

## **L3 : Biotechnologie végétale**

### **Module : LES METHODES D'EXTRACTION DE SUBSTANCES NATURELLES**

#### **INTRODUCTION**

Les substances naturelles comprennent d'une part les arômes et les fragrances naturelles et, d'autre part, les substances bioactives.

L'origine des substances naturelles est la matière inerte tels que le N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et les éléments minéraux, l'animal (enzymes hormones etc.), les microorganismes (antibiotiques) et le végétale (substances synthétisés par le métabolisme primaire : protéine, lipides, hormones, sucres et les acides aminés et celles synthétisés par le métabolisme secondaire : les polyphénols, les terpènes, coumarines, alcaloïdes etc..).

Ces dernières années, les substances naturelles connaissent un intérêt croissant dans de nombreux domaines car le consommateur se montre de plus en plus réticent à consommer des produits contenant des molécules chimiques. Ce sont des molécules à propriétés physico-chimiques bénéfiques (anti-tumorales, antivirales, antifongiques, antimicrobiennes, antioxydantes, cicatrisantes etc...).

La valorisation de ces substances naturelles représente donc un potentiel économique énorme offrant un large champ d'application:

1- Dans le domaine de l'agriculture car:

- Elles permettent de limiter l'utilisation des pesticides conventionnels.
- Leur efficacité assure le contrôle des agresseurs et maintient leur développement en dessous des seuils de nuisibilité (biocontrôle)
- Elles augmentent la résistance des plantes contre les agents biotiques et abiotiques
- Elles stimulent la croissance et améliorent les rendements

2- dans le domaine de la santé et de pharmacologie pour la fabrication de l'essentiel des médicaments utilisés par l'Homme pour se soigner et pour soigner les animaux (santé humaine et animale), tel que les antibiotiques isolés de microorganismes, l'aspirine (inspirés de produits naturels isolés du saule) ; les anesthésiques locaux (inspirés par la structure de la cocaïne, isolée de la coca) ; des analgésiques puissants (inspirés par la structure de la morphine, isolée de l'opium du pavot) ; des antipaludiques (inspirés par la structure de la quinine du quinquina), la réserpine du rauwolfia (pour lutter contre l'hypertension) ; vincamine de la petite pervenche, alcaloïdes de diverses plantes tropicales utilisés dans le traitement de maladies cardiovasculaires etc.

3- Dans le domaine alimentaire comme additifs nutritionnels, compléments alimentaires et nutraceutique (omega 3 et 6 et les composés actifs naturels).

4- Dans le domaine cosmétiques pour traiter les problèmes de peau, des cheveux et des ongles sous forme de crèmes, savons, lotions, de gèles et de poudres

Les arômes sont ajoutés aux denrées alimentaires pour leur conférer une odeur et/ou une saveur. Les fragrances sont, incorporées à toute sorte de produits non

alimentaires, dont les cosmétiques et les détergents, pour leur donner une odeur particulière.

Vue l'importance de ces molécules bioactives dans plusieurs domaines, plusieurs méthodes d'extraction ont été mises au point en vue de leur exploitation dans un domaine précis.

## **1. METHODES D'EXTRACTION DE SUBSTANCE BIOACTIVES A PARTIR D'UNE PLANTE**

L'extraction est un procédé qui permet d'obtenir une espèce chimique à partir d'une substance naturelle qui la contient et se fait à partir :

- **des plantes fraîches:** elles servent de base à la préparation des teintures mères, qui permettent à leur tour l'élaboration des médicaments homéopathiques.
- **des plantes séchées:** elles constituent la base des teintures officinales, des nébulisât, des extraits, mais aussi des poudres.
- **des plantes stabilisées:** le potentiel enzymatique de la plante est annihilé par l'action de l'alcool ou de la chaleur, permettant la conservation des constituants dans leur état originel. Ces plantes permettent d'obtenir les intraits (extrait obtenu à partir d'une plante stabilisée et qui a donc conservé sa composition chimique initiale).

### **1.1. Techniques traditionnelles d'extraction:**

Les plantes peuvent être préparées par des procédés traditionnels :

**infusion, décoction ou macération.** L'extraction est faite de la plante entière ou une partie de la plante après leur traitement (récolte adéquate, treillages, lavage, séchage).

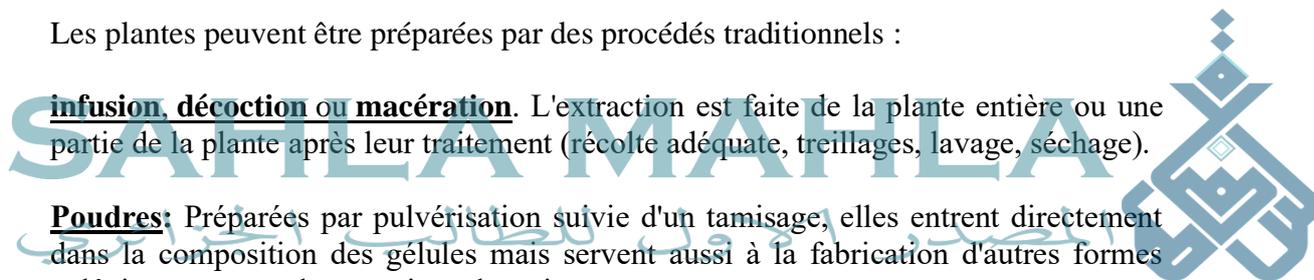
**Poudres:** Préparées par pulvérisation suivie d'un tamisage, elles entrent directement dans la composition des gélules mais servent aussi à la fabrication d'autres formes galéniques comme les extraits et les teintures

**Un extrait sec** est le résidu solide qui persiste après évaporation du liquide d'une infusion, décoction ou teinture. Un extrait sec est en général plus concentré en principes actifs, mais ne contient pas certaines molécules détruites ou évaporées par l'ébullition. Ces extraits se prennent en général sous forme de gélule

**L'infusion :** consiste à verser de l'eau chaude sur les fleurs, les feuilles ou les herbes (tiges) des plantes choisies. Ensuite il faut laisser reposer quelques minutes. Il faut toujours couvrir l'infusion pour ne pas que les principes actifs s'évaporent. On la boit après.

**La décoction :** consiste à faire bouillir pendant quinze minutes les tiges ou les racines de la plante, dans de l'eau afin de les ramollir et d'extraire les principes actifs

**La macération :** on laisse tremper des fleurs, écorces ou racines de plantes dans de l'huile, de l'alcool ou de l'eau à température ambiante pendant plusieurs heures. Le macérât peut ensuite être utilisé sous forme de cataplasme.



**Le pressage** : il s'agit d'exercer une pression sur une orange pour obtenir le jus, ou d'écraser des fleurs pour extraire les arômes comme le faisaient les égyptiens.

**Alcoolatures** : Ce sont des teintures préparées avec des plantes fraîches n'ayant donc pas subi les effets de la dessiccation

**Une teinture** est souvent plus concentrée en principes actifs, ou contient quelques molécules supplémentaires, réalisée à l'aide de solvants (glycérine, alcool...)

**La digestion** :

On maintient la plante en contact avec l'eau (température inférieure à celle de l'ébullition, mais supérieure à la température ambiante) pendant 1 à 5 heures

## **1.2.Méthodes d'extraction scientifiques ou modernes**

### **1.2.1.Extraction des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont utilisées en thérapeutique depuis des siècles, mais ce n'est que récemment des recherches scientifiques sont menées à leur sujet.

• *Le rôle des huiles essentielles dans les plantes est principalement d'attirer les pollinisateurs ou de repousser ses ennemis. Elles servent aussi à réguler la température à l'intérieur de la plante lui permettant ainsi de mieux supporter la chaleur.*

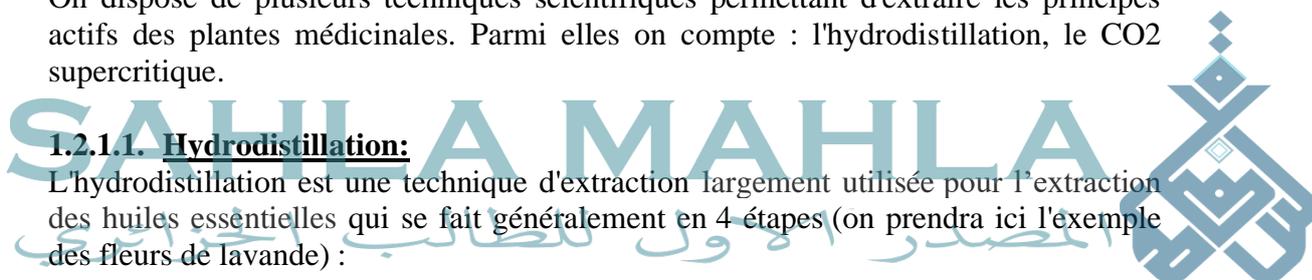
On dispose de plusieurs techniques scientifiques permettant d'extraire les principes actifs des plantes médicinales. Parmi elles on compte : l'hydrodistillation, le CO2 supercritique.

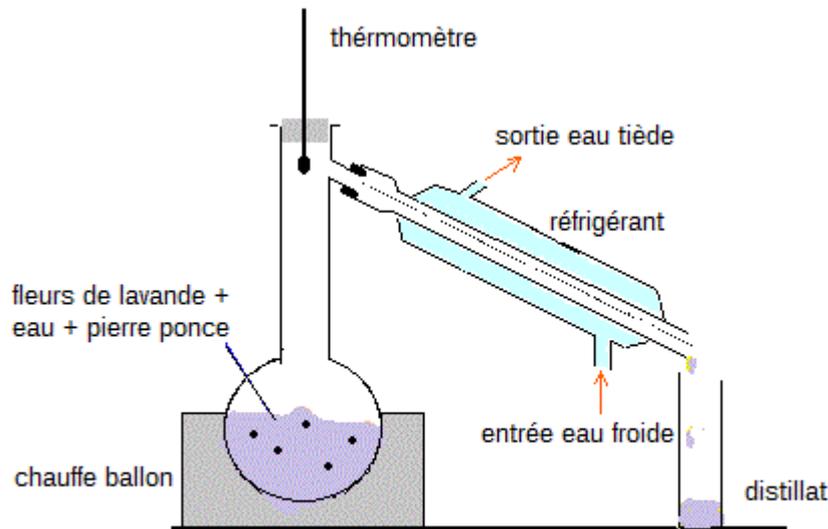
#### **1.2.1.1. Hydrodistillation:**

L'hydrodistillation est une technique d'extraction largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles qui se fait généralement en 4 étapes (on prendra ici l'exemple des fleurs de lavande) :

##### **a- l'hydrodistillation**

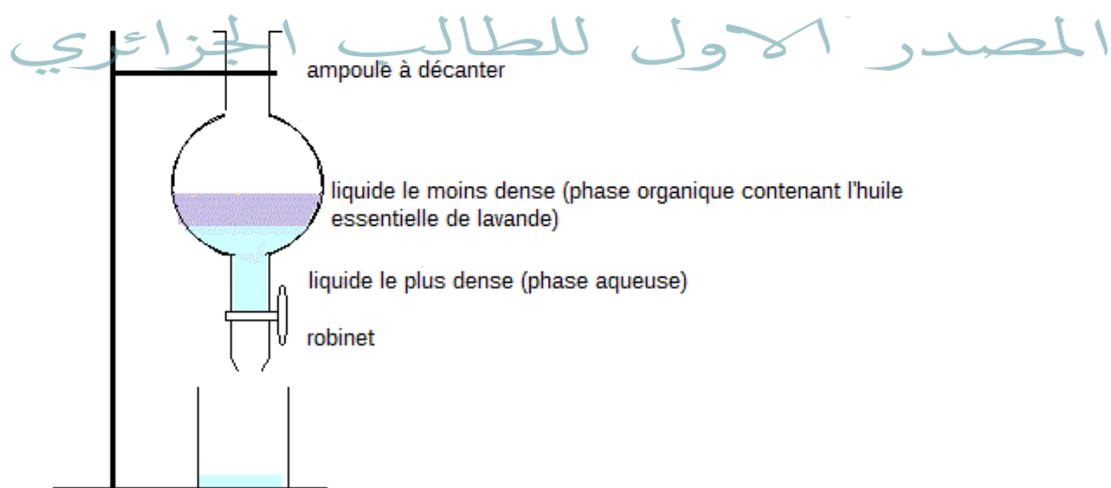
- **Par ébullition** : On porte à ébullition un mélange d'eau, de plante (fleurs de lavande) et de pierres ponce (pour régulariser l'ébullition et homogénéiser la température du mélange). Les cellules du végétal éclatent et libèrent alors les espèces chimiques odorantes qui (non solubles dans l'eau) sont entraînées par la vapeur d'eau puis récupérées dans un autre récipient après condensation dans le réfrigérant. L'hydrodistillat obtenu contient une phase aqueuse ainsi qu'une phase organique constituée par l'huile essentielle (de lavande).





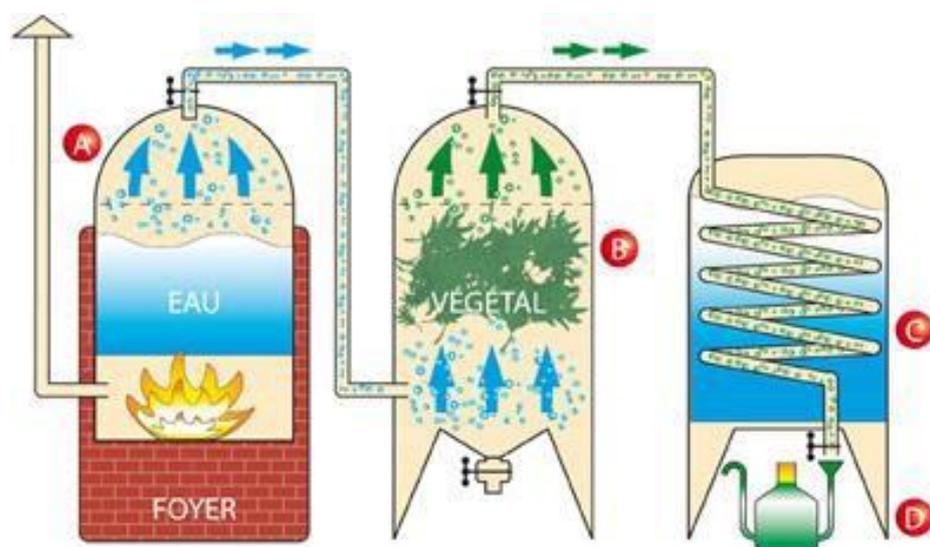
**b- le relargage :** Les huiles essentielles que l'on désire extraire sont des composés organiques en partie solubles dans l'eau. Le relargage consiste à les rendre **moins solubles** dans l'eau en ajoutant du chlorure de sodium (qui n'est tout simplement que du sel). De cette façon il sera plus aisé de récupérer ces huiles essentielles (de lavande).

**c- la décantation :** On la réalise dans une ampoule à décanter dans laquelle le mélange précédent se sépare en deux phases non miscibles. Une **phase aqueuse**, en général plus dense, se situe dans la partie inférieure et une **phase organique**, de densité plus faible et contenant les huiles essentielles (de lavande) se situe au-dessus.



**d- Le séchage et la filtration :** Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, on fait agir un **déshydratant**. C'est l'opération de séchage. On filtre ensuite pour ne recueillir que la phase organique. Cette opération peut durer une demi-heure ou plus si nécessaire.

**-Hydrodistillation par entrainement à la vapeur d'eau:** C'est la technique d'extraction la plus ancienne et qui reste la plus utilisée. Elle permet de distiller des matières végétales mélangées avec de l'eau. La vapeur d'eau entraîne les constituants volatils des végétaux, et, après condensation dans un réfrigérant, on obtient un distillat (molécule aromatique + eau) qui sera décanté puis traité (les molécules aromatiques étant insolubles dans l'eau, permet d'isoler l'essence). L'eau résiduelle peut encore contenir une faible proportion de certains composés volatils et peut être utilisée sous le terme d'eau florale. On l'utilise surtout pour extraire les espèces chimiques odorantes présentes dans les plantes.



**A :** L'eau se transforme en vapeur. **B :** La vapeur passe à travers les plantes, elle se volatilise et **entraîne les molécules aromatiques**. **C :** La vapeur chargée des composés volatils est recondensée en passant dans le serpentín réfrigérant. **D :** A la sortie de l'alambic, un *essencier* récupère l'huile essentielle qui flotte à la surface de l'eau de distillation (la partie jaune, au sommet du récipient, sur le dessin).

المصدر الاول للطلاب الجزائري



#### **1.2.1.2. Extraction par « l'expression à froid »**

Technique réservée aux agrumes (citron, orange, bigarade, mandarine, pamplemousse). L'extraction se fait sans chauffage, l'écorce ou les fruits des plantes sont pressés à froid (notamment pour les *hespéridés* : citron, orange...).

On utilise des presses hydrauliques. La pulpe et l'H.E. sont séparées à la centrifugeuse. Le résultat est un mélange aqueux où l'huile essentielle finira par remonter à la surface.

L'inconvénient est que le produit pressé à froid, a souvent une durée de vie courte – environ six mois.



**1.2.1.3. L'enfleurage.** Les fleurs fragiles (violette ou jasmin) sont posées sur des châssis enduits de graisse animale très pure et inodore qui absorbe le parfum des fleurs au contact ; en fin de séchage, les graisses sont imprégnées de substances odorantes que l'on extrait avec de l'alcool. Les huiles essentielles utilisées en massage sont souvent extraites par macération. La macération crée une «huile parfumée» et non une huile essentielle.

La masse végétale est trempée, puis chauffée. L'huile est ensuite utilisée pour des produits comme les huiles de massage et parfois dans la cuisine.



SAHLA MAHLA  
المصدر الأول للطالب العربي



**1.2.1.4. Extraction par le CO<sub>2</sub> supercritique :** Ce procédé se décompose selon les étapes suivantes :

- 1- La plante est introduite dans l'extracteur
- 2- Le CO<sub>2</sub> est acheminé vers l'extracteur après avoir été comprimé sous plusieurs dizaines de bars et chauffé de 30°C à 40 °C maximum.
- 3- Le liquide présent dans l'extracteur se charge ainsi en composé extrait, puis il est détendu.
- 4- Le CO<sub>2</sub> retrouve alors une forme gazeuse qui lui permet de se séparer de l'extrait à proprement dit ; cette opération a lieu dans un séparateur.
- 5- L'extrait est récupéré par décantation alors que le CO<sub>2</sub> est recyclé par condensation pour être stocké de nouveau sous forme liquide.

Les avantages de cette extraction sont : on obtient des extraits 100% naturels, sans trace de solvant et étant donné la faible température (40°C), tous les composés, même les plus fragiles, sont préservés. De ce fait, les propriétés thérapeutiques du produit final sont très proches du produit brut. L'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique est donc actuellement le moyen le plus écologique et technologique d'obtenir des actifs végétaux de très haute qualité.

#### **1.2.1.5. L'extraction assistée par ultra-sons (UAE, Ultrasonic Assisted Extraction)**

Principe de d'extraction UAE : Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 16 KHz à 1 GHz pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. Dans un milieu liquide, la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression) [16]. Cette différence de pression va générer des mouvements moléculaires au sein du milieu. Lors d'un cycle de raréfaction la distance entre molécules est augmentée et au-dessus d'une certaine distance, dépendant de chaque milieu, des bulles de cavitations vont se former. Ces bulles vont croître pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression. La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité d'énergie [19]. Lorsque les bulles de cavitation sont formées à proximité d'une surface solide (Fig. II- 3) elles deviennent asymétriques, et l'implosion qui en résulte produit des jets de liquide projetés à très grande vitesse vers la surface du solide, ainsi qu'une augmentation locale de la température et de la pression. Dans le cas d'une matrice végétale, ces jets de liquides vont percer les parois végétales et permettre ainsi la libération des molécules dans le milieu liquide [16] En effet, l'extraction peut être réalisée de manière très simple en utilisant un bain à ultra-sons - ce qui par-ailleurs permet d'effectuer plusieurs extractions simultanément - ou via une sonde ultrasonore combinée à un agitateur [2, 16]. De plus, l'effet mécanique des ultra-sons sur la matrice végétale induit une meilleure pénétration du solvant dans les cellules, ce qui améliore ainsi le transfert de masse et augmente le rendement d'extraction et la cinétique d'extraction.

#### **1.2.1.6. L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME, Solvent-Free Microwave Extraction) :** La SFME développée par Lucchesi et al. [29, 30] est une technique « verte », simple et rapide qui permet d'extraire les huiles essentielles sans solvant et sans eau à pression atmosphérique. Cette technique combine l'effet de l'énergie micro-ondes et de l'hydrodistillation. L'échauffement de l'eau (100 – 150 °C) constitutive du matériel végétal frais induit une rupture des glandes riches en huiles essentielles, qui sont ensuite entraînées par la vapeur d'eau produite vers un système de réfrigération situé au-dessus du four micro-onde. Les huiles essentielles sont par la suite récupérées dans un essencier. Pour améliorer la cinétique d'extraction le matériel sec peut être légèrement humidifié avant extraction. D'un point de vue comparatif, la SFME (30 min) est plus rapide que l'hydrodistillation (4.5 h), pour la même quantité d'huile essentielle extraite. Néanmoins l'huile essentielle obtenue par SFME diffère de celle obtenue par hydrodistillation avec plus de composés oxygénés et moins de monoterpènes et moins de d'antioxydants.

- **Calcul du rendement :**

• **Différentes rendements d'huiles essentielles pour différentes plantes.**

Les rendements sont très faibles en comparant entre le poids du végétal et la quantité en huiles essentielles, obtenue **quelques soient les méthodes d'extraction**.

Certaines H.E. sont plus difficiles à extraire (*Geranium rosat*, Rose de Damas, Immortelle/Hélichryse ...). D'où le prix élevé de toutes les huiles essentielles et encore plus élevé pour certaines d'entre elles.

Prenons comme exemple la rose :

- **1 400 000 roses = 5 tonnes de roses = 1 hectare de rosier => donne 1 Kg d'H.E.**
- **100 kg de lavandes => donne 1 Kg d'H.E.**

Plantes	Rendement en kg de plante pour obtenir 1 kg d'HE	Coût
<i>Cannelle de Ceylan-écorce</i>	250	380
<i>Cyprès- rameaux jeunes avec peu de bois</i>	250	40
<i>Eucalyptus – feuilles</i>	35	20
<i>Girofle- clou (bouton floral desséché)</i>	10	45
<i>Lavande officinale (vraie) épi en fleur</i>	200	190
<i>Mélisse officinale-feuille</i>	6700	3500
<i>Menthe poivrée-feuille et sommité fleurie</i>	500	50
<i>Rose pâle- pétale (rosa centifolia)</i>	5000	4000
<i>Rose de Bulgarie-pétale (rosa damascena)</i>	6250	25000

### 1.2.1.7. Les points à vérifier pour une huile essentielle

#### a) La « certification botanique » d'une huile essentielle

Regardez sur l'étiquette l'appellation botaniquement certifiées de la plante, origine de l'huile essentielle : **le genre, l'espèce et le mode de culture**. Le genre et l'espèce peuvent être renseignés en français mais il est primordial qu'ils soient aussi **renseignés en latin**.

Exemple : Pour la lavande, le genre est « *Lavandula* ». Pour ce genre, il existe deux espèces :

*Lavande vraie, relaxante et régénératrice (Lavandula angustifolia)*

*Lavande aspic, spécifiquement anti-toxique (Lavandula latifolia)*.

Le mode de culture peut être biologique.

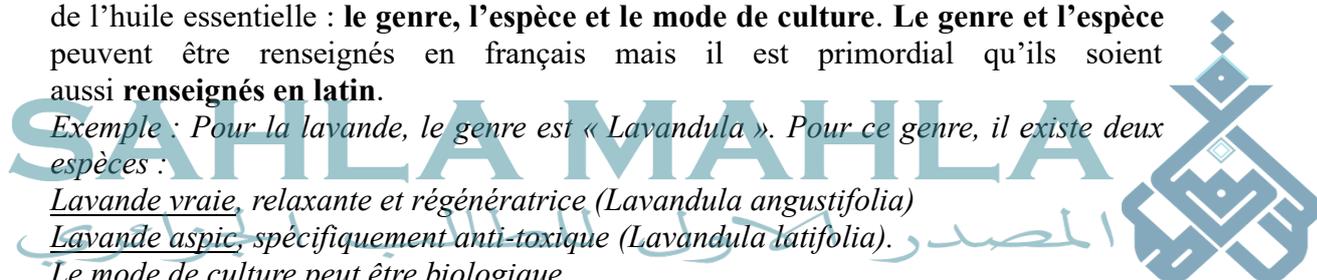
#### b) L'origine géographique des huiles essentielles

Les vertus thérapeutiques d'une huile essentielle dépendent de son lieu de culture (ensoleillement, climat, composition des sols, altitude,...).

Selon l'endroit où a été cultivée une plante donnée, l'huile essentielle extraite aura des **vertus thérapeutiques différentes, des spécificités biochimiques différentes**. C'est ce que l'on appelle le **chénotype** d'une huile essentielle. C'est grâce à une analyse du chénotype (analyse chromatographique) qu'on peut déterminer les vertus thérapeutiques d'une huile essentielle.

#### c) Le mode de culture des huiles essentielles

Regardez sur l'étiquette de l'huile essentielle le **type de culture** qui est inscrit. Vous serez renseigné si la **plante est sauvage** ou **cultivée** et si elle est issue d'une **culture biologique** (avec le logo obligatoire) ou non. Privilégiez le mode de culture sauvage en premier, biologique en deuxième avec logo obligatoire.



#### d) La partie de la plante distillée

Là encore, les vertus thérapeutiques sont différentes selon **la partie distillée de la plante**.

*Par exemple, l'écorce de cannelle de Ceylan ne contient pas la même essence que les feuilles du même arbre.*

Les parties à distiller d'une plante sont : gousses (ail), bois (bois de rose), racines (angélique), écorce (bouleau), zestes (citron), fruits (poivre), feuilles (romarin), etc.

#### e) Le mode d'extraction des huiles essentielles

Regardez sur l'étiquette de l'huile essentielle le mode d'extraction utilisé pour récolter l'huile essentielle. L'extraction utilisée va **jouer sur la composition de celle-ci**. Le mode le plus utilisé est la **distillation**.

#### f) Sa qualité : Huile essentielle 100 % naturelle, pure et complète (ou intégrale)

##### f.1) L'huile essentielle doit être 100 % naturelle.

C'est-à-dire que l'huile essentielle doit être composée seulement de **molécules aromatiques**. L'huile essentielle doit seulement être composée de la **première partie du « liquide » qui résulte de la distillation** de la plante en question (pour la seconde partie du « liquide », il s'agit de l'hydrolat).

##### f.2) L'huile essentielle doit être 100% pure.

C'est-à-dire que l'huile essentielle **ne doit pas être coupée** avec une autre substance telle que les huiles végétales, une autre huile essentielle proche, l'alcool, de l'eau ...

##### f.3) L'huile essentielle doit être 100% complète.

C'est-à-dire que l'huile essentielle doit rester comme quand elle est sortie du processus de distillation, en d'autres termes, elle ne doit **pas être rectifiée**.

#### 1.2.1.8. Conservation des huiles essentielles

Elles sont fragiles, et nécessitent d'être protégées de l'air et de la lumière.

Les changements brutaux de température et leur mélange avec de l'alcool, leur chauffage au-delà de 40°C les altèrent également.

Les HE sont à conserver hors de portée des enfants, dans un placard sec (pas dans la salle de bain), entre 5 et 20°. Elles doivent être conservées à l'abri de la lumière, dans des flacons teintés ou des flacons d'aluminium. Les HE sont souvent conditionnés dans des flacons de 10, 5 ou 50 ml.

Attention à bien les refermer pour éviter l'évaporation.

En bonnes conditions, les HE se conservent 5 ans et les essences d'agrumes, 3 ans.

#### 1.2.1.9. Utilisations sanitaires (exemples)

- Les HE sont à l'étude pour éloigner les mouches charbonneuses, qui piquent les animaux domestiques<sup>11</sup>, et ainsi éviter l'usage d'insecticides.

- Les HE sont utilisées en raison de leurs propriétés stimulantes ou inhibitrices notamment sur les microbes (désinfection) et les activités cellulaires des plantes ou animaux.

- Les HE servent par exemple comme produits phytosanitaires pour combattre dans les cultures végétales les infections fongiques ou bactériennes ou virales. Elles apportent des solutions en agriculture biologique, réduisant les effets néfastes des pesticides de synthèse comme la pollution ou le développement de résistances.

- À l'instar de ce qui est fait pour l'homme, les HE entrent aussi dans la composition de traitements pour les animaux, chez qui ils permettent par exemple de réduire

l'apparition des résistances aux antibiotiques conventionnels, ou limiter les effets secondaires.

### 1.2.20. Utilisations industrielle (exemples)

- Les industries de la parfumerie, des arômes et de la cosmétique sont les principales consommatrices d'huiles essentielles. Ce sont en effet les produits de base utilisés pour ajouter des odeurs, en raison de leur forte volatilité et du fait qu'elles ne laissent pas de trace grasse. Dans l'agro-alimentaire on utilise aussi des HE pour incorporer aux aliments des saveurs.
- Les huiles essentielles sont très employées pour parfumer les produits cosmétiques : savons, shampoings, gels-douches, crèmes cosmétiques et/ou hydratantes, etc.
- Le secteur des produits ménagers (détergents et lessives par exemple) consomme beaucoup d'huiles essentielles pour masquer les odeurs, souvent peu agréables, des produits purs.
- L'utilisation des huiles essentielles dans les arômes alimentaires est croissante. Les arômes sont omniprésents de nos jours : ils sont utilisés comme exhausteur de goût dans divers produits : café, thés, tabacs, vins, yaourts, plats cuisinés, etc.

### 1.2.21. Dilution des Huiles essentielles

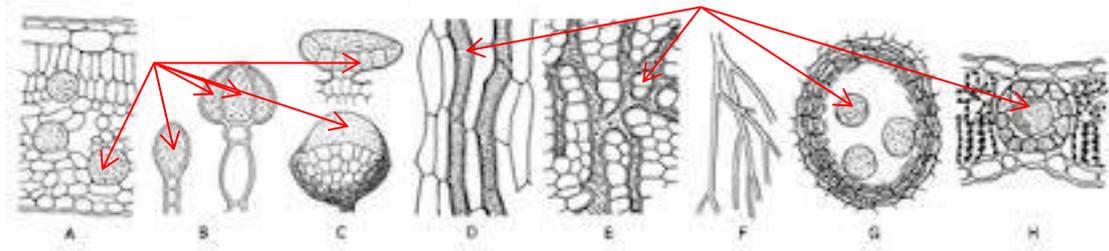
Les huiles essentielles sont concentrées et tout de même assez chères. Pour les utiliser en aromathérapie, il faut normalement les mélanger à une huile végétale. De nombreuses huiles végétales peuvent servir à cette fin. Les plus fréquemment employées sont :

- Les huiles d'olive
- Les huiles de pépins de raisin
- Les huiles d'amande douce
- Les huiles de tournesol
- Les huiles de germe de blé
- Les huiles d'avocat
- Les huiles d'argan
- Les huiles de macadamia
- Les huiles d'arachide, les huiles d'abricot etc.

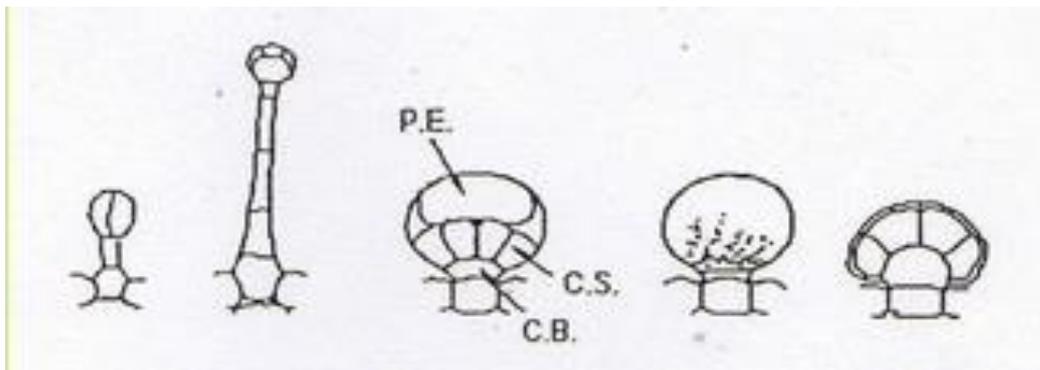
### 1.2.22. Localisation des cellules sécrétrices d'HE dans les plantes

Les essences des plantes sont sécrétées par des cellules spéciales, localisées au niveau de l'épiderme, souvent à la base d'un poil. Elles sont aussi présentes dans les feuilles (menthe/verveine/basilic/estragon), dans les fleurs (lavande/jasmin/ylang ylang ...), dans les racines (vétiver, HE de la tranquillité ...), dans les fruits (piment/poivre ...), dans la résine (cannabis/myrrhe/térébenthine ...), dans le bois (santal/camphre ...), dans les boutons fleuris (girofle ...).



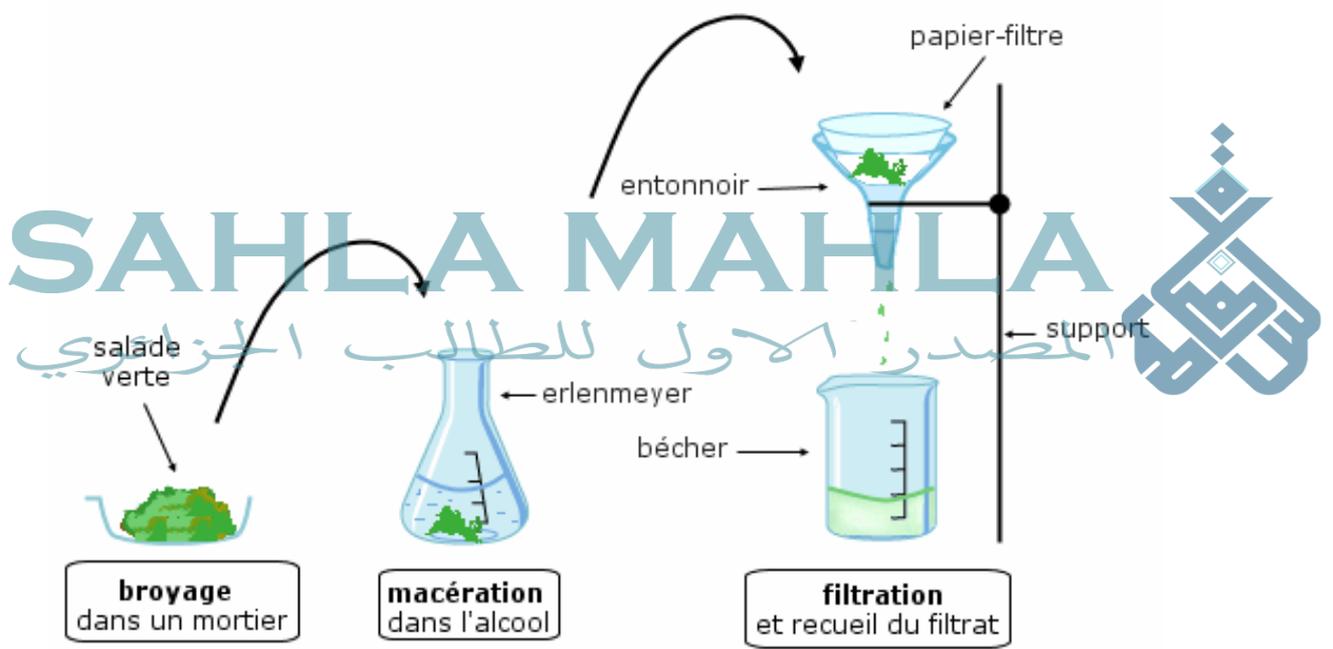
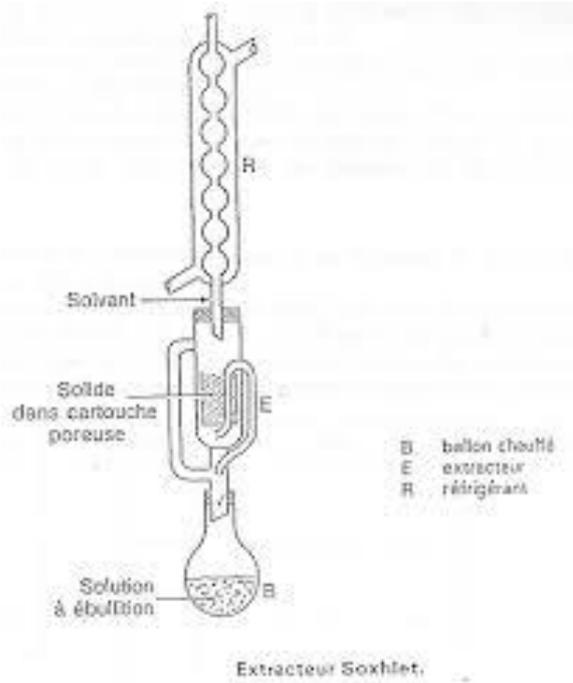


**Canaux glandulaires:** Ces structures sont toujours composées de **cellules sécrétrices (C.S)** déversant leur production d'essence dans une **poche (P.E)** ou un **canal à essence (C.E)**.



## 1.2. Extraction solide-liquide des substances bioactives

**1.2.2. Extraction par solvants au Soxhlet :** c'est une méthode classique. L'échantillon entre rapidement en contact avec une portion de solvant pur, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. De plus, elle ne nécessite pas de filtration après extraction et peut être utilisée quel que soit la matrice végétale. Ses inconvénients les plus significatifs sont la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée (devant être ultérieurement évaporé), ce qui limite sa rentabilité économique et la rend peu écologique. Il n'y pas de possibilité de travailler à froid, ce qui peut être gênant avec des substances sensibles à la chaleur. Cette technique est limitée d'un point de vue de la sélectivité du solvant et n'est pas facilement automatisable.



**Exemple :** extraction de la chlorophylle :

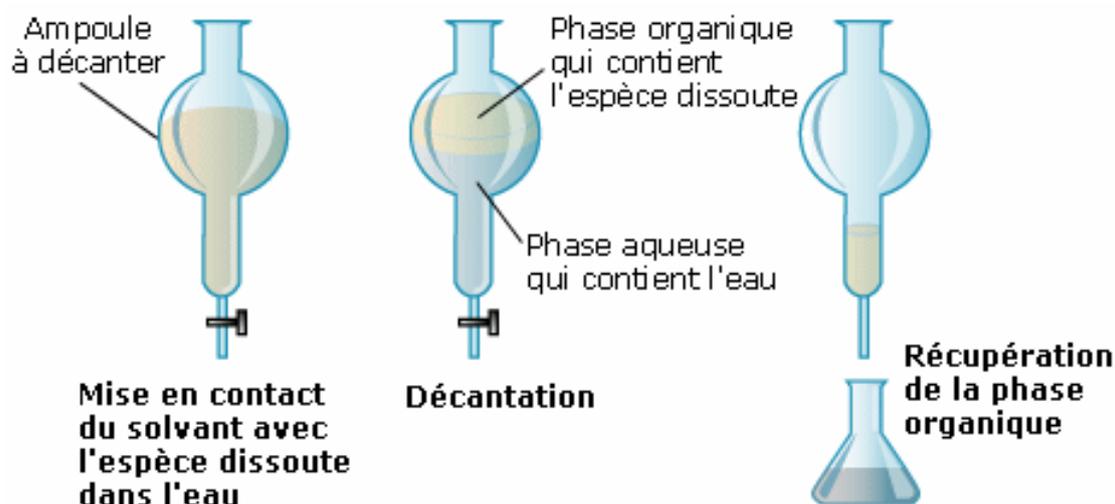
**1.2.3. Extraction liquide-liquide**

L'extraction d'une substance chimique d'un solvant **A** vers un autre solvant, dit **extracteur**, **B** est basé sur la plus **grande solubilité de la substance** à extraire dans le solvant B, en utilisant une **ampoule à décantier**.

Une autre condition est nécessaire. Il doit exister une **différence de densité** entre les solvants A et B pour qu'ils ne soient **pas miscibles** :

La densité d'un liquide par rapport à l'eau est égale au rapport de la masse **m** d'1 L du liquide par la masse **m<sub>0</sub>** d'1 L d'eau :  $d = m/m_0$ . La densité s'exprime par un nombre

Le liquide le **moins dense** se retrouve **au-dessus** de l'autre liquide non miscible.  
Si le solvant A est l'eau ( $d = 1,00$ ) et que le solvant B est l'acétone ( $d = 0,79$ ) alors l'eau (plus dense) se trouvera dans la phase inférieure de l'ampoule à décantier. On l'appellera **phase**



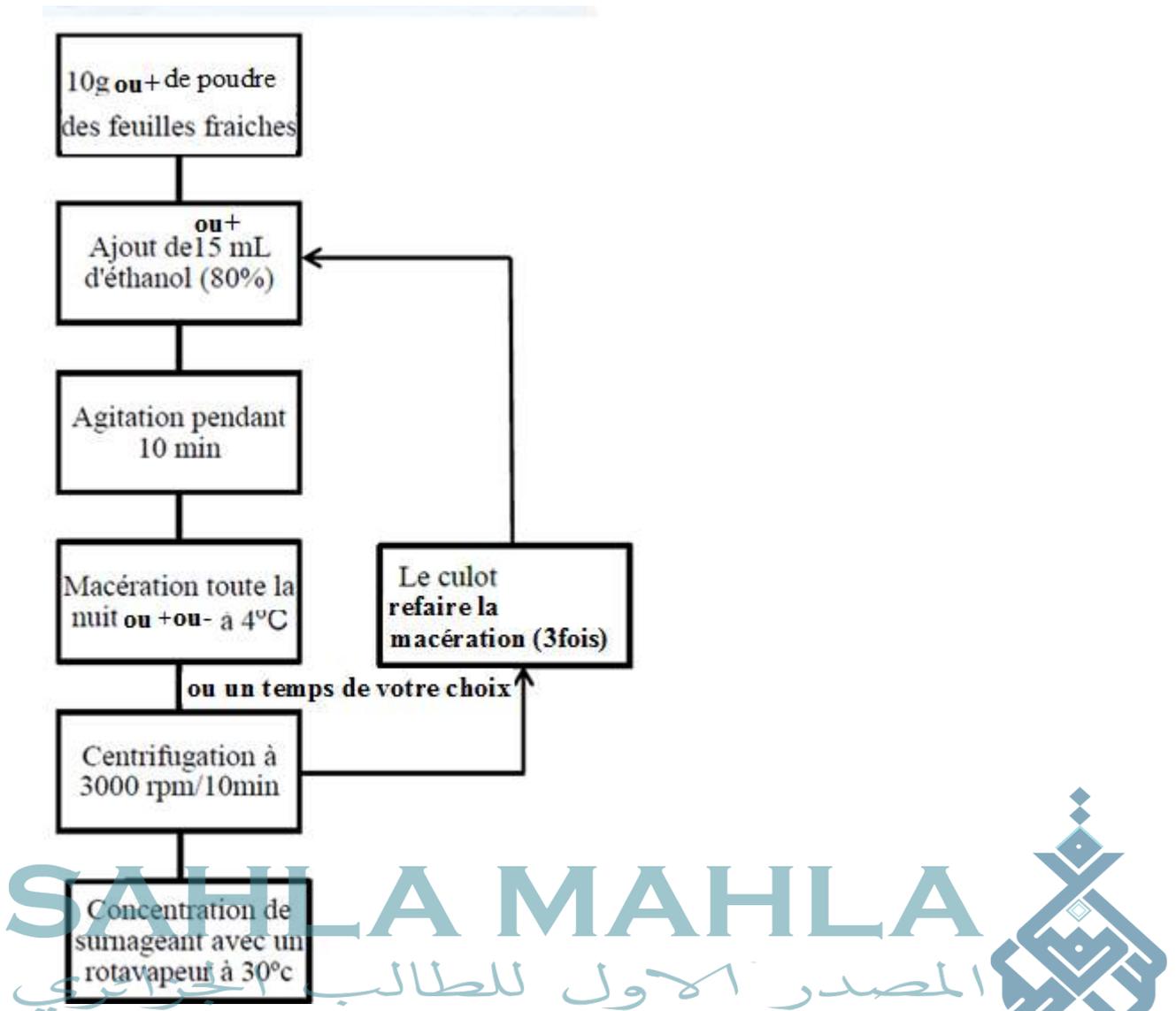
### 1.2.2. Extraction des polyphénols

**Extraction par macération** : Pour extraire les polyphénols de différentes parties d'artichaut par macération, par le protocole décrit par Romani et al. [5] qui consiste en la macération de la poudre végétale à température ambiante pendant 2,5 h (X fois) avec V ml de solutions aqueuses des solvants : éthanol, acétone, méthanol à 70 % v/v et eau ou une autre composition de solvants. Après filtration sur un tissu mousseline, les filtrats sont centrifugés pendant 20 min à 4000 t/min à température ambiante, filtrés sur papier filtre N° 1 et conservés à 4 °C jusqu'à utilisation.

**Extraction par décoction** : L'extraction des polyphénols par décoction a été effectuée selon le protocole décrit par Chavane et al. [16] : m g de poudre sont ajoutés à V ml de solvant d'extraction (éthanol, acétone et méthanol à 70 % v/v dans l'eau et eau) ou une autre composition de solvants. Chaque mélange est porté à ébullition dans un bain Marie durant 30 min puis filtré sur un tissu mousseline. Les marcs sont extraits de la même manière que précédemment et les filtrats sont réunis, centrifugés à 4000 tr/min pendant 20 min et conservés à 4 °C jusqu'à utilisation.

- **Extraction des composés phénoliques totaux** selon la technique décrite par Bozzi et ses collaborateurs (2007).

10 g d'échantillon sont mélangés avec 15 mL d'éthanol (80%), puis agités pendant 10 min et laissés macérer toute la nuit à 4°C, et subis une centrifugation à 3000 rpm /10 min, le surnageant obtenu est concentré à l'aide d'un rotavapeur à 30°C (figure 11). Cette étape est répétée deux fois. L'extrait obtenu est reconstitué dans l'éthanol (80%) (Figure 4).



**1. Rendement d'extraction** est calculé par la formule donnée par Falleh et al. [17] :  $R (\%) = 100 \text{ Mext}/\text{Méch}$ . Où : R est le rendement en %; Mext est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg et Méch est la masse sèche de l'échantillon végétal en mg.

## 2. Dosage des polyphénols (teneure):

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (FC) [18] : 100  $\mu\text{l}$  d'extrait végétal sont mélangés avec 500  $\mu\text{l}$  du réactif FC et 400  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 7,5 % (m/v). Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant dix minutes et l'absorbance est mesurée à 760 nm par un spectrophotomètre UV (Perkin Elmer).

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

**3. Dosage des Flavonoïdes** : La détermination des flavonoïdes totaux a été effectuée selon la méthode décrite par Dehpeur et al. [19] :  $v\mu\text{l}$  de chaque extrait à analyser sont ajoutés à 3 $v\mu\text{l}$  de méthanol à 95 %,  $v/5\mu\text{l}$  de  $\text{AlCl}_3$  ou  $\text{FeCl}_3$  à 10 % (m/v),  $v/5\mu\text{l}$  d'acétate de sodium 1 M et 2,8 ml d'eau distillée. Le mélange est agité puis incubé à

l'obscurité et à température ambiante pendant 30 min. Le blanc est réalisé par remplacement de l'extrait par du méthanol à 95 % et l'absorbance est mesurée à 415 nm en utilisant un spectrophotomètre UV (Perkin Elmer). Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine ou un autre flavonoïdes et étalon.

**4. Dosage des Tanins condensés :** Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide décrite par Ba et al. [20] : Le réactif de vanilline a été préparé en mélangeant à volume égal : HCl à 8 % (v/v), le méthanol à 37 % (v/v) et 4 % de vanilline dans du méthanol (m/v). Le mélange a été maintenu à 30 °C avant le dosage. 200 µl de chaque extrait à analyser ont été ajoutés à 1 000 µl de réactif de vanilline ; le mélange a été agité puis incubé à l'obscurité à 30 °C pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 500 nm par un spectrophotomètre UV (Perkin Elmer) contre un blanc constitué d'un mélange de méthanol (37 %) et de HCl (8%) à volume égal. Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchol/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage du catéchol.

#### **5. Dosage des tanins totaux**

L'estimation de la teneur en tanins totaux contenus dans les extraits est réalisée par la méthode de Hagerman et Butler (1989).

Les tanins sont connus par leur propriété principale, qui est la précipitation des protéines en fonction des facteurs liés au milieu réactionnel (pH, température et temps). L'utilisation de la BSA dans le dosage des tannins en milieu acide a pour but de séparer ces derniers des autres polyphénols présents dans l'extrait. Le chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) réagit avec les tannins (en milieu alcalin : SDS/TEA pour former des chélates de couleur violette. la préparation des solutions utilisées est plus détaillée dans l'annexe (04).

1mL d'extrait et 2mL de la solution de BSA (1mg/mL) préparés dans le tampon acétate 0,4M, pH= 6) ont été mélangés. Après 24 heures d'incubation à 4°C, le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 20 min. Le précipité est dissout dans 4mL de la solution tampon : SDS/TEA et mis à l'obscurité pendant 15mn ,1mL de la solution de chlorure ferrique (0,1N) est ajouté, après une incubation de 15 min, la lecture de l'absorbance est effectuée à 510 nm.

La concentration en tannins est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage préparée avec l'acide tannique (Annexe 03). Les concentrations sont exprimées en mg équivalent de l'acide tannique par 100g du PF (mg Eq AT/100gdu PF).

#### **6. Dosage des anthocyanes**

L'estimation de la teneur en anthocyanines est réalisée par la méthode de Çam et ses collaborateurs (2009).

Le dosage des anthocyanines est effectué selon la méthode du pH différentiel. Cette méthode utilise la propriété des anthocyanes à être sous une forme colorée et sous une forme incolore en fonction du pH du milieu. La fonction phénolique n'étant pas affectée par cette variation du pH, donc les autres composés phénoliques n'interfèrent pas, et par conséquent, la variation de la couleur est proportionnelle à la teneur en anthocyanines.

Cette méthode utilise deux systèmes tampon : Le chlorure de potassium à 0,025 M (pH1 = 1,0) et l'acétate de sodium à 0,4 M (pH2 = 4,5). 0,4 mL d'extrait est mélangé avec 3,6 mL de chaque solution tampon. Les absorbances sont mesurées à 510 et à 700 nm.

L'absorbance qui correspond aux anthocyanines est calculée comme suit :

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH 1} - (A_{510} - A_{700})_{pH 2}$$

La concentration en anthocyanines, exprimée en mg équivalent de cyanidine-3-glucoside par 100 g du PF, est calculée selon l'équation suivante :

$$[\text{Anthocyanines}] = A \times MM \times 100 / AM$$

A : absorbance;

MM : masse moléculaire de la cyanidine-3-glucoside (449,2 g/mol);

AM : coefficient d'absorbance molaire (26900 mol.cm. L).

### 7. Dosage des caroténoïdes

L'estimation de la teneur en caroténoïdes totaux contenus dans les extraits est réalisée selon la méthode de Yolanda et ses collaborateurs (2007).

2 g d'échantillon sont homogénéisés avec 20 mL du mélange de solvants suivant : (hexane/acétone/éthanol, 2:1:1). Après agitation pendant 30min, la phase supérieure est récupérée et protégée de la lumière par du papier aluminium, 10 mL d'hexane sont ajoutés et une deuxième extraction réalisée. Le mélange des deux extractions est centrifugé pendant 5 min à 6500 rpm.

La teneur en caroténoïdes est déterminée par la mesure de l'absorbance de l'extrait hexanique à 420 nm. Les concentrations des caroténoïdes sont estimées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la  $\beta$ - carotène comme standard d'étalonnage (Annexe 03). Les concentrations sont exprimées en mg équivalent de la  $\beta$ -carotène par 100 g du PF (mg Eq  $\beta$ -carotène /100 g du PF).

### 8. Type d'extraction :

Les solvants qui peuvent être utilisés dans l'extraction solide-liquide ou liquide-liquide :

On peut schématiquement classer les **solvants** par **polarité croissante** et présenter en regard les classes de substances potentiellement extractibles:

• **éther de pétrole, hexane, cyclohexane** : favorisent l'extraction de carbures, de lipides, de stérols, d'essences, de cires, de lécithines, de caroténoïdes, de lactones les moins polaires...

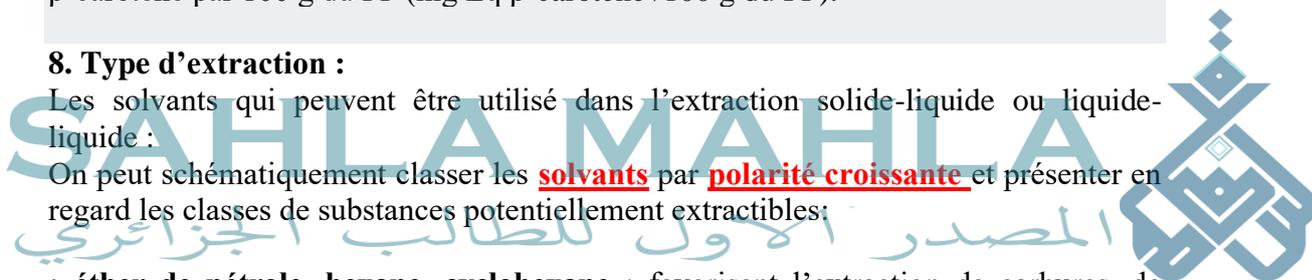
• **toluène, chloroforme, chlorure de méthylène** : favorisent l'extraction de chlorophylles, caroténoïdes, pigments divers, résines et oléorésines, aglycones (flavonoïdes, anthraquinones, coumarines...), alcaloïdes bases, lactones, terpènes peu oxygénés...

• **acétate d'éthyle, acétone, méthanol, alcool de titre variable, eau par ordre de polarité croissante** : favorisent l'extraction de terpénoïdes, stéroïdes, phénols, lactones, hétérosides (flavonoïdes, anthraquinones, quinones, coumarines...), alcaloïdes, polyols, tanins, saponosides, acides organiques, sels minéraux, acides aminés

• **eau froide** : favorisent l'extraction de protéines, acides aminés, gommes, mucilages, sels minéraux

• **eau bouillante** : favorisent l'extraction de amidon, inuline, pectines.

Le solvant d'extraction est ensuite décanté, centrifugé et filtré avant de réaliser une distillation destinée à obtenir l'extrait à la concentration voulue. La solution est ensuite généralement séchée par nébulisation, afin de recueillir un extrait sec dépourvu de toute trace de solvant.



Des techniques plus modernes d'extraction se développent, faisant appel à l'utilisation de gaz à l'état supercritique comme solvants.

### 10. Les paramètres capables d'influencer le calcul du rendement et le dosage des substances bioactives sont les suivants:

- type de drogue
- nature du solvant
- quantité de la matière végétale
- type d'extraction
- procédé de fabrication (durée, température, pression etc.)
- type d'appareil (extracteur, pression...)

### 11. La standardisation

Standardiser consiste à **uniformiser les procédures de qualité à toutes les étapes de fabrication, depuis la drogue de départ jusqu'à l'extrait, afin d'aboutir à un standard spécifié.**

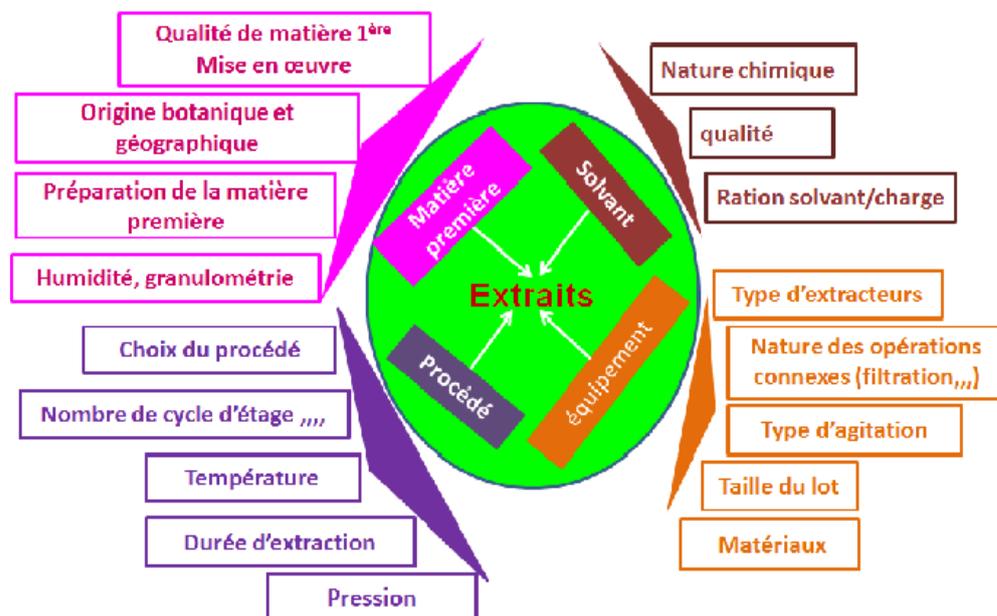
Tous les paramètres influant sur la qualité du produit (extrait, produit fini) doivent être définis et respectés et concernent la drogue de départ (son origine, ses procédés de culture, la partie de plante, son identité, sa pureté, sa teneur), mais aussi la nature et la concentration du solvant d'extraction, le procédé de fabrication (macération/percolation, température, durée, pression lors de la fabrication, procédé de séchage, contrôles en cours de fabrication). Les demandes d'AMM font de plus en plus souvent appel à une standardisation de tous ces paramètres.

### 12. La normalisation

Si l'ensemble des constituants participant à l'activité thérapeutique est connu, la standardisation peut être renforcée d'une normalisation:

Normaliser consiste à créer une norme déterminée dans le cas d'une drogue ou d'un extrait, en précisant à la fois une teneur minimale, mais aussi une teneur maximale, rapportée à la substance ou à un groupe de substances déterminant(e) pour l'activité.

### 13. Principaux paramètres influent sur la qualité d'un extrait (Lang, 1999).



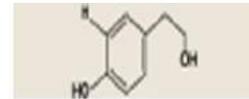
Les polyphénols ont tous des propriétés antioxydantes liées à leur structure chimique. La majorité d'entre eux appartiennent aux familles ci-dessous:

- › Les acides phénoliques et phénols simples
- › Les proanthocyanidines (dont les OPC: oligo-proanthocyanidines= flavonoides)
- › Les acides hydroxycinnamiques
- › Les hydroxystilbènes (dont le Resvératrol)
- › Les tanins

Origin :  
Olive

**Phenols  
Simples**

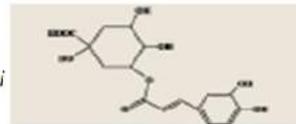
ex : Tyrosol



Origin : Café  
vert

**Acides  
Hydroxycin-  
namiques**

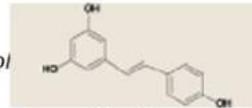
ex : Acide  
chlorogeni-  
que



Origin :  
Raisin

**Stilbenoïdes**

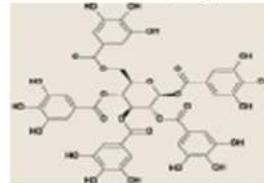
ex :  
Resveratrol



Origin :  
Châtaignier,  
noix...

**Tanins  
Hydrolysables**

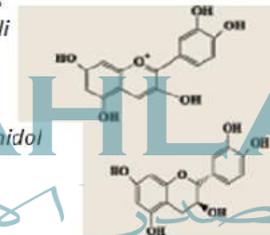
ex : Tanin  
Gallique



Origin :  
Potentille,  
pépins de  
raisin

**Tanins  
condenses**

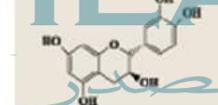
ex :  
Oligomères  
pro-yanidoli-  
ques



Origin :  
Framboise,  
myrtille,  
fraise...

**Anthocyanes**

ex : Cyanidin



SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



## EXTRACTION ET DOSAGE DES ELEMENTS CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES

### 1- Dosage des protéines par la méthode de Kjeldahl (A.O.A.C. no. 960.52. 2000)

On introduit dans un matras de minéralisation 1 g d'échantillon et une pincée de catalyseur (sulfate de cuivre et de potassium), puis on ajoute 15 mL d'acide sulfurique pur et on applique un chauffage progressif ; d'abord une attaque à froid pendant 15 mn jusqu'à l'apparition de vapeur blanche d'anhydride sulfurique, puis le chauffage est rendu plus énergique, attaque à chaud pendant 4 à 5 heures. Quand la solution devient limpide, elle est refroidie et complétée à 100 mL avec de l'eau distillée. La distillation est réalisée dans un distillateur semi-automatique (VELP) en ajoutant 20 mL de lessive de soude à 35 % dans le matras et 25 % d'acide borique dans une fiole de 250 mL. L'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique contenant l'indicateur coloré (le réactif de TACHIRO) (mélange de bleu de méthylène et rouge de méthyle). L'excès d'ammoniac est alors dosé par l'acide sulfurique 0,05 N dans un titreur automatique.

La teneur en azote total est déterminée par la formule suivante

$$N(\%) = \frac{C_0 \times 2 \times V \times 14}{P}$$

Avec :

- C<sub>0</sub> : Normalité de l'acide sulfurique (0.05) ;
- V : Volume de l'acide sulfurique versé (mL) ;
- P : Poids de la prise d'essai (g).

La teneur en protéines est calculée en multipliant le taux d'azote total N (%) par le coefficient 6,25.

### 2- Dosage des lipides par la méthode de Soxhlet

Les lipides sont des substances naturelles, constituants des structures cellulaires tels que les phospholipides, les glycolipides membranaires, éléments de revêtement (cires, cutines, etc. ), les substances de réserve , sources d'énergie cellulaire. On les appelle couramment huiles, graisses, beurres. La distinction entre graisses et huiles est purement arbitraire car basée sur l'état physique à température ambiante :

- **huiles pour les liquides** : -les lipides simples (acides gras, glycérides, cérides) - les lipides complexes (phospholipides, glycolipides)

- **graisses pour les solides et les pâtes** : Substance lipidique onctueuse, fondant entre 25°C et 50°C, d'origine animale ou végétale. On parle de :

- suif (graisse des ruminants)
- Lard (graisse des porcines: porc, sanglier, rhinocéros) -saindoux (graisse fondue des porcins)
- Le beurre : de lait de mammifères représente 3 à 10% des matières grasses du lait.

#### Classification des lipides :

- Les lipides non polaires, totalement insolubles dans l'eau et qui ne forment pas de films monomoléculaires (le carotène, le limonène, le géraniol ou encore le squalène).

- Les lipides polaires partiellement ou totalement solubles (es triacylglycérols, diacylglycérols et le cholestérol, les phospholipides, monoacylglycérols et acides gras ionisés , les sels biliaires et lysophospholipides)

**Principe** de l'extraction des lipides : Les lipides sont solubles à chaud ou à froid dans les solvants organiques tels que l'éther de pétrole, l'éther-diéthylique, l'hexane, l'acétone, l'éthanol, le chloroforme, le méthanol, etc. En pratique l'hexane et l'éther de pétrole à chaud sont les plus couramment utilisés. On utilise pour cela un solvant à reflux dans extracteur de type SOXHLET. Les vapeurs chaudes du solvant traversent la mouture dans une cartouche, se condensent plus haut dans un réfrigérant et retombent dans la cartouche contenant la mouture. Il y a alors macération et extraction des huiles de la mouture.

Lorsque le solvant remplit la cartouche, il y a siphonnage et le solvant retombe dans le ballon d'ébullition. Le cycle continu jusqu'à l'extraction complète de la matière grasse. Le solvant contenu dans le ballon est alors saturé des huiles extraites. Il suffit alors d'évaporer le solvant à l'aide d'un appareil ROVAPOR pour recueillir les huiles et récupérer le solvant qui pourrait être réutilisé plusieurs fois.

### Matériels

- Extracteur Soxhlet (chauffe ballon et cartouche)
- Balance de précision
- Broyeur de type waring blendor
- Dessiccateur
- Hexane (500 ml)
- Sésame ou Arachide

### Protocole d'extraction des lipides

La capacité de l'hexane à solubiliser est donc utilisée pour les extraire au solvant organique. La détermination des matières grasses est faite dans cette manipe selon la méthode d'extraction par le SOXHLET en utilisant l'hexane ou l'éther de pétrole comme solvant. Broyer dans un waring blendor les graines de sésame jusqu'à l'obtention d'une mouture très fine et très homogène ( $\phi = 0.3-0.5$  mm).

Peser avec précision 50 g de la mouture en notant le poids exact dans la cartouche qui suffira pour l'extraction. Placer alors la cartouche dans le Soxhlet en l'ayant recouvert avec du coton ou avec un linge propre et sec. Peser le ballon qui servira à recouvrir le solvant et y introduire 500 ml hexane. Réaliser alors le montage de l'appareil en suivant le schéma décrit. Alimenter le réfrigérant avec le cryostat thermostaté à 0-4°C. Avant de commencer la manipulation, faites vérifier le montage par l'assistant. Brancher alors la prise du chauffe -ballon et régler la température à 60°C ( éviter les surchauffes). Effectuer 4-6 siphonnages. Débrancher le chauffe-ballon. Arrêter le cryostat. Démontez l'appareil (en présence de l'assistant). Chasser alors par distillation la majeure partie du solvant à l'aide de l'évaporateur rotatif (ROTAVAPOR) pour éviter l'ébullition de l'huile qui à la longue pourrait modifier les indices d'acidité. Le ballon contenant les lipides est placé à l'étuve pendant 30 min à 103°C, puis au dessiccateur pendant 30 min. Une série de pesées sont réalisées, toujours après avoir séché le ballon à l'étuve

puis au dessiccateur jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le poids des lipides est obtenu par la différence entre le poids final et le poids initial du ballon.

$$MG(\%) = \frac{(P2 - P1)}{P3} \times 100$$

La teneur en matière grasse est déterminée selon la formule suivante :

Avec :

- P1 : poids du ballon vide (g);
- P2 : poids du ballon avec l'huile extraite (g);
- P3 : poids de la prise d'essai (g).

### 3-Extraction des sucres totaux des végétaux

Dosage spectrophotométrique des sucres totaux et des sucres réducteurs Principe En milieu acide et à chaud, les liaisons glycosidiques des carbohydrates sont hydrolysées. Les oses simples ainsi libérés subissent une déshydratation intramoléculaire pour des dérivés furfuraux (furfural ou hydroxyméthyl furfural). La fonction aldéhyde des furfuraux se condense ainsi en milieu acide avec l'hydroxyl d'un composé phénolique (Figure 1) pour donner des acétals ou héli-acétals de couleur rougeâtre qui absorbent dans le visible (450-500 nm). Cette méthode permet ainsi de doser tous les glucides totaux d'un matériel biologique. Les sucres réducteurs sont dosés par une méthode colorimétrique avec le réactif à l'Acide 3,5-Dinitrosalicylique (DNS). C'est une réaction d'oxydo-réduction non stœchiométrique permettant de quantifier les sucres réducteurs. Dans cette réaction, la fonction aldéhyde du sucre libre (réducteur) est transformée en fonction carboxylique par le DNS (oxydant). L'absorbance du DNS oxydé est lue à 546 nm.

#### Matériels et réactifs

- Bain -marie
- Spectrophotomètre UV-visible
- Tubes à essais
- Centrifugeuse
- Plaques chauffantes
- Solution de phénol : 5% (p/v) dans l'eau
- Acide sulfurique à 75%
- Réactif au DNS

Solution A= 2g de DNS dispersé dans 40 ml d'eau distillée

Solution B. 3.2 g de NaOH dissout dans 30 ml d'eau

Les deux solutions A et B sont mélangées et on y ajoute 60 g de tartrate double de sodium et de potassium. Dissolution du mélange peut nécessiter un léger chauffage sur une plaque chauffante. Après dissolution, le volume est ajusté à 100ml avec l'eau.

- Solution standard de maltose à 0.05 mg /ml pour les sucres totaux
- Solution de maltose à 0.5 mg/ml pour les sucres réducteurs

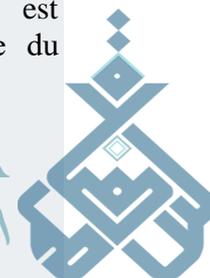
#### Mode opératoire

- a. Etablissement des courbes d'étalonnage

Tableau 1. Courbe d'étalonnage pour les sucres totaux

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب العربي



Réactif /tube	T=0(Blanc)	T=1	T=2	T=3	T=4	T=5
Maltose (0.05mg/ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
H2O (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Phénol (5%) (ml)	0.5	0.50	0.5	0.5	0.5	0.5
H2SO4	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml
Incubation bain marie bouillant	15 min					
Incubation à l'obscurité	15min					

Réactif /tube	T=0(Blanc)	T=1	T=2	T=3	T=4	T=5
Calcul conc. maltose						
Absorbance A 492nm						

-Tracer la courbe  $A_{492} = f([\text{maltose}])$ ; et donner l'équation de la droite.

Tableau 2. Courbe d'étalonnage pour les sucres réducteur

Réactif /tube	T=0 (Blanc)	T=1	T=2	T=3	T=4	T=5
Maltose (0.5mg/ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
H2O (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Réactif DNS (ml)	1	1	1	1	1	1
Incubation bain marie bouillant	8 min					
Calcul conc. maltose						
Moy A546 O						

-Tracer la courbe  $f([\text{maltose}]) = A_{546}$  ; et donner l'équation de la droite.

### b. Préparation et dosage des échantillons à analyser

1 g de farine d'échantillon est dispersé dans 10 ml de DMSO à 25% (v/v) dans l'eau. Le mélange est incubé au bain marie bouillant pendant 15 min. 0.1 ml de ce mélange est dilué dans 9.9 ml d'eau.

- Dosages des sucres totaux. A 0.5 ml de ce dernier, on ajoute 0.5 ml de phénol (5%).

Après homogénéisation, on ajoute 2 ml de H2SO4 (75%). Ce mélange est ensuite traité comme précédemment décrit pour le standard. Faire l'essai en triplicate.

- Dosage des sucres réducteurs. 0.1 ml de l'échantillon préalablement dispersé dans le DMSO sont mélangés avec 0.4 ml d'eau distillée. La solution est ensuite mélangée avec 1 ml du réactif au DNS puis incubé au bain comme précédemment décrit pour le standard.

Faire l'essai en triplicate.

Calculer la proportion des sucres totaux et des sucres réducteurs dans l'échantillon

Discuter les résultats

### 5- Dosage des éléments minéraux par Spectroscopie d'Absorption Atomique (SAA)

La teneur en éléments minéraux des échantillons étudiés a été déterminée selon la méthode décrite par Boss et Freedon (1989).

Dans un tube contenant 1mL d'acide chlorhydrique, on dissout 1g des cendres obtenues par incinération du matériel végétal et on ajoute avec précaution 10mL d'eau distillée; la solution obtenue est chauffée pendant quelques minutes au bain-marie bouillant (100°C) jusqu'à la dissolution complète des cendres. Enfin dans une fiole jaugée de 100 mL, on verse la solution, puis on complète à 100mL avec de l'eau distillée. A partir de cette solution le dosage des éléments minéraux suivant : le plomb, le chrome, le zinc, le fer, le cuivre, le manganèse, le cadmium en se référant à des courbes d'étalonnages.

**Exemple de technique de dosage: Comparaison du dosage spectrophotométrique des protéines par la méthode de Bradford/Sedmak et par la méthode de Kjeldahl.**

### Méthode de Bradford :

#### Principe

Le dosage des protéines en solution par la méthode de Bradford est basé sur l'interaction en milieu acide, entre les protéines et le Coomassie Brilliant Bleu G250 (CBBG-250) . le CBBG-250 réagit plus spécifiquement avec les acides aminés basiques (K, R, H) mais il interagit avec les autres acides aminés. De ce fait plus la concentration en protéine est élevée, plus l'absorbance à 450 nm baisse, et l'absorbance à 620 nm augmente. Ainsi, le ratio de l'absorbance à 620 sur l'absorbance à 450 est fonction de la concentration protéique.

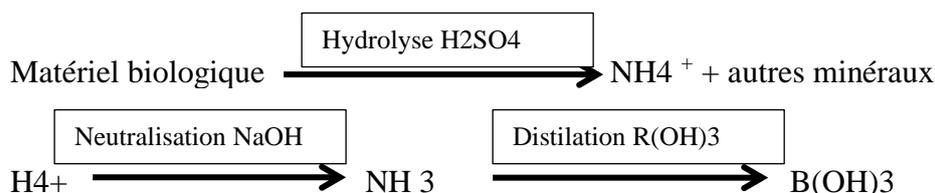
### Méthode de Kjeldal :

#### Principe

$A_{450}/A_{620}=f(\text{protéine})$

Le tracé de cette courbe nous donne une droite de la forme  $y = ax$  (si on soustrait le blanc) ou une droite de la forme  $y = ax + b$  (sans soustraction du blanc).

Le dosage des protéines par la méthode de Kjeldahl est basé sur la minéralisation totale de la matière biologique en milieu acide, suivie de la distillation de l'azote sous forme d'ammoniac. En effet, le matériel biologique est minéralisé dans l'acide sulfurique concentré (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à chaud (500-600°C) pendant 5-10 heures en présence du catalyseur de la digestion (mélange de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> et sélénium ; ce dernier est de moins en moins utilisé à cause de sa toxicité). Le dosage de l'azote s'effectue selon les étapes suivantes :



A la fin de la minéralisation l'azote se trouve sous la forme minérale [(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)<sub>2</sub>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>]. Afin de pouvoir distiller l'azote par entraînement à la vapeur d'eau, il faut d'abord neutraliser l'acide sulfurique et transformer l'azote sous d'ammoniac gazeux (NH<sub>3</sub>). Au cours de la distillation l'azote de l'ammoniac (Base de Léwis possédant un doublet électronique) est entraîné à la vapeur d'eau et piégé dans l'acide borique : B(OH)<sub>3</sub> qui est un acide de Léwis (possédant une orbitale

vacante). L'ammoniac est piégé dans l'acide borique à travers une liaison dative :

$\text{NH}_3 \rightarrow \text{B}(\text{OH})_3$ , est ensuite titré avec une solution faible (0.1N) d'acide sulfurique. La quantification de l'azote total permet d'extrapoler pour estimer la quantité de protéines. On admet d'une manière générale que :

-la masse des protéines végétales = masse d'azote x 6.25

-la masse des protéines animales = masse d'azote x 5.75

### Matériels et réactifs du dosage

-Spectrophotomètre UV-visible

-Tubes à essais, Centrifugeuse

-Bleu de Coomassie G250

-Acide sulfurique concentré

-NaOH 10 N

-Phénophtaléine (1% dans l'éthanol)

-Tablet de catalyse de minéralisation :  $\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4$

-Acide perchlorique ( $\text{HClO}_4$ )

-Sérum Albumine bovin

-Acide borique (1.6 g /litre d'eau distillée)

### Modes Opératoires

#### a. Préparation du bleu de Coomassie.

La solution de CBBG-250 (Sigma nr. B-1131) est préparée à une concentration de 0.06% (p/v) dans une solution d'acide perchlorique à 3 % (p/v). La solution est laissée sous agitation pendant 24 h, puis filtrée. La solution est ajustée pour donner une DO de 1.3-1.5 à 450 nm, à l'aide d'une solution d'acide perchlorique à 3 % (p/v). Le réactif, stocké à l'abri de la lumière, pourrait être conservé pendant plus de 10 ans.

#### b. Préparation de la courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines

La protéine standard utilisée pour le dosage des protéines est le bovin serum albumin (BSA) à une concentration de  $50 \cdot \mu\text{g/ml}$  dans l'eau distillée).

**Tableau 1. Préparation de l'étalon**

Tube	blanc	1	2	3	4
5	6				
BSA (50 $\mu\text{g/ml}$ ) en ml	0	0.1	0.2	0.4	0.6
0.8	1				
Eau distillée	1	0.9	0.8	0.6	0.4
0.2	0				
Réactif Bleu de Coomassie	1	1	1	1	1
1	1				
A620					
A450					

Après avoir ajouté le réactif, les DOs sont lues dans les 2-5 min qui suivent.

Tracer la courbe :  $A_{450}/A_{620} = f(\text{protéine})$

#### c. Extraction des protéines de l'échantillon et dosage

- Solution d'extraction : 7.5 g de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) sont mélangés à 225 µl de β-mercapto-éthanol, le tout compléter à 500 ml avec l'eau.

La solution d'échantillon est obtenue par dissolution de 5 g du matériel biologique dans 12.5 ml de la solution d'extraction. Cette solution est ensuite centrifugée à 5 000 r/m pendant 5 min.

Après centrifugation, le surnageant recueilli. Filtrer le surnageant avec un papier filtre ou à défaut un papier lotus, juste pour retenir les particules solides et diluer le surnageant 10 fois. Le dosage s'effectue comme suit :

**Tableau : dosage de l'échantillon :**

Tube	blanc	1	2	3
Echantillon (ml)	0	0.1	0.1	0.1
Solution d'extraction contenant				
le réactif : <b>DNS</b>	0.01	0	0	0
Eau	0.990	0.9	0.9	0.9
Réactif au Bleu de Coomassie	1	1	1	1
A620				
A450				

-Calculer la concentration protéique de l'échantillon en vous basant sur la courbe d'étalonnage déjà établie. ??

-Pourquoi mettons dans le blanc le SDS dans les mêmes proportions que votre échantillon ???

**SAHLA MAHLA**

المصدر الأول للطلاب الجزائري

