*A tous **mes Amies**...et ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour.*

Warda

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction..... 01

Partie 01 : synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Présentation de la plante étudiée

| | |
|--|----|
| 1. Historique..... | 03 |
| 2. La plante..... | 03 |
| 2.1. Description générale de lin..... | 03 |
| 2.2. Systématique et centre d'origine de l'espèce..... | 04 |
| 2.3. Morphologie et botanique de <i>linum usitatissimum</i> L..... | 04 |
| 3. La graine..... | 05 |
| 3.1. Morphologie et microstructure..... | 05 |
| 3.2. Composition chimique de grain de lin..... | 06 |
| 3.3. L'accumulation des réserves dans les graines de lin..... | 07 |
| 4. Domaine d'Utilisation..... | 08 |
| 4.1. Utilisation industrielle..... | 08 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 4.2. Utilisation thérapeutique..... | 08 |
|-------------------------------------|----|

Chapitre 02 : Substances végétales bioactives.

| | |
|---|----|
| 1. Polyphénols..... | 10 |
| 1.1. Acides phénoliques simples..... | 10 |
| 1.1.1. Acides hydroxybenzoïques..... | 10 |
| 1.1.2. Acides hydroxycinnamiques..... | 11 |
| 1.2. Quinones..... | 12 |
| 1.3. Tannins..... | 12 |
| 1.4. Coumarine..... | 13 |
| 1.5. Lignanes..... | 13 |
| 1.6. Flavonoïdes..... | 14 |
| 1.7. Stilbènes..... | 14 |
| 1.8. Anthocyanes | 15 |
| 2. Alcaloïdes..... | 15 |
| 2.1. Alcaloïdes vrais..... | 15 |
| 2.2. Proto-alcaloïdes..... | 15 |
| 2.3. Pseudo-alcaloïdes..... | 16 |
| 3. Huiles essentielles et composés terpéniques..... | 16 |
| 3.1. Huiles essentielles..... | 16 |

| | |
|--------------------------------|----|
| 3.2. Composés terpéniques..... | 16 |
| 4. Les huiles fixes..... | 16 |

Chapitre 03: les activités biologiques

| | |
|---|----|
| 1. Activité antioxydante..... | 17 |
| 1.1. Définition d'un radical libre..... | 17 |
| 1.2. Définition d'un antioxydant..... | 17 |
| 1.3. Les principales sources d'antioxydants..... | 17 |
| 1.3.1. Les antioxydants naturels..... | 17 |
| 1.3.2. Les antioxydants synthétiques..... | 17 |
| 1.4. Les types d'antioxydants..... | 17 |
| 1.4.1. Les antioxydants primaires ou piègeur des radicaux libres..... | 17 |
| 1.4.2. Les antioxydants secondaires ou préventifs..... | 18 |
| 1.5. Mécanismes d'action des antioxydants..... | 18 |
| 2. Activité anti bactérienne..... | 18 |
| 2.1. Définition de l'activité antibactérienne..... | 18 |
| 2.2. Mécanisme d'effet antimicrobien des plantes médicinales..... | 18 |
| 2.3. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées..... | 19 |
| ➤ <i>Staphylococcus aureus</i> | 19 |
| ➤ <i>Escherichia coli</i> | 19 |

| | |
|---|----|
| ➤ <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> | 19 |
| ➤ <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 19 |
| ➤ <i>Enterococcus sp</i> | 20 |
| 2.4. Définition d'anti biotique..... | 20 |
| 2.4.1. Mode d'action des antibiotiques..... | 20 |
| 3. Activité anticoagulante | 20 |
| 3.1. Définition..... | 20 |
| 3.2. Facteurs de la coagulation..... | 21 |
| 3.3. Voies de la coagulation..... | 21 |
| 3.3.1. Voie endogène..... | 21 |
| 3.3.2. Voie exogène..... | 22 |
| 3.4. Les anticoagulants..... | 23 |
| 3.4.1. Les héparines..... | 23 |
| 3.4.2. Les anti-vitamines K..... | 23 |
| 3.4.3. Les nouveaux anticoagulants..... | 23 |

Partie 02 : Étude Expérimentale

Chapitre 01 : Matériel et méthode

| | |
|----------------------------|----|
| 1. Matériel..... | 24 |
| 1.1. Matériel végétal..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 2. Méthodes | 24 |
| 2.1. Préparation de matériel végétal | 24 |
| 2.2. Screening phytochimique | 25 |
| ➤ Macération éthanolique..... | 25 |
| • Détection des polyphénols | 27 |
| • Détection des saponosides | 27 |
| • Détection des flavonoïdes | 27 |
| • Détection des anthocyanes | 27 |
| • Détection des anthraquinones | 27 |
| • Détection des coumarines | 27 |
| • Détection des tanins | 28 |
| • Détection des quinones libre | 28 |
| • Détection des glycosides..... | 28 |
| • Détection des alcaloïdes | 28 |
| • Détection les stérols et les triterpènes..... | 29 |
| 2.3. Extraction des polyphénols..... | 29 |
| 2.3.1. Préparation de l'extrait méthanolique..... | 29 |
| 2.3.2. Préparation de l'extrait aqueux..... | 29 |
| 2.3.3. Détermination des rendements des composés phénoliques | 29 |

| | |
|--|----|
| 2.4. Extraction des huiles fixes | 30 |
| 2.4.1. Extraction par éthanol | 30 |
| 2.4.2. Extraction Par le chloroforme..... | 30 |
| 2.4.3. Extraction par pressage..... | 30 |
| 2.4.4. Détermination des rendements des huiles fixes | 30 |
| 2.5. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie (méthode de Folin Ciocalteu)..... | 31 |
| 2.5.1. Principe | 31 |
| 2.5.2. Mode opératoire | 31 |
| 2.5.3. Expression des résultats..... | 32 |
| 2.6. Etude de l'activité antioxydante..... | 32 |
| 2.6.1. Test au DPPH..... | 32 |
| 2.6.1.1. Principe..... | 32 |
| 2.6.1.2. Préparation de la solution DPPH | 33 |
| 2.6.1.3. Mode opératoire..... | 33 |
| 2.6.1.4. Expression des résultats..... | 34 |
| 2.6.1.5. Calcul des EC50 (IC50)..... | 34 |
| 2.7. Activité anti bactérienne..... | 34 |
| 2.7.1. Matériel du test de l'activité antibactérienne..... | 34 |
| • Les souches bactériennes..... | 34 |

| | |
|--|----|
| • Les antibiotiques..... | 35 |
| • Le milieu de culture..... | 35 |
| 2.7.2. Méthode de diffusion par disque l'aromatogramme..... | 35 |
| 2.7.3. Préparation de l'inoculum..... | 35 |
| 2.7.4. Ensemencement..... | 36 |
| 2.7.5. Préparation des disques d'aromatogramme..... | 36 |
| 2.7.6. Lecture..... | 37 |
| 2.8. Activité anti coagulante..... | 37 |
| 2.8.1. Préparation du pool plasmatique..... | 37 |
| 2.8.2. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène..... | 37 |
| 2.8.2.1. Principe..... | 37 |
| 2.8.2.2. Mode opératoire..... | 38 |
| 2.8.3. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène (TQ)..... | 38 |
| 2.8.3.1. Principe..... | 38 |
| 2.8.3.2. Mode opératoire..... | 38 |

Chapitre 02 : Résultat et discussion

| | |
|---------------------------------|----|
| 1. Screening phytochimique..... | 40 |
| 1.1. Résultats..... | 40 |
| • Polyphénols..... | 40 |

| | |
|--|----|
| • Saponines..... | 41 |
| • Flavonoïdes..... | 41 |
| • Coumarines..... | 42 |
| • Les tanins..... | 42 |
| • Les anthocyanes..... | 43 |
| • Les anthraquinones..... | 43 |
| • Quinones libres..... | 44 |
| • Les glucosides..... | 44 |
| • Les alcaloïdes..... | 44 |
| • Des stérols et triterpènes..... | 45 |
| 1.2. Discussion..... | 46 |
| 2. Rendement des extraits bruts..... | 46 |
| 3. Rendement d'extraction de l'huile fixe..... | 47 |
| 3.1. Caractéristique organoleptique d'huile fixe extraite..... | 48 |
| 4. Dosage des polyphénols totaux | 49 |
| 4.1. Résultat..... | 49 |
| 4.2. Discussion..... | 50 |
| 5. Activité antioxydant..... | 51 |
| 5.1. Résultats..... | 51 |

| | |
|--|----|
| 5.1.1. Analyse des effets des paramètres étudiés sur l'AAO..... | 51 |
| • Effet des extraits de polyphénols et des huiles fixes (HFC, HFE et HFP) sur l'AAO..... | 52 |
| • Effet de dilution sur l'AAO..... | 52 |
| • Effet du temps sur l'AAO..... | 53 |
| • Effet interaction extraits /temps..... | 54 |
| • Effet interaction extraits /dilution..... | 55 |
| • Effet interaction temps /dilution..... | 55 |
| • Effet interaction extraits /temps /dilution..... | 56 |
| 5.2. Discussion..... | 56 |
| 5.3. Calcul des EC50 (IC50)..... | 56 |
| 5.3.1. Résultat..... | 56 |
| 5.3.2. Discussion..... | 57 |
| 6. L'activité anti bactérienne | 58 |
| 6.1. Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques..... | 58 |
| 6.2. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut de polyphénol et des huiles fixes des graines de lin et de leurs dilutions..... | 60 |
| 6.2.1. Effet des différents extraits bruts de polyphénol et des huiles fixes sur les souches testées..... | 60 |
| 6.2.2. Effet des différentes dilutions de polyphénol de l'extrait aqueux et méthanolique sur les souches testées..... | 60 |

| | |
|--|-----------|
| 6.2.3. Effet des différentes dilutions des huiles fixes sur les souches testées..... | 62 |
| 6.3. Discussion..... | 66 |
| 7. L'activité anti coagulante..... | 67 |
| 7.1. Résultat..... | 67 |
| 7.1.1. La voie endogène (TCK)..... | 67 |
| 7.1.1.1. Le polyphénol..... | 67 |
| 7.1.1.2. Les huiles fixes..... | 69 |
| 7.1.2. La voie exogène (TQ)..... | 70 |
| 7.1.2.1. Le polyphénol..... | 70 |
| 7.1.2.2. Les huiles fixes..... | 71 |
| 7.2. Discussion..... | 72 |
| Conclusion et perspectives | 74 |

Références bibliographiques

Annexe

Liste des abréviations

| | | |
|-------------------------|---|---|
| % | : | Pourcentage |
| AAO | : | Activité antioxydante |
| Abs | : | Absorbance |
| ASC | : | Acide ascorbique |
| ATCC | : | American type culture collection |
| AVK | : | Anti vitamine k |
| CHCl₃ | : | Chloroforme |
| CMI | : | Concentration minimale inhibitrice |
| CN₁₀ | : | Gentamicine |
| CPG | : | Chromatographie en phase gazeuse |
| DMSO | : | Dimethylsulfoxyde |
| DPPH• | : | 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle |
| EAG/g.MS | : | Equivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche |
| EX.AQ | : | Extrait aqueux. |
| EX.Méth | : | Extrait méthanolique. |
| F_{3P} | : | Facteur 3 plaquettaire |
| FCR | : | Folin Ciocalteu |
| FeCl₃ | : | Chlorure ferrique |
| g | : | Gramme |

| | |
|--|--|
| H₃PMo₁₂O₄₀ : | D'acide phosphomolybdique |
| H₃PW₁₂O₄₀ : | D'acide phosphotungstique |
| HBMP: | Les héparines de bas poids moléculaire |
| HCL : | Acide chlorhydrique |
| HFC : | Huile fixe de chloroform. |
| HFE : | Huile fixe d'éthanol. |
| HFP : | Huile fixe de pressage. |
| HNF : | L'héparine non fractionnée |
| IC50 : | Concentration inhibitrice à 50% |
| J.C : | Jésus-Christ. |
| KOH : | Hydroxyde de potassium |
| Lu : | Linum usitatissimum |
| Mg : | Milligramme |
| Min : | Minute |
| Na₂CO₃ : | Carbonate de sodium |
| OH• : | Radical hydroxyl |
| OMS : | Organisation mondiale de la santé. |
| pH : | Potentiel d'hydrogène |
| PPP : | Plasma pauvre en plaquettes |

| | | |
|-------------------------|---|---|
| rpm | : | Rotation par minute |
| Sxt₂₅ | : | Cotrimoxazol |
| TCK | : | Temps de céphaline kaolin |
| TP | : | Taux de prothrombine |
| v/v | : | Volume par volume |
| TQ | : | Temps de Quick |
| μl | : | Microlitre. |
| Me | : | Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant |
| Mv | : | Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction |
| R % | : | Rendement en % |

Liste des figures

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figure 01: | Fresques égyptiennes..... | 03 |
| Figure 02: | Planche botanique du lin cultivé (<i>Linum Usitatissimum</i>), domaine publique..... | 05 |
| Figure 03: | Gamme de couleurs des graines de lin..... | 06 |
| Figure 04: | Accumulation des réserves dans les embryons de lin..... | 07 |
| Figure 05: | Structures chimiques de coumarine..... | 13 |
| Figure 06: | Squelette de base des flavonoïdes..... | 14 |
| Figure 07: | Structures chimiques de quelques anthocyanidines | 15 |
| Figure 08: | La cascade de coagulation dans la voie endogène et la voie exogène... | 25 |
| Figure 09: | les graines de lin..... | 24 |
| Figure 10: | La poudre de graines de lin..... | 25 |
| Figure 11: | Forme libre et réduite du DPPH..... | 32 |
| Figure 12: | Protocole d'évaluation de l'activité anti-oxydante in vitro..... | 33 |
| Figure 13: | Résultat du test des polyphénols..... | 41 |
| Figure 14: | Résultat de test des saponines..... | 41 |
| Figure 15: | Résultat du test des flavonoïdes..... | 42 |
| Figure 16: | Résultat de test des coumarines..... | 42 |
| Figure 17: | Résultat de test des tanins..... | 43 |
| Figure 18: | Résultat de test des anthocyanes..... | 43 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figure 19: | Résultat de test des anthraquinones..... | 44 |
| Figure 20: | Résultat de test des quinones libres..... | 44 |
| Figure21: | Résultat de test des glucosides..... | 45 |
| Figure 22: | Résultat de test des alcaloïdes..... | 45 |
| Figure23: | Résultat de test des stérols et triterpènes..... | 46 |
| Figure 24: | Rendement des extraits bruts..... | 47 |
| Figure 25: | Rendement des huiles fixes..... | 48 |
| Figure 26: | la courbe d'étalonnage de l'acide gallique..... | 49 |
| Figure 27: | teneur en polyphénol totaux pour Lu..... | 50 |
| Figure 28: | Effet des antibiotiques sur les bactéries étudiées..... | 59 |
| Figure 29: | Effet de polyphénol de l'extrait aqueux sur les bactéries étudiées... | 61 |
| Figure 30: | Effet de polyphénol de l'extrait méthanolique sur les bactéries étudiées..... | 62 |
| Figure 31: | Effet des huiles fixes à chloroforme sur les bactéries étudiées..... | 64 |
| Figure 32: | Effet des huiles fixes d'éthanol sur les bactéries étudiées..... | 65 |
| Figure 33: | Effet des huiles fixes de pressage sur les bactéries étudiées..... | 66 |
| Figure 34: | Capacité anticoagulante des extraits méthanoliques et aqueux de (Lu) vis-à-vis de la voie endogène..... | 68 |
| Figure 35: | Capacité anticoagulante des huiles fixes de (Lu) vis-à-vis de la voie endogène..... | 69 |

| | |
|---|----|
| Figure 36: Capacité anticoagulante des polyphénols vis-à-vis de la voie exogène..... | 70 |
| Figure 37: Capacité anticoagulante de différents extraits de TV vis-à-vis de la voie Exogène..... | 71 |

Liste des tableaux

| | | |
|---------------------|--|----|
| Tableau 01 : | Composition chimique (%) des grains de lin..... | 07 |
| Tableau 02 : | Composantes fonctionnelles des graines de lin..... | 09 |
| Tableau 03 : | Principaux acides hydroxybenzoïques..... | 11 |
| Tableau 04 : | Principaux acides hydroxycinnamiques..... | 12 |
| Tableau 05 : | Facteurs de la coagulation plasmatique | 21 |
| Tableau 06 : | Les tests de screening phytochimique..... | 26 |
| Tableau 07 : | Liste des souches bactériennes étudiées..... | 35 |
| Tableau 08 : | Evaluation de l'effet antibactérien selon le diamètre d'inhibition..... | 37 |
| Tableau 09 : | Résultats de screening phytochimique..... | 40 |
| Tableau 10 : | Caractéristique organoleptique d'huile fixe..... | 48 |
| Tableau 11: | Effet des paramètres étudiés sur l'AAO..... | 51 |
| Tableau 12: | Effet des extraits de polyphénol et des huiles fixes sur l'AAO..... | 52 |
| Tableau 13: | Effet dilution sur l'AAO..... | 53 |
| Tableau 14: | Effet temps sur l'AAO..... | 53 |
| Tableau 15: | Effet interaction extraits /temps..... | 54 |
| Tableau 16: | Effet interaction temps /dilution..... | 55 |
| Tableau 17: | La concentration inhibitrice (IC50) de polyphénol et des huiles fixes qui inhibent 50 % du Radical DPPH..... | 57 |

| | | |
|---------------------|--|----|
| Tableau 18 : | Diamètres des zones d'inhibition en (mm) en présence des deux antibiotiques..... | 58 |
| Tableau 19 : | Diamètres de zones d'inhibitions en (mm) des extraits bruts de grain de lin..... | 60 |
| Tableau 20 : | Les valeurs des CMI des deux extraits de polyphénol..... | 61 |
| Tableau 21: | Les valeurs des CMI des huiles fixes..... | 63 |

Résumé

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les constituants phytochimiques et les activités antioxydante, anticoagulante et antibactérienne des extraits phénoliques et des huiles fixes obtenues à partir des graines de lin.

Les analyses phytochimiques de *Linum usitatissimum* L. révèlent la présence des constituants bioactifs responsables des vertus thérapeutiques. De plus, l'estimation quantitative des phénols totaux par la méthode colorimétrique a montré que les deux extraits aqueux et méthanolique sont faibles de ces composés.

L'étude de l'activité antioxydante des huiles fixes et des polyphénols a été réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Les résultats obtenus ont montré l'existence d'une importante activité antioxydante pour l'huile fixe extraite par : éthanol et pressage et pour l'extrait aqueux de polyphénol par contre l'extrait méthanolique montre une faible activité antioxydante.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de polyphénol et d'huiles fixe a été réalisée par la méthode des disques par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les résultats ont montré qu'aucune activité antibactérienne des extraits phénolique n'a été observée, cependant les huiles fixes de chloroforme et d'éthanol donnent des meilleures zones d'inhibition à l'encontre des cinq bactéries testées.

L'activité anticoagulante des huiles fixes et des polyphénols a été également évaluée in vitro en utilisant les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ). Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal indiquent qu'elles exercent une activité modérée sur les deux voies de la coagulation.

Mots clés : *Linum usitatissimum* L. activité antioxydante, activité antibactérienne, activité anticoagulante, huiles fixes, polyphénol, TCK, TQ.

Abstract

The objective of this study is to evaluate the phytochemical constituents and antioxidant, anticoagulant, and antibacterial activities of phenolic extracts and fixed oils obtained from flax grains.

The Phytochemical analyses of *Linum usitatissimum* L. reveal the presence of bioactive constituents responsible for therapeutic properties. In addition, the quantitative estimation of total phenols by the colorimetric method showed that both aqueous and methanolic extracts are low in these compounds.

The study of the antioxidant activity of fixed oils and polyphenols was carried out by the free radical trapping method DPPH. The results obtained showed the existence of significant antioxidant activity for the fixed oil extracted by: Ethanol and pressing and for the aqueous polyphenol extract on the other hand the methanol extract shows a low antioxidant activity.

The evaluation of the antibacterial activity of polyphenols and fixed oils was carried out by the disc method by determining the minimum inhibitory concentration (MIC). The results showed that no antibacterial activity with polyphenols was observed, however, fixed chloroform and ethanol oils give better inhibition zones against the five bacteria tested. The anticoagulant activity of fixed oils and polyphenols was also evaluated in vitro using the cephaline-kaolin (TCK) and Quick time (TQ) tests. The coagulation times obtained on normal plasma indicate that they have moderate activity on both coagulation pathways.

Keywords: *Linum usitatissimum* L. antioxidant activity, antibacterial activity, anticoagulant activity, fixed oils, polyphenol, TCK, TQ.

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم المكونات الكيميائية النباتية لبذور الكتان *linum usitatissimum* L. عن طريق الحصر الكيميائي الاولي للمواد الفعالة، بالإضافة الى دراسة كل من الأنشطة : المضادة للأكسدة و المضادة للتخثر والمضادة للبكتيريا للمستخلصات الفينولية والزيوت الثابتة التي تم استخراجها من هذه البذور.

بينت نتائج الحصر الكيميائي لنبات *linum usitatissimum* L. عن وجود مكونات نشطة بيولوجيا ومسؤولة عن بعض الخصائص العلاجية لهذا النبات، بالإضافة إلى ذلك أظهر التقدير الكمي للفينولات الكلية بواسطة طريقة القياس اللوني أن المستخلصات المائية والميثانولية ضعيفة المحتوى من هذه المركبات.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من خلال إجراء دراسة النشاط المضاد للأكسدة للزيوت الثابتة والبوليفينول بواسطة طريقة إزالة الجذور الحرة DPPH، عن وجود نشاط مضاد للأكسدة بالنسبة للزيوت الثابتة المستخرجة من الإيثانول والضغط وللمستخلص المائي للبوليفينول على عكس المستخلص الميثانولي الذي أظهر نشاط.

بينت نتائج تقييم دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للبوليفينول والزيوت الثابتة عن طريق تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط. غياب نشاط مضاد للبكتيريا من البوليفينول على عكس الزيوت الثابتة للكلوروفورم والإيثانول التي أظهرت مناطق تثبيط واضحة ضد خمس سلالات بكتيرية التي تم اختبارها.

تم تقييم النشاط المضاد للتخثر لمستخلصات الزيوت الثابتة والبوليفينول في المختبر باستخدام وقت التخثر الجزئي (TQ) واختبارات (TCK)، وتشير أوقات التخثر التي تم الحصول عليها في البلازما العادية إلى وجود هذه المستخلصات على أنها تمارس نشاط مضاد لتخثر الدم في كلا مسيري التخثر.

الكلمات المفتاحية: *Linum usitatissimum* L ، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للجراثيم ،النشاط المضاد

للتخثر ، الزيوت الثابتة ،البوليفينول ، TQ، TCK.

INTRODUCTION

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (**Lhuillier, 2007**).

Les plantes ont toujours constitué une source majeure pour les médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. Celui-ci produit des molécules variées permettant aux plantes de contrôler leur environnement animal et végétal.

Parmi les milliers de molécules produites par ce métabolisme, l'homme sélectionne celles qui lui permettent de se défendre contre les agressions d'autres organismes vivants pathogènes (champignons, bactéries, virus...) et de corriger ses troubles métaboliques, parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les lignanes, les terpènes, les huiles et les polyphénols.

Les polyphénols présentent le groupe de métabolites secondaires le plus important à cause de leurs structures chimiques diversifiées. Les composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes possèdent des propriétés antioxydants, anticoagulantes, antimicrobiennes, hépatoprotectrices, gastro-protecteur et anticancéreuses...etc.

Les huiles, de manière générale, occupent une place importante dans le secteur agricole et agroalimentaire. La production d'huile végétale est considérée depuis plusieurs années comme l'une des filières les plus prometteuses pour la diversification des productions agricoles dans le domaine des applications alimentaires et non alimentaires.

Les observations épidémiologiques ainsi que les études nutritionnelles menées sur l'animal et sur l'homme ont montré que les huiles végétales alimentaires disposent de nombreux composants doués d'activités biologiques, nutraceutiques et thérapeutiques (**Belluzzi, 2002**).

Le lin est considérablement employé dans le quotidien de la santé publique et énormément introduit en nutrition animale. Il n'est pas un nouvel aliment, il est un des plus anciens et peut-être, un des aliments originaux et précieux en raison de ses propriétés de guérison qui ont fait de lui une plante millénaire aux vertus médicinales.

D'ailleurs, son nom latin « *Linum usitatissimum* » (lin de tous les usages) (**Tzang et al., 2009**).

Cette étude intitulée «caractérisation biochimique et évaluation de l'activité biologique des extraits phénoliques et des huiles fixes de l'espèce *Linum usitatissimum* L.», a pour objectifs énoncés ci-dessous :

- ❖ criblage phytochimique des grains de lin.
- ❖ évaluation des activités biologiques des extraits phénoliques et des huiles fixes de la plante étudiée :
 - ✓ Activité antioxydante.
 - ✓ Activité anticoagulante.
 - ✓ Activité antibactérienne.

Notre étude est subdivisée en deux parties. Une synthèse bibliographique décrivant dans un premier chapitre, les généralités de la plante *Linum usitatissimum* ; le deuxième chapitre comporte des informations sur les différentes substances végétales bioactives et le troisième chapitre est consacré à l'activité antioxydante, anticoagulante et antibactérienne.

Une partie expérimentale décrit l'ensemble des techniques analytiques et les dispositifs expérimentaux utilisés au cours de cette étude. Cette partie comporte deux chapitres :

- Le premier chapitre traite le matériel et les différentes méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail.
- Le deuxième chapitre regroupe l'ensemble des résultats qui seront par la suite suivis d'une discussion.

Pour terminer, une conclusion générale sur l'ensemble de cette étude sera donnée et complétée par d'éventuelles perspectives qui seront dégagées.

Partie 01
Synthèse bibliographique

Chapitre 01

Présentation de la plante
étudiée

1. Historique

Le lin, plante de la famille du Linaceae, fut l'une des premières plantes cultivées par l'homme. Des traces de son existence datant de - 8000 ans avant J.C. ont ainsi été découvertes dans des cités lacustres suisses. Néanmoins son origine (probablement des hauts plateaux d'Asie) n'est pas connue. Son utilisation a été étendue par l'Égypte des pharaons où les momies étaient entourées de bandelettes de lin. De plus, des fresques retrouvées dans les pyramides illustrent la culture du lin (figure1) (Savoire, 2008).



(a) Détail d'un relevé de fresque par Cailliaud



(b) Arrachage du lin, par un dignitaire et sa femme, Tombe de Sennedjem, der el Medineh, XIXème dynastie

Figure 01: Fresques égyptiennes (Savoire, 2008).

La culture du lin a été introduite en Europe par Charlemagne au cours du premier millénaire après J.C. Sa généralisation quant à elle date du XIème siècle.

Elle est cultivée en qualité de plante textile ou oléagineuse. Le Canada est le plus grand producteur de lin, environ 38% de la production mondiale, suivie par la Chine, les États Unis, l'Inde et l'Union Européenne (FAOSTAT, 2008).

2. La plante

2.1. Description générale de lin

Le nom *Linum* vient du mot celtique lin ou "fil" et le nom *usitatissimum* est latin "plus utile" ou "lin de tous les usages" (Muir et Neil, 2013), en anglais appelé Flaxseed et en arabe el ketan.

Le lin cultivé (*Linum usitatissimum* L.) est une dicotylédone annuelle, herbacée. Deux différents types se distinguent au sein de cette espèce : le type *vulgare* destinées à l'utilisation des fibres pour le textile et le type *humile* pour l'huilerie. En effet, les variétés destinées à la production de fibres ont des tiges longues et peu ramifiées conduisant à une faible production de graines (de mauvaise qualité) tandis que les variétés à huile présentent des tiges courtes et très ramifiées permettant une production de graines plus importantes (Warrand, 2004).

2.2. Systématique et centre d'origine de l'espèce

La famille du Linaceae est géographiquement répandue avec environ 300 espèces dans le monde entier. Cette famille est positionnée dans le royaume des plantes comme suit:

Classification du lin (Diederichsen et Richards, 2003) ;

- **Division** : Pteridophyta
- **Sous-division** : Angiospermae
- **Classe** : Dicotylédone
- **Sous-classe** : Rosidae
- **Ordre** : Geraniales
- **La famille** : Linaceae
- **Tribu** : Linoideae
- **Genre** : *Linum*
- **Espèce** : *usitatissimum*

Les origines du *linum usitatissimum* L. (n = 15) chromosome, une des plus anciennes plantes cultivées sont incertaines. Des restes de plante appartenant à une espèce de lin, possiblement le *L. angustifolium* Huds. (n = 15) ont été découverts dans les sites archéologiques de civilisations anciennes. L'ancêtre le plus probable du *L. usitatissimum* est le *L. Angustifolium* (Lay et Dybing, 1989).

2.3. Morphologie et botanique de *linum usitatissimum* L.

La plante atteinte une hauteur comprise entre 0,8 et 1,2 mètre pour un diamètre à la base de l'ordre de 1 à 2 millimètre.

L'inflorescence est en forme de cyme qui porte plusieurs fleurs bleues ou blanches. La fleur hermaphrodite et hypogyne, elle est de type 5 : 5 sépales, 5 pétales, 5 étamines et un pistil formé de 5 carpelles séparés par autant de fausses cloisons.

La pollinisation du lin par les insectes est possible mais rare, le pollen étant collant. Les graines de forme ovale ont une surface lisse colorée du brun-rouge à l'orange ont une longueur de 3 à 6,4 mm. Le lin possède une courte racine pivotante pourvue de radicelles fibreuses de longueur variable allant jusqu'à 120cm. Les feuilles disposées tout le long de la tige dressée sont simples et sessiles et ont trois nervure d'une longueur de 25 mm environ (Casa *et al.*, 1999).

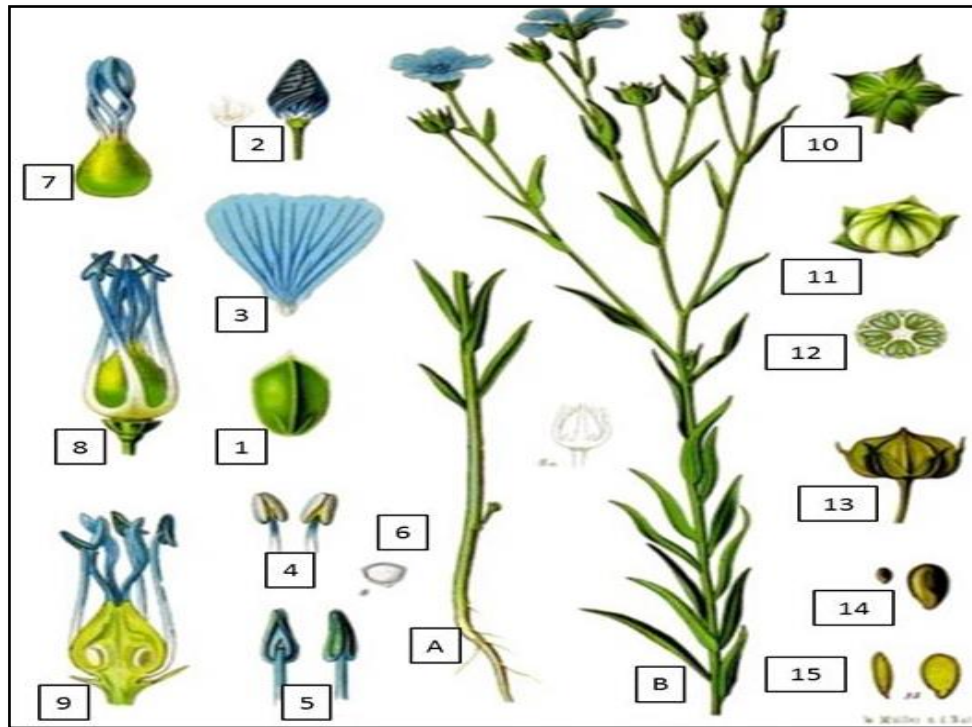


Figure 02 : Planche botanique du lin cultivé (*Linum usitatissimum*) (Casa *et al.*, 1999).

A, B : plante; 1 : sépales; 2 : bourgeon sans calice; 3 : pétale; 4 et 5 : étamines; 6 : grain de pollen; 7 : pilon avec 5 colonnes; 8 et 9 : Fleur sans calice, corolle et étamines; 10 et 11 : fruit non mur (capsule); 12 : coupe transversale d'une capsule de lin; 13 : fruit mature; 14 : graine de lin brune; 15 : coupe longitudinale des graines de lin brune.

3. La graine

3.1. Morphologie et microstructure

La graine de lin a une forme ovale, aplatie et lisse. La graine présente un bec plus ou moins recourbé à son extrémité. Le tégument de la graine prend des couleurs variant du jaune au marron (figure 03). Les dimensions des graines commerciales sont variables: de 3,0 à 6,4 mm de longueur de 1,8 à 3,4 mm de largeur et 0,6 à 1,5 mm d'épaisseur en moyenne (Freeman, 1995). Le poids de mille grains varie entre 5 et 10 g (Labalette *et al.*, 2011). La variabilité de ce poids

est relative à la date et à la densité de semis et rend compte de la bonne formation et alimentation des graines (FAO, 2012).



Figure 03 : Gamme de couleurs des graines de lin (Dybing et Lay, 1981).

La graine est formée d'un embryon entouré d'un albumen huileux, l'ensemble étant protégé par des téguments. Ces téguments comprennent cinq assises cellulaires dont (de l'intérieur vers l'extérieur) (Karleskind, 1992) :

- Une assise mucilagineuse transparente,
- Une assise verdâtre à aspect parenchymateux,
- Une assise fibreuse à membranes épaisses, colorée en jaune,
- Une couche de débris cellulaires informe, mince et incolore,
- Une couche monocellulaire rouge (donne sa couleur à la graine, si elle est absente, les graines sont vertes ou jaune et brun foncé si elle est atrophiée).

3.2. Composition chimique de grain de lin

La composition de la graine (pour un génotype donné) varie en fonction de son degré de maturité, ainsi que des conditions biotiques et abiotiques de culture (Hall *et al.*, 2006). La graine de lin englobe de nombreux composés et éléments biologiquement actifs, y compris l'acide linoléique, l'acide α -linoléique, (Shim *et al.*, 2014).

Les graines de lin sont composées majoritairement d'huile (30 à 45 %), de protéines (10 à 30 %) et de fibres alimentaires (25-32 %) (Tableau 01), mais également de composés secondaires (Daun *et al.*, 2003 ; Coskuner et Karababa 2007).

Les graines de lin présentent également des teneurs élevées en lignanes et notamment en SDG (secoisolaricirésinol di-glucoside), 75 à 800 fois plus que dans les autres graines oléagineuses (Nesbitt *et al.*, 1999).

Les téguments sont composés majoritairement de polyphénols et de composés glucidiques (mucilage) alors que l'embryon est composé majoritairement d'huile et de protéine.

Tableau 01: Composition chimique (%) des grains de lin (**Rubilar et al., 2010**).

| Protéine | Lipide | Fibre | Cendre | Références |
|----------|--------|-------|--------|------------------------------|
| 23,4 | 45,2 | - | 3,5 | (Mueller et al., 2010) |
| 20–25 | 30–40 | 20–25 | 3–4 | (Coskuner et Karababa, 2007) |

3.3. L'accumulation des réserves dans les graines de lin

De la fleur à la graine récoltée, de nombreuses transformations interviennent.

Au cours de son développement, la graine de lin accumule ses réserves sous trois formes principales, les lipides, les protéines et les polysaccharides. Les cinétiques suivies par ces trois composés sont différentes. Ainsi l'accumulation des lipides est rapide, entre 15 et 27 jours après floraison elle est de 0,17 mg.embryon-1.jour-1 (**Troufflard et al., 2007**). Tandis que l'accumulation des protéines est plus lente et inversement corrélée à la diminution de la teneur en amidon.

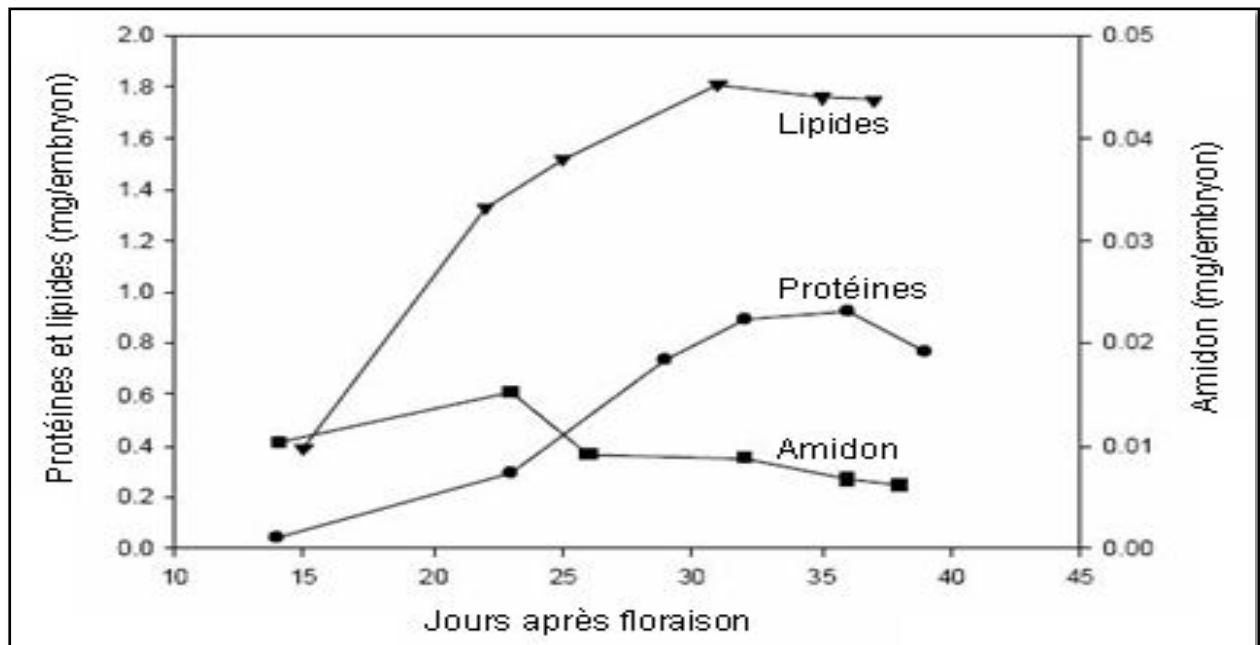


Figure 04 : Accumulation des réserves dans les embryons de lin (d'après **Troufflard et al., 2007**).

4. Domaine d'utilisation

Son nom latin « *Linum usitatissimum* L.» (Lin de tous les usages) est amplement mérité (Weill et Mairesse, 2010). Traditionnellement, le lin et son huile sont utilisés pour divers usage incluant.

4.1. Utilisation industrielle

L'utilisation industrielle du lin réside principalement dans son huile. En effet cette dernière présente un indice d'iode très élevé le définissant comme une huile siccativ.

Cette propriété, permettant la polymérisation à l'air de l'huile pour former un film ressemblant à du plastique, a justifié son utilisation dans les encres, vernis et autres applications de surface. Pour saturer la matière des ardoises, pour mettre au point le savon noir et pour protéger les pièces de monnaie de même que l'acier rouillé. L'huile de lin rentre également dans la composition du linoléum. De plus avec le développement de substituts aux produits pétroliers, l'huile de lin peut être utilisée comme biolubrifiant, comme huile destinée à remplacer les huiles perdues de type huile de tronçonneuse ou encore comme matière première dans la synthèse du diester.

Le lin est également d'intérêt industriel car l'ensemble de la plante peut être valorisé en huile comme décrit précédemment, mais aussi en alimentation animale grâce aux tourteaux et dans l'industrie textile grâce à ses fibres. Ces fibres peuvent également être utilisées pour la fabrication de matériaux composites utilisés dans les carrosseries de voiture. L'alimentation des volailles par du tourteau de lin permet également de produire des œufs enrichis en oméga-3.

Les graines alimentaires ont trouvé une place de choix dans l'alimentation moderne: les graines de lin entières sont alors utilisées en boulangerie, grillées ou non, en couverture de pains spéciaux, le lin est donc une plante d'avenir. L'huile de lin présente donc de nombreuses propriétés intéressantes (Bloedon et Szapary, 2004).

4.2. Utilisation thérapeutique

Les graines de lin sont maintenant considérées comme des aliments fonctionnels car elles contiennent des nutriments et des composantes qui favorisent la santé et qui peuvent prévenir certaines maladies. Ces composantes sont les fibres alimentaires, l'acide α -linoléique, les lignanes (Muir & Westcott, 2003), de même que les protéines (Oomah, 2001).

On trouve notamment l'acide alpha-linolénique (un oméga 3) qui agit dans la réduction du risque cardiovasculaire. Les fibres solubles et insolubles, les lignanes et les protéines sont

également responsables de l'intérêt porté au lin. Le lin permet ainsi d'inhiber des médiateurs pro-inflammatoires, de diminuer le cholestérol sanguin, de lutter contre les maladies auto-immunes et de diminuer les risques de cancer hormono-dépendant (Oomah, 2001; Oomah et Mazza, 1999; Rapport et Lockwood, 2001).

L'huile de lin est conseillée chez les personnes souffrant de sclérose en plaque ou de diabète. Elle a aussi un effet sur les systèmes hormonal et immunitaire. L'utilisation quotidienne d'huile de lin protège la membrane gastrique et urinaire (tableau 02). Elle convient aussi pour le visage, la peau irritée et le corps, elle est reconnue pour ses propriétés adoucissantes et émoullientes.

Elle est employée aussi pour le traitement des cuirs, pour nourrir les sabots des chevaux (Bloedon et Szapary, 2004).

Tableau 02 : Composantes fonctionnelles des graines de lin (adapté de Muir et Westcott, 2003).

| Composantes des graines de lin | Bénéfices sur la santé |
|---------------------------------------|--|
| Grain entier ou broyée | - Réduction du cholestérol total et du cholestérol LDL. - Réduction de la réponse glycémique postprandiale. -Diminution de l'inflammation et du risque cancer. |
| Fibres solubles | -Réduction de la cholestérolémie et de la glycémie. |
| Fibre insoluble | -Régulation de la fonction intestinale. |
| Acide alpha-linolénique | -Réduction de la cholestérolémie et des concentrations de biomarqueurs inflammatoires. -Réduction du risque de coronaropathie, d'accident vasculaire cérébral et de cancer. |
| Lignanes | -Traitement de l'hypertrophie de la prostate. -Prévention du cancer (cancer de sein, du colon et du poumon, leucémie). |

Chapitre 02
Substances végétales
Bioactives

Les différentes propriétés des plantes médicinales sont essentiellement dues à leurs composés bioactifs. L'intérêt porté sur ces composés ne cesse de croître ces dernières années. Ils sont étudiés dans le but de trouver de nouvelles structures modèles pour le développement de médicaments thérapeutiques ou protecteurs (**Bossokpi, 2003**).

1. Polyphénols

Polyphénol ou « Composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules (**Bahorun, 1997 ; Garcia-Salas et al., 2010**). Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques: celle du shikimate et celle issue de l'acétate (**Bruneton, 2009**).

L'élément structural fondamental qui caractérise les polyphénols est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (Ester, Méthyle ester, Glycoside...) (**Bruneton, 1999**).

Les polyphénols sont classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base. Il existe plusieurs classes des polyphénols, principalement, les acides phénoliques simples, les phénols simples, stilbènes, coumarines, tanins, quinones, flavonoïdes, lignanes, lignines et xanthonés (**Dacosta, 2003**).

1.1. Acides phénoliques simples

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, on distingue :

1.1.1. Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C₆-C₁). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides.

Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau 03 (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Tableau 03 : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

| R1 | R2 | R3 | R4 | Acides phénoliques |
|----|------------------|----|------------------|--------------------------|
| H | H | H | H | Acide benzoïque |
| H | H | OH | H | Acide phydroxy benzoïque |
| H | OH | OH | H | Acide protocatechique |
| H | OCH ₃ | OH | H | Acide vanillique |
| H | OH | OH | OH | Acide gallique |
| H | OCH ₃ | OH | OCH ₃ | Acide syringique |
| OH | H | H | H | Acide salicylique |
| OH | H | H | OH | Acide gentisique |

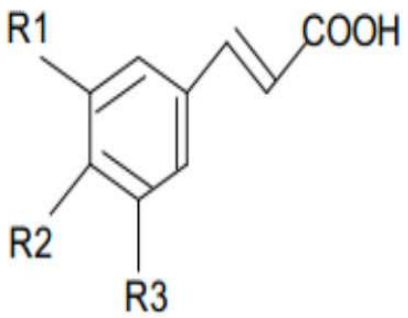
1.1.2. Acides hydroxycinnamiques

Ces acides dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C₆-C₃). Elles existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques comme l'acide chlorogénique (Ester d'acides hydroxycinnamiques : acide caféique avec l'acide quinique, pour former des mono-esters comme l'acide caféylquinique (ACQ) ex. les acides chlorogéniques: 3-ACQ, 5-ACQ, suivant que la liaison se fait en position 3 ou 5 sur les hydroxyles de l'acide quinique). On rencontre aussi des composés formés de plusieurs acides hydroxycinnamiques conjugués avec un acide quinique, comme l'acide 3,5-O-dicaféylquinique.

Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (tableau 04) (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Tableau 04 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

| R1 | R2 | R3 | Acides phénoliques |
|------------------|----|------------------|--------------------|
| H | H | H | Acide cinnamique |
| H | OH | H | Acide p-coumarique |
| OH | OH | H | Acide caféique |
| OCH ₃ | OH | H | Acide férulique |
| OCH ₃ | OH | OCH ₃ | Acide sinapique |



1.2. Quinones

Les quinones constituent une série de diènes (hydrocarbures qui contiennent deux doubles liaisons) plutôt que des composés aromatiques comportant un noyau de benzène (C₆) comme benzoquinones, sur lequel deux atomes d'hydrogène sont remplacés par deux atomes d'oxygène formant deux liaisons carbonyles (dicétones éthyléniques conjuguées cycliques). Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Ils sont caractérisés par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diénique (Paraquinones) ou éventuellement par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diénique (Orthoquinones) (**Bruneton, 1993**). Les quinones sont utilisées dans les colorants, médicaments et fongicides.

1.3. Tannins

Les tannins sont très abondants chez les angiospermes dicotylédones (Tannins Hydrolysables) et les gymnospermes (Tannins condensés). Leur masse moléculaire est comprise entre 500 et 3000 PM (**Atefeibu, 2002**). Sont répandus, particulièrement, dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ces composés ayant en commun la propriété de tanner la peau combinaisons à des macromolécules (Protéines, Polysaccharides...) par des liaisons résistantes

aux attaques fongiques et bactériennes). Ils sont utilisés dans le traitement des aliments et la clarification des vins, des bières et des jus de fruits (propriétés biologiques).

Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques. Ils sont constitués soit de polyol (ou polyalcool ou glycol, caractérisé par des groupes hydroxyle) (glucose le plus souvent) ou de catéchine ou de triterpénoïde auquel sont attachés des unités galloyles (ou leurs dérivés) ou soit d'oligomères ou polymères de flavanols. On distingue, habituellement, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénique: tanins hydrolysables, tanins galliques (**Bruneton, 2009**).

1.4. Coumarines

Les coumarines sont aussi les dérivés de C₆-C₃, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense de type phytoalexine (**O'Kennedy et Thornes, 1997**).

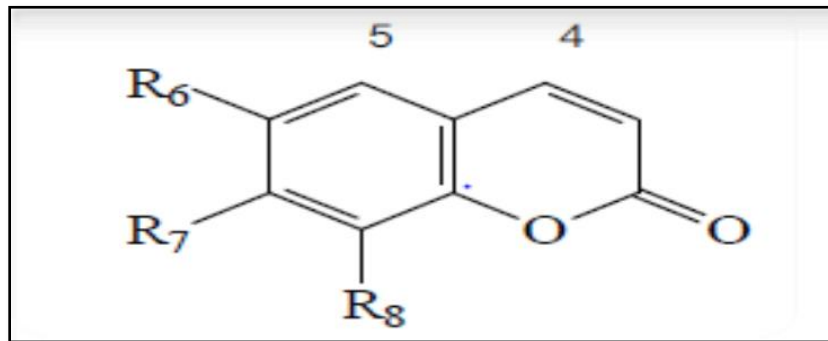


Figure 05: Structure chimique de coumarine (**O'Kennedy et Thornes, 1997**).

1.5. Lignanes

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C₆-C₃). Leur distribution botanique est large, ils se trouvent souvent dans le bois des gymnospermes et dans les tissus soumis à lignification chez les angiospermes (**Krief, 2003**). Les graines de lin sont la source la plus importante de lignanes, viennent ensuite, les lentilles, les haricots blancs, les graines de céréales et certains légumes (**Mazur et al., 1998 cité par Dacosta, 2003**).

1.6. Flavonoïdes

Les polyphénols sont des composés dont la structure de base est $C_6-C_3-C_6$ et sont constitués de deux noyaux aromatiques (Cycle A et B) reliés par un hétérocycle oxygéné (Cycle C), c'est le squelette de base des flavonoïdes, (Figure 06) (Erlund, 2004).

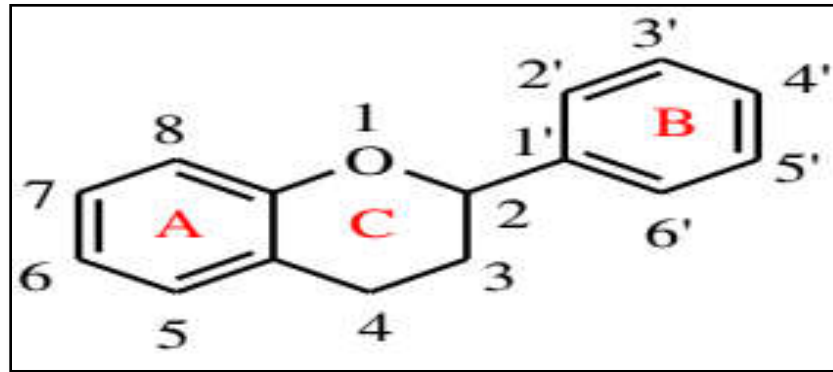


Figure 06 : Squelette de base des flavonoïdes (Erlund, 2004).

On les retrouve dans toutes les plantes vasculaires, dans divers organes: racine, tiges, feuilles et fruits (Bruneton, 1999). Ils sont synthétisés au niveau du chloroplaste et participent à la phase lumineuse de la photosynthèse comme transporteurs d'électrons, certains quittent le chloroplaste et s'accumulent dans les vacuoles (Elicoh-Middleton, 2000).

Les flavonoïdes se rencontrent libre (Aglycones ou génines), soit sous forme d'hétérosides C- ou O-glycosides comme l'hyperoside et la rutine (Glycoside entre la quercétine de flavonol et lerutinoose de disaccharide) (Dacosta, 2003).

Ils se répartissent en plusieurs classes: flavones (Apigénine, Luteoline), flavonols (Quercétrine, Kaempférol, Myricétine et Catéchine), flavanones (Naringénine), dihydroflavonols, flavanes, flavanonols, flavan-3-ols (Epicatéchine), flavylum, chalcones, aures et anthocyanines (Pélagonidine, cyanidine et péonidine), les chalcones (Butéine et phlorétine) et les isoflavonoïdes (Isoflavones, roténoïdes) et les coumaranochromones (figure 05) (Bruneton, 2009).

Les flavonoïdes partagent une origine biosynthétique commune, suite à deux voies complémentaires, voie acétate malonate et voie shikimate (Elicoh-Middleton, 2000).

1.7. Stilbènes

Les membres de cette famille possèdent la structure $C_6-C_2-C_6$.

Ce sont des phytoalexines; composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux (**Krisa et al., 1997**).

1.8. Anthocyanes

Ou pigments anthocyaniques qui colorent les fleurs, les fruits et parfois les feuilles, proche des flavonoïdes sur le plan de l'origine, de la structure et des propriétés pharmacologiques (**Catier et Roux, 2007**).

Les anthocyanes sont présents uniquement sous forme d'hétérosides appelés anthocyanosides, on les trouve dans les racines, tiges, feuilles et graines. Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavon » généralement glucosylé en position C₃ (figure 07).

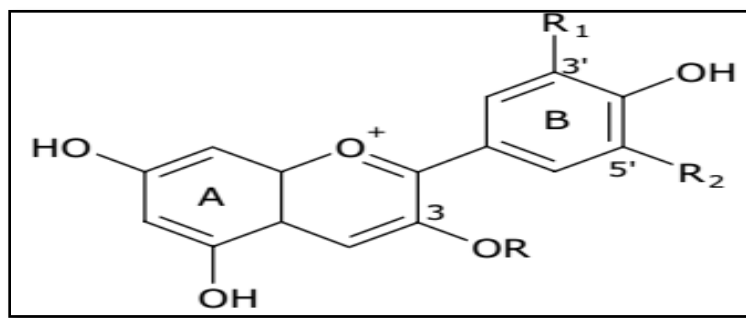


Figure 07 : Structure chimique d'anthocyanidine (**Collin et Crouzet, 2011**).

2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés, hétérocyclique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (**Zenk et Juenger, 2007**).

Ils présentent des réactions communes de précipitation, ils sont détectés par des réactions de précipitation (capacité de se combiner avec des métaux), représentant un groupe fascinant de produits naturels. Ils constituent un des plus grands groupes de près de 10000 à 12000 structures (**Stöckigt et al., 2002**).

On distingue généralement (**Beddou, 2015**):

2.1. Alcaloïdes vrais: dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle.

2.2. Proto-alcaloïdes: qui dérivent d'acides aminés, dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique.

2.3. Pseudo-alcaloïdes : présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ne sont pas des dérivés des acides aminés. Les alcaloïdes les plus courants : Alcaloïdes pyrrolizidiniques, les alcaloïdes tropaniques, les alcaloïdes quinoléiques.

3. Huiles essentielles et composés terpéniques

3.1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles, sont un extrait pur et naturel provenant de plantes aromatiques (**Wegrzyn et Lamendinh, 2005**). Elles sont le produit de la distillation d'une plante ou d'une partie de plante. Il s'agit de substances odorantes, volatiles, résinoïdes, de consistance huileuse mais sans corps gras, plus ou moins fluides, très concentrées, souvent colorées, offrant une forte concentration en principes actifs (**Solène, 2012 ; Lorrain, 2013**).

3.2. Composés terpéniques

Ce sont des produits naturels, résultant de l'assemblage d'un nombre entier d'unités isopréniques conduisant à la formation de composés terpéniques de plus en plus complexes tels que: les hormones (gibbérellines, acide abscissique), les pigments caroténoïdes (carotène, xanthophylle), les stérols et leurs dérivés (ergostérol, sitostérol, saponosides...) (**Hopkins, 2003**).

4. huiles fixes

Une huile végétale est un mélange à consistance liquide ou semi-liquide à température ambiante, de substances majoritairement hydrophobes, solubles dans les solvants organiques apolaires ou peu polaires, non volatiles: on parle alors d' « huile fixe ou grasse » (**Karleskind A., 1992**).

Chaque huile végétale est caractérisée par ces composants propres, mais c'est toujours le même principe : des acide gras et des vitamines et/ou des insaponifiables.

Les huiles végétales sont des lipides simples, c'est-à-dire des corps 100% gras, composés d'atome de carbone, d'hydrogène et d'oxygène qui forment eux même des triglycérides. A cela s'ajoutent des insaponifiables qui regroupent tantôt des vitamines tantôt des stérols végétaux, des trace d'huile essentielle aromatique, ou tout cela à la fois (**Julien, 2013**).

Chapitre 03

Les activités biologiques

1. Activité antioxydante

1.1. Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne (**Dacosta, 2003**).

1.2. Définition d'un antioxydant

Un antioxydant est toute substance, présente à une concentration inférieure à celle du substrat oxydable, qui est capable de retarder ou de prévenir l'oxydation de ce substrat (**Halliwell et Gutteridge, 1999**).

1.3. Les principales sources d'antioxydants

1.3.1. Les antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo*. Celles-ci incluent la vitamine E, la vitamine C, le gallate d'épigallocatechine, les caroténoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes et les polyamines (**Svoboda et Hampson, 1999**).

1.3.2. Les antioxydants synthétiques

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

1.4. Les types d'antioxydants

Il existe deux types d'antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action :

1.4.1. Les antioxydants primaires ou piègeur des radicaux libres

Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et la propagation de l'oxydation en participant au processus d'oxydation et en convertissant les radicaux libres vers leurs formes inactives. Les antioxydants primaires sont généralement des composés phénoliques

(AH) capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non radicalaire (Huang *et al.*, 2005).

1.4.2. Les antioxydants secondaires ou préventifs

Ils englobent une large gamme de différentes substances chimiques qui inhibent l'oxydation des lipides par différents mécanismes et ne transfèrent pas le radical libre sous sa forme non-radicalaire. Avec quelques exceptions, les antioxydants secondaires sont généralement reliés à l'inhibition de facteurs initiant l'oxydation. Ce type d'antioxydants inclut: des chélateurs de métaux pro -oxydatifs, des désactivateurs de l'oxygène singulier, des piègeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydative, enzymes antioxydants et destructrices des hydroperoxydes (Miller *et al.*, 1996).

1.5. Mécanismes d'action des antioxydants

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

2. Activité anti bactérienne

2.1. Définition de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne correspond à l'activité d'une molécule ou composé présente au sein d'un végétal qui a très faible concentration, inhibe ou tue le développement d'une bactérie. La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de l'antibactérien (Nicola et Daniel, 1998).

2.2. Mécanisme d'effet antimicrobien des plantes médicinales

Il est sans doute très complexe, peut impliquer multiples modes d'actions tels que : l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer, l'inhibition du métabolisme microbien (Milane, 2004), dégradation de la paroi cellulaire, perturbation de la membrane cytoplasmique, ce qui cause une fuite des composants cellulaires, l'influence de la synthèse de l'ADN et l'ARN (Zhang *et al.*, 2009), des protéines des lipides, et la fonction mitochondriale (Balentine *et al.*, 2006), ainsi que la formation des complexes avec la paroi (Gangoué piéboji, 2007). Ces mécanismes ne sont pas des cibles séparées, certains peuvent être comme

conséquence d'un autre mécanisme. Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organismes et à l'arrangement de la membrane externe (Shan *et al.*, 2007).

2.3. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

➤ *Staphylococcus aureus*

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des Staphylococcaceae et se compose de 34 espèces et 13 sous-espèces. *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus fréquente et la plus connue. C'est une coque à Gram positif de 0,5 à 1 µm de diamètre, non sporulé, immobile, aéro-anaérobie, T° optimale: 37, pH optimum: 6-7. Une espèce (staphylocoque doré), tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales (Chambers, 1997).

➤ *Escherichia coli*

E. coli est un bacille à gram négatif de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm (Kaper *et al.*, 2004).

Cette dernière constitue la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales (Fauchère, Avril, 2002).

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, est une bactérie mobile, les flagelles sont polaires, aérobie stricts. La température optimale de croissance se situe entre 4 °C et 42 °C. Les souches de cette espèce sont constituées de bacilles de 0,5 à 0,8 µm de diamètre sur 1,5 à 3,0 µm de longueur. Elle est obtenue à l'eau, sol humide et sur les surfaces des végétaux, responsable à l'infection nosocomiales (personnes fragilisées ou immunodéprimées), et les infections urinaires, oculaires et pulmonaires (Philippon, 1995).

➤ *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae est un bacille Gram négatif, aéro-anaérobie. Les colonies bactériennes sont volumineuses, bombées, brillantes et visqueuses, l'aspect visqueux est en étroite relation avec la capsule qui entoure ces souches (Avril, 1992).

K. pneumoniae est une espèce ubiquitaire abondante dans le sol et les eaux, c'est également un germe commensal que l'on retrouve au niveau du tube digestif et de l'appareil respiratoire des Hommes et des animaux (**Prescott, 2010**).

Ce germe cause de façon opportuniste un type grave de pneumonie, des infections nosocomiales de types respiratoires (abcès pulmonaires, pleurésies), intestinales et urinaires (**Tortora, 2012**).

➤ ***Enterococcus sp***

Est une bactérie à Gram positif, non sporulées qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînette. Elle habite au tube digestif responsable de l'inflammation de l'intestin et l'infection de la vessie et de la prostate (**DALLARAS C, 2007**).

2.4. Définition d'antibiotique

Composé chimique élaborés par un micro-organisme vivant ou produits par synthèse et qui ont la propriété d'inhiber à faible dose de processus des vitaux des virus ; micro-organismes (bactéries, champignons) ou certaines cellules des êtres pluri cellulaires (cellules cancéreuses).

Certains antibiotiques ont été identifiés et beaucoup ont été développés pour être des médicaments destinés au traitement des maladies infectieuses (**Muylaert et Mainil, 2012**).

2.4.1. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent habituellement soit comme bactéricides (ils tuent les bactéries) soit comme bactériostatique (ils inhibent la croissance bactérienne et détruisent les bactéries). Par exemple, une bêta-lactamine est bactéricide parce qu'elle inhibe la synthèse de la paroi bactérienne. Sans cette paroi, la bactérie meurt. D'autres antibiotiques interfèrent avec le processus chimiques internes de la cellule, ce qui entraîne la mort de la bactérie (**CHETLEY A, 2000**).

3. Activité anticoagulante

3.1. Définition

La coagulation correspond à une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la transformation par la thrombine du fibrinogène soluble en fibrine insoluble qui constitue l'armature du caillot. Ce phénomène est localisé et régulé par un ensemble d'inhibiteurs physiologiques. Les dérèglements de ce système exposent à un risque de thrombose ou à un risque hémorragique (**Butenaset et Mann, 2002**). Elle est divisée en deux voies, la voie

extrinsèque et la voie intrinsèque, suivie d'une voie commune après l'activation du Facteur X (FX) (De Caterina *et al.*, 2012 ; Pierce *et al.*, 1999).

3.2. Facteurs de la coagulation

Les facteurs de la coagulation ont été découverts et décrits comme une activité biologique présente chez l'homme normal et absente au cours de maladies hémorragiques héréditaires (tableau 05) (Cambus, 2002).

Tableau 05: Facteurs de la coagulation plasmatique (Boisseau, 1996).

| N° de facteurs | Nom de facteurs | Rôle | Lieu de synthèse |
|----------------|----------------------------|-----------|--|
| I | Fibrinogène | Substrat | Fois |
| II | Prothrombine | Zymogène | Fois |
| III | Facteur tissulaire | Cofacteur | Sous-Endothélium Cellules sanguines |
| V | Proéaccélérine | Cofacteur | Foie |
| VII | Proconvertine | Zymogène | Foie |
| VIII | Facteur antihémophilique A | Cofacteur | Foie |
| IX | Facteur antihémophilique B | Zymogène | Foie |
| X | Facteur STUART | Zymogène | Foie |
| XI | Facteur de Rosenthal | Zymogène | Foie |
| XII | Facteur de Hageman | Zymogène | Foie |

3.3. Voies de la coagulation

3.3.1. Voie endogène

L'activation de la voie intrinsèque de la coagulation est déclenchée par la fixation des facteurs XII et XI, de la prékallikréine et du kininogène de haut poids moléculaire sur une surface électronégative ; c'est la phase de contact. La surface est représentée in vivo par le sous

endothélium ou les plaquettes agrégées, in vitro par le verre, le kaolin, des polymères comme le sulfate de dextran ou des micelles comme les sulfatides. La fixation de ces facteurs entraîne leur protéolyse, ils deviennent ainsi actifs. Le facteur XIa en présence d'ion calcium active le facteur IX par protéolyse. Le facteur IXa va ensuite activer le facteur X au sein d'un complexe qui comprend l'enzyme (facteur IXa), un cofacteur protéinique (facteur VIII), des ions calcium et une surface phospholipidique (phospholipide membranaire de la cellule endothéliale). Le facteur VIII C ne joue son rôle de cofacteur que s'il est préalablement activé par protéolyse par le facteur IXa. Ce complexe enzymatique est la prothrombinase (**Girondon et al., 1995**).

3.3.2. Voie exogène

Cette voie possède une cinétique très rapide : quelques secondes. Le facteur VII se fixe sur la partie phospholipidique de la thromboplastine cellulaire en présence de calcium. Le facteur VII ainsi activé agit alors sur le facteur X (facteur Stuart). Le facteur X activé en présence du facteur V (proconvertine) coupe la prothrombine en plusieurs fragments dont un est la thrombine (**Girondon et al., 1995**).

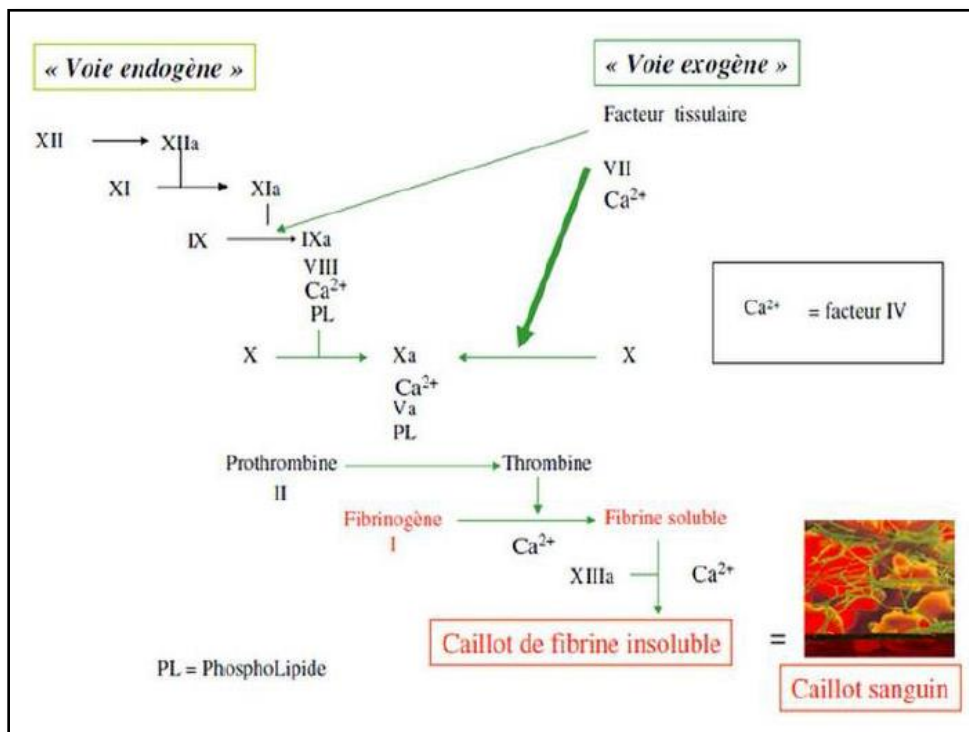


Figure 08: La cascade de coagulation dans la voie endogène et la voie exogène (**Lemaoui, 2011**).

3.4. Les anticoagulants

Les anticoagulants représentent le traitement principal de la maladie veineuse thrombo-embolique. De nombreux anticoagulants agissant à différents niveaux de la cascade de la coagulation sont utilisés et ils sont regroupés en trois classes, deux classes des anticoagulants classiques (les héparines et les anti-vitamines K) et la classe des nouveaux anticoagulants (**Batty et Smith, 2010**).

3.4.1. Les héparines

Il existe deux types des héparines utilisables et administrées par voie intraveineuse ou sous-cutanée, l'héparine non fractionnée (HNF) et les héparines de bas poids moléculaire (HBMP). L'héparine non fractionnée est composée d'un mélange hétérogène de chaînes polysaccharidiques sulfatées de taille et de structures différentes extraites de la muqueuse intestinale de porc alors que les héparines de bas poids moléculaire sont issues de la dépolymérisation des chaînes polysaccharidiques de l'HNF par des procédés chimiques ou enzymatiques. L'HNF et les HBPM forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine III potentialisant son effet sur l'inactivation de divers facteurs de coagulation (**Batty et Smith, 2010**).

3.4.2. Les anti-vitamines K

La vitamine K est un élément nécessaire dans la synthèse au niveau du foie de quatre facteurs de la coagulation, la prothrombine II, la proconvertine VII, le facteur Stuart X, et le facteur anti-hémophilique B (le facteur IX).

Les indications des anti-vitamines K (AVK) sont extrêmement nombreuses car ils sont utilisés dans la prévention des thromboses et des embolies, notamment les thromboses veineuses et les embolies pulmonaires (**Vidal, 2009**).

3.4.3. Les nouveaux anticoagulants

Des nouveaux anticoagulants sont actuellement utilisés à côté des anticoagulants classiques. Ces anticoagulants sont subdivisés selon leur mode d'action en deux catégories, les inhibiteurs indirects qui agissent en potentialisant l'activité de l'antithrombine III, et parmi les quelles, la fondaparinux et l'idraparinux (**Girardel, et Samama., 2006**). Les inhibiteurs directs agissent directement sur le facteur Xa ou la thrombine et parmi les quelles, l'hirudine, L'argatroban...etc. (**Girardel et Samama, 2006**).

Partie 02

Etude expérimentale

Chapitre 01
Matériel et méthodes

L'étude de l'espèce *linum usitatissimum* L. a été menée dans le laboratoire du Centre Universitaire Abdelhafid Boussof-Mila et dans le laboratoire d'analyse médicale Dr.Mirouh.H à Ferdjioua au cours de la période 2018-2019.

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre étude porte sur les graines de lin, *Linum usitatissimum* L. (**figure 09**) qui s'appellent localement «Zaria'at el ketan», achetées d'un herboriste de Ferdjioua wilaya de Mila.

Le matériel de laboratoire utilisé dans notre étude est illustré dans l'Annexe I.



Figure 09 : les graines de lin (photo personnelle, 2019).

2. Méthodes

2.1. Préparation de matériel végétal

Les graines de *Linum usitatissimum*L. ont été nettoyées et débarrassées d'autres particules, et par la suite broyées en poudre à l'aide d'un broyeur électrique (figure 10). Le broya est récupéré après tamisage et conservé dans des flacons en verre fermés hermétiquement et stockés à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

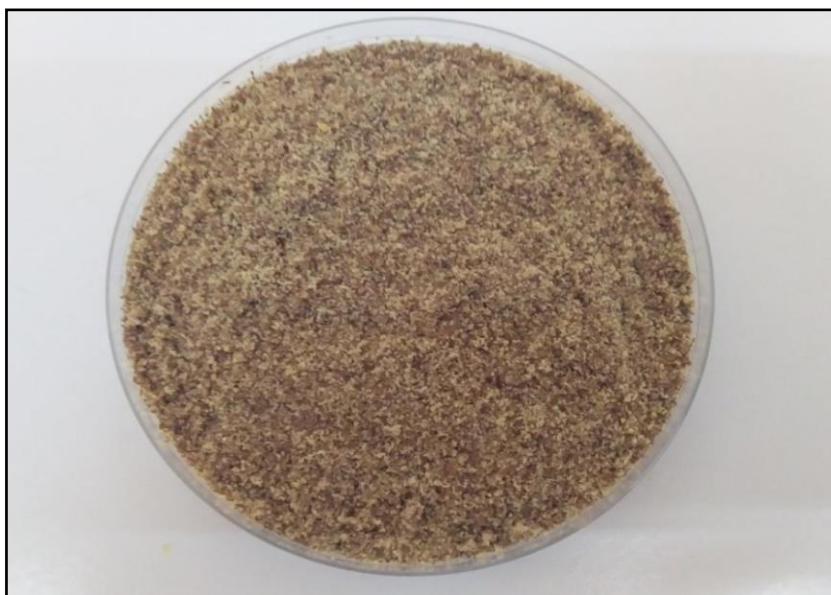


Figure 10 : La poudre de graines de lin (photo personnelle, 2019).

2.2. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques sont des tests purement qualitatifs permettant de mettre en évidence et de caractériser les différents groupes chimiques contenus dans les extraits végétaux. Ils sont basés sur des réactions de coloration et/ou de précipitation.

La méthode d'extraction que nous avons utilisée est la macération qui consiste à laisser le matériel végétal en contact prolongé avec un solvant à température ambiante, Ce qui permet d'extraire le maximum des molécules chimiques contenant dans les graines de la plante (Ribereau-Gayou J.B, 1968, Bruneton J, 1999).

Afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains métabolites secondaires, un criblage phytochimique est réalisé dans l'extrait préparé (tableau 06).

➤ Macération éthanolique

Pour préparer l'extrait éthanolique 50g de broya (Lu) a été macérée dans 250 ml d'éthanol sous agitation mécanique à température ambiante pendant 2 jusqu'à 3 jour.

Après 3 jours, les produits obtenus ont été filtrés à l'aide d'un papier filtre de type Whatman, les filtrats obtenus sont conservés dans des flacons en verre fermés hermétiquement et stockés à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

Tableau 06 : Les tests de screening phytochimique.

| Group chimique | Réactifs d'identification | Indicateur |
|-------------------------------|---|---|
| Polyphénols | -Chlorure ferrique FeCl ₃ (2%) | -Coloration bleu noirâtre ou vert plus ou moins foncé |
| Saponosides | -Indice mousse >1 cm | -Apparition d'un mousse Persistante |
| Flavonoïdes | -Alcool chlorhydrique | -coloration jaune claire |
| Anthocyanes | -H ₂ SO ₄ -NH ₄ OH | -Coloration bleu –violacée |
| Anthra –quinones | -NH ₄ OH | -Anneau rouge |
| Coumarines | -KOH 10% -HCL 10% | - Précipitation rouge brune |
| Tanins | - Alcool éthylique 5 0 % -FeCl ₃ 1% | -Coloration verdâtre |
| Quinones libres | -Ether de pétrole -NaOH 10% | - La phase aqueuse vire au jaune ; rouge ou violet |
| Glucosides | -L'eau distillée -Liqueur de Fehling | -Précipité rouge brique |
| Alcaloïdes | -Réactif de Wagner -Acide chlorhydrique HCl (10%) -Hydroxyde d'ammonium -L'étherdi-éthylique; HCl (2%) | -Précipité blanc et brun |
| Stérols et triterpènes | -Anhydride acétique -Chloroforme -H ₂ SO ₄ | -Anneau rouge brunâtre |

- **Détection des polyphénols**

Pour mettre en évidence les polyphénols, la réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) a été utilisée. Ainsi, à 2 ml de l'extrait est ajoutée une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%.

Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivées polyphénoliques l'apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée (**Békro *et al.*, 2007**).

- **Détection des saponosides**

Pour mettre en évidence les saponosides 2 g de la poudre a été macéré avec 80 ml d'eau distillée, On porte à ébullition pendant 30 min après on agite le filtrat obtenu avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. L'apparition d'une mousse persistante supérieure à 1 cm dans le milieu prouve la présence des saponosides (**Kalla, 2012**).

- **Détection des flavonoïdes**

Pour le criblage des flavonoïdes, une solution à base de 5 g de poudre et 150 ml d'HCl (à 1%) a été préparée, après une macération de 24h, le mélange a été filtré. 5 ml du filtrat ont été ensuite récupérés puis rendus basiques par ajout progressif de KOH. L'apparition d'une couleur jaune atteste de la présence de flavonoïdes dans le milieu. (**Tadros S.H, 1979**).

- **Détection des anthocyanes**

Les anthocyanes sont détectés en plaçant 5 ml d'extrait dans un tube aux quels on ajoute 5 ml d' H_2SO_4 (Milieu acide). Après agitation, le mélange est additionné de 5 ml NH_4OH (10%) (Milieu basique). La présence d'anthocyanes est affirmée par une coloration bleue-violacée en milieu basique et une coloration rouge en milieu acide.

- **Détection des anthraquinones**

Pour la détection des anthraquinones, 10 ml d'extrait est ajouté à 5 ml de NH_4OH à 10%. Après agitation, l'apparition d'un anneau rouge indique la présence d'anthraquinone (**Oloyede, 2005**).

- **Détection des coumarines**

Les coumarines sont révélés à partir de la macération de 20g de la poudre, dans 20 ml d'éthanol, après filtration on ajoute au 5 ml du filtrat 5 ml de KOH (10%) et 5 ml de HCl (10%),

l'apparition d'une précipitation rouge brune révéla la présence des coumarines (**Koffi N *et al.*, 2009**).

- **Détection des tanins**

La présence des tanins est mise en évidence à macéré 10 g de la poudre avec 80 ml d'alcool éthylique (50 %) pendant quelques minutes, après filtration on agite le filtrat obtenu, puis on ajoute quelques gouttes de FeCl_3 au milieu. L'apparition d'une couleur verte prouve la présence des tanins (**Kalla, 2012**).

- **Détection des quinones libres**

Un gramme de matériel végétal sec finement broyé est placé dans un tube avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 h, l'extrait est filtré ensuite et concentré au rotavapeur.

La présence de quinone libre est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet (**Dahou *et al.*, 2003**).

- **Détection des glycosides**

Leur détection consiste à traiter 1ml de l'extrait avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, la solution est ensuite chauffée dans un bain Marie.

L'observation d'une précipitation rouge brique indique la présence de composés réducteurs (**Trease et Evans., 1987**).

- **Détection des alcaloïdes**

Le test est réalisé par des réactions de précipitation avec le réactif de Wagner. 20 ml de l'extrait a été ajouté à 5 ml d'acide chlorhydrique HCl (10%), puis chauffer dans un bain Marie, où un volume de solution d'hydroxyde d'ammonium (10%) a été ajouté d'un milieu de pH = 9, une extraction avec de l'éther di éthylique est réalisée suivi d'une concentration avec un dispositif «évaporateur rotatif».

Le résidu est repris dans 5 ml de HCl (2%), est traité par quelques gouttes de réactif de Wagner afin d'obtenir un précipité brun indiquant la présence des alcaloïdes (**Memelink *et al.*, 2001**).

- **Détection des stérols et les triterpènes**

La présence des stérols et triterpènes est mis en évidence à l'aide de H₂SO₄ concentré. Un extrait est tout d'abord réalisé à partir d'une macération pendant 24 heures de 1g de la poudre dans 20 ml d'éther.

Les stérols et triterpènes sont mis en évidence par ajout de 1ml de CHCl₃ au résidu de 10 ml du macéra évaporé, la solution obtenue est partagée dans deux tubes à essais, puis 1ml à 2ml de H₂SO₄ concentré sont ajoutés au fond des tubes la formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides indique la présence des stérols et triterpènes (**Diallo, 2000**).

2.3. Extraction des polyphénols

2.3.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Une quantité de 10g de la poudre est macérée dans une solution de méthanol/eau (70 : 30, V/V) sous agitation mécanique à température ambiante pendant 2 à 3 jours, après filtration, Le filtrat obtenu est soumis ensuite à une évaporation par rota-évapheur. Permettant ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur jaune claire, qui est considéré comme étant l'extrait brut, qui est ensuite stockés dans des boites de Pétries en verre fermés hermétiquement à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

2.3.2. Préparation de l'extrait aqueux

Pour préparer un extrait aqueux, une quantité de 10g de broya de (Lu) est macérée dans 100 ml d'eau distillé sous agitation mécanique pendant 24 h à une température ambiante. La solution obtenue est filtré à l'aide d'un papier filtre. Le filtrat est ensuite évaporé dans une étuve à une température de 40 °C pour éliminer l'eau. Le résidu sec obtenu est conservé dans un flacon opaque à basses températures jusqu'à leur utilisation.

2.3.3. Détermination des rendements des composés phénolique

Le rendement des extraits bruts est calculé par le rapport entre le poids de l'extrait sec et celui de la plante en poudre. Il est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$R \% = (Me/Mv) \times 100$$

R %: Rendement en %.

Me: Masse de l'extrait après évaporation du solvant.

Mv: Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

2.4. Extraction des huiles fixes

2.4.1. Extraction par éthanol

L'huile des graines de lin a été obtenue à partir de la macération de 50 g de la poudre dans 200 ml de l'éthanol sous agitation mécanique pendant une nuit à une température ambiante, puis séparation des deux phases (Surnageant du culot). le surnageant est évaporé dans le rotvapeur, puis conservée l'huile obtenue à 4°C à l'abri de l'air et de la lumière (**Irshad et al., 2012**).

2.4.2. Extraction par le chloroforme

L'extraction des huiles fixes a été réalisée selon le protocole de **Irshad et al., (2012)**, 20g de la poudre est mise à macérer dans 100ml de chloroforme sous agitation pendant une heure à température ambiante. Le mélange est ensuite filtré, et le filtrat est évaporé à 60°C dans l'étuve pour récupérer les huiles fixes.

2.4.3. Extraction par pressage

Les graines de lin ont été lavées avec l'eau courante pour éviter d'éventuelle contamination, ensuite séchées dans un endroit à l'abri de lumière. les graines de lin ont été écrasées un peu d'eau froide a été ajouté et le mélange obtenue a été versée dans une compresse stérile puis pressé manuellement.

L'huile obtenue a été stockée dans des flacons en verre bien remplis, hermétiquement fermées et gardaient au frais à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

2.4.4. Détermination des rendements des huiles fixes

Le rendement en huiles fixes est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile fixe obtenue et la masse du matériel végétal à traiter.

$$R\% = M_{HF} / M_V \times 100$$

R% : rendement en huiles fixes en %.

M_{HF} : quantité de l'huile récupérée exprimée en gramme (g).

M_V : quantité de la matière végétale utilisée pour l'extraction exprimée en gramme (g).

2.5. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie (méthode de Folin Ciocalteu)

Le dosage des polyphénols totaux est effectué par la méthode de réactif de Folin Ciocalteu décrite en 1965 par Singleton et Rossi.

2.5.1. Principe

Le réactif de Folin Ciocalteu constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Ce mélange est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau, 1968**). La coloration bleue produite a une absorption maximum à 765 nm et est proportionnelle à la teneur en composés phénoliques présentent dans les extraits végétaux (**Boizotet Charpentier, 2006 ; Ghazi et Sahraoui, 2005**).

2.5.2. Mode opératoire

Le test de dosage des polyphénols totaux de notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de centre universitaire de Mila et vérifié encore dans le laboratoire d'analyses médicales : Dr. Mirouh.H à Ferdjioua.

Ce dosage permet de déterminer la concentration en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée à partir de concentrations connues d'acide gallique.

Pour ce dosage de polyphénols, 500 µl de l'extrait à différentes concentrations ont été ajoutés à 2.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois) (1 ml de réactif de Folin -Ciocalteu et 9 ml d'eau distillé). Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 15 minutes.

Après 15 min, on ajoute 2 ml de $NaCO_3$ (7,5%) puis on agite le mélange. Le mélange final est incubé pendant 2 heures à l'obscurité et à température ambiante. l'absorbance est mesurée à 760 nm contre un blanc (**Li et al., 2007**).

2.5.3. Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (mg/ml) et exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

2.6. Etude de l'activité anti-oxydante

2.6.1. Test au DPPH

L'activité du balayage des radicaux libres a été mesurée en employant le radical libre stable DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants (Markowicz Bastos *et al.*, 2007).

2.6.1.1. Principe

Le test DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydant. En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule.

La présence de ces radicaux DPPH • donne lieu à une coloration violette foncée de la solution. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (Molyneux, 2004) (figure 11). Le changement de couleur peut être suivie par spectrophotométrie à 517nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait de plante peut être déterminée (Morikawa T *et al.*,2004).

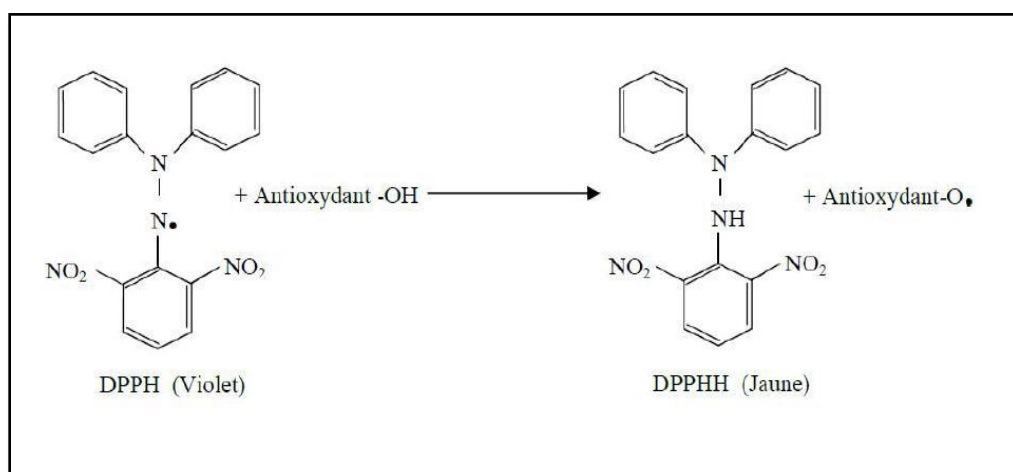


Figure 11 : Forme libre et réduite du DPPH (Morikawa T *et al.*,2004).

2.6.1.2. Préparation de la solution DPPH

0.008g de DPPH a été dissous dans 150ml de la solution méthanolique (105 ml méthanol + 45ml eau distillé). La solution a été incubé pendant 24h sous agitation mécanique à l'obscurité.

2.6.1.3. Mode opératoire

L'activité antioxydante des deux extraits phénoliques, des trois huiles fixes, et celle de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre au sein du laboratoire de centre universitaire de Mila et vérifiée dans le laboratoire d'analyses médicales Dr. Mirouh à Ferdjioua.

Selon la méthode de (Ammar *et al.*,2009), on prépare des dilutions pour les deux extraits phénoliques et pour les huiles fixes dans d'avoir les différentes concentrations de l'ordre de microgramme par ml.

Le test consiste à mélanger 1ml de la solution méthanolique du DPPH préparé avec (0.1, 0.2, 0.3 et 0.4 ml), de chaque extrait puis, on ajoute le solvant d'extraction jusqu'à 3ml.

Dans trois tubes à essai respectivement, quatre gammes de dilution de ces extraits ont été préparées et incubés à température ambiante à l'abri de la lumière. La première incubée pendant 30min, la deuxième pendant 45 min et la dernière pendant 60 min (figure 12).

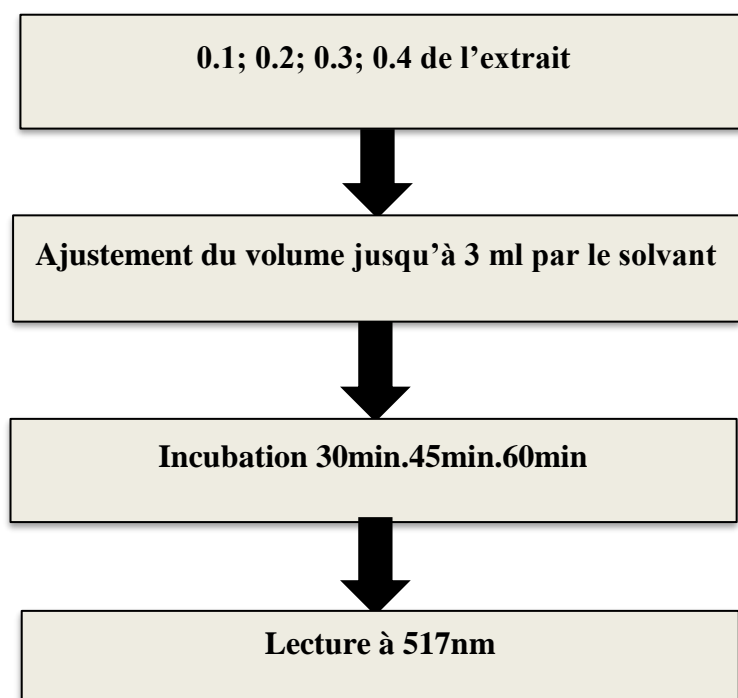


Figure 12 : Protocole d'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro*.

2.6.1.4. Expression des résultats

La capacité de piégeage du radical libre est ensuite à calculée travers le pourcentage d'inhibition :

$$\text{Le pourcentage d'inhibition} = \{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}) / \text{Abs contrôle}\} \times 100$$

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

Abs contrôle: Absorbance de la solution DPPH.

Abs test : Absorbance de l'extrait.

2.6.1.5. Calcul des EC50 (IC50)

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC50 qui est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC50 sont calculées à partir de l'équation des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait testé et le standard utilisé dans l'étude (**Bouras et Houchi, 2013**).

2.7. Activité anti bactérienne

L'activité antibactérienne de *linum usitatissimum* L. in vitro vis-à-vis des différents souches bactérienne *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Enterococcus sp* a été réalisée par la méthode de l'aromatogramme dans le laboratoire pédagogique du centre universitaire de Mila et dans laboratoire d'analyse médicales de Ferdjioua.

2.7.1. Matériel du test de l'activité antibactérienne

Les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne doivent être réalisés dans des conditions d'asepsie rigoureuses. En effet, le matériel, les solutions et les milieux de cultures doivent être stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

- **Les souches bactériennes**

Les souches bactériennes sur lesquelles nous avons testé l'activité des huiles fixes et des extraits phénoliques de *linum usitatissimum* L. sont des souches cliniques ramenées du laboratoire microbiologie de Dr Mirouh H. (tableau 07).

Tableau 07 : Liste des souches bactériennes étudiées.

| Genre et espèce | Gram | Famille |
|-------------------------------|------|---------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | <i>Staphylococcaceae</i> |
| <i>Enterococcus sp</i> | + | <i>Enterococcaceae</i> |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | - | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | <i>Pseudomonadaceae</i> |
| <i>Escherichia.coli</i> | - | <i>Enterobacteriaceae</i> |

- **Les antibiotiques**

Les antibiotiques utilisés dans ce travail sont : Gentamicine (CN₁₀) et Cotrimoxazol (SXT₂₅).

- **Le milieu de culture**

Nous avons utilisé les milieux de cultures suivants : Mueller Hinton (MH) et l'eau physiologique (Annexe I).

2.7.2. Méthode de diffusion par disque d'aromatogramme

Cette méthode est utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de nos extraits. Bien qu'elle fiable et reproductible. Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé d'huile fixe ou de polyphénol, sur un tapis bactérien au début de sa croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne de l'huile fixe ou le polyphénol est ainsi déterminé (Hayes et Markovic, 2002).

2.7.3. Préparation de l'inoculum

Après l'identification des souches bactériennes dans l'appareil Vitec, chaque souche a été ensemencée en stries sur les milieux gélosés pour obtenir des colonies isolées. Après incubation de 24h à 37°C, quelques millilitres de cette culture sont ajoutés dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile, et agité au vortex pendant quelques secondes. L'opacité de la suspension doit être équivalente à 0.5 Mc Ferland, pour cela la concentration bactérienne des différentes

solutions ou inoculum est évaluée par turbidité est exprimée par la mesure des densités optiques de 0.08 à 0.10 à une longueur d'onde de 625 nm à l'aide d'une appareil densitcheck. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit le milieu de culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. Il est à signaler d'une part, que la suspension ajustée devra contenir 108 UFC /ml (units forming colony /ml) et d'autre part, que l'inoculum ainsi préparé ne doit pas être utilisé au-delà de 15 minutes faute de quoi la concentration et donc l'opacité risque d'augmenter à cause de la croissance bactérienne.

2.7.4. Ensemencement

Cet inoculum sert à ensemer des géloses de Mueller Hinton coulées dans des boites de Pétri. L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, à partir de l'inoculum fraîchement préparé, L'écouvillon trempé dans la suspension bactérienne et essoré est frotté sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées. L'opération est répétée en tournant la boite de 60° à chaque fois.

L'ensemencement est terminé en passant pour la dernière fois l'écouvillon sur la zone périphérique du milieu de culture. Finalement, les boites ont été fermées et laissées à côté pour l'étape suivante.

2.7.5. Préparation des disques d'aromatogramme

Pour effectuer le test, des disques de 6mm de diamètre de papier Whatman n°3 sont misent dans un tube à essai stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage) et déposés à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen sur la gélose précédemment inoculée avec le microorganisme choisi. Ils sont ensuite imbibés par différentes concentrations d'extraits. Chaque disque contient 10µl d'une seule concentration d'un seul extrait (huile fixe ou polyphénol), d'autres disques imprégnés avec 10µl de solvant d'extraction (10µl pour chaque disque et pour chaque souche bactérienne) sont utilisés comme témoins négatifs. La gentamicine (Gn₁₀) et le cotrimoxazol (sxt₂₅) sont utilisées comme témoins positifs. Le test est répété trois fois et les antibiogrammes sont effectués en parallèle avec les aromatogrammes. Finalement, les boites de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C dans l'étuve.

2.7.6. Lecture

La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition (à l'aide d'une règle (mm) à l'extérieure de la boîte) qui est représentée par une auréole formée autour de disque où aucune croissance n'est observée (Najjaa *et al.*, 2007).

Tableau 08: Évaluation de l'effet antibactérien selon le diamètre d'inhibition.

| Observation | Signe | Diamètre d'inhibition |
|----------------------|-------|-----------------------|
| Non sensible | (-) | <8 mm |
| Sensible | (+) | 8 à 14mm |
| Très sensible | (++) | 15 à 20mm |
| Extrêmement sensible | (+++) | >20mm |

2.8. Activité anti coagulante

L'activité anticoagulante des extraits de la plante étudiée et de leurs principaux constituants a été réalisée au sein du laboratoire d'analyses médicales : Dr.Mirouh.H à Ferdjioua.

Cette activité a été évaluée *in vitro* vis-à-vis des deux voies de la coagulation (la voie endogène et la voie exogène) sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide des deux tests chronométrique globaux, le test de temps de céphalin-kaolin (TCK) et le test de temps de Quick (TQ).

2.8.1. Préparation du pool plasmatique

Le pool plasmatique déplaquetté est un mélange de plasma déplaquetté des 10 volontaires sains adultes non traités, dont les TQ et TCK sont normaux.

Le sang de chaque volontaire est prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur une solution anticoagulante de citrate de sodium à 3,2% et à raison de 1 volume pour 9 volumes du sang. Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Le mélange de ces plasmas (plasma standard) est conservé à basse température (-10C°) jusqu'à son utilisation.

2.8.2. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène

2.8.2.1. Principe

L'évaluation de l'activité anticoagulante des extraits vis-à-vis la voie endogène de la coagulation a été réalisée en utilisant le temps de céphaline-kaolin ou le temps de

thromboplastine partielle activé, un test qui permet d'explorer l'activité des facteurs II, V, VIII, IX, X, XI et XII de la voie endogène et la voie commune de la coagulation (**Rizzo et al ., 2008**).

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 C° d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP) et citrate mis en présence de phospholipides (la céphaline) substitut du facteur 3 plaquettaire (F3P) d'un activateur du système contact (Prékalikriène, Kininogène de haut poids moléculaire et le facteur XII) qui est généralement le Kaolin et de calcium comme un facteur déclenchant (**Caquet, 2004**).

2.8.2.2. Mode opératoire

L'activité des extraits et de certains de leurs composés est établie sur 100 µl de ce plasma qui est mélangé avec différents volumes de ces solutions (10, 20, 30 µl) préparées à une concentration donnée. Après 15 min. d'incubation à 37°C, 100 µl de céphaline-kaolin est additionné au mélange qui est réincubé durant exactement 3 min sous agitation à 37°C.

Le temps de coagulation est alors déterminé à l'aide d'un coagulomètre par ajout de 100 µl de chlorure de calcium (0,025M) préchauffé (**Wang et al., 2010**).

2.8.3. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène (TQ)

2.8.3.1. Principe

L'activité anticoagulante des échantillons et de leurs constituants vis-à-vis la voie exogène de la coagulation a été déterminée en utilisant un test de coagulation appelé le temps de Quick ou le taux de prothrombine (TP) est le test qui explore les facteurs II, V, VII et X de la voie extrinsèque et la voie commune de la coagulation (**Rizzo et al .,2008**).

La technique originale a été décrite par Quick en 1935. Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37C° d'un plasma pauvre en plaquettes en présence d'un mélange de facteurs tissulaires et des phospholipides (la thromboplastine) et de calcium. Les facteurs de la voie exogène donc sont activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré (**Athukorala et al., 2007**).

2.8.3.2. Mode opératoire

L'effet des extraits sur la voie exogène de la coagulation a été évalué selon le protocole décrit par Wang et ses collaborateurs (2010), Les facteurs de la voie exogène sont donc activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré.

100 µl de plasma pauvre en plaquettes préchauffé durant 2 min à 37°C est mélangé avec différents volumes des extraits et de certains de leurs composés (10, 20, 30 µl), préparées à une concentration donnée. Après 15 min. d'incubation à 37°C, 200 µl de thromboplastine calcique (préchauffée au moins 15 minutes à 37°C) est additionné au mélange et le temps de la coagulation est alors enregistré à l'aide d'un coagulomètre.

Chapitre 02
Résultats et discussion

1. Screening phytochimique

1.1. Résultats

Le Screening phytochimique qualitatif basé sur des réactions colorées ou des précipitations par des réactifs chimiques spécifiques sur les extraits de grains de (*Lu*) a pour but de révéler les différentes familles de substances existantes dans les grains de la plante étudiée.

Les résultats des tests phytochimiques sont représentés dans le tableau 09.

Tableau 09 : Résultats de screening phytochimique.

| Test | Résultat |
|---------------------------------------|----------|
| Polyphénols | + |
| Saponosides | - |
| Flavonoïdes | + |
| Anthocyanes | - |
| Anthraquinones | - |
| Coumarines | ± |
| Tanins | + |
| Quinones libres | + |
| Glucosides | + |
| Alcaloïdes | + |
| Les stérols et les triterpènes | + |

(+) Test positif, (-) Test négatif, (±) Trace.

- **Polyphénols**

D'après le résultat du test l'apparition de la couleur verte montre la présence des composés phénoliques dans l'extrait de (*Lu*) (figure 13).

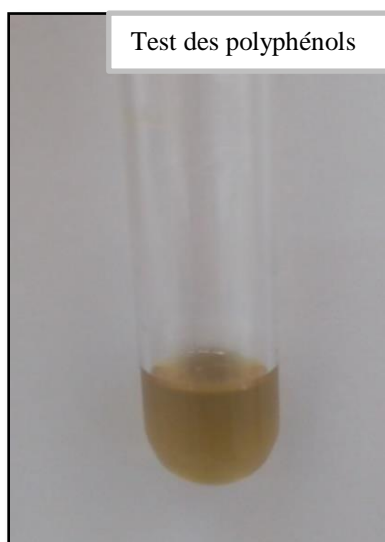


Figure 13: Résultat du test des polyphénols (photo personnelle,2019).

- **Saponines**

Nous remarquons l'apparition d'une mousse non persistante avec une hauteur inférieure à 1 cm, ce résultat indique l'absence des saponines (figure 14).



Figure 14 : Résultat de test des saponines(photo personnelle,2019)..

- **Flavonoïdes**

Pour ce test l'apparition de la couleur jaune claire dans l'extrait de (Lu) confirme leur richesse en flavonoïdes (figure 15).



Figure 15 : Résultat du test des flavonoïdes (photo personnelle,2019)..

- **Coumarines**

Le résultat du test des coumarines montre la présence de quelques traces des coumarines (figure 16).

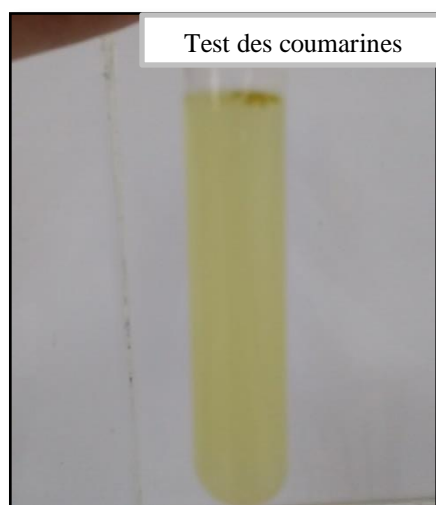


Figure 16 : Résultat de test des coumarines.

- **Les tanins**

L'apparition d'une intensité de la couleur verte foncée dans l'extrait de (Lu), prouve la présence des tanins (figure 17).



Figure 17 : Résultat de test des tanins (photo personnelle,2019)..

- **Les anthocyanes**

L'absence de la coloration bleu-violacée en milieu basique et une coloration rouge en milieu acide dans l'extrait de (Lu), indique qui sont dépourvues des anthocyanes (figure 18).



Figure 18 : Résultat de test des anthocyanes (photo personnelle,2019)..

- **Les anthraquinones**

Les résultats de test d'antraquinone (figure 19), ne révèlent pas le changement de la couleur de la solution, cela confirme leur absence dans les graines de (Lu).



Figure 19 : Résultat de test des anthraquinones (photo personnelle,2019)..

- **Quinones libres**

Nous remarquons la présence d'une couleur jaune qui signifie la présence des quinones libres dans nos extraits (figure 20).



Figure 20 : Résultat de test des quinones libres (photo personnelle,2019)..

- **Les glucosides**

L'apparition d'une précipitation rouge-brique (figure 21) indique la présence des glycosides (composés réducteurs) dans l'extrait de (Lu).

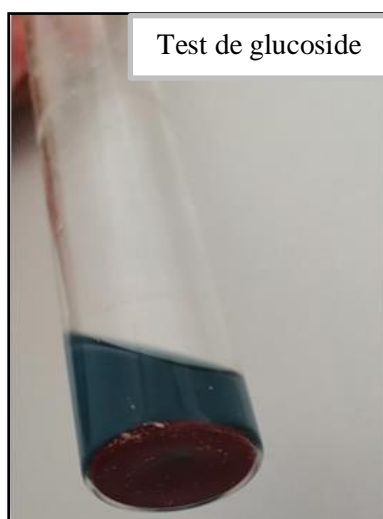


Figure 21 : Résultat de test des glucosides (photo personnelle,2019)..

- **Les alcaloïdes**

La présence des alcaloïdes est confirmée par la présence d'une précipitation brune au contact avec le réactif de Wagner (figure 22).



Figure 22 : Résultat de test des alcaloïdes (photo personnelle,2019)..

- **Des stérols et triterpènes**

La présence d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides, révèle la présence des stérols et des triterpènes (figure 23).

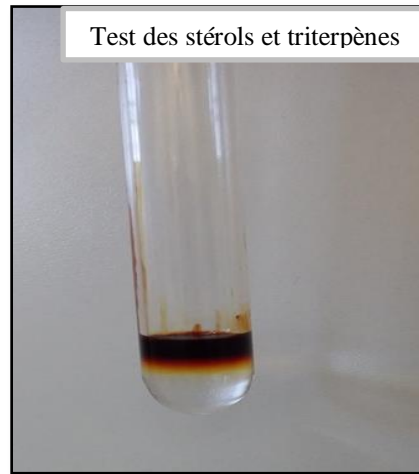


Figure 23 : Résultat de test des stérols et triterpènes (photo personnelle,2019). .

1.2. Discussion

Les tests phytochimiques effectués sur l'extrait de *linum usitatissimum* L. révèlent la présence des flavonoïdes, des polyphénols, des alcaloïdes, des stérols et triterpènes des tanins, des quinones libres, des glucosides et quelque trace des coumarines ; tandis que les tests de saponines, anthocyanes et anthraquinones sont négatifs.

De même les résultats du screening phytochimique réalisés par (ALAchaher ,2018) ont montré que Lu contient les flavonoïdes, glucosides, terpénoïdes, alcaloïdes et les phénols. Mais ne contient pas les saponosides ce qui s'accordent avec nos résultats.

Les graines de Lu contient des alcaloïdes, des flavonoïdes, des stérols et des triterpènes ; ces résultats s'accordent avec ceux obtenus par (Zafar Javed *et al.*,2019)

2. Rendement des extraits bruts

Les extraits ont été préparés par la macération à température ambiante du broyat des grains de *linum usitatissimum* L. Celle-ci a été effectuée par des solvants présentant des polarités distinctes, à savoir l'eau, le méthanol-eau. Les extraits obtenus sont donc l'extrait aqueux (Ex.Aq) et l'extrait méthanolique (Ex.Meth).

Le rendement d'extraction exprimé en pourcentage de la masse du résidu sec par rapport à la masse du broyat de la plante. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 24.

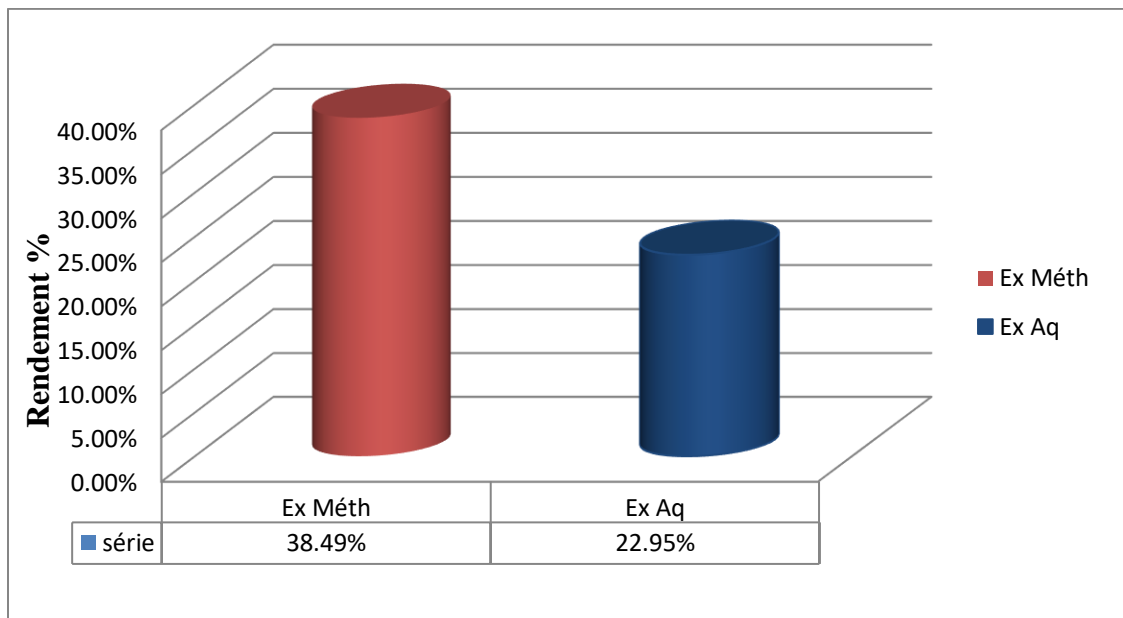


Figure 24 : Rendement des extraits bruts.

Au vu des résultats rapportés dans la figure, il ressort qu'il y a un faible écart entre le rendement de l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux de (Lu). Ces rendements sont estimés de 38,49% et de 22,95% respectivement. Il apparaît que le rendement de l'extrait aqueux est plus faible que celui de l'extrait méthanolique.

3. Rendement d'extraction de l'huile fixe

L'huile de graines de *Linum usitatissimum* L. a été obtenue par la méthode d'extraction en utilisant le chloroforme, l'éthanol et par pressage manuelle. Dans notre étude le rendement obtenu après extraction sont de 49%, 4,45% et 7,14% respectivement.

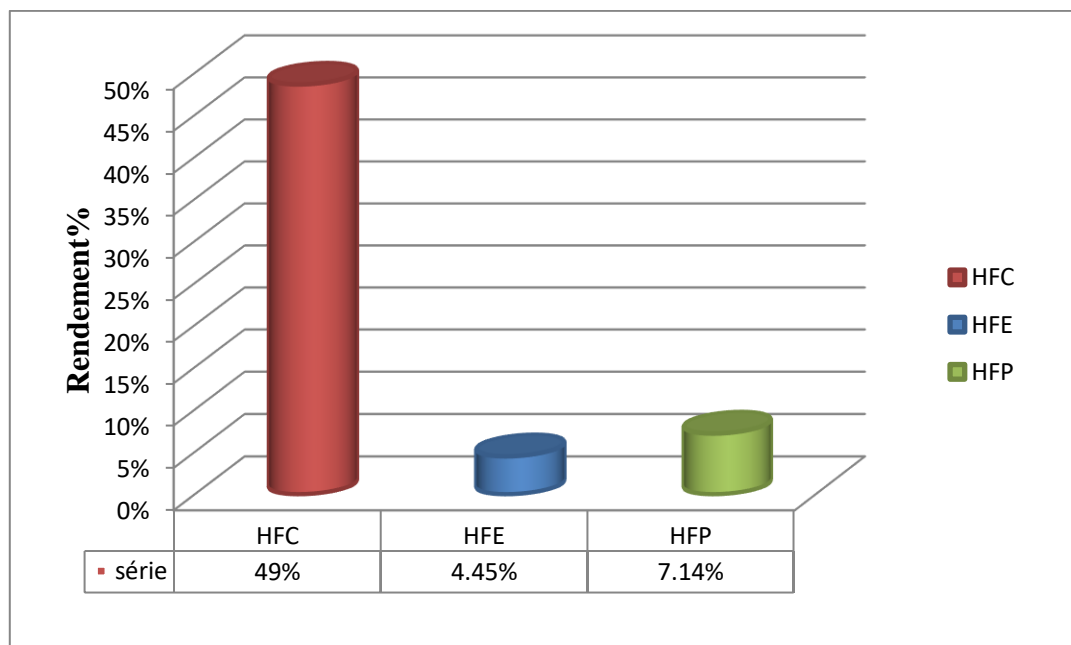


Figure 25 : Rendement des huiles fixes.

Il ressort à travers l’observation des rendements d’extraction des huiles fixes (figure 25) que l’extraction de chloroforme donne le meilleur rendement d’extraction: 49%. En revanche, l’extraction de pressage et d’éthanol donne le plus faible rendement 7,14 %, 4,45 % respectivement.

3.1. Caractéristique organoleptique d’huile fixe extraite

La saveur des huiles fixes est similaire chez les trois extraits, cependant, la couleur différée d’un extrait à l’autre.

Tableau 10 : Caractéristique organoleptique de l’huile fixe.

| Caractère \ Extrait | Saveur | Couleur |
|---------------------|--------|--------------------------------------|
| H. F. à chloroforme | Fort | Jaune d’orée dégradée vers la claire |
| H .F. à éthanol | Fort | Jaune d’orée foncé |
| H.F. à pressage | Fort | Jaune d’orée |

4. Dosage des polyphénols totaux

La détermination de la teneur en phénols totaux dans les deux extraits de *Linum usitatissimum* L. est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure 26.

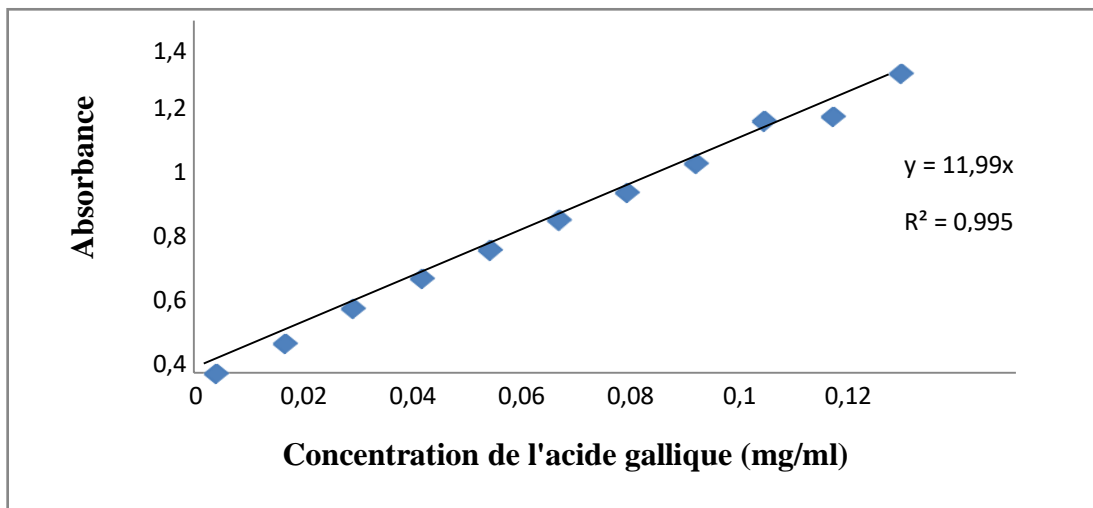


Figure 26 : la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

4.1. Résultat

Les résultats d'estimations quantitatives des polyphénols totaux sont présentés dans la figure 27.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux des deux extraits révèlent des quantités faibles de composé phénolique obtenues dans l'extrait méthanolique et aqueux. Ils montrent que les deux extraits bruts étudiés présentent généralement les teneurs les plus faibles en phénols totaux avec des valeurs moyennes sont respectivement de $(0.065 \pm 0.0293 \text{ mg EAG/g})$ et $(0.178 \pm 0.0028 \text{ mg EAG/g})$.

La dilution (1/2) des deux extraits (méthanolique et aqueux) nous a permis d'obtenir des valeurs moyennes en polyphénols de $(0.028 \pm 0.0086 \text{ mg EAG/g})$ et de $(0.096 \pm 0.0023 \text{ mg EAG/g})$ respectivement. Il ressort que l'extrait aqueux a une valeur importante que l'extrait méthanolique.

D'après les résultats de la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique (figure 27). Il ressort que leur teneur obtenue pour une dilution de (1/2) est plus élevé que celle de

l'extrait brut de (0.065 ± 0.0293 mg EAG/g) avec une valeur moyenne de (0.028 ± 0.0086 mg EAG/g).

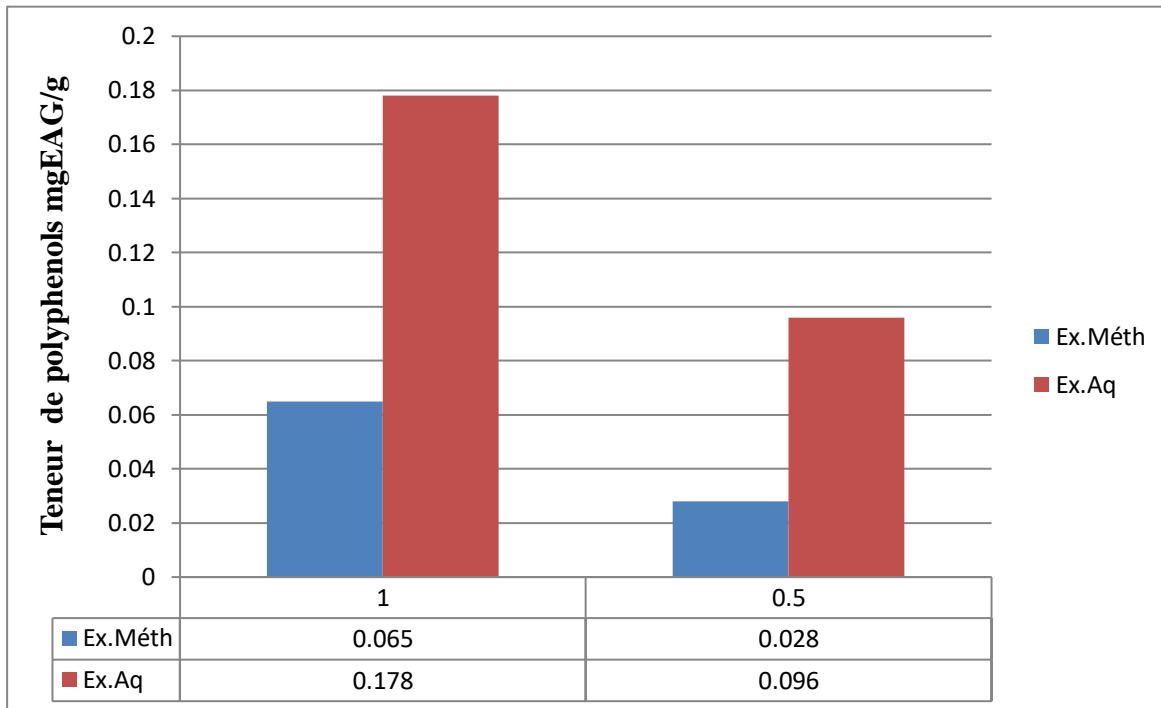


Figure 27 : teneur en polyphénol totaux pour Lu.

4.2. Discussion

Selon l'étude réalisée par **Acket, (2015)**, le dosage des polyphénols dans les graines de lin a donné une teneur estimée à 0.90g/100g de matière sèche, la courbe d'étalonnage utilisée dans cette étude est celle de l'acide férullique. Ces résultats ont permis de dire que la teneur en polyphénols trouvée dans notre étude 0.00178g/100g est inférieure que celle trouvée par (**Acket, 2015**).

Nos résultats montrent que la teneur moyenne en polyphénol totaux de l'extrait méthanolique est de 0.065mg EAG/g. Cette teneur est élevée que celle trouvée par (**alachehar.2017**).

Une étude récente a révélé l'existence de différents types de polyphénols dans les grains de (Lu) comme les lignanes, l'acide phénolique et les flavonoïdes (**kasote, 2013**).

En définitif, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie, à cause de plusieurs facteurs qui peuvent influencer la répartition qualitative et quantitative des composés phénoliques dans nos extraits, parmi ces facteurs : Les facteurs climatique et environnementaux (**Ebrahimi et al., 2008**) et la période de récolte et conservation (**Miliauskas et al., 2004**). Ainsi,

la méthode d'extraction et de quantification et aussi la sélectivité du solvant utilisée peuvent également influencer la teneur en polyphénols totaux (Lee *et al.*, 2003).

5. Activité antioxydante

A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée auparavant.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de nos extraits et du standard a été effectuée dans trois temps différents et avec quatre dilutions.

5.1. Résultats

5.1.1. Analyse des effets des paramètres étudiés sur l'AAO

Les valeurs de l'activité antioxydant des deux extraits de polyphénols, des huiles fixes (HFC, HFE et HFP) et du standard sont représentées dans le tableau 11.

Tableau 11: Effet des paramètres étudiés sur l'AAO

| Source | Somme des carrés de type III | ddl | Carré moyen | F | Signification |
|----------------------------|------------------------------|-----|-------------|---------|---------------|
| Extrait | 63767,293 | 5 | 12753,459 | 911,713 | 0,000** |
| Dilution | 229,803 | 3 | 76,601 | 5,476 | 0,000** |
| Temps | 1311,989 | 2 | 655,995 | 46,895 | 0,000** |
| Extrait * Dilution | 17584,372 | 15 | 1172,291 | 83,804 | 0,000** |
| Extrait * Temps | 7456,116 | 10 | 745,612 | 53,302 | 0,000** |
| Dilution * Temps | 192,163 | 6 | 32,027 | 2,290 | 0,000** |
| Extrait * Dilution * Temps | 1029,932 | 30 | 34,331 | 2,454 | 0,000** |

* La corrélation est significative au niveau $P \leq 0.05$. ** La corrélation est hautement significative au niveau ($0 < P \leq 0.01$). ^{ns} la corrélation est non significative au niveau de $p > 0.05$.

L'étude générale de ces résultats révèle qu'il y'a des différences très hautement significatives à $p \leq 0.01$ pour tous les paramètres étudiés.

- **Effet des extraits de polyphénols et des huiles fixes (HFC, HFE et HFP) sur l'AAO**

L'effet des différents extraits étudiés sur les résultats relatifs à l'AAO est représenté dans le tableau 12.

Tableau 12: Effet des extraits de polyphénol et des huiles fixes sur l'AAO

| | | AAO | | | |
|----------|---------|--------------------|------------|---------|---------|
| | | Moyenne | Ecart type | Minimum | Maximum |
| Extraits | EX.Méth | 50,79 ^a | 14.20 | 20,78 | 63,31 |
| | EX.Aq | 72,25 ^b | 14.53 | 40,64 | 92,81 |
| | HFC | 48,50 ^c | 18.46 | 33,33 | 90,50 |
| | HFE | 90,76 ^d | 6.27 | 60,47 | 97,75 |
| | HFP | 76,66 ^e | 6.96 | 58,68 | 87,96 |
| | ASC | 91,64 ^f | 3.37 | 84,74 | 96,61 |

À la lumière des résultats présentés dans le tableau on enregistre des différences hautement significatives entre les différents extraits étudiés et le standard pour ce variable. Notons que l'ASC présente une AAO plus élevé avec une valeur moyenne de (91,64) suivie par l'HFE avec (90,76), puis l'HFP qui présente une activité AO avec une moyenne de (76,66). Cependant l'HFC présente une AAO moins importante que celle de l'ASC avec une moyenne de (48,50).

Tandis que l'extrait aqueux de polyphénols présente une activité AAO moins importante avec (72.25) que celle de l'ASC (91.64) mais se trouve plus importante que celle de l'extrait méthanolique avec (50,79).

- **Effet de dilution sur l'AAO**

Les résultats de l'effet de la dilution sur l'AAO sont représentés dans le tableau 13.

Tableau 13: Effet dilution sur l'AAO.

| | | AAO | | | |
|----------|-------|--------------------|------------|---------|---------|
| | | Moyenne | Écart type | Minimum | Maximum |
| Dilution | 0,1ml | 70,90 ^a | 23.31 | 20,78 | 96,44 |
| | 0,2ml | 71,49 ^b | 22.82 | 26,22 | 96,61 |
| | 0,3ml | 71,56 ^b | 19.91 | 32,37 | 97,75 |
| | 0,4ml | 73,38 ^c | 17.34 | 36,47 | 97,01 |

Les résultats liés à ce paramètre montrent des différences hautement significatives entre les quatre dilutions, la dilution 0,4ml enregistre la plus grande AAO avec une valeur moyenne de (73,38) suivie par les dilutions 0,3ml et 0,2ml avec des valeurs de (71,56) et de (71,49) respectivement. Cependant la dilution 0,1ml présente une AAO moins importante que les autres dilutions avec une valeur moyenne de (70,90).

- **Effet de temps sur l'AAO**

Pour l'effet de temps sur l'AAO, les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 14.

Tableau 14: Effet temps sur l'AAO.

| | | AAO | | | |
|-------|-------|--------------------|------------|---------|---------|
| | | Moyenne | Écart type | Minimum | Maximum |
| Temps | 30min | 74,19 ^a | 18.80 | 33,33 | 97,75 |
| | 45min | 72,91 ^b | 18.98 | 33,33 | 94,95 |
| | 60min | 68,47 ^c | 24.13 | 20,78 | 96,61 |

L'étude générale de ces résultats montre que l'AAO la plus élevée est enregistrée dans le temps 30min avec une valeur moyenne de 74,19 suivie par la valeur moyenne de 72,91 enregistrée dans le temps 45min. Cependant et avec le temps 60min la valeur moyenne de l'AAO obtenue est de 68,47.

- **Effet interaction extrait /temps**

L'effet interaction extraits /temps est représenté dans le tableau 15.

Tableau 15: Effet interaction extraits /temps.

| | | | | AAO | | | |
|---------|-----|-------|-------|---------|------------|---------|---------|
| | | | | Moyenne | Ecart type | Minimum | Maximum |
| Extrait | EM | Temps | 30min | 60.93 | 2.82 | 53.07 | 63.31 |
| | | | 45min | 59.76 | 1.30 | 57.78 | 61.06 |
| | | | 60min | 31.67 | 5.77 | 20.78 | 38.52 |
| | EAQ | Temps | 30min | 65.05 | 12.52 | 60.79 | 92.81 |
| | | | 45min | 71.48 | 13.42 | 48.81 | 83.88 |
| | | | 60min | 80.23 | 14.41 | 40.64 | 77.25 |
| | HFC | Temps | 30min | 45.88 | 13.87 | 33.33 | 72.96 |
| | | | 45min | 46.34 | 19.08 | 33.33 | 78.10 |
| | | | 60min | 53.27 | 22.15 | 35.40 | 90.50 |
| | HFE | Temps | 30min | 88.20 | 4.30 | 84.81 | 97.75 |
| | | | 45min | 90.95 | 2.84 | 88.02 | 94.95 |
| | | | 60min | 93.34 | 8.92 | 60.47 | 94.85 |
| | HFP | Temps | 30min | 73.28 | 5.67 | 63.47 | 81.07 |
| | | | 45min | 77.90 | 8.05 | 58.68 | 87.54 |
| | | | 60min | 78.51 | 6.24 | 68.38 | 87.96 |
| | ASC | Temps | 30min | 91.42 | 3.81 | 84.74 | 95.76 |
| | | | 45min | 91.03 | 2.54 | 86.44 | 94.06 |
| | | | 60min | 92.47 | 3.72 | 86.44 | 96.61 |

L'étude des résultats de l'effet interaction extrait /temps montre que l'ASC, l'HFE, l'HFP et l'EX.Aq de polyphénol ont donné une forte AAO dans le temps 60min.

L'Acide ascorbique présente une valeur moyenne de (92,47), suivie par l'HFE avec une valeur moyenne de (93,34) et enfin l'HFP avec une valeur moyenne de (78,51). Tandis que, l'EX.Aq de polyphénol présente une valeur moyenne de (80,23) (tableau 11).

- **Effet interaction extrait /dilution**

Les résultats illustrés dans le tableau de ce paramètre (Interaction extraits /dilution) montrent que la meilleure activité antioxydante est celle de l'ASC dans la dilution 0,1ml avec une valeur moyenne de (94,50), suivie par l'HFE avec une valeur moyenne de (92,02) dans la dilution 0,2ml, et l'HFP présente une valeur moyenne de (83,35) dans la dilution 0,4ml et enfin l'HFC avec une valeur de (78,01) dans la dilution 0,4ml. Cependant, l'EX.Aq de polyphénol donne une moyenne de (81,31) dans la dilution 0,1ml. Tandis que l'EX.Méth se révéla une valeur moyenne de (52,58) dans la dilution 0,3ml.

- **Effet interaction temps /dilution**

Pour ce paramètre les résultats de l'analyse des variances sont représentés dans le tableau 16 :

Tableau 16: Effet interaction temps /dilution

| | | | | AAO | | | |
|----------|-------|-------|-------|---------|------------|---------|---------|
| | | | | Moyenne | Écart type | Minimum | Maximum |
| Dilution | 0.1ml | Temps | 30min | 69,88 | 19,64 | 37,37 | 95,67 |
| | | | 45min | 67,40 | 19,80 | 33,33 | 94,95 |
| | | | 60min | 63,39 | 23,32 | 20,78 | 94,95 |
| | 0.2ml | Temps | 30min | 71,14 | 19,93 | 33,33 | 92,81 |
| | | | 45min | 69,01 | 18,17 | 35,18 | 91,97 |
| | | | 60min | 63,23 | 23,53 | 26,22 | 91,86 |
| | 0.3ml | Temps | 30min | 72,88 | 17,90 | 34,07 | 97,75 |
| | | | 45min | 70,00 | 17,86 | 36,18 | 88,94 |
| | | | 60min | 68,10 | 21,43 | 32,37 | 88,67 |
| | 0.4ml | Temps | 30min | 74,45 | 12,56 | 59,83 | 97,01 |
| | | | 45min | 74,28 | 15,34 | 48,81 | 88,25 |
| | | | 60min | 71,82 | 23,55 | 36,47 | 91,15 |

Les résultats d'interaction (temps/dilution) montrent que la plus importante AAO est enregistrée dans le temps 30 min dans les quatre dilutions 0,1ml , 0,2ml ,0,3ml et 0,4ml avec des valeurs moyennes qui sont respectivement de (69,88) , (71,14) , (72,88) et (74,45).

- **Effet interaction extrait /temps /dilution**

Les résultats de l'activité antioxydante d'interaction des trois paramètres étudiés en présence de l'ASC sont récapitulés dans le tableau (Annexe IV), où il ressort que l'HFE dans le temps 30min avec la dilution 0,1ml donne une valeur plus importante (94,95) suivie par l'EX.Aq dans le temps 30min avec la dilution 0.2ml qui exercent une activité d'une valeur moyenne de (92,81) et pour l'ASC on a enregistré une valeur moyenne (90,84) dans le temps 60min avec la dilution 0.4ml. Alors l'HFC présente une valeur de (89,58), ce qui apparaît proche de celle de l'ASC dans le même le temps mais avec la dilution 0.4ml.

Cependant les résultats obtenus pour l'HFP enregistrent une valeur de (84,51) dans le temps 60min avec la dilution 0,4ml. Tandis que l'EX.Méth dans le temps 30min et avec la dilution 0,2ml donne une valeur de l'AAO moins importante que les autres extraits avec une valeur moyenne de (63,04).

5.2. Discussion

Les effets des paramètres étudiés sur le pouvoir antioxydant des différents extraits montrent que les graines de lin présentent une AAO modérée avec des valeurs variées qui ont mis en évidence une forte AAO des huiles fixes que l'extrait méthanolique de polyphénols. Cela corrobore aux résultats menés par (Messaoudi, 2017) et par (EL Abdali, 2017).

L'activité antioxydante d' HFE, d'HFP et des polyphénols contenus dans l'extrait aqueux de lin se trouve plus importante de celle de l'extrait méthanolique et de l'HFC.

5.3. Calcul des EC50 (IC50)

La capacité antioxydante de nos extraits (polyphénol et les huiles fixes) est déterminée à partir des IC50, c'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical de DPPH, en comparaison avec le résultat de l'activité antioxydante de l'acide ascorbique.

5.3.1. Résultat

Les valeurs des IC50 trouvées pour les différents extraits testés sont représentées dans le tableau 17 :

Tableau 17: La concentration inhibitrice (IC50) de polyphénol et des huiles fixes qui inhibent 50 % du Radical DPPH.

| | EC50% | | | | | |
|---------------|------------|----------|--------------|-------|-------|-------|
| | Polyphénol | | Huiles fixes | | | ASC |
| | Ex. Aq | Ex .Méth | HFE | HFC | HFP | Ex.Aq |
| 30 min | 0.198 | 0.245 | 0.160 | 0.297 | 0.200 | 0.171 |
| 45 min | 0.227 | 0.262 | 0.167 | 0.283 | 0.186 | 0.169 |
| 60 min | 0.251 | 0.444 | 0.168 | 0.244 | 0.185 | 0.165 |

A la lumière des résultats représentés dans le tableau, il ressort que les valeurs d'IC50 d'Acide Ascorbique sont corrélées négativement avec le temps, donc une activité antioxydant très élevée s'augmente avec le temps.

Selon ces résultats illustrés dans le tableau 17, l'effet anti-radicalaire des deux extraits de polyphénol (aqueux et méthanolique) testés est se diminué selon l'ordre suivant : extrait aqueux > l'extrait méthanolique.

Les trois huiles fixes de *Linum usitatissimum* L. présentent une activité anti-radicalaire par l'inhibition du DPPH, il ressort que l'HFE a donné une activité plus importante que celle enregistrée pour l'acide ascorbique dans le temps 30min, cependant les huiles à pressage sont révéler proches au standard. Tandis que l'huile de chloroforme a donné une activité plus faible que celle de l'acide ascorbique.

5.3.2. Discussion

Les travaux de (AlAchaheer, 2017) présentent des valeurs d'IC50% d'extrait méthanolique de polyphénol de 0.220mg/ml. Ce résultat est révéler supérieur à celui obtenu dans notre étude (0.444mg/ml).

Par ailleurs, (Messoudi, 2017) montre que les huiles des graines de Lu possèdent une IC50% de 0,0156mg/ml, ce qui apparait plus élevé par rapport au nos résultats d'huile de pressage de 0.185mg/ml.

Les travaux de (El Abdali ,2017) montrent que les graines de Lu présentent des valeurs d'IC50% des huiles fixes de chloroforme de l'ordre de 0,039mg /ml, ce qui s'avéré plus important celle trouvée de notre travail de 0.244mg/ml.

Selon les études récentes, l'hydrolyse de protéines alimentaires génère certains peptides possédant des propriétés antioxydantes (à l'aide d'enzymes). Cela est démontré sur des protéines contenues dans les oléagineux tels les graines de lin (Marambe *et al.*, 2008).

Cette différence observée peuvent être expliqué par le degré de la maturité et la durée de Stockage des graines de cette plante.

6. L'activité anti bactérienne

L'activité antibactérienne des HFs et des polyphénols des graines de lin a été estimée en termes de diamètre de zone d'inhibition autour des disques contenant l'huile fixe ou le polyphénol à tester vis-à-vis de cinq souches bactériennes (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterococcus sp*, et *k. peunomounia*). La détermination de la zone d'inhibition permet de donner une estimation d'un caractère de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne contre des extraits testés.

6.1. Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques

L'antibiogramme consiste à chercher la sensibilité ou la résistance des souches vis-à-vis des antibiotiques. Les résultats de l'antibiogramme qui sont donnés par la méthode de diffusion en disque des cinq souches testées sont représentés dans le tableau 11 et la figure 28 ci-dessous.

Tableau 18 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm) en présence des deux antibiotiques.

| Antibiotiques Bactéries | Gentamicine (CN ₁₀) | Cotrimoxazol (Sxt ₂₅) |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 21 | 35 |
| <i>Enterococcus sp</i> | 17 | 34 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 22 | 13 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 28 | 33 |
| <i>Klebseilla peunemonai</i> | 9 | 0 |

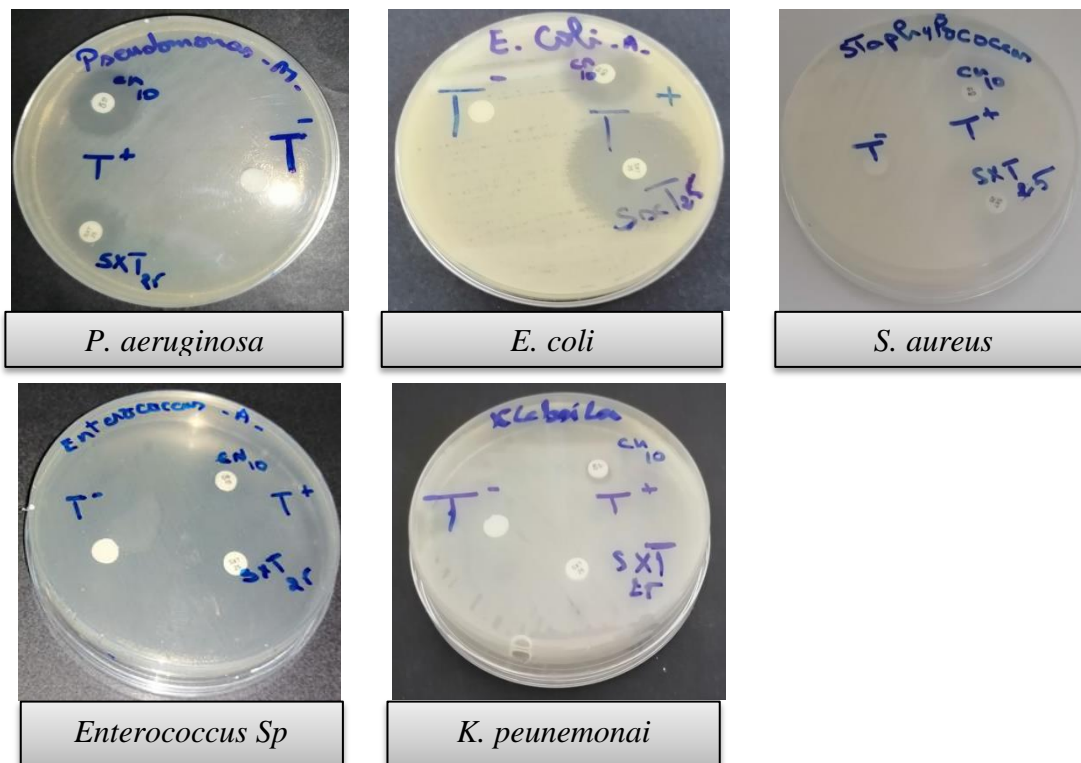


Figure 28: Effet des antibiotiques sur les bactéries étudiées (photo personnelle, 2019).

D'après les résultats suscités (tableau et figure), on observe que les différentes souches bactériennes étudiées réagissent différemment aux deux antibiotiques testés (la gentamicine et cotrimoxazol).

Le cotrimoxazol (SXT25) a été révélé extrêmement actif contre *E. coli*, *Enterococcus sp*, *S. aureus*, et *P. aurogenosa* avec des zones d'inhibitions égale à 35mm, 34mm, 33mm et 13mm respectivement alors qu'il a été inactif contre *K.penemeunia*.

Par ailleurs la sensibilité de souche *S. aureus* à la gentamicine (CN₁₀) testée a montré un meilleur résultat par rapport aux autres bactéries étudiées avec un diamètre de zone d'inhibition de 28mm. L'absence de la croissance bactérienne de *P.aeruginosa* et *E. coli* et *Enterococcus sp* montre que CN₁₀ exerce une activité vis-à-vis de ces bactéries avec des diamètres de zones d'inhibition qui sont respectivement de : 22mm, 21mm ,13 mm et 9mm.

6.2. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut de polyphénol et des huiles fixes des graines de lin et de leurs dilutions

6.2.1. Effet des différents extraits bruts de polyphénol et des huiles fixes sur les souches testées

Les diamètres de zones d'inhibition des souches étudiées sous l'action des extraits bruts de polyphénol et des huiles fixes sont représentés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Diamètres de zones d'inhibitions en (mm) des extraits bruts de graines de lin.

| Extrait \ Bactérie | EX. Aq | EX. Méth | HFC | HFE | HFP |
|------------------------|--------|----------|------|------|-----|
| <i>E. coli</i> | – | – | 12mm | 12mm | 9mm |
| <i>Enterococcus sp</i> | – | – | 11mm | 11mm | – |
| <i>p. aeruginosa</i> | – | – | 12mm | 14mm | – |
| <i>S. aureus</i> | – | – | 12mm | 12mm | – |
| <i>K.pneumounia</i> | – | – | 13mm | 13mm | 8mm |

Les résultats obtenus indiquent que l'extrait brut des deux extraits phénoliques (aqueux et méthanolique) n'a aucun effet inhibitrice sur les souches étudiées.

L'activité antibactérienne de l'huile brute de chloroforme est avérée une réponse variable vis-à-vis des bactérie *E. coli*, *Enterococcus sp*, *p. aeruginosa*, *S.aureus*, *k. pneumounia* avec des zones d'inhibition allant de 12mm, 11mm, 12mm, 12mm, et 13mm respectivement.

En même les résultats obtenus indiquent que l'huile brute d'éthanol a un effet inhibiteur vis-à-vis de toutes les souches testées, avec des zones d'inhibition allant de 11 mm à 14 mm sont observées. Le meilleur résultat obtenu est celui observé chez la bactérie *P. aeruginosa* avec un diamètre de 14mm, suivi par *K .Pneumoniae puis E.coli* et enfin l'effet vis-à-vis de *S. aureus* avec un diamètre des zones d'inhibition de 13mm, 12mm et 11mm respectivement.

Tandis que l'huile de pressage a enregistré un effet d'inhibition à l'encontre de *E. coli et K. pneumounia* avec des zones de 09mm et 08mm respectivement.

6.2.2. Effet des différentes dilutions de polyphénol de l'extrait aqueux et méthanolique sur les souches testées

La concentration minimale inhibitrice (CMI) obtenue par les dilutions de polyphénol de grain de lin est représentée dans le tableau.

Tableau 20 : les valeurs des CMI des deux extraits de polyphénol.

| CMI $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ Bactéries | EX.Aq | | | EX. Méth | | |
|--|-------|-----|-----|----------|-----|-----|
| | 500 | 250 | 125 | 500 | 250 | 125 |
| <i>E.coli</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>Enterococcus</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>P. aeruginosa</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>K. pneumoniam</i> | + | + | + | + | + | + |

(+) présence de croissance

(-) absence de croissance

Selon les résultats enregistrés (tableau 20), les différentes CMI de phénoliques d'extrait aqueux de notre plante n'ont exprimés aucune activité contre les bactéries testées (figure 29).

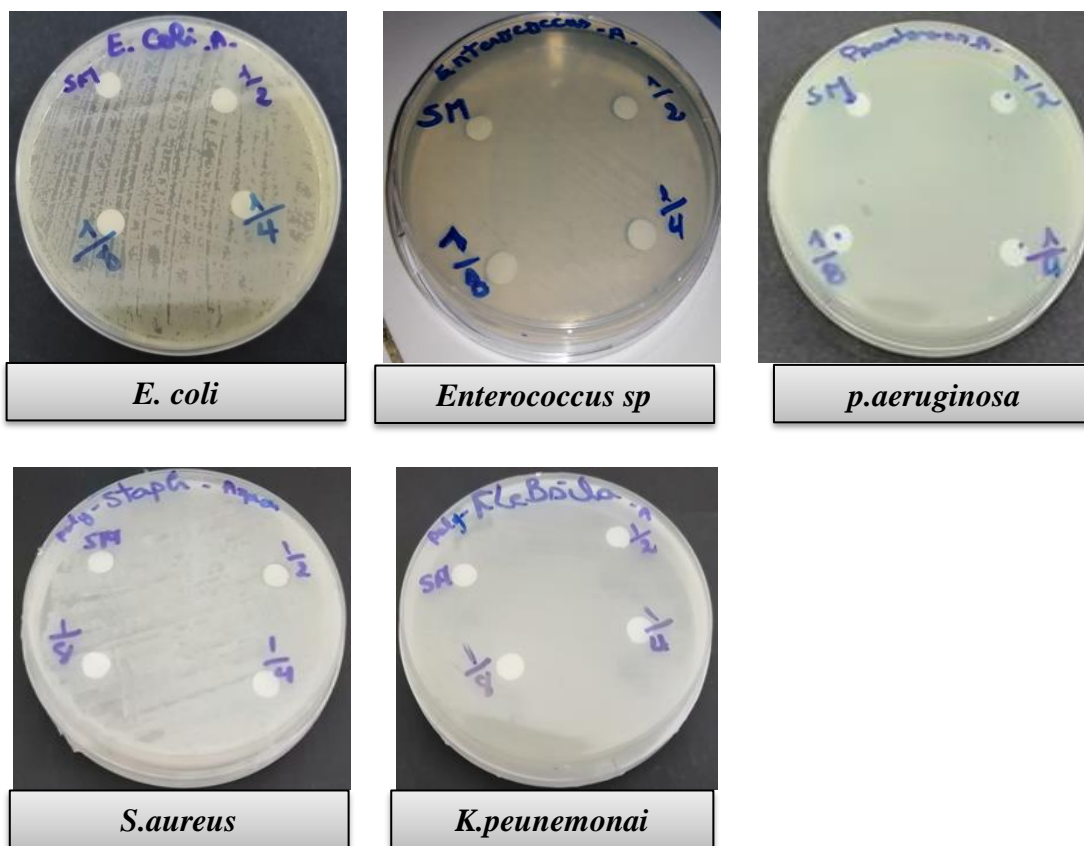


Figure 29 : Effet de polyphénol de l'extrait aqueux sur les bactéries étudiées (photo personnelle, 2019).

Les résultats de l'activité antibactérienne de polyphénol de l'extrait méthanolique montrent qu'il n'y a aucune zone d'inhibition autour des disques des souches testées. Ils sont représentés dans la figure suivante :

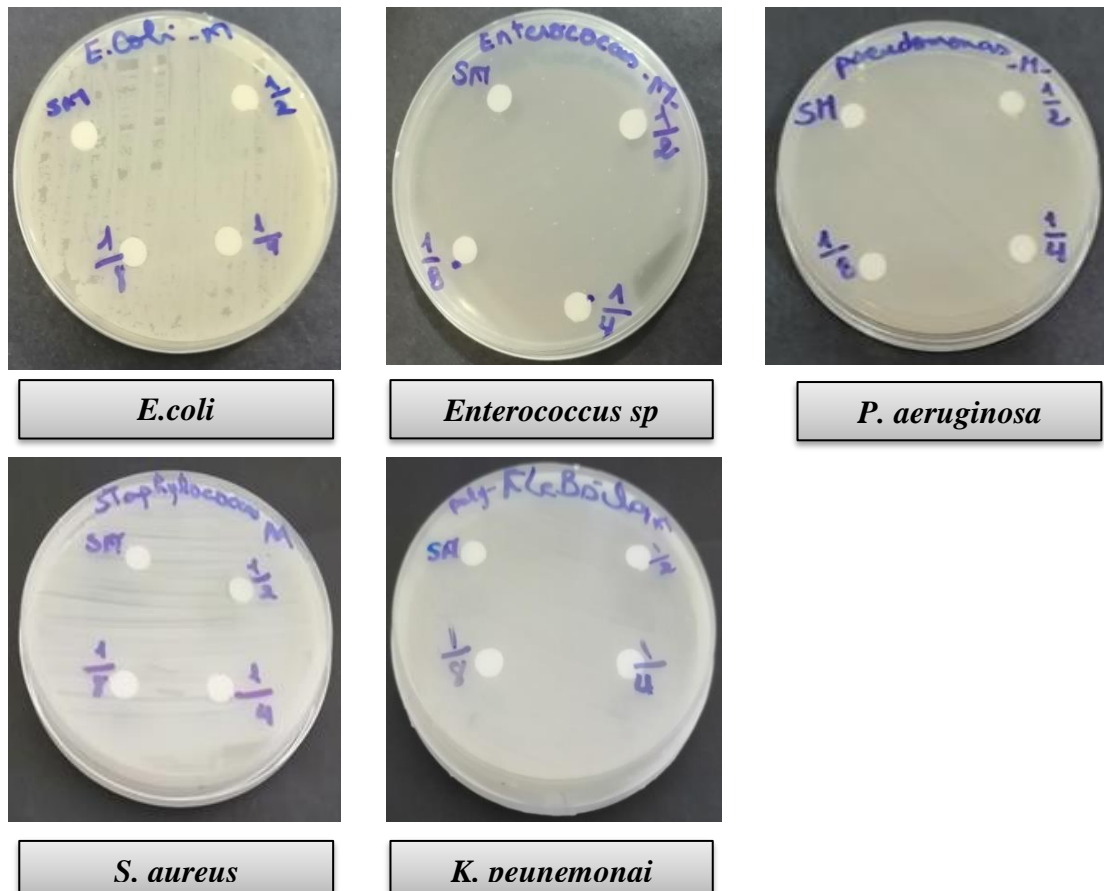


Figure 30 : Effet de polyphénol de l'extrait méthanolique sur les bactéries étudiées (photo personnelle, 2019).

6.2.3. Effet des différentes dilutions des huiles fixes sur les souches testées

Les concentrations minimales inhibitrices obtenues par les dilutions des huiles fixes des graines de lin sont représentées dans le tableau 21.

Tableau 21: les valeurs des CMI des huiles fixes.

| CMI μ l/ μ l | HFC | | | HFE | | | HFP | | |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 500 | 250 | 125 | 500 | 250 | 125 | 500 | 250 | 125 |
| Bactérie | | | | | | | | | |
| <i>E.coli</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| <i>Enterococcus sp</i> | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <i>P. aeruginosa</i> | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <i>K. peunemonai</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

On considère que l'ensemble de ces résultats, les huiles à chloroforme et à l'éthanol sont beaucoup plus actives contre les bactéries testées que les huiles de pressage.

Les huiles fixes de chloroforme (HFC) est active contre *E coli* avec des zones d'inhibition varient entre 15mm ,19mm et 14mm pour les déférentes CMI 500 μ l / μ l, 250 μ l / μ l, et 125 μ l / μ l respectivement.

P.aeruginosa est révélée résistante à l'HF et *S.aureus* a enregistré des zones d'inhibitions égales à 10 mm, 9 mm et 10 mm en ordre avec la gamme de concentration. En fin, l'HF a donné des effets inhibiteurs déférents de l'ordre de 14 mm, 9 mm et 15 mm pour *K.peunoumeniae*.

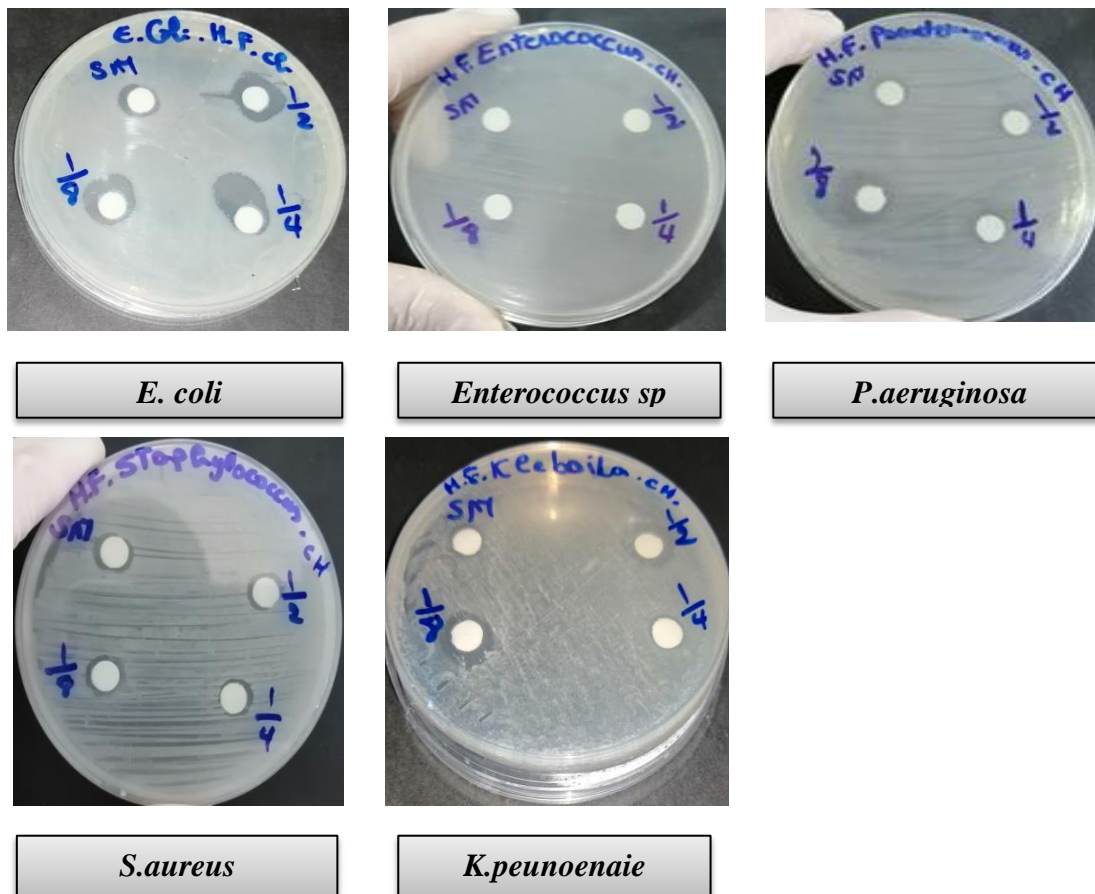


Figure 31 : Effet des huiles fixes de chloroforme sur les bactéries étudiées (photo personnelle, 2019).

D'après les résultats obtenus nous soulignons que les CMI de l'HFE présentent un effet sur les bactéries testées (figure 31). Il s'est avéré active contre *E. Coli*, *Enterococcus sp*, *P. aeruginos*, *S. aureus* et *K.Pneumoniae* dans la dilution 50% (CMI 500 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$) avec des zones d'inhibition de 12mm, 12mm, 16mm, 12mm et 13mm respectivement. Dans la dilution 25% (CMI 250 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$) on observe l'absence de la croissance des bactéries donc l'HFE a montré un effet inhibiteur sur ces bactéries avec un diamètre de zone d'inhibition de 13mm, 12mm, 13mm, 11mm et 07mm respectivement.

L'absence de la croissance des cinq bactéries dans la dilution 12,5% (CMI125 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$) confirme la présence d'un effet antibactérienne de HFE sur cette souche avec des diamètres de zones d'inhibition de 11mm, 12mm, 13mm, 09mm et 13.5mm respectivement.

La plus grande zone d'inhibition (14mm de diamètre) est enregistrée avec *P. aeruginos* dans la concentration 500 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$.

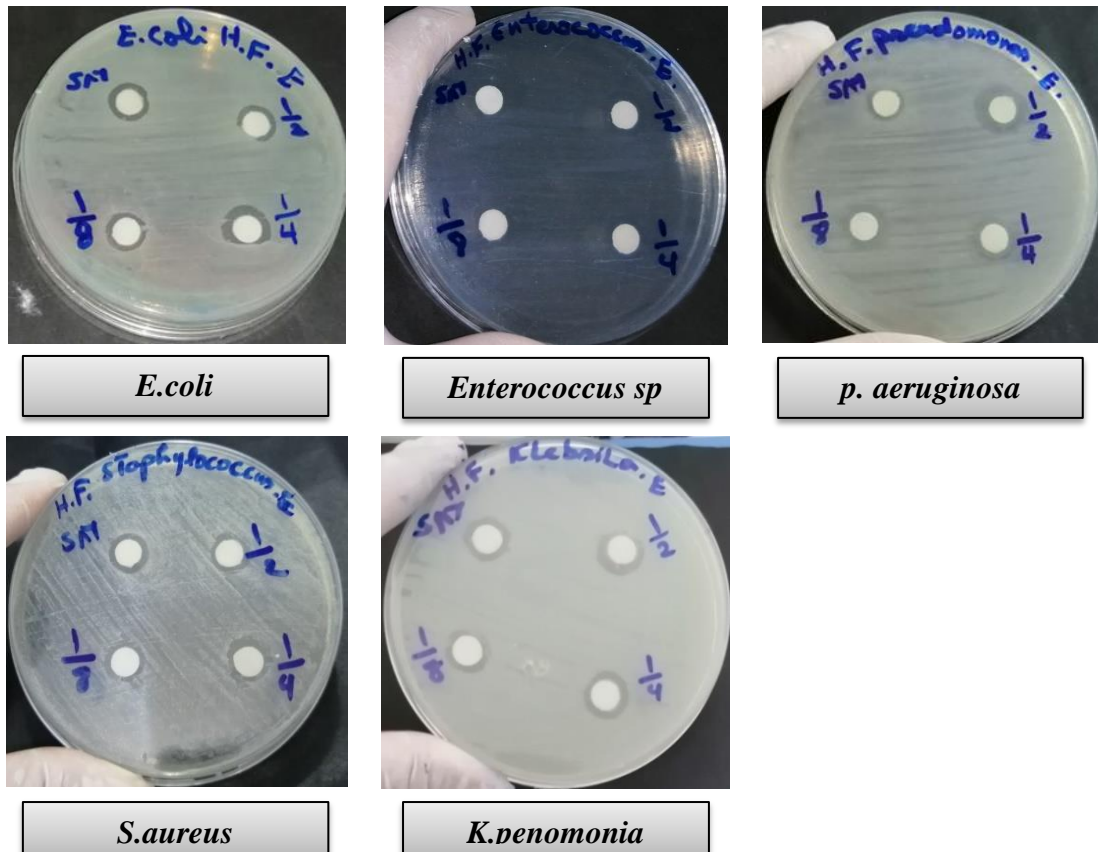


Figure 32 : Effet des huiles fixes d'éthanol sur les bactéries étudiées (photo personnelle, 2019).

L'huile fixe de pressage et quelque soit la dose sont révélés inactive sur les souches *Enterococcus sp*, *P. aeruginosa*, et *S. aureus*.

De même l'huile de pressage montre une activité anti *K. pneumoniae* et *E. coli* dans les dilutions (500 μl / μl et 250 μl / μl). Cela confirme que l'HFP a une activité vis-à-vis de ces bactéries avec un diamètre de zone d'inhibition de 9mm, 7mm et 8mm respectivement, mais cette activité est disparu avec la dose 125 μl / μl .

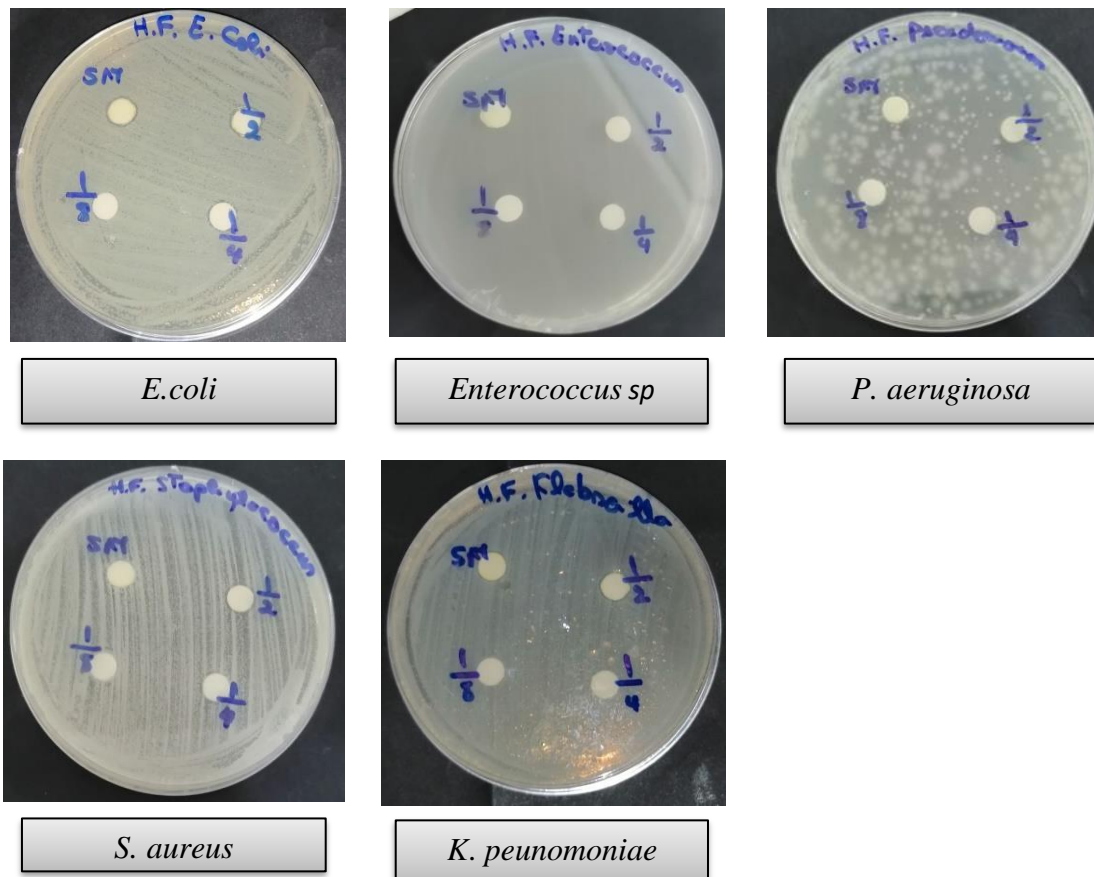


Figure 33 : Effet des huiles fixes de pressage sur les bactéries étudiées (photo personnelle, 2019).

6.3. Discussion

L'activité antibactérienne est réalisée dans ce travail par la méthode des disques ainsi que par la détermination des CMI, elle révèle que le polyphénol de lin n'avait aucun effet vis-à-vis des souches bactériennes cibles, ce qui est probablement due à la faible concentration de polyphénols testés. Tandis que les HFC et HFE ont enregistré un important effet anti bactérien vis-à-vis des souches testées. Alors que les HFP sont avérés moins active.

L'activité antibactérienne des deux extraits phénoliques et des trois types des huiles fixes sur les souches bactériennes qui montrent que le pouvoir antibactérien des différents extraits est faible par rapport à l'activité, généralement enregistrées avec les antibiotiques sur ces mêmes souches.

Une étude récente sur l'activité antibactérienne d'HF de *L. usitatissimum* a montré des résultats positifs exprimés par une grande zone d'inhibition de 15,83mm et de 19,66mm à l'égard de *S. aureus* ATCC29737 et ITCC8531 respectivement. Cette étude a également montré une

bonne activité antibactérienne vis-à-vis d'*E.coli* (ATCC 8739) (Chytilova *et al.*, 2013). Ceci est supérieur par rapport à nos résultats obtenus par les HFC et HFE à l'encontre de *S. aureus* et *E. coli*.

Une autre étude a aussi montré que l'huile de lin était douée d'une activité anti microbienne contre plusieurs micro-organismes ; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis* (Kaithwas *et al.*, 2011).

Nos résultats concernant l'activité anti bactérienne restent faible comparativement au ceux obtenus par plusieurs chercheurs travaillant sur les HFS et le polyphénol de Lu.

7. Activité anticoagulante

L'activité anticoagulante des polyphénols et des huiles fixes des grains de (Lu) a été évaluée in vitro vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide des deux tests chronométriques généraux qui explorent la coagulation d'une manière non spécifique, le TCK et le TQ respectivement.

7.1. Résultats

7.1.1. La voie endogène (TCK)

L'évaluation de la capacité anticoagulante des deux extraits phénoliques et des trois huiles fixes de (Lu) vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation a été réalisée à l'aide du test de temps de céphaline kaolin (TCK) et la voie commune (facteur X, V, II, fibrinogène) de la coagulation avec un temps de coagulation (TCK) allongé par rapport à un témoin de TCK de 28,3S.

7.1.1.1. Le polyphénol

Les résultats de l'activité anticoagulante vis-à-vis à la voie endogène des extraits phénolique (méthanoliques et aqueux) de (Lu) sont représenté dans la figure 34:

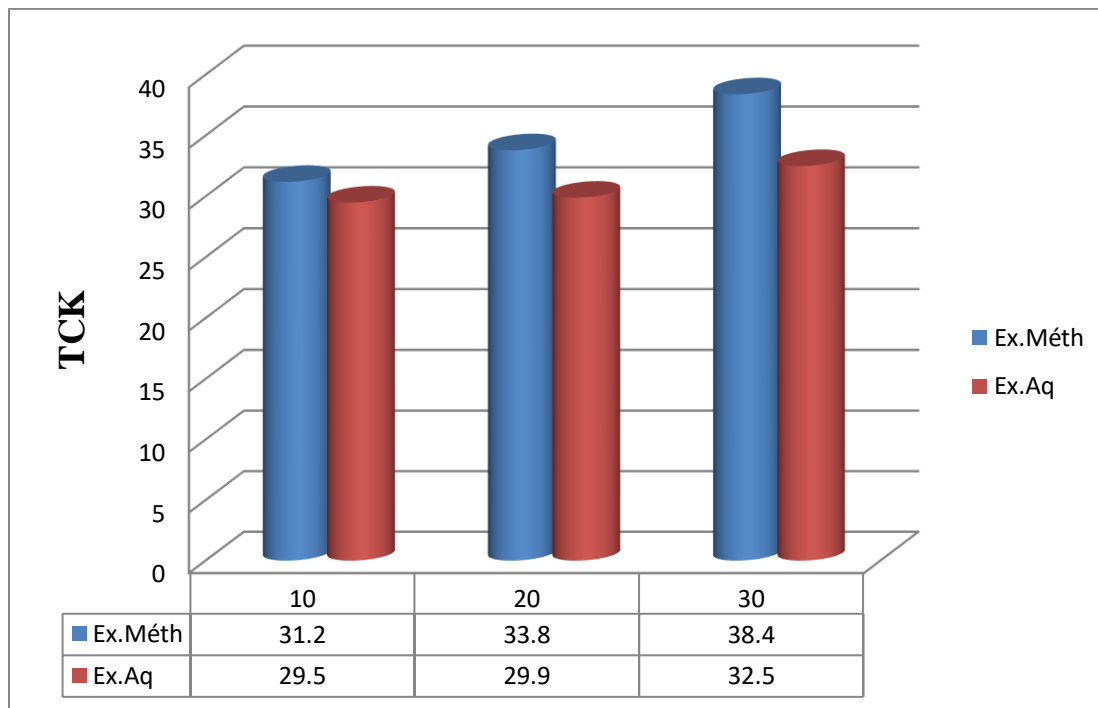


Figure 34 : Capacité anticoagulante des extraits méthanoliques et aqueux de (Lu) vis-à-vis de la voie endogène.

A la lumière des résultats obtenus, il ressort que les deux extraits méthanoliques et aqueux de (Lu) exercent une activité anticoagulante positivement corrélée avec le volume de l'extrait vis-à-vis de la voie endogène (figure 34).

Le volume 10 μ L est capable d'exercer une activité anticoagulante estimée par un TCK de 31,2 S par un allongement de 2,9 S pour l'extrait méthanolique et un TCK de 29,5 S avec allongement de 1,2 S pour l'extrait aqueux.

Alors que le volume 20 μ L des deux extraits méthanolique et aqueux de (Lu) a une activité anticoagulante estimée par un TCK de 33,8 S par un allongement de 5,5 S et un TCK de 29,9 S par un allongement de 1,6 S respectivement.

Le volume 30 μ L des extraits phénolique de (Lu) a allonger le temps de coagulation avec des valeurs d'ordre de 10,1 S avec un TCK de 32,5 S pour l'extrait méthanolique et 4,2 S avec un TCK de 32,5 S pour l'extrait aqueux.

7.1.1.2. Les huiles fixes

Les résultats de l'activité anticoagulante vis-à-vis à la voie endogène des huiles fixes obtenues extraites par chloroforme, éthanol et par pressage de (Lu) sont représentés dans la figure 35 :

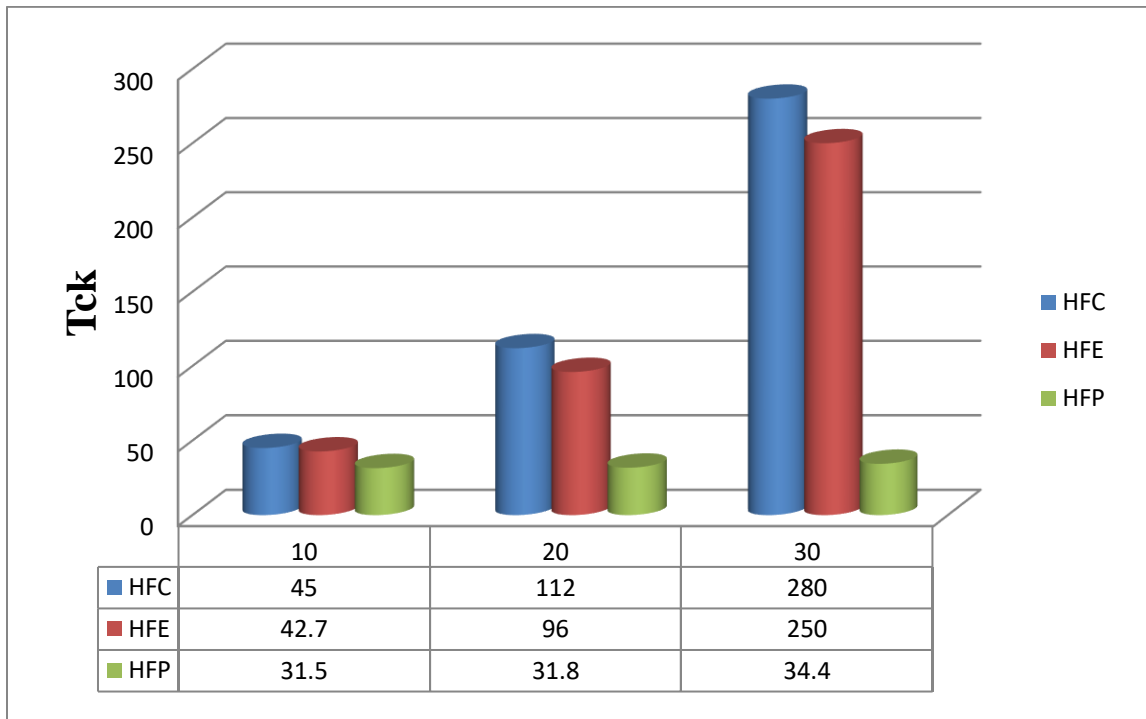


Figure 35 : Capacité anticoagulante des huiles fixes de (Lu) vis-à-vis de la voie endogène.

D'après les résultats obtenus, il apparaît clairement que les trois types d'huiles fixes obtenues de chloroforme, d'éthanol et celle de pressage de (Lu) exercent une activité anticoagulante dépendante avec le volume de l'extrait vis-à-vis de la voie endogène.

Pour les différents volumes (10 ; 20 ; 30 µL) des huiles fixes de (Lu), il ressort que le volume 10 µL est capable d'exercer une activité anticoagulante estimée par un TCK de 45 S par un allongement de 16,7 S pour les huiles fixes de chloroforme, un TCK de 42,7 S avec allongement de 14,4 S pour les huiles fixes d'éthanol et un TCK de 31,5 S avec allongement de 3,2 S pour les huiles fixes de pressage.

Par ailleurs le volume 20 µL des huiles fixes de chloroforme, d'éthanol et de pressage ont enregistré respectivement des activités anticoagulantes importantes estimées par un TCK de 112

S par un allongement de 83,7 S, un TCK de 96 S par un allongement de 67,7 S et un TCK de 31,8 S par un allongement de 3,5 S.

Enfin, le volume 30 μ L des huiles fixes de chloroforme, d'éthanol et celles obtenues par pressage ont allongé le temps de coagulation avec des valeurs d'ordre de 251,7 S avec un TCK de 280 S (incoagulable), 221,7 S avec un TCK de 250 S (incoagulable) et 6,1 S avec un TCK de 34,4 S respectivement (Figure 35).

7.1.2. La voie exogène (TQ)

Le temps de Quick (TQ) ou le taux de prothrombine (TP) est le test qui permet d'explorer globalement la voie exogène de la coagulation où le facteur tissulaire est le déclencheur de cette voie.

Dans le but de rechercher un allongement au niveau du temps de coagulation qui se définit par une activité anticoagulante des polyphénols et des huiles fixes de (Lu) vis-à-vis de la cascade de cette voie. Un temps de coagulation (TQ ou TP) estimé par rapport à un témoin de TQ de 13,5S.

7.1.2.1. Le polyphénol

Les résultats de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène des extraits aqueux et méthanoliques de polyphénol de (Lu) sont représentés dans la figure 36:

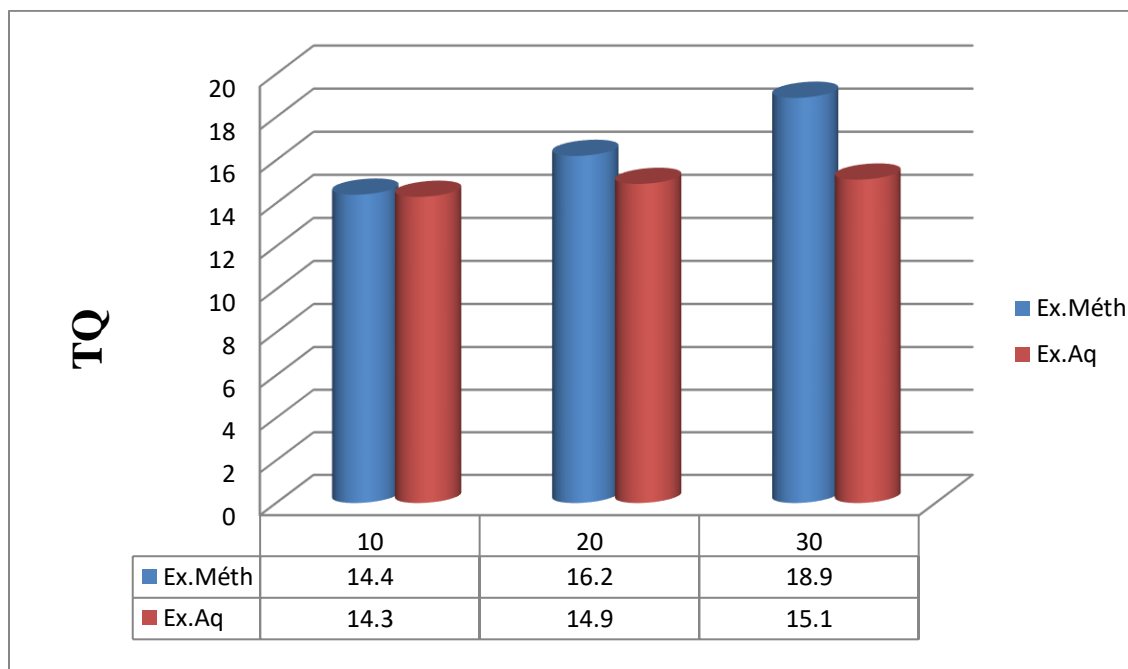


Figure 36 : Capacité anticoagulante des polyphénols vis-à-vis de la voie exogène.

Le volume 10 µL des deux extraits méthanoliques et aqueux de (Lu) sont capables d’allonger le temps de quick avec des valeurs d’ordre de (0.9 S et de 0.8 S) avec un TQ de 14.4 S et de 14.3 S respectivement, cela nous a permis de déduire que il n y a pas de différence significative entre le temps de coagulation de témoin et celui des deux extraits phénoliques.

Le volume 20 µL est capable d’exercer une activité anticoagulante sur la voie exogène de la coagulation, estimée par TQ de 16.2 S avec un allongement de 2.7 S pour l’extrait méthanolique et un TQ de 14.9 S avec un allongement de 1.4 S pour l’extrait aqueux.

Alors que le volume 30 µL des deux extraits de (Lu) présentent un TQ de 18.9 S avec allongement de 5.4 S pour l’extrait méthanolique et un TQ de 15,1 S avec allongement de 1.6 S pour l’extrait aqueux (figure 36).

7.1.2.2. Les huiles fixes

Les résultats de l’activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène des huiles fixes de chloroforme, d’éthanol et de pressage de (Lu) sont représentés dans la figure 37:

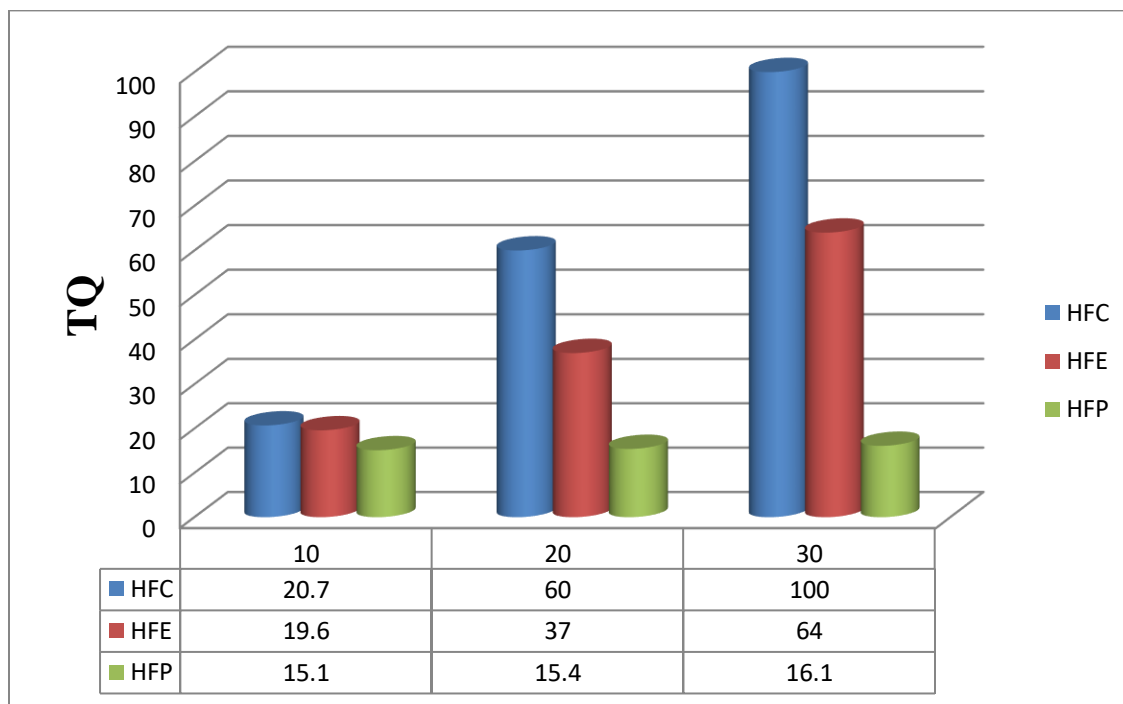


Figure 37 : Capacité anticoagulante de différents extraits de TV vis-à-vis de la voie Exogène.

Le volume 10 µL présente une activité anticoagulante très importante qui est enregistrée avec les huiles fixes de chloroforme d’un TQ de 20,7 S avec allongement de temps de quick de

7,2 S, suivi par un TQ d'HF d'éthanol qui est de 19,6 S avec allongement de temps de quick de 6,1 S, tandis que l' HF de pressage donne une valeur de TQ moins importante à l'ordre de 15,1 S et avec un allongement de 1,6 S.

Le volume 20 µL des huiles fixes de (Lu) exerce un effet anticoagulant vis-à-vis de la voie exogène estimé par des valeurs de TQ de 60 S avec un allongement de 46,5 S pour l' HF de chloroforme, un TQ de 37 S avec un allongement de 23,5 S pour l'HF d'éthanol et un TQ de 15,4 S avec un allongement de 1,9 S pour l' HF de pressage.

Enfin et avec le volume 30 µL il ressort qu'il possède un effet anticoagulant vis-à-vis de la voie exogène avec des TQ de 100 S d'un allongement de 86,5 S pour l' HF de chloroforme, un TQ de 64 S d'un allongement 50,5 S pour l' HF d'éthanol et enfin un TQ de 16,1 S avec un allongement de 2,6 S pour l' huile de pressage.

La plus importante activité anticoagulante observée lors du test TCK et TP est celle obtenue par les huiles fixes de chloroforme et d'éthanol et suivi par une activité moins importante enregistrée avec les extraits phénoliques méthanoliques et aqueux, tandis que les huiles fixes par pressage ont enregistré la plus faible activité anticoagulante (figure 37).

7.2. Discussion

Malgré qu'il existe plusieurs projets de recherche axés sur l'activité anticoagulante de divers extrait végétaux, cette activité n'a pas été étudiée pour les extraits phénoliques et les huiles fixes des grains de Lin de ce fait le sujet de ce mémoire est considéré comme étant le premier de son genre qui s'inscrit dans le cadre des études intéressées à la prévention et la thérapie des maladies thrombotiques et cela par la recherche d'une éventuelle activité anticoagulante des polyphénols et des huiles fixes de *linum ussitatissimum* L.

Les résultats obtenus dans notre étude montrent que les polyphénols et les huiles fixes de Lu sont capables d'allonger le temps de coagulation, ces résultats s'accordent avec les autres travaux réalisés sur différentes plantes médicinales parmi lesquelles :

Des études récentes réalisées par **Lemaoui (2011)** concernant l'évaluation de l'activité anticoagulante in vitro des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa* L. ont montré que ces huiles riches en polyphénols peuvent provoquer un prolongement au niveau du temps de coagulation ; ces études s'accordent avec notre résultat qui prouve les extraits contiennent du polyphénol.

Selon **Sakthipriya et Vidhya, (2015)** *Pergulariadeamia* présente une bonne activité anticoagulante peut être attribuée par la présence des tanins, des alcaloïdes et d'autres composés actifs, ces études confirment notre résultat vu de la richesse de notre plante en alcaloïde et en tanins.

En fin, il faut signaler également qu'ils existent d'autres composés doués aussi de cette activité, tels que les peptides (**Mieszczanek et al., 2004**), les glycoprotéines, les coumarines (**Zhou et al., 2009**), quelques tanins (**Bae, 2011**) et les polysaccharides (**Youmbai, 2015**). De ce fait ces études donnent espoir pour le développement des suppléments alimentaires qui contribuent à la prévention des thromboses.

Conclusion

Conclusion et perspectives

Ces dernières années, les plantes médicinales sont devenues un sujet de choix pour les chercheurs au niveau de nombreux laboratoires à travers le monde. Le grand intérêt donné à ces plantes revient en fait à leur richesse en composés naturels bioactifs d'une part et le besoin de chercher un moyen thérapeutique plus doux qui constituera un alternatif aux molécules de synthèse d'une autre part.

L'activité biologique autour de laquelle s'est articulé ce présent travail concerne le pouvoir antioxydant, antibactérien et anti coagulant des extraits phénoliques et des huiles fixes des graines de lin utilisées en médecine traditionnelle.

Après une analyse qualitative des extraits, réalisée par criblage phytochimique, il s'est avéré que les graines de *Linum usitatissimum* L. renferment plusieurs familles de composés naturels comme les flavonoïdes, les stérols et les tris terpènes, les polyphénols, les composés réducteurs et les tanins. Ces substances sont généralement responsables de certaines activités biologiques des extraits des plantes médicinales.

La macération des graines de lin dans le méthanol et dans l'eau a donné des rendements variables en extrait sec. Un faible rendement est obtenu par extraction dans l'eau, par contre le celui de méthanol est s'avéré plus élevé.

Concernant le rendement en huile, il varie selon la méthode et le solvant utilisé pour l'extraction. Le rendement obtenu par chloroforme est plus élevé que celui de l'huile extraite par pressage et par extraction éthanolique.

La détermination quantitative des composés phénoliques de nos extraits méthanolique et aqueux chez l'espèce étudiée a bien montré que leur graines contiennent une faible teneur en polyphénols totaux.

L'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols et des huiles fixes de l'espèce étudiée a été effectuée par la méthode du DPPH, montre que ces extraits possèdent une activité antioxydante modérée. Les valeurs EC50 du test DPPH ont révélé que huile d'éthanol possède plus d'activité réductrice du radical que des autres extraits.

S'agissant de l'activité antibactérienne des deux extraits phénoliques et des trois types des huiles fixes, celle-ci a été réalisée sur cinq souches bactériennes d'origine clinique : (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus sp*, *S. aureus* et *E. coli*).

Les extraits phénoliques, n'ont exprimé aucune activité contre les bactéries testées par contre les huiles fixes de chloroforme et d'éthanol ont exercé un effet inhibiteur, bien que modéré, vis-à-vis de toutes les souches bactériennes étudiées.

Quelques bactéries ont enregistré une grande résistance vis-à-vis des huiles de pressage; il s'agit de *P. aeruginosa*, *Enterococcus sp* et *S. aureus*.

L'étude du pouvoir anticoagulant des extraits phénoliques et des huiles fixes des graines de *Linum usitatissimum* L. a été évaluée in vitro vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TQ et le TCK respectivement. Cette étude démontre que ces extraits exercent une activité anticoagulante importante pour les deux voies de coagulation mais elle est plus observée dans la voie exogène que dans la voie endogène de la coagulation.

Le lin est une plante médicinale riche en métabolites actifs. Une exploitation de ses propriétés pharmacologiques s'impose sur une recherche approfondie de ses principes actifs.

A cet effet, il est souhaité de :

- Approfondir l'analyse chromatographique pour isoler et identifier les molécules actives de cette plante.
- Compléter l'étude in vivo pour l'évaluation de l'activité antioxydante et anticoagulante des extraits phénoliques de Lu.
- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles qui peuvent répondre aux problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments de synthèses.

Références bibliographiques

A

Acket S. (2015). Implication du métabolisme carboné pour une production différentielle d'huile chez les plantes oléagineuses-Lin : modélisation des systèmes. Thèse de doctorat, Université de Technologie, Compiègne.

ALachaher Fatima Zohra. (2018). Effet de la supplémentation des grains brunes de lin sur le profil lipidique et les statuts redox et inflammatoire, chez les rats rendus diabétique par streptozotocine. Thèse de Doctorat, Université d'Ahmed Benbella, Oran, Alger.

Ammar R. B., Bhourri W., Sghaier M. B., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlel L., Kilani S., Mariotte A. M., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M. G. D. and Ghedira K. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chem*; 116: 258-264.

Atefeibu E.S.I. (2002). Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne d'*Acacia Nilotica* Var *Andesonii*. Thèse de doctorat, Université cheikh AntaDiop de Dakar. 33p.

Athukorala Y., Lee K W., Kim SK., JeonY.J. (2007). Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology*. 98 : 1711-1716.

Avril J. L., Dabernat H., Denis, F., Monteil, H. (1992). BACTERIOLOGIE CLINIQUE. 2ème édition, 7p.

B

Bae J. (2011). Antithrombotic and profibrinolytic activities of phloroglucinol. *Food and Chemical Toxicology*, 49 : 1572-1577.

Bahorun T. (1997). Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural resarchcouncil, Réduit, Mauritius*. p. 83-94.

Balentine C. W., Crandall P. G., O'Bryan C. A., Duong D. Q., Pohlman F. W. (2006). Thepre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*.73: 413-421.

- Batty P. E. T., Smith G. (2010).** Anticoagulation. *Surgery*, 28 (6): 243-247.
- Beddou F. (2015).** Étude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillearadiata* Coss. & Dur. Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie.
- Békro Y.A., Békroj A. M., Bouab. B., Trab F. H. and Ehilé E. E. (2007).** Etude Ethnobotanique et Screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana*. (Bai) Herend et Zarucchi (caesalpinaceae). *Rev. Sci. Nat*, 4 (2) : p. 217-225.
- Belluzzi A. (2002).** Fatty acids for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Proceedings Nutrition Society*, 61(3) : 391-395.
- Bouras F., Houchi A. (2013).** Etude de l'activité antioxydant de la plante *Rumex Vesicarius* L. Mémoire master académique, 28p.
- Bloedon L.T., Szapary P.O. (2004).** Flaxseed and cardiovascular risk. *Nutrition Review*. 62(1) : 18-27.
- Boisseau M. R. (1996).** Données actuelles sur l'hémostase. *Phlébologie*, 42 (2) : 175-186.
- Boizot N., Charpentier J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, INRA p.79-82.
- Bossokpi I. P. L. (2003).** Etude des activités biologiques de *fagarazanthoxyloides* Lam (Rutaceae). Thèse doctorat, Université de Bamako, p. 8-10.
- Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie phytochimie des plantes médicinales. 2^{ème}Ed. Paris ; Tec & Doc Lavoisier, P. 207-211.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie phytochimie des plantes médicinales. 3^{ème}Ed. Paris ; Tec & Doc Lavoisier, P. 207-211.
- Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie phytochimie des plantes médicinales. 4^{ème}Ed. Paris ; Tec & Doc Lavoisier, P. 207-211.
- Butenaset S., Mann K. G., (2002).** *Biochemistry (Moscow)*, 67(1), p. 3-12

C

- Cambus JP, (2002).** Physiologie de l'hémostase, p. 2-3.
- Caquet R. (2004).** 250 Examens de laboratoire : prescription et interprétation (9ème Ed. Masson (Paris); p. 388-389.
- Casa R., Russell G., Cascio B. L., Rossini F. (1999).** Environmental effects on linseed (*Linum usitatissimum*L.) yield and growth of flax at different stand densities. *European journal of agronomy*, 11(3) : 267-278.
- Catier O. and Roux D. (2007).** Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie: Cahiers du préparateur en pharmacie. 3ème Ed. France, Wolters Kluwer.
- Chambers H. F. (1997).** Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10 : 781-791.
- CHETLEY A. (2000).** Médicament à problèmes. Paris : édition. ReMed, 405p.
- Chytilova M., Mudron'ova D., Nemcova R., Gancarc'ikova S., Buleca. V, Koš'ova. J, Tkac'ikova. L'. (2013).** Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of flax-seed oil and *Lactobacillus plantarum*–BiocenoI™ LP96 in gnotobiotic pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. Department of Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovak Republ Research in Veterinary Science, 95: 103-109.
- Collin S. and Crouzet J. (2011).** Polyphénols et procédés: Transformation des poly phénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Paris, Tec & Doc Lavoisier.
- Coskuner Y., Karababa E. (2007).** Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Food Engineering*, 78, 3, p. 1067-1073.

D

- Dacosta Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs : 669 référencés bibliographiques. Edition. Yves Dacosta, Paris, 317p.
- DALLARAS C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris. 654p.

- Daun J., Barthet V., Chornick T., Duguid S. (2003)** Structure, composition, and variety development of flaxseed. dans: *Flaxseed in Human Nutrition*, Second Edition. Eds Thompson, L. U. and Cunnane, S. C., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, p. 1-40.
- De Catarina R., Husted S., Walentin L., Andreotti F., Arnesen H., Bachman F. Baigent C., Hubert K., Jespersen J., Kristensen SD., Goy HL., Morais J. Rasmussen LH., Siegbahn A., Verheugt FWA., Weitz JI. (2012)**. General Mechanism of coagulation and targets of anticoagulant. *ThrombHaemos*, p. 569-579.
- Diallo A. (2005)**. Étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat, Mali.
- Diederichsen A., Richards K. (2003)**. Cultivated flax and the genus *Linum* L. *Flax: the genus Linum*, p.32-38.
- Dohou N., Yani K., Thahrouch S., Idrissi Hassani L. M., Badoc A., Gmira N. (2003)**. Screening phytochimique d'une endémique ibéro-Marocaine, *Thynelaealythroïdes*. *Bull.Soc, Pharm. Bordeaux*. 142: 61-78.
- Dybing C. D., Lay C. (1981)**. Flax *Linum usitatissimum*. dans: *CRC handbook of biosolar resources*. Eds McClure, T. A., Lipinsky, E.S., CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, II. Resource materials, p. 71-85

E

- Ebrahimi NS., Hadian J., Mirjalili MH., Sonboli A., Youcef Zadi M. (2008)**. Essential oil composition and antimicrobial activity of *thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*. 110: 927-931
- El Abdali Youness. (2017)**. Caractérisation phytochimique et activité antioxydante et immunostimulante de *Lavandula dentata* et *Linum usitatissimum*. Mémoire de Master, Université Sidi Mohamed ben Abdellah, Alger.
- Elicoh-Middleton J. R., Chithan K. and Theoharis C. (2000)**. Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, 4(52): 673-751.
- Erlund I. (2004)**. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24 : 851-874.

F

- FAOSTAT** (page mise à jour le 7 janvier 2008) Base de données statistique de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture <http://faostat.fao.org/>.
- FAO (2012)**. Guide pratique - Stockage et conservation des grains à la ferme. Site consulté le 13 mars 2012, www.fao.org/Wairdocs/X5163F/X5163f02.htm
- Fauchère JL., Avril JL. (2002)**. Bactériologie générale et médicale. Ed., Ellipse. p. 213-281.
- Favier A. (2006)**. Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6) : 390-396.
- Freeman T. P. (1995)**. Structure of flaxseed. *Dans: Flaxseed in human nutrition*. Cunnane S. C., Thompson L. U. eds., AOCS Press, Champaign, USA, pp.

G

- Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A. (2010)**. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15: 8813-8826.
- Gangouépiéboji J. (2007)**. Caractérisation des bêta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat, Liège.
- Ghazi F., Sahraoui S. (2005)**. Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes Tantboucht et Hamraia, mémoire d'ingénieur en agronomie, El Harrach.
- Girardel J. M. et Samama C. M. (2006)**. Les nouveaux anti thrombotiques: une Thérapeutique en mutation, des perspectives d'avenir New anticoagulant agents: the presentand the future. *Réanimation*, 15, p. 117-123.
- Girondon E., Ganzengel C., Ghanem N., Gossen M. (1995)**. Aspect moléculaire des Hémophilies, Encyclopédie Médico-chirurgicale, Paris, France, Hématologie, F.a 13. 021-B -10, 8p.

H

- Hall C. I., Tulbek M. C., Xu., Y. (2006).** Flaxseed. *Advances in Food and Nutrition Research*, 51, p. 1-97.
- Halliwell B, Gutteridge J. M. C. (1999).** *Free radicals in biology and medicine*, Oxford, UK.
- Hayes A. J. et Markovic B. (2002).** Toxicity of australian essential oil *Backhousia Citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food Chem Toxicol.*40: 535-543.
- Hopkins W. G. (2003).** Physiologie végétale. Ed. De Boeck Université, Bruxelles, 514p.
- Huang D., Ou B, Prior R. L. (2005).** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856.

I

- Irshad, M., Aziz, S., ur-Rehman, H., Shahid, M., Naeem Ahmed, M., Minhas, F. Ribéreau-Garyon. P. (2012).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris, 254p.

J

- Julien K. (2013).** Les huiles végétales c'est malin. Leduc.s Éditions, 22 août 2013 – 256 pages. p.13, 19, 20, 21, 35.

K

- Kasote D. M. (2013).** Flaxseed phenolic as natural antioxidants. *Int Food Res Journal.* 20: 27-34.
- Karleskind A. (1992).** Détermination des caractéristiques physiques. dans: Manuel des corps gras. Karleskind A. ed., Lavoisier Tec & Doc, Paris, France, vol. 2, p. 1290-1311.
- Kaithwas G., Mukerjee A., Kumar P., Majumdar D. K. (2011).** *Linum usitatissimum* (linseed/flaxseed) fixed oil: antimicrobial activity and efficacy in bovine mastitis. *Inflammo Pharmacology.* 19: 45-52.

Koffi N et al., (2009). In vitro antibacterial activity of som plant essential oils. *Jornal of complementary and alternative medicine*. Vol. (9): 6-39.

Krisa S., WaffoTeguo P., Decendit A., Deffieux G., Huguet F., Fauconneau B. and Mérillon JM. (1997). Production, purification et activité biologique des picéides (stilbènes) extraits de cultures cellulaires de *vitisvinifera* L. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 136 : 7-18.

L

Labalette F., Landé N., Wagner D., Roux-Duparque M., Saillet E. (2011). La filière lin oléagineux française : panorama et perspectives. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 18(3) : 113-122

Lay C. L. and C. D. Dybing. (1989). Linseed. 416p - 430 In: *Oil Crops of the World* edited by G. Röbbelen, R. K. Downey and A. Ashri. McGraw-Hill, New York.

Lemaoui A. (2011). Activités antioxydants et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigellasativa*.L Algérienne. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister en Biochimie, Université Ferhat Abbas, Sétif. 72p.

Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J., Lee C. Y., (2003). Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Fo of chemistry*, 51: 7292-7295.

Lhuillier A. (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauriasalicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauriapolyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissatrichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embeliaconcinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat, Toulouse.

Li H. B., Cheng K. W., Wong C. C., Fan K. W., chen F., Tian Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102, p.771-776.

Lisu W., Jui-Hung Y., Hsiao-Ling L, Ming-Jiuan W. (2003). Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbonucifeca* Gertn). *Journal of food and drug analysis*, 11(1): 60-66.

M

- Marambe, P., Shand, P. J., & Wanasundara, J. P. D. (2008).** An In-vitro Investigation of Selected Biological Activities of Hydrolysed Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Proteins. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85(12) : 1155-1164.
- MESSAOUDI A. (2017).** Contribution à l'étude de la qualité de l'huile de lin (*linum usitatissimum*) par des méthodes physico-chimique. Mémoire de Master, Université de Tlemcen ABOU BEKR BELKAID, Alger.
- Mieszczanek J., Harrison L. M., Vlasuk G. P., Cappello M. (2004).** Anticoagulant peptides from *Ancylostomacanthum* are immunologically distinct and localize to Separate structures within the adult hookworm. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 133: 319-323.
- Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat, Strasbourg.
- Miliauskas G., Venskutonis P. R., Van Beek TA. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*, 85: 231-237.
- Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P. M., Rice-Evans C. A. (1996).** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS letters*, 384(3): 240-242.
- Morikawa T., Xu F., Ninomiya K., Matsuda H., Yoshikawa M.(2004).** Nigellamines A3 , A4 A5 and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism- promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chem.Pharm.Bull*; 52(4):494-497.
- Mueller K., Eisner P., Yoshie-Stark. Y., Nakada R., Kirchhoff, E. (2010).** Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum*), *J. Food Eng.* 98: 453-460.
- Muir A. D., Neil D. (2003).** Flax the genus *linum* Westcott Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
- Muir A. D., and Westcott N. D. (2003).** Flax, The genus *Linum*. Taylor & Francis Group. Canada, p.22-25.

Muylaert A. et Mainil JG. (2012). Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Annales de Médecine Vétérinaire*. 156 : 109-123.

N

Najjaa H., Neffati M., Zouari., S. and Ammar E. (2007). Essential oil composition and Antibacterial activity of different extracts of *Allium roseum*L., a north African endemic species. *C. R. Chimie*, 10: 820-826.

Nesbitt P. D., Lam Y., and Thomposo L. U. (1999). Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed .*American journal of clinical nutrition*, 69:549-555.

Nicola M., et Daniel C. (1998). Activité technologiques en microbiologique-Téchniques de base et méthodologie. Editeurs CRDP D'aquitaine - Bordeaux, 152p.

O

O'kennedy R., Thornes R.D. (1997). Coumarins–Biology, Applications and Mode of Action, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, Eds, 315p.

Oloyede O. I. (2005). Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan journal of nutrition*, 4, p. 379-381.

Oomah B. D. (2001). Flaxseed as a functional food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, p. 889-894.

Oomah B. D., Mazza G. (1999). Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops. *Trends in Food Science & Technology*, 10 : 6-7, p. 193-198.

P

Philippon A. (1995). Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques. *Lett. Infectiol.* 10 : 619-630.

Pierce T. B., Maruf M. B. A., Razzuk L. A., Hoover S. J. (1999). A comprehensive review of the physiology of hemostasis and antithrombotic agents. *BUMC*, p. 39-49.

Prescott L., Harley J., Klein D. (2010). *Microbiologie* 3ème Ed., De Boeck. p. 520-582.

R

- Rapport L., Lockwood B. (2001).** Flaxseed and flaxseed oil. *The Pharmaceutical Journal*, 266, 3, p. 287-289.
- Ribéreau-Garyon. P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris, 254p.
- Rubilar M., Gutiérrez C., Verdugo M., Shene C., & Sineiro J. (2010).** Flaxseed as a source of functional ingredients. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10 (3): 373-377.

S

- Sakthipriya P. et Vidhya R. (2015).** Phytochemical and in-vitro thrombolytic Activity of *Pergulariadeamia* (forsk.) stem. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4 (5): 1325-1337
- Sarni-Manchado P. and Cheynier V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec & Doc, Paris, p. 2-10.
- Savoire R. (2008).** *Etude multi-échelles de la séparation solide-liquide dans la trituration du lin oléagineux*, Thèse de doctorat, Université de Technologie, Compiègne, 11p.
- Shan B., Cai Y. Z., Brooks J. D., Corke H. (2007).** The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J Food Microbiology*. 117: 112-119.
- Shim Y. Y., Gui B., Arnison P. G., Wang Y. et Reaney M. J. T. (2014).** Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature. *Trends Food sics Technol*. 38: 5-20.
- Sherazi T. (2012).** Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Skimmealaureolagrowing* wild in the state of Jammu and Kashmir. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6: 1680-1684.
- Solène J. (2012).** La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de diplôme d'état de docteur en pharmacie, Faculté de pharmacie, Université de Lorraine.

Stöckigt J., Sheludk Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H. and Stöckigt D. (2002). High performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography a*, 967 (1): 85-113.

Svoboda K. P., Hapson J. B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Ayr (Scotland), *Plant Biology Department*.

T

Tadros S. H., (1979). Pharmacognostical study of entrolobuimcyclocarpumgriseb growing in Egypt. Ph. D. thesis. Faculty of pharmacy. Cairouniversity. Florida state horticultural society. 426p.

Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. (2012). Introduction à la microbiologie 2ème édition, Ed., ERPI Science. p. 141-145.

Tresse E. et Evans W. C. (1987). Pharmacognosy Billiaire. Ed. Tindall, London, 13, p. 61-62.

Troufflard S., Roscher A., Thomasset B., Barbotin J. N., Rawsthorne S., Portais J. C. (2007). In vivo ¹³C NMR determines metabolic fluxes and steady state in linseed embryos. *Phytochemistry*, 68: 16-18, p. 2341-2350.

Tzang B. S., Yang S. F., Fu S. G., Yang H. C., Sun H. L., Chen Y. C. (2009). Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. *Food Chemistry*, 114: 1450-1455.

V

Vidal Dictionnaire. (2009). Editions Vidal, 3024p.

W

Warrand J. (2004). Etude structurale et propriétés en solution des polysaccharides constitutifs du mucilage de lin (*Linum usitatissimum*), Thèse de l'Université de Picardie Jules Verne, Amiens, 220p.

Weill P. et Mairesse G. (2010). Le lin, son huile, sa graine et notre santé *Article De synthèse. Phytothérapie* 8: 1–5.

Wegrzyn R. and Lamendinh H. (2005). Huiles essentielles et aromathérapie bucco-dentaire. *Le Chirurgien-dentiste de France*, 1225 : 62-66.

Y

Youbai A. (2015). Contribution à l'étude des polysaccharides hydrosolubles de quelques plantes de la famille des Apiaceae récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Algérien). Thèse magister, Université Kasdi Merbah. 38p.

Z

Zafar Javed Khan., Naeem Ahmad Khan., Imrana Naseem., Shahab A. A Nami. (2019). Exploration of physicochemical potential of *Linum usitatissimum* Linn (Tukhm-e-Katan). *Asian journal of pharmacy and pharmacology*. 5(3):551-558.

Zenk M. H., Juenger M. (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of Nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68, (22-24), 2757-2772.

Zhang H., Kong, B., Xiong Y. L., Sun X. (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. *Meat Science*. 81: 686-692.

Zhou H.Y., Hong J.L., Shu P., Juan Ni Y., Qin M. J. (2009). A new coumarin and Anticoagulant activity from *Viola yedoensis* Makino. *Fitoterapia*, 80: 283–285.

Annexes

Annexe I

1. L'appareillage



Spectrophotomèt



Bains Marie



Rota vapeur



Centrifugeuse



Plaque chauffant



Ph mètre



Bec bunsen



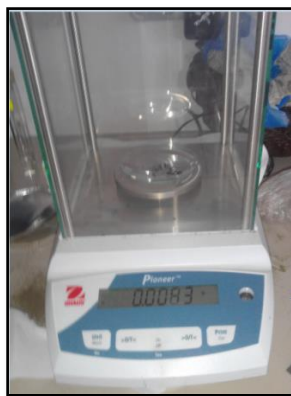
Autoclave



Vortex



Densitchek



Balance



Etuve

2. Les Verreries

Flacons ; bécher ; erlenmeyer ; entonnoir ; papier filtre ; barreau magnétique ; spatule ; pipettes ; portoirs ; verres à montre, micros pipettes, boites de pétri en verre ; tube à essai ; tubes secs à bouchons ; pince ; boîte de pétri.

3. Les produits chimiques

Méthanol ; éthanol ; chloroforme ; éther de pétrole ; acide gallique ; acide ascorbique ; folin-ciocaltau ; iodure de potassium ; iode ; acide chlorhydrique (HCL) ; hydroxyde d'ammonium ; l'éther diéthylique ; alcool chlorhydrique ; alcool iso-amylique ; chlorure ferrique (FeCL₃) ; liqueur de Fehling ; KOH ; NaOH ; NH₄OH ; H₂SO₄ ; NH₄OH ; anhydride acétique ; arbonate de sodium ; DPPH, DMSO ; céphaline kaolin ; chlorure de calcium ; thromboplastine calcique ; l'eau physiologie ; Muller-Hinton.

4. Composition des principaux Milieux de culture utilisés

• Milieux liquides

Eau physiologique stérile

| | |
|--------------------------------|-------|
| Chlorure de sodium (NaCL)..... | 0,9g |
| Eau distillée..... | 100ml |

• Milieux solides

Gélose Muller Hinton (MH)

| | |
|-----------------------------------|-----|
| Gélose Mueller Hinton poudre..... | 38g |
|-----------------------------------|-----|

Eau distillée..... 1L

PH =7.3

Stérilisation à 121°C/15min

Annexe II : AAO

1. Polyphénol de *Linum usitatisimum* L.

| Extrait | Absorbance | | | | | | | | | | | |
|---------|------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| | 30 min | | | | 45 min | | | | 60 min | | | |
| | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 |
| EX.Mét | 0.196 | 0.237 | 0.238 | 0.295 | 0.126 | 0.291 | 0.299 | 0.303 | 0.222 | 0.273 | 0.303 | 0.311 |
| | 0.205 | 0.249 | 0.275 | 0.275 | 0.217 | 0.268 | 0.297 | 0.300 | 0.223 | 0.273 | 0.304 | 0.335 |
| | 0.205 | 0.253 | 0.253 | 0.276 | 0.216 | 0.268 | 0.292 | 0.310 | 0.219 | 0.272 | 0.303 | 0.334 |
| EX.Aq | 0.063 | 0.040 | 0.136 | 0.231 | 0.095 | 0.129 | 0.159 | 0.283 | 0.134 | 0.164 | 0.166 | 0.331 |
| | 0.062 | 0.042 | 0.132 | 0.230 | 0.099 | 0.131 | 0.159 | 0.296 | 0.132 | 0.164 | 0.186 | 0.350 |
| | 0.067 | 0.045 | 0.140 | 0.207 | 0.089 | 0.129 | 0.149 | 0.302 | 0.124 | 0.169 | 0.186 | 0.350 |
| ASC | 0.097 | 0.093 | 0.065 | 0.048 | 0.095 | 0.090 | 0.055 | 0.043 | 0.088 | 0.084 | 0.039 | 0.032 |
| | 0.103 | 0.090 | 0.051 | 0.043 | 0.099 | 0.087 | 0.048 | 0.040 | 0.092 | 0.088 | 0.032 | 0.028 |
| | 0.108 | 0.089 | 0.055 | 0.038 | 0.100 | 0.081 | 0.065 | 0.039 | 0.091 | 0.085 | 0.043 | 0.025 |

2. Les huiles fixes

| Extrait | Absorbance | | | | | | | | | | | |
|---------|------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| | 30 min | | | | 45 min | | | | 60 min | | | |
| | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 |
| HFC | 0.037 | 0.037 | 0.040 | 0.047 | 0.038 | 0.035 | 0.033 | 0.048 | 0.036 | 0.045 | 0.037 | 0.049 |
| | 0.033 | 0.036 | 0.046 | 0.047 | 0.035 | 0.036 | 0.036 | 0.047 | 0.034 | 0.049 | 0.038 | 0.051 |
| | 0.030 | 0.032 | 0.040 | 0.043 | 0.035 | 0.035 | 0.036 | 0.048 | 0.049 | 0.049 | 0.038 | 0.049 |
| HFE | 0.072 | 0.134 | 0.178 | 0.193 | 0.084 | 0.134 | 0.186 | 0.196 | 0.083 | 0.136 | 0.191 | 0.207 |
| | 0.075 | 0.130 | 0.181 | 0.197 | 0.084 | 0.134 | 0.193 | 0.189 | 0.080 | 0.135 | 0.189 | 0.232 |
| | 0.086 | 0.125 | 0.175 | 0.204 | 0.090 | 0.135 | 0.184 | 0.200 | 0.090 | 0.136 | 0.189 | 0.230 |
| HFP | 0.66 | 1.04 | 1.70 | 2.00 | 0.90 | 1.24 | 1.95 | 2.49 | 1.16 | 1.40 | 2.75 | 2.90 |
| | 0.57 | 1.00 | 1.85 | 2.04 | 0.95 | 1.29 | 1.99 | 2.35 | 1.29 | 1.43 | 2.60 | 3.04 |
| | 0.61 | 1.01 | 1.82 | 2.00 | 0.92 | 1.25 | 2.00 | 2.33 | 1.12 | 1.34 | 2.69 | 3.02 |

Annexe III : Les pourcentages d'inhibitions

1. Polyphénol

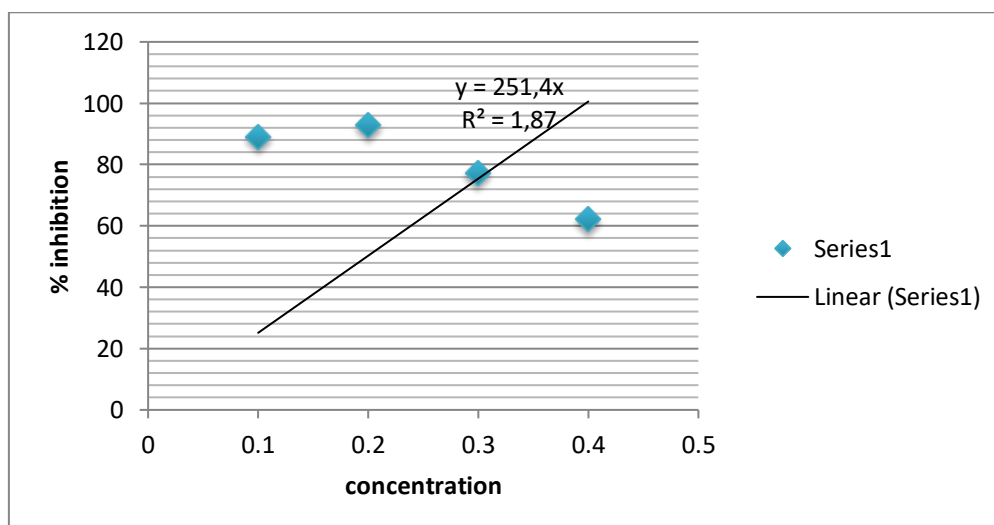


Figure 1: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux (30min).

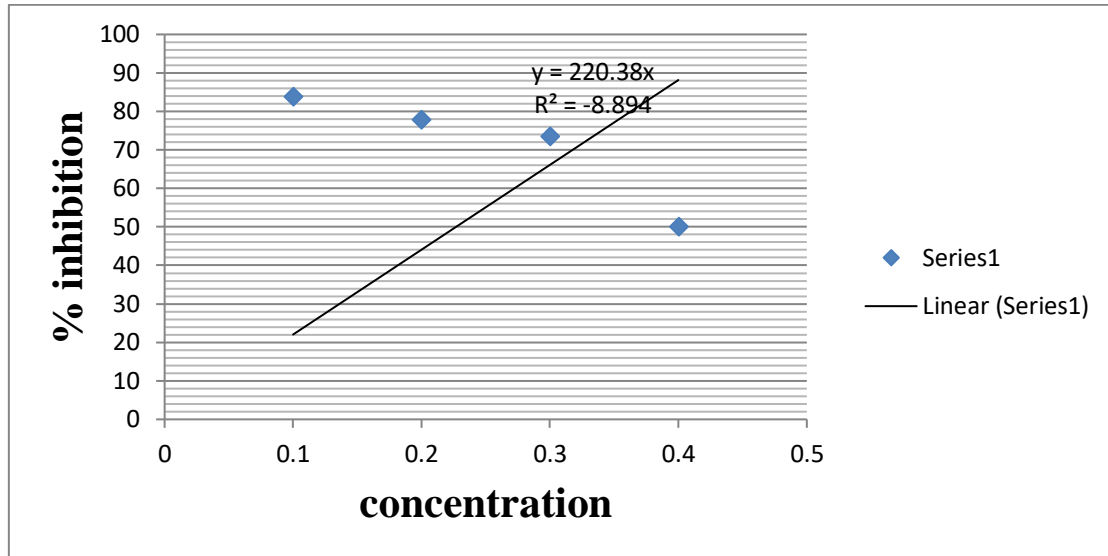


Figure 2: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux de Lu (45min).

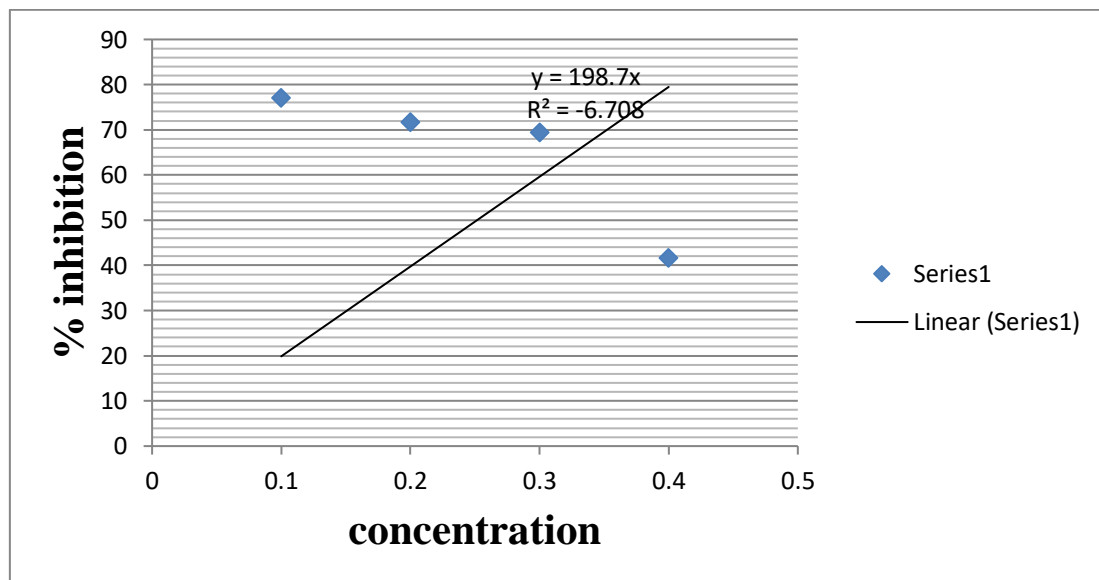


Figure 3: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux de Lu (60min).

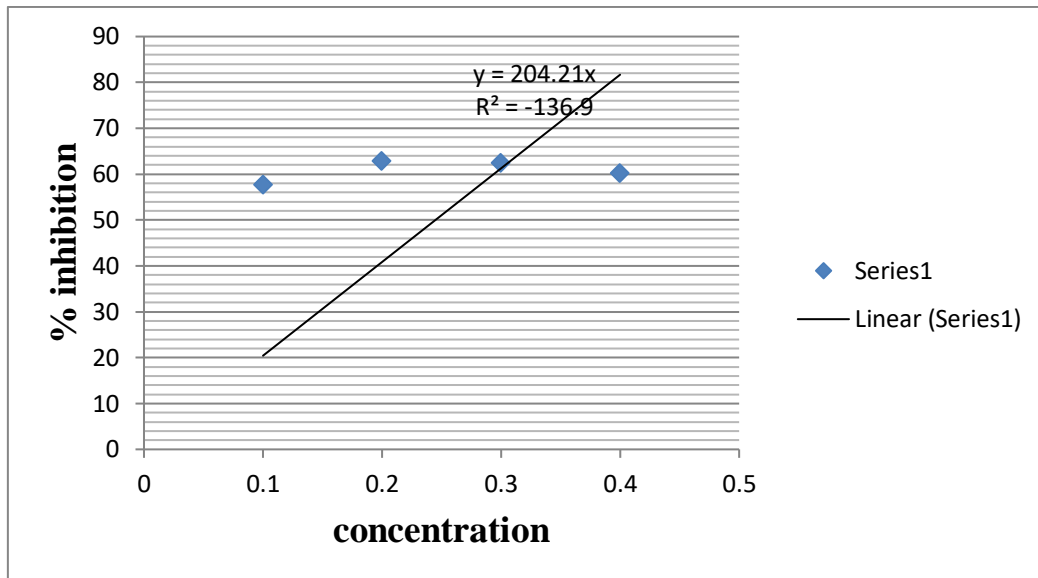


Figure 4: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations l'extrait méthanolique de Lu (30min).

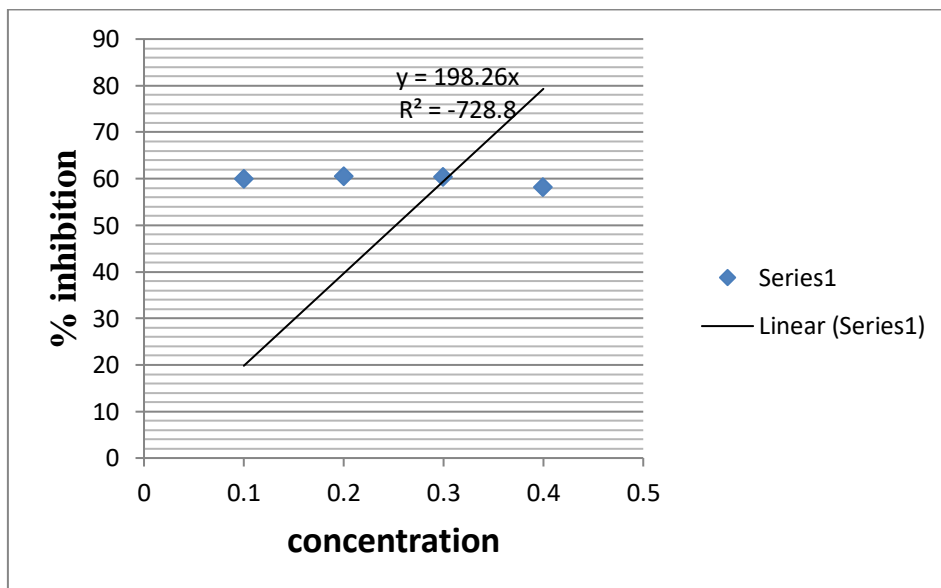


Figure 5: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de Lu (45min).

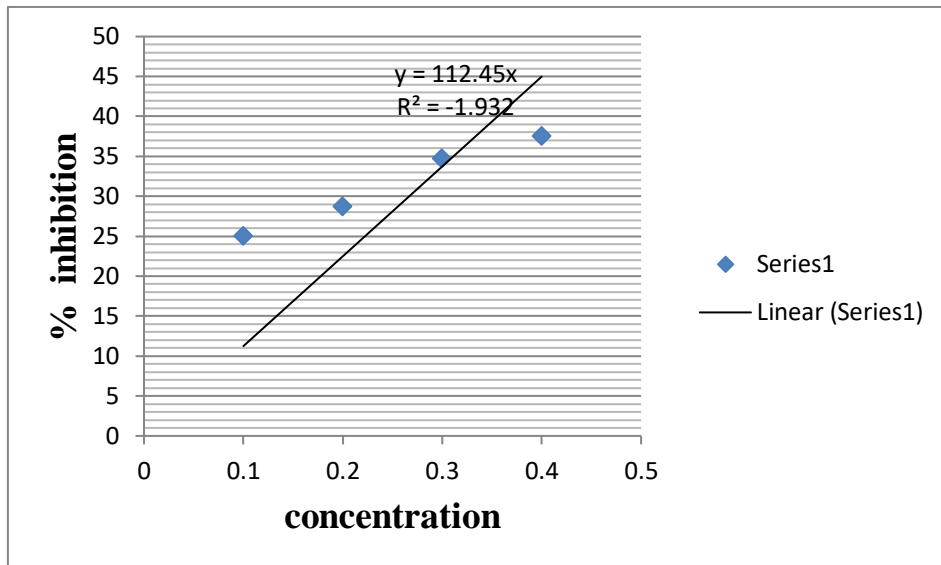


Figure 6: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations l'extrait méthanolique de Lu (60min).

2. ASC

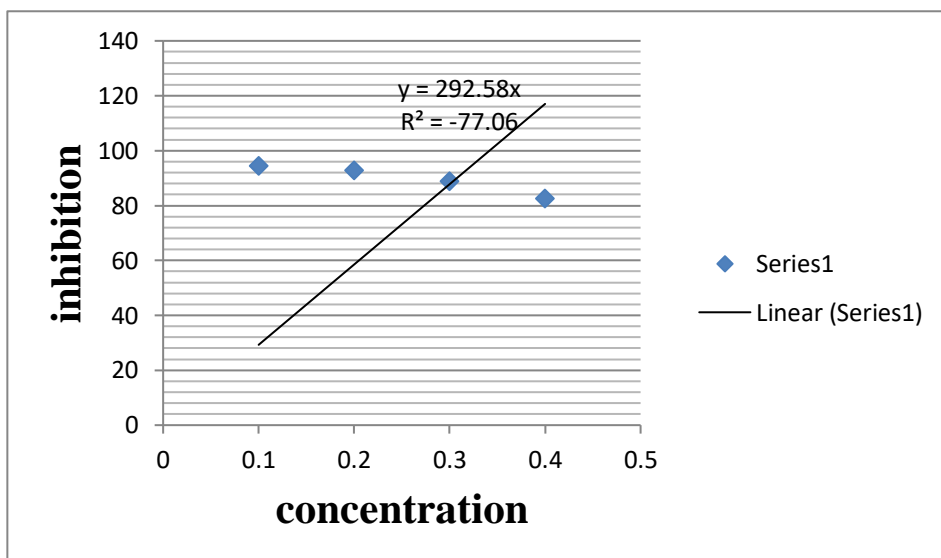


Figure 7 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait d'ASC (30min).

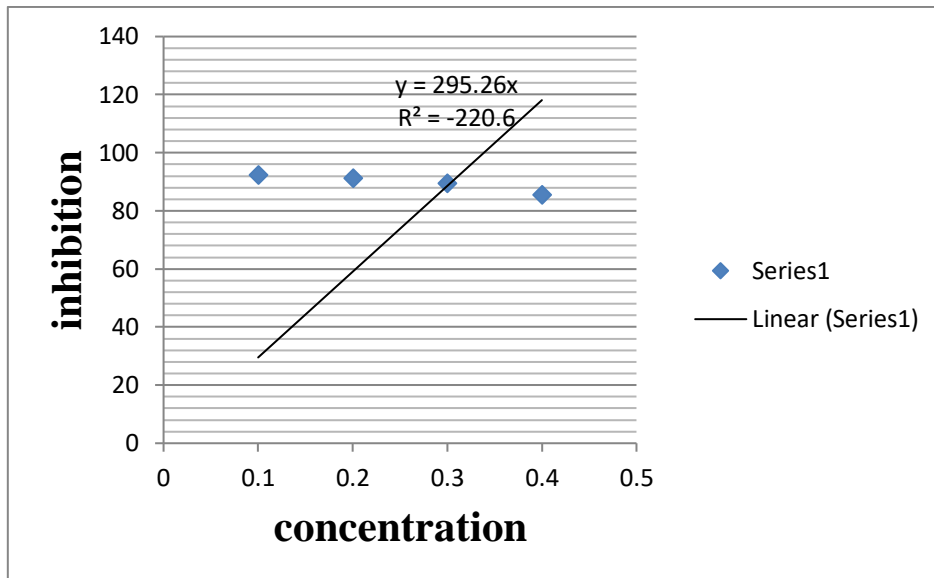


Figure 8: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait d'ASC (45min).

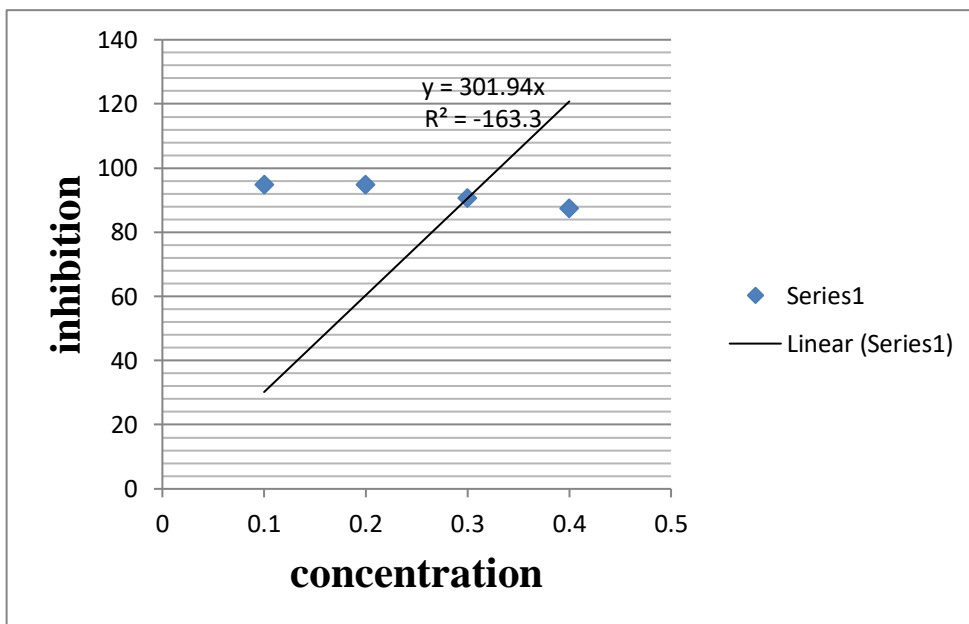


Figure 9: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'extrait d'ASC (60min).

3. Les huiles fixes

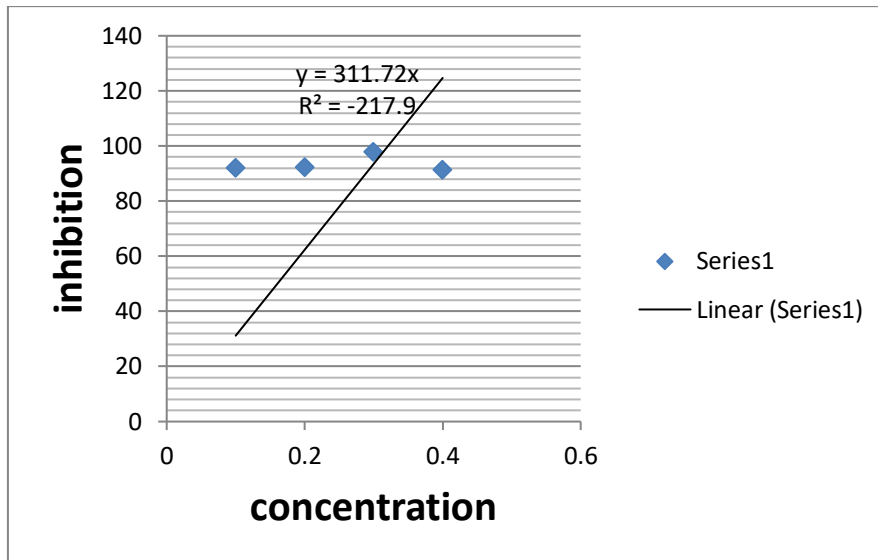


Figure 10: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de HFE de Lu (30min).

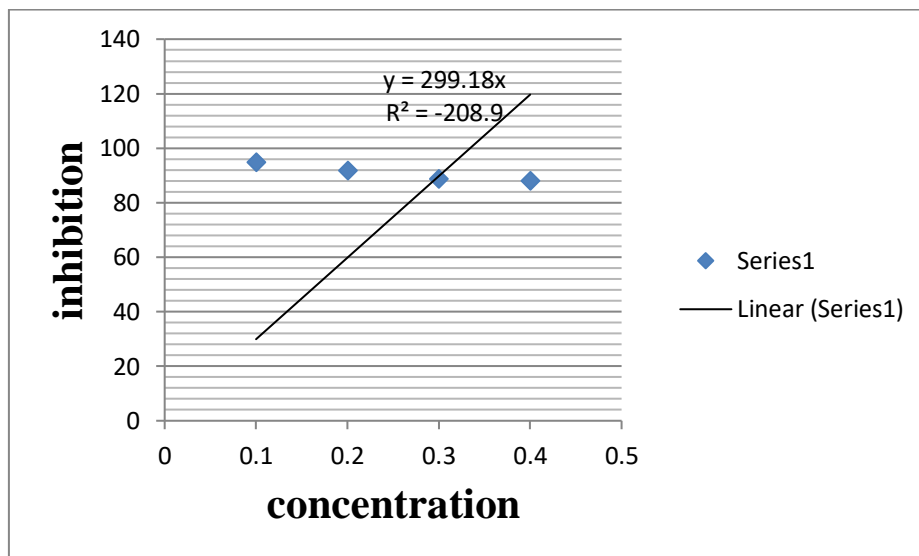


Figure 11: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations HFE de Lu (45min).

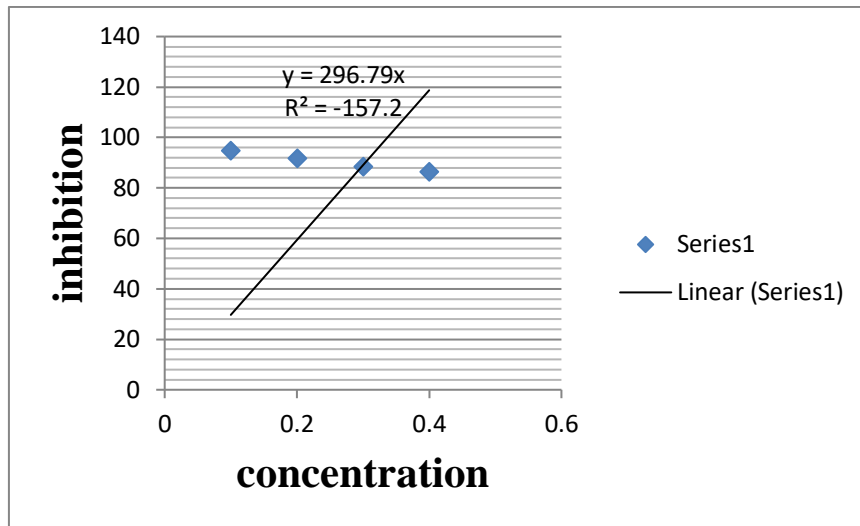


Figure 12: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'HFE de Lu (60min).

4. Chloroforme

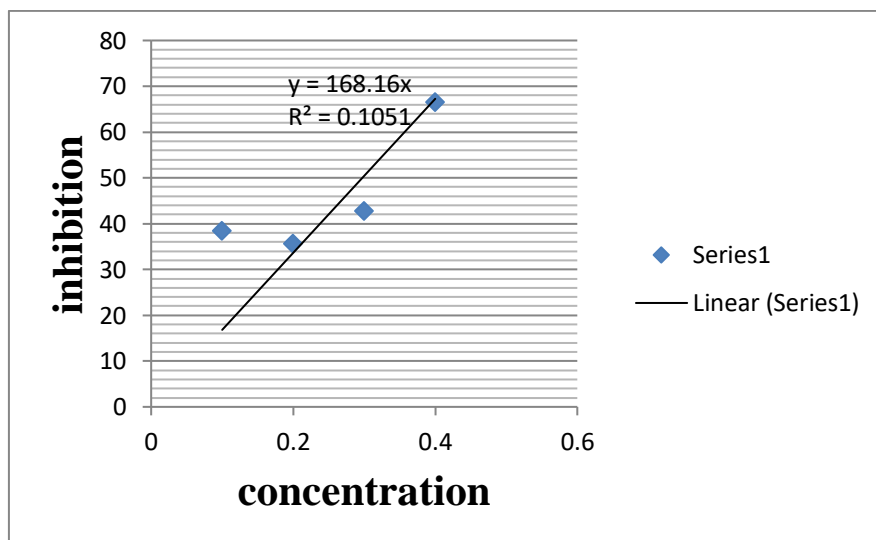


Figure 13: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'HFC (30min).

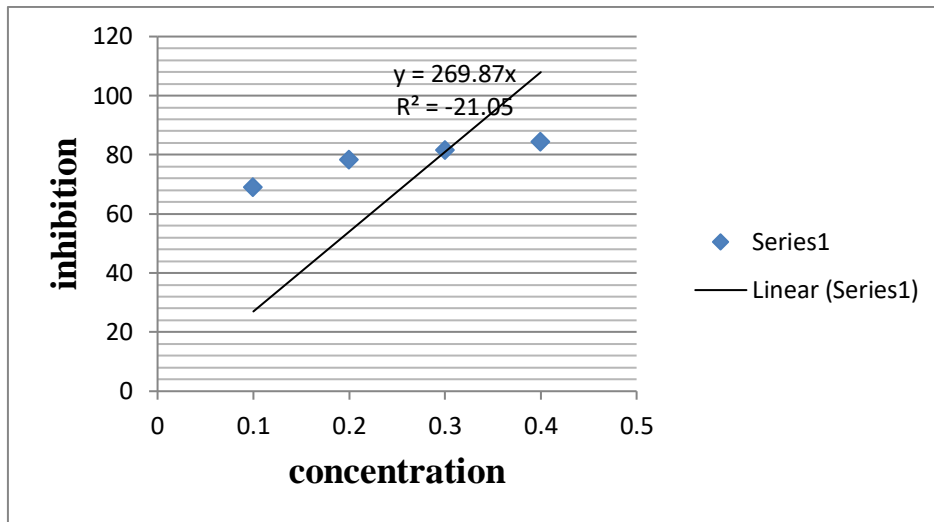


Figure 14: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'HFC de Lu (45min).

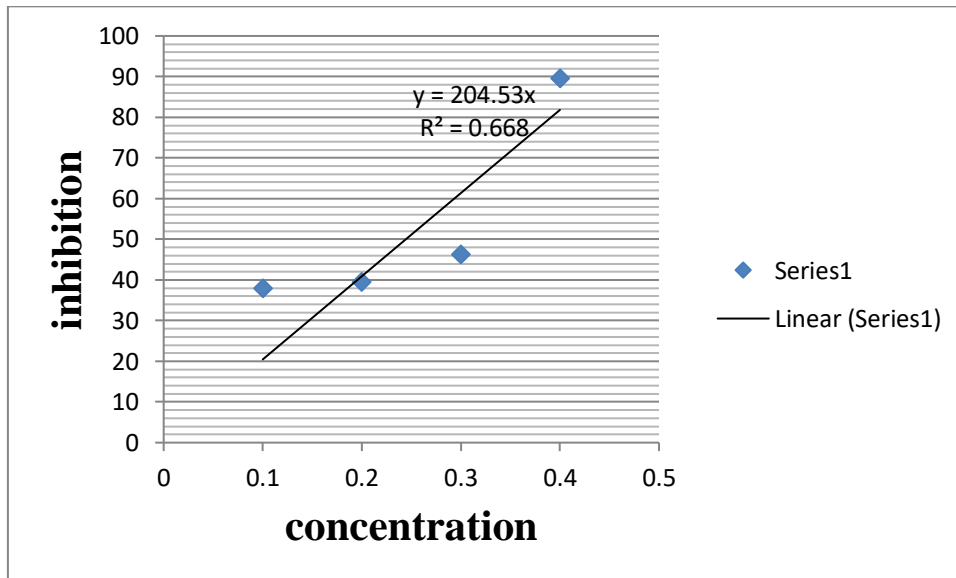


Figure 15: La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'HFC de Lu (60min).

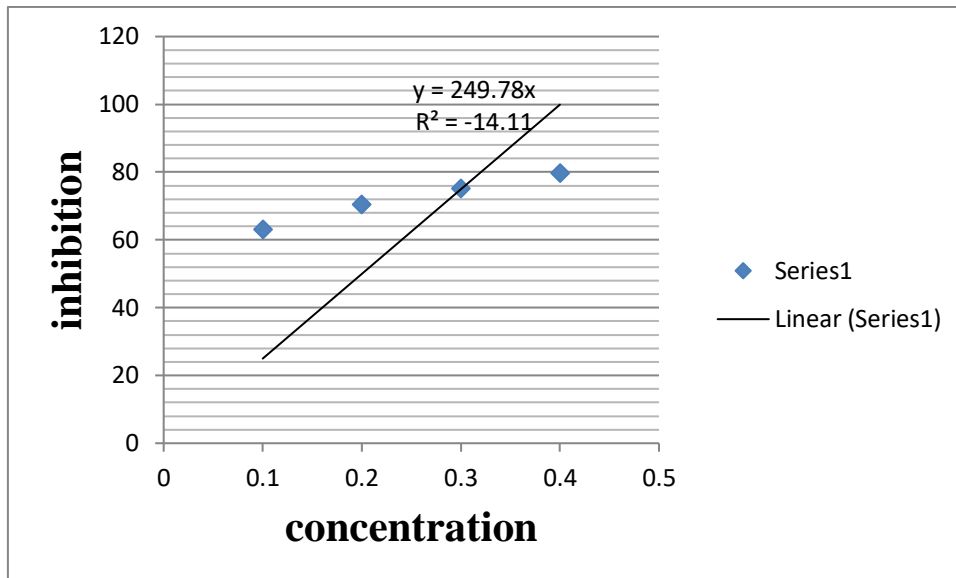


Figure 16 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations HFP de Lu (30min).

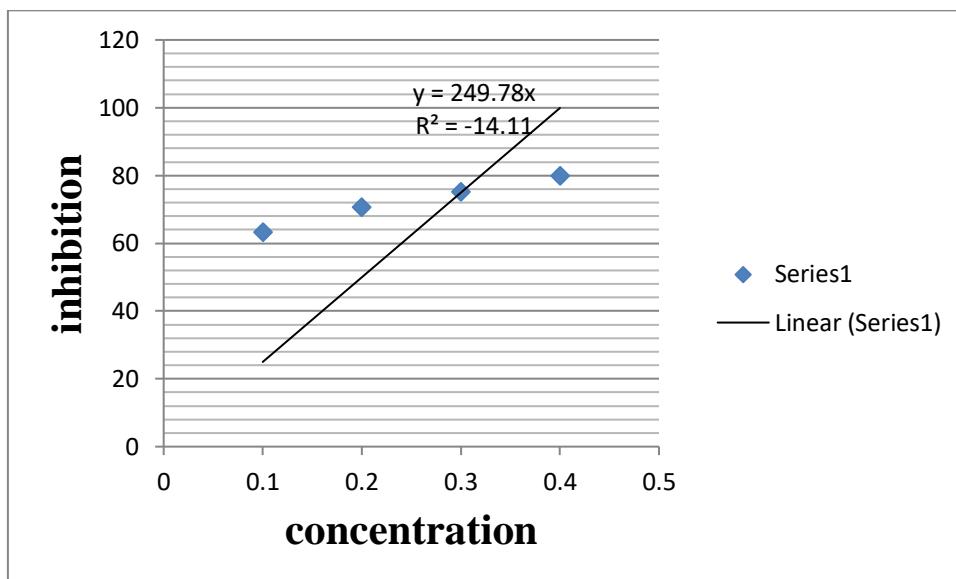


Figure 17 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de HFP de Lu (45min).

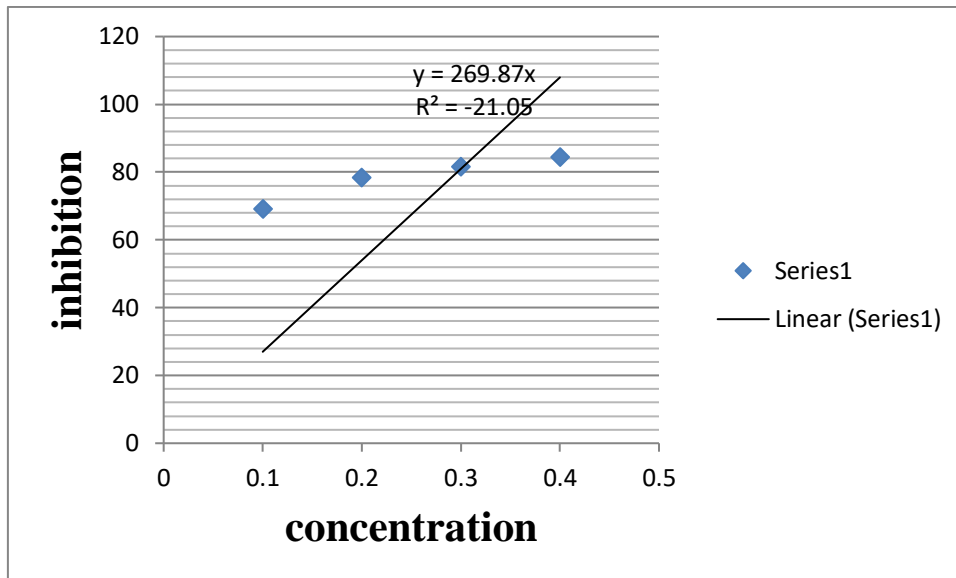


Figure 18 : La régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de HFP de Lu (60min).

Annexe IV : Analyse statistique d'AAO

Tableau 01 : Effet interaction extrait /dilution.

| | | | | AAO | | | |
|---------|----------|----------|-------|---------|------------|---------|---------|
| | | | | Moyenne | Ecart type | Minimum | Maximum |
| Extrait | EM | Dilution | 0.1ml | 47,80 | 16,92 | 20,78 | 61,06 |
| | | | 0.2ml | 50,72 | 16,75 | 26,22 | 63,11 |
| | | | 0.3ml | 52,58 | 13,50 | 32,37 | 63,31 |
| | | | 0.4ml | 52,04 | 10,87 | 36,47 | 60,65 |
| | EAQ | Dilution | 0.1ml | 83,31 | 5,09 | 77,15 | 89,45 |
| | | | 0.2ml | 80,97 | 9,33 | 71,23 | 92,81 |
| | | | 0.3ml | 73,39 | 3,47 | 68,38 | 77,57 |
| | | | 0.4ml | 51,34 | 9,03 | 40,64 | 64,76 |
| | HFC | Dilution | 0.1ml | 37,33 | 2,01 | 33,33 | 40,37 |
| | | | 0.2ml | 36,84 | 2,26 | 33,33 | 39,80 |
| | | | 0.3ml | 41,82 | 7,13 | 34,07 | 55,55 |
| | | | 0.4ml | 78,01 | 10,37 | 62,96 | 90,50 |
| | HFE | Dilution | 0.1ml | 90,61 | 11,08 | 60,47 | 95,67 |
| | | | 0.2ml | 92,02 | 0,21 | 91,85 | 92,46 |
| | | | 0.3ml | 91,69 | 4,53 | 88,44 | 97,75 |
| | | | 0.4ml | 88,72 | 3,25 | 86,08 | 97,01 |
| | HFP | Dilution | 0.1ml | 69,68 | 7,59 | 58,68 | 85,02 |
| | | | 0.2ml | 74,63 | 3,86 | 69,98 | 80,77 |
| | | | 0.3ml | 78,74 | 3,13 | 74,79 | 82,33 |
| | | | 0.4ml | 83,35 | 3,38 | 78,62 | 87,96 |
| ASC | Dilution | 0.1ml | 69,09 | 4,15 | 60,20 | 73,20 | |
| | | 0.2ml | 72,84 | 1,71 | 70,20 | 75,60 | |
| | | 0.3ml | 83,74 | 3,22 | 80,10 | 88,12 | |
| | | 0.4ml | 87,63 | 2,55 | 84,30 | 91,15 | |

Tableau 02 : Effet interaction extrait /dilution/temps.

| | | | | | | AAO | | | |
|---------|----------|----------|-------|-------|-------|---------|------------|---------|---------|
| | | | | | | Moyenne | Ecart type | Minimum | Maximum |
| Extrait | EM | DILUTION | 0.1ml | TEMPS | 30min | 57,78 | 4,11 | 53,07 | 60,65 |
| | | | | | 45min | 59,97 | 1,89 | 57,78 | 61,06 |
| | | | | | 60min | 25,66 | 4,22 | 20,78 | 28,19 |
| | | | 0.2ml | TEMPS | 30min | 63,04 | 0,12 | 62,90 | 63,11 |
| | | | | | 45min | 60,52 | 0,51 | 60,04 | 61,06 |
| | | | | | 60min | 28,61 | 4,15 | 26,22 | 33,40 |
| | | | 0.3ml | TEMPS | 30min | 62,60 | 0,61 | 62,25 | 63,31 |
| | | | | | 45min | 60,38 | 0,31 | 60,04 | 60,65 |
| | | | | | 60min | 34,76 | 3,29 | 32,37 | 38,52 |
| | | | 0.4ml | TEMPS | 30min | 60,31 | 0,43 | 59,83 | 60,65 |
| | | | | | 45min | 58,19 | 0,41 | 57,78 | 58,60 |
| | | | | | 60min | 37,63 | 1,05 | 36,47 | 38,52 |
| | EAQ | DILUTION | 0.1ml | TEMPS | 30min | 88,89 | 0,49 | 88,59 | 89,45 |
| | | | | | 45min | 83,86 | 0,02 | 83,84 | 83,88 |
| | | | | | 60min | 77,19 | 0,06 | 77,15 | 77,25 |
| | | | 0.2ml | TEMPS | 30min | 92,81 | 0,20 | 92,81 | 92,81 |
| | | | | | 45min | 78,32 | 0,39 | 78,08 | 78,77 |
| | | | | | 60min | 71,78 | 0,47 | 71,23 | 72,05 |
| | | | 0.3ml | TEMPS | 30min | 77,09 | 0,42 | 76,77 | 77,57 |
| | | | | | 45min | 73,56 | 1,03 | 72,94 | 74,74 |
| | | | | | 60min | 69,51 | 1,96 | 68,38 | 71,77 |
| | | | 0.4ml | TEMPS | 30min | 62,11 | 2,29 | 60,79 | 64,76 |
| | | | | | 45min | 50,18 | 1,64 | 48,81 | 52,00 |
| | | | | | 60min | 41,72 | 1,84 | 40,64 | 43,84 |
| HFC | DILUTION | 0.1ml | TEMPS | 30min | 38,49 | 1,64 | 37,37 | 40,37 | |
| | | | | 45min | 35,64 | 2,57 | 33,33 | 38,40 | |
| | | | | 60min | 37,86 | 0,44 | 37,40 | 38,28 | |
| | | 0.2ml | TEMPS | 30min | 35,67 | 2,10 | 33,33 | 37,40 | |
| | | | | 45min | 35,35 | 0,30 | 35,18 | 35,70 | |
| | | | | 60min | 39,48 | 0,28 | 39,25 | 39,80 | |
| | | 0.3ml | TEMPS | 30min | 42,83 | 11,27 | 34,07 | 55,55 | |
| | | | | 45min | 36,46 | 0,39 | 36,18 | 36,90 | |
| | | | | 60min | 46,16 | 1,86 | 45,00 | 48,30 | |
| | | 0.4ml | TEMPS | 30min | 66,54 | 5,57 | 62,96 | 72,96 | |

| | | | | | | | | |
|-----|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | 45min | 77,92 | 0,17 | 77,77 | 78,10 |
| | | | | 60min | 89,58 | 0,80 | 89,10 | 90,50 |
| HFE | DILUTION | 0.1ml | TEMPS | 30min | 91,99 | 6,22 | 84,81 | 95,67 |
| | | | | 45min | 94,95 | 0,00 | 94,95 | 94,95 |
| | | | | 60min | 86,33 | 17,24 | 60,47 | 94,95 |
| | | 0.2ml | TEMPS | 30min | 92,29 | 0,15 | 92,19 | 92,46 |
| | | | | 45min | 91,93 | 0,05 | 91,88 | 91,97 |
| | | | | 60min | 91,85 | 0,01 | 91,85 | 91,86 |
| | | 0.3ml | TEMPS | 30min | 97,73 | 0,02 | 97,72 | 97,75 |
| | | | | 45min | 88,74 | 0,27 | 88,44 | 88,94 |
| | | | | 60min | 88,60 | 0,09 | 88,50 | 88,67 |
| | | 0.4ml | TEMPS | 30min | 91,35 | 4,90 | 88,52 | 97,01 |
| | | | | 45min | 88,17 | 0,13 | 88,02 | 88,25 |
| | | | | 60min | 86,63 | 0,83 | 86,08 | 87,58 |
| HFP | DILUTION | 0.1ml | TEMPS | 30min | 64,58 | 1,56 | 63,47 | 65,68 |
| | | | | 45min | 71,25 | 13,21 | 58,68 | 85,02 |
| | | | | 60min | 71,05 | 3,74 | 68,38 | 76,58 |
| | | 0.2ml | TEMPS | 30min | 70,57 | 0,58 | 69,98 | 71,13 |
| | | | | 45min | 75,42 | 0,63 | 74,79 | 76,04 |
| | | | | 60min | 79,54 | 1,73 | 78,32 | 80,77 |
| | | 0.3ml | TEMPS | 30min | 75,18 | 0,34 | 74,79 | 75,38 |
| | | | | 45min | 79,27 | 2,39 | 76,58 | 81,13 |
| | | | | 60min | 81,77 | 0,54 | 81,25 | 82,33 |
| | | 0.4ml | TEMPS | 30min | 79,88 | 1,23 | 78,62 | 81,07 |
| | | | | 45min | 85,66 | 2,65 | 82,63 | 87,54 |
| | | | | 60min | 84,51 | 3,00 | 82,51 | 87,96 |
| ASC | DILUTION | 0.1ml | TEMPS | 30min | 64,44 | 3,91 | 60,20 | 67,90 |
| | | | | 45min | 70,74 | 1,60 | 69,37 | 72,50 |
| | | | | 60min | 72,10 | 0,98 | 71,32 | 73,20 |
| | | 0.2ml | TEMPS | 30min | 72,49 | 2,79 | 70,20 | 75,60 |
| | | | | 45min | 72,49 | 0,55 | 72,15 | 73,12 |
| | | | | 60min | 73,56 | 1,55 | 72,20 | 75,25 |
| | | 0.3ml | TEMPS | 30min | 81,81 | 1,57 | 80,10 | 83,18 |
| | | | | 45min | 81,62 | 1,32 | 80,10 | 82,50 |
| | | | | 60min | 87,78 | 0,57 | 87,12 | 88,12 |
| | | 0.4ml | TEMPS | 30min | 85,49 | 1,13 | 84,30 | 86,56 |
| | | | | 45min | 86,57 | 0,63 | 86,12 | 87,29 |
| | | | | 60min | 90,84 | 0,53 | 90,23 | 91,15 |

Universitaire : 2018/2019

présenté par : BIRI Kenza

: LEZBACHE Warda

Thème :

Caractérisation biochimique et évaluation de l'activité biologique des extraits phénolique et des huiles fixes de l'espèce *Linum usitatissimum* L.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention de diplôme de Master en : biotechnologie végétale

Résumé

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les constituants phytochimiques et les activités antioxydantes, anticoagulantes et antibactériennes des extraits phénoliques et des huiles fixes obtenues à partir des graines de lin.

Les analyses phytochimiques de *Linum usitatissimum* L. révèlent la présence des constituants bioactifs responsables des vertus thérapeutiques. De plus, l'estimation quantitative des phénols totaux par la méthode colorimétrique a montré que les deux extraits aqueux et méthanolique sont faibles de ces composés.

L'étude de l'activité antioxydante des huiles fixes et des polyphénols a été réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Les résultats obtenus ont montré l'existence d'une importante activité antioxydante pour l'huile fixe extraite par : éthanol et pressage et pour l'extrait aqueux de polyphénol par contre l'extrait méthanolique montre une faible activité antioxydante.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de polyphénol et d'huiles fixe a été réalisée par la méthode des disques par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les résultats ont montré qu'aucune activité antibactérienne à polyphénol n'a été observée, cependant les huiles fixes de chloroforme et d'éthanol donnent des meilleures zones d'inhibition à l'encontre des cinq bactéries testées.

L'activité anticoagulante des huiles fixes et des polyphénols a été également évaluée in vitro en utilisant les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ). Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal indiquent qu'elles exercent une activité modérée sur les deux voies de la coagulation.

Mots clés : *Linum usitatissimum* L. activité antioxydante, activité antibactérienne, activité anticoagulante, les huiles fixes, le polyphénol, TCK, TQ.

Laboratoires de recherche : laboratoire du centre Universitaire Abdelhafide BOUSSOUF MILA ; laboratoire d'analyse médicales : Dr.Mirouh.H. à Ferdjioua.

Jury d'évaluation :

Présidente de jury : BOUGUERIA Hassiba

Examineur : YAHIA Abdelouahab

Promoteur : BOUKERIA Sabah

Date de soutenance : 13/07/2019