



**HAL**  
open science

# Mise au point d'une méthodologie de fractionnement d'extraits bruts issus de végétaux aquatiques

Léa Juillard-Condat

► **To cite this version:**

Léa Juillard-Condat. Mise au point d'une méthodologie de fractionnement d'extraits bruts issus de végétaux aquatiques. Chimie. 2022. hal-04183767

**HAL Id: hal-04183767**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04183767v1>**

Submitted on 21 Aug 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Limoges  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
Master 1 Chimie Parcours Substances Naturelles

---

## Mise au point d'une méthodologie de fractionnement d'extraits bruts issus de végétaux aquatiques

---

*Tutrices : Carmen MALEPEYRE, Juliette ROSEBERY*

CENTRE DE VALORISATION DES AGRORESSOURCES (CVA)  
Rue Robert Margerit  
19100 Brive-La-Gaillarde



**Léa JUILLARD-CONDAT**  
*Stage : Avril-Juillet 2022*

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier vivement, tout d'abord, l'équipe ECOVEA de l'INRAE de Bordeaux pour m'avoir accepté en tant que stagiaire pour ce projet, pour leur confiance dans les missions confiées. Je pense particulièrement à Juliette ROSEBERY, chercheuse en écologie et tutrice de mon stage pour sa disponibilité, pour son suivi à distance, pour les échanges précieux qui m'ont permis l'élaboration de ce rapport de stage.

Je remercie également le Centre de Valorisation des Agro-ressources (CVA) pour m'avoir accueilli durant ce stage de Master 1 Chimie Parcours Substances Naturelles d'avril à juillet 2022 pour effectuer ce projet externe. J'ai apprécié les valeurs qu'il porte ainsi que l'ensemble de son équipe.

Mes remerciements s'adressent particulièrement à Carmen MALEPEYRE, directrice du CVA et tutrice de mon stage pour son accueil, pour sa disponibilité, pour son aide, pour sa régularité dans le suivi de ce stage ainsi que pour la relecture de ce rapport de stage.

Je suis reconnaissante envers Julien CELERIER, Responsable Développement R&D, pour m'avoir accordé de son temps en partageant son savoir, pour la clarté de ses explications lors de l'encadrement et le suivi de ce stage, et pour la relecture de mon rapport. Sa disponibilité, la transmission de sa passion et de son savoir m'ont été très bénéfiques. Ses conseils très précieux ont enrichi mes connaissances et mes compétences scientifiques.

Je tiens à remercier toute l'équipe du CVA avec qui j'ai travaillé au quotidien, je pense donc à Pierre DELJARRY, Laura AUBLET, Laura BELOT, Maëlle LEBREAUD et Laureen CRAPET ainsi qu'à Stéphanie VALLERIN, responsable Conception actifs chez SOREDEC pour leur gentillesse, leur bonne humeur, leur soutien, leur conseil et leur aide tout au long de ce stage.

Je remercie également Vincent CHALEIX, professeur à l'Université de Limoges pour m'avoir orienté vers Carmen MALEPEYRE pour la réalisation de ce stage.

Cette riche expérience m'a permis d'acquérir de nouvelles aptitudes et connaissances qui me seront indispensables pour mon futur avenir professionnel.

## SOMMAIRE

Liste des figures .....	
Liste des tableaux .....	
Abréviations .....	
CONTEXTE.....	
PRESENTATION DE L'ENTREPRISE D'ACCUEIL.....	
I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
I-1) Présentation générale des deux plantes aquatiques étudiées .....	1
I-1)A) <i>Lagarosiphon major</i> .....	1
I-1)B) <i>Egeria densa</i> .....	2
I-2) Composition chimique et effets biologiques de certaines plantes aquatiques.....	2
I-3) Les saponines : un exemple de composés d'intérêt.....	3
I-3)A) Définition.....	3
I-3)B) Structure des saponines.....	3
I-3)C) Caractéristiques particulières des saponines .....	5
I-3)D) Applications industrielles et commerciales .....	5
I-4) Les polyphénols : un autre exemple de composés d'intérêt .....	5
I-4)A) Définition.....	5
I-4)B) Classification des polyphénols.....	6
I-4)C) Rôle et intérêt des polyphénols .....	6
I-4)D) Applications industrielles et commerciales .....	7
I-5) Méthodes de fractionnement des métabolites secondaires .....	7
I-5)A) Extraction liquide-liquide .....	7
I-5)B) Résine d'adsorption XAD.....	7
I-5)C) Chromatographie d'exclusion stérique .....	8
II- MATERIELS ET METHODES .....	9
II-1) Matériel végétal.....	9
II-1)A) Collecte et séchage des plantes aquatiques .....	9
II-2) Préparation de l'« extrait brut ».....	10
I-3) Caractérisation des extraits .....	11
II-3)A) Matière sèche.....	11

II-3)B) Dosages colorimétriques.....	11
II-4) Fractionnement des extraits bruts.....	12
II-4)A) Extraction liquide/liquide .....	13
II-4)B) Ultrafiltration (UF) .....	13
II-4)C) Résine d'adsorption XAD .....	14
II-4)D) Chromatographie d'exclusion stérique.....	14
III- RESULTATS / DISCUSSION .....	15
III-1) Caractérisation des extraits bruts .....	15
III-1)A) Matière sèche .....	15
III-1)B) Rendements d'extraction.....	15
III-1)C) Composition en molécules d'intérêt.....	15
III-2) Mise au point des méthodes de fractionnement.....	16
III-2)A) Concentration micellaire critique des saponines pour l'UF .....	16
III-2)B) Adsorption des polyphénols sur la résine d'adsorption .....	17
III-3) Caractérisation des fractions obtenues .....	18
III-3)A) Rendements d'extraction.....	19
III-3)B) Caractérisation des fractions .....	19
CONCLUSION .....	24
Annexe 1 : Protocoles des différents dosages .....	26
Annexe 2 : Courbes d'adsorption des saponines sur la résine XAD.....	30
Bibliographie.....	31

## Liste des figures

Figure 1 : Organigramme des salariés du CVA .....	
Figure 2 : Lagarosiphon major .....	1
Figure 3 : Egeria densa.....	2
Figure 4 : Structure de saponines .....	3
Figure 5 : Structure des saponines triterpéniques.....	4
Figure 6 : Exemple de saponines stéroïdiques .....	4
Figure 7 : Structure d'une classe de polyphénols .....	6
Figure 8 : Schéma des différentes classes de polyphénols.....	6
Figure 9 : Broyeur à couteaux (RETSCH SM 300) vu d'extérieur (a) et d'intérieur (b).....	9
Figure 10 : Réacteurs a) échelle laboratoire b) échelle pilote .....	10
Figure 11 : Principe du dosage des oses neutres par la méthode de Dubois .....	12
Figure 12 : Appareil d'ultrafiltration utilisé pour fractionner les saponines .....	14
Figure 13 : Graphique représentant la composition en molécules d'intérêt dans les extraits des deux plantes.....	16
Figure 14 : Evolution de l'absorbance du bleu de méthylène en fonction de la concentration en traits d'E. densa (bleu) et L. major (orange).....	17
Figure 15 : Evolution de la concentration en polyphénols non adsorbés sur la résine au cours du temps chez E. densa (bleu) et L. major (orange).....	18
Figure 16 : Graphique présentant les rendements d'extraction des différentes fractions chez les deux plantes.....	19
Figure 17 : Graphique représentant les concentrations en polyphénols dans les diverses fractions des deux plantes .....	20
Figure 18 : Graphique représentant la proportion de polyphénols dans les diverses fractions pour les deux plantes .....	21
Figure 19 : Graphique représentant les concentrations en saponines dans les diverses fractions des deux plantes .....	22
Figure 20 : Graphique représentant la proportion de saponines dans les diverses fractions chez les deux plantes .....	23
Figure 21 : Evolution de la concentration en saponines non adsorbées sur la résine au cours du temps chez E. densa (bleu) et L. major (orange).....	30

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Membres du Bureau du CVA.....	
Tableau 2 : Composition chimique et effets biologiques retrouvés dans la littérature chez certaines plantes aquatiques .....	2
Tableau 3 : Récapitulatif des choix des différentes méthodes de fractionnement .....	8
Tableau 4 : Conditions expérimentales des extractions en réacteur des deux plantes aquatiques .....	10
Tableau 5 : Préparation des solutions filles pour le dosage des polyphénols totaux .....	26
Tableau 6 : Préparation des milieux réactionnels pour le dosage des polyphénols totaux .....	26
Tableau 7 : Préparation des solutions filles pour le dosage des flavonoïdes .....	27
Tableau 8 : Préparation des milieux réactionnels pour le dosage des flavonoïdes .....	27
Tableau 9 : Préparation des solutions filles pour le dosage des saponines .....	27
Tableau 10 : Préparation des milieux réactionnels pour le dosage des saponines .....	28
Tableau 11 : Préparation de la gamme étalon de glucose pour la méthode de Dubois .....	28
Tableau 12 : Préparation des milieux réactionnels pour le dosage des sucres neutres .....	28

## Abréviations

AG : Assemblée Générale

AVRUL : Agence pour la Valorisation de la Recherche Universitaire en Limousin

BECAME : BioactivE Compounds in Aquatic invasive Macrophytes : Ecological insights and potential industrial applications

CA : Conseil d'Administration

CE : Chromatographie d'exclusion

CMC : Concentration Micellaire Critique

CVA : Centre de Valorisation des Agro-ressources

ECOVEA : Ecologie des Communautés VEgétales Aquatiques)

E. densa : *Egeria densa*

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (fusion de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) et de l'Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA))

IUT : Institut Universitaire de Technologie

LCSN : Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

L. major : *Lagarosiphon major*

MeOH : Méthanol

MP : Matières Premières

MS : Matière Sèche

Rpm : Round Per Minute

T°C : Température

UF : Ultrafiltration



## CONTEXTE

Dans le cadre de mon Master 1 Chimie Parcours Substances Naturelles effectué au sein de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Limoges, j'ai eu l'opportunité de réaliser mon stage de fin d'année au sein du Centre de Valorisation des Agro-ressources (CVA) situé à Brive-La-Gaillarde dans le cadre d'un projet financé par l'INRAE de Bordeaux. Ce stage est d'une durée de quatre mois. Le CVA est un centre de transfert de technologies, spécialisé dans le domaine de la valorisation de coproduits végétaux pour des applications cosmétiques, alimentations santé humaine et animale et biocontrôle.

La mission de mon stage fait partie intégrante du projet EXOBIO, financé par des fonds Carnot Eau & Environnement, en partenariat avec l'équipe ECOVEA de l'INRAE de Bordeaux. Ce dernier vise à valoriser une ressource produite à partir des milieux aquatiques tout en participant à la protection de la biodiversité de ces écosystèmes. Les lacs aquitains ont été récemment colonisés par des macrophytes exotiques, notamment *Egeria densa* et *Lagarosiphon major* affectant la biodiversité et les usages de ces lacs. Aujourd'hui ces plantes ne sont pas valorisées du fait de la contrainte logistique liée à l'opération. Dans les faits, elles sont généralement simplement épandues à proximité des zones de récoltes pour limiter au maximum les coûts de transport. L'élimination de ces plantes dans les lacs du Bassin aquitain, bien que nécessaire, représente donc aujourd'hui une réelle charge économique.

Partant du fait que les hydrophytes aquatiques constituent une source potentielle de molécules d'intérêt, l'idée de ce travail R&D, qui a commencé en 2018, a donc été de rechercher de nouvelles voies de valorisation à plus forte valeur ajoutée via l'identification de substances bioactives dans ces plantes pour des applications telles que la nutraceutique, les cosmétiques, ou la phytopharmaceutique (agents de biocontrôle...).

L'évaluation du potentiel des extraits d'*Egeria densa* et *Lagarosiphon major* en tant que solution de biocontrôle a été mis en œuvre dans le projet EXOBIO. Cette évaluation vise à faire face à deux problématiques en Nouvelle-Aquitaine : le développement des pathogènes de la vigne d'une part et le développement de cyanobactéries toxiques dans les eaux de baignade d'autre part. La littérature a montré que des extraits végétaux peuvent être riches en saponines pour le biocontrôle des pathogènes de la vigne et en polyphénols pour inhiber la croissance algale dont en particulier les cyanobactéries. Les travaux réalisés dans le cadre de ce stage concernent principalement la propriété anti-algale des extraits.

L'an dernier, des premiers résultats ont pu être obtenus dans le cadre d'un stage INRAE de Master 2 réalisé dans un projet précédent intitulé BECAME. Ces travaux avaient abouti à la mise en évidence d'une action inhibitrice d'un extrait d'une de ces plantes (*L. major*) sur l'activité photosynthétique d'une culture de *Microcystis aeruginosa*, souche de cyanobactérie toxique typique des lacs aquitains, ainsi que sur sa capacité à produire des toxines. Actuellement, le projet EXOBIO a pour objectif de confirmer cette action inhibitrice par des approches de métabolomique, plus sensibles que les mesures exploratoires portant sur l'activité photosynthétique. Les activités des extraits des deux plantes (*L. major* et *E. densa*) vont être évaluées contrairement au projet BECAME où seulement une plante avait été étudiée. Avant le début de mon stage, des tests à différentes concentrations en extraits bruts de ces plantes ont été mis en place sur des cultures de *Microcystis aeruginosa* par un stagiaire de Master 2. Ils sont poursuivis en ce moment et les résultats permettront d'évaluer les différences d'activité entre les deux plantes afin de sélectionner celle qui présentera le plus grand potentiel de valorisation. A partir de là, le stagiaire de M2 travaillera dans un second temps, sur une dizaine de fractions de la plante afin d'en déterminer la fraction active. Ces fractions seront alors caractérisées par des techniques d'élucidation structurale.

Mon stage s'inscrit en étroite collaboration avec le stagiaire de M2. En effet, le but des travaux que je réalise consiste à fractionner les différents groupes de métabolites présents dans les extraits bruts de ces deux plantes. Ces différentes fractions seront ensuite fournies à l'équipe de l'INRAE de Bordeaux pour que leurs activités sur les cyanobactéries puissent être évaluées.

Les procédés utilisés, déterminés au préalable à la lumière de la recherche bibliographique menée, consisteront à séparer ces composés moléculaires par différentes techniques chromatographiques (chromatographie d'exclusion moléculaire ou chromatographie liquide sur gel de silice), extraction liquide/liquide, résine d'adsorption, ultrafiltration. Ces techniques ont pour but d'isoler à la fois les saponines et les polyphénols majoritaires dans ces extraits. Dix fractions pourront être analysées par l'INRAE.

Dans ce rapport, après avoir présenté la structure d'accueil et son historique dans le projet, les différentes techniques de séparation des molécules cibles décrites dans la bibliographie seront détaillées. La seconde partie présentera le matériel et les méthodes sélectionnées au cours de ce stage. Les résultats obtenus seront présentés et discutés dans une troisième partie afin de les analyser et d'en déduire des perspectives.

## **PRESENTATION DE L'ENTREPRISE D'ACCUEIL**

- **Historique du CVA**

Le Centre de Valorisation des Agro-ressources a été créé en 2010 suite à des études de marché réalisées en 2007 et en 2010. Les conclusions émises avaient montré l'intérêt pour la Région Limousin de développer un volet « chimie verte du végétal et ingrédients naturels » au travers de la création du centre de transfert de technologie, le CVA. C'est à partir de 2013 que le CVA a intégré ses propres locaux à Brive-La-Gaillarde. Auparavant, c'est-à-dire de 2010 à 2013, le CVA était adossé au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de l'Université de Limoges, maintenant devenu le Laboratoire PEIRENE. Le CVA était alors inscrit dans le département plateforme de l'AVRUL. Ainsi durant ces 3 ans, le CVA était incubé à l'IUT Génie Biologique de Limoges dans une antenne du LCSN. C'est à partir de janvier 2013 que le CVA s'est structuré en Association loi 1901 et a intégré ses propres locaux à Brive-La-Gaillarde en septembre 2013. Le CVA occupe toujours ces mêmes locaux.

- **Activités**

Le CVA est un centre technique qui propose trois grands types d'activités :

- La valorisation de coproduits végétaux issus de l'industrie agroalimentaire, l'agriculture, l'industrie forestière, ... par procédés d'éco-extraction permettant ainsi d'offrir ses services aux entreprises extérieures,

- L'accompagnement des entreprises dans leur projet de valorisation de coproduits végétaux en les aidant à réaliser une veille scientifique, des analyses qualitatives et quantitatives de molécules, des procédés d'éco-extraction de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote et des tests biologiques d'activité,

- Des services de formation ainsi qu'une mise à disposition des locaux et des équipements.

- **L'organigramme du CVA**

Les statuts du CVA prévoient que la structure soit organisée de la manière suivante :

- Un Conseil d'Administration (CA), lui-même constitué de 10 membres actifs élus et de 11 membres de droit (membres fondateurs du CVA, essentiels des Institutions) décide des axes stratégiques développés par la structure. Les membres actifs sont constitués paritairement de

représentants du secteur privé et du secteur public (5 membres du privé et 5 membres du public). L'INRAE de Bordeaux est membre élu du CA du CVA depuis l'AG du mois de juin 2021 et est représenté par Juliette ROSEBERY, coordinatrice du projet EXOBIO.

- Un Bureau désigné parmi les membres du CA est composé de 6 membres (Tableau 1) :

Tableau 1 : Membres du Bureau du CVA

Fonction	Nom Prénom	
Président	Frédéric MAS	Président de SOREDEC, groupe Sothys
Vice-président	Vincent SOL	Ancien directeur du Laboratoire Peirene
Trésorier	Eric CHAMBOULIVE	Président de XYLEX Groupe Bois et Dérivés
Secrétaire	Marie-Christine FARGES	Elue CCI19, Présidente de NOVAPOLE, Présidente des Minoteries FARGES
Expert scientifique du secteur public	Tan-Sothea OUK	Enseignant chercheur du Laboratoire PEIRENE
Expert scientifique du secteur privé	Jean-Pierre MEUNIER	Co-fondateur de ALFAPROTEI

Une équipe opérationnelle salariée composée de 7 personnes œuvre au quotidien pour appliquer les stratégies et décisions prises par le CA. Actuellement, le CVA est constitué de cinq salariés et deux apprenties (Figure 1) et est dirigé depuis janvier 2018 par Carmen MALEPEYRE.



Figure 1 : Organigramme des salariés du CVA

\*En apprentissage  
V3 maj le 02/05/2022

- **Historique de l'implication du CVA dans le projet EXOBIO**

Le CVA travaille sur le sujet de la valorisation de ces plantes invasives depuis 2018. Les premières opérations de R&D avaient été réalisées dans le cadre d'une collaboration scientifique entre l'INRAE de Bordeaux, à ce moment-là encore IRSTEA et le laboratoire

PEIRENE qui avait redirigé l'étude vers le CVA. Une demande de financement de thèse avait été demandée pour la suite de ce projet. Elle aurait dû démarrer en fin d'année 2019, seulement le financement n'avait pas été accordé. Néanmoins, un financement collaboratif via un dispositif de financement LABEX COTE avait pu être accordé pour le projet (2019/2020/2021). Ce projet portait l'acronyme « BECAME » pour Bioactive Compounds in Aquatic invasive Macrophytes: Ecological insights and potential industrial applications. Les laboratoires impliqués dans ce projet étaient l'INRAE de Bordeaux Nouvelle Aquitaine, l'UMR BIOGECO, le laboratoire PEIRENE, le CVA et le syndicat mixte Géolandes.

Le CVA avait pour mission d'identifier et d'extraire des biocomposés d'intérêt à partir de ces deux macrophytes en vue de leur valorisation. L'INRAE devait évaluer ces extraits via une approche allélopathique.

L'étude réalisée depuis 2018 a permis de caractériser et de déterminer de nouvelles voies de valorisation de ces macrophytes. À la suite de ces travaux, en 2020 le CVA avait proposé de concentrer ses efforts sur l'extraction des polyphénols et des saponines issues de ces deux plantes. Deux extraits optimisés en concentration et en rendements ont pu être ainsi développés sur les deux plantes. Ces extraits dits « extraits bruts » dans ce rapport ont été évalués pour la première fois par l'INRAE en 2021 sur les cyanobactéries.

L'objet de ce travail consiste donc à fractionner ces extraits dans le but d'identifier les fractions actives sur les cyanobactéries.

# **I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I-1) Présentation générale des deux plantes aquatiques étudiées**

La plupart des espèces végétales sont bénéfiques pour l'Homme. Cependant, il existe une petite fraction d'espèces particulières. En effet, certaines plantes sont dites envahissantes, c'est-à-dire qu'elles possèdent une grande capacité de colonisation qui dans certaines circonstances en font des espèces invasives. D'après l'ANSES, ces plantes peuvent avoir un impact néfaste sur l'environnement, la biodiversité et présentent potentiellement un risque pour la santé de l'Homme. C'est pourquoi, de nos jours, un grand nombre de plantes invasives sont arrachées mais ces dernières ont la capacité de se multiplier rapidement par simple bouturage lors des campagnes de fauchage.

Ainsi, dans la suite de ce rapport, on s'intéressera plus particulièrement à deux espèces de plantes envahissantes très présentes dans les lacs littoraux Aquitains : *Lagarosiphon major* et *Egeria densa*. Ces deux espèces de plantes envahissantes appartiennent à la famille des *Hydrocharitaceae* vivant dans les eaux stagnantes et à faible courant. Chacune d'entre elles possèdent diverses caractéristiques (Centre de Ressources Espèces Exotiques Envahissantes, 2016).

### **I-1A) *Lagarosiphon major***

La plante aquatique *Lagarosiphon major* ou Elodée d'Afrique est une espèce majeure au vu de sa taille élevée. Cette dernière est originaire d'Afrique Australe et est utilisée à la base comme plante d'aquarium d'eau douce (Figure 2) (Aquaportail).



Figure 2 : *Lagarosiphon major*

*Lagarosiphon major* est une plante aquatique immergée et enracinée, on la nomme alors hydrophyte fixée. Elle possède des rhizomes et ses tiges peuvent atteindre trois mètres de longueur. Elle présente de longues feuilles allant de 1 à 2 cm, fortement arquées vers l'arrière et insérées en spirale sur la tige (Invasive Species Compendium, 2008). Cette espèce a la capacité de coloniser une large gamme de milieux aquatiques et s'implante de préférence au sein des eaux stagnantes ou dans des eaux à faible courant. *Lagarosiphon major* a la capacité de persister dans les eaux turbides.

En ce qui concerne sa propagation, l'allongement du rhizome contribue à l'extension locale des herbiers, et le sommet des tiges étant très cassant, les fragments libérés représentent autant de boutures qui peuvent coloniser des nouveaux sites (Aquaportail).

### **I-1)B) *Egeria densa***

La plante aquatique *Egeria densa* ou Elodée dense a été nommée ainsi du fait de ses feuilles disposées en verticilles serrés (Figure 3). C'est une plante d'aquarium très courante et est originaire des zones subtropicales d'Amérique du Sud.



Figure 3 : *Egeria densa*

*Egeria densa* est une plante submergée d'eau douce à longue durée de vie poussant dans des eaux peu profondes. Les tiges d'*Egeria densa* sont de formes cylindriques, traînantes et produisent des racines à intervalles le long de la tige. Les feuilles sont de forme ovale, généralement de 1,5 à 4 cm de long, de 2 à 5 mm de large avec un sommet aigu, et se trouvent en groupes (COOK and URMI-KÖNIG, 1984).

La reproduction végétative est le mode de propagation privilégié de cette plante, les fragments se dispersent grâce aux courants puis s'enracinent.

### **I-2) Composition chimique et effets biologiques de certaines plantes aquatiques**

Etant donnée une littérature très peu développée sur *L. major* (aucune référence répertoriée à ce jour) et *E. densa*, des recherches ont été effectuées à partir d'autres plantes aquatiques. Ainsi, de nombreuses plantes aquatiques possèdent une diversité de composés intracellulaires dont la teneur peut être variable suivant la plante choisie (d'une même espèce). Du fait de cette riche composition et de la nature de ces molécules, de multiples effets biologiques sont scientifiquement observés et rapportés dans la littérature existante pour les plantes aquatiques (Tableau 2). Ces plantes peuvent donc être valorisables et sont ainsi valorisées dans plusieurs secteurs économiques notamment l'écologie, l'agriculture, l'agroalimentaire, la cosmétique et la (para)pharmacie.

Tableau 2 : Composition chimique et effets biologiques retrouvés dans la littérature chez certaines plantes aquatiques

Composition chimique	Effets biologiques	Références bibliographiques
Eau	Allélopathique, Nématicide, Anti-fongique, Antioxydant, Algicide, Inhibiteur de croissance, Phyto-protection antimicrobienne, Phytothérapie	ALVAREZ X., et al., 2020 / SCHOELYNCK J., et al., 2015 / MOHAMED Z.A., 2017 / PENSEC F., et al., 2013 / Approches expérimentales nécessaires
Matières azotées		
Matières minérales		
Métaux lourds		
Cellulose		
Hémicellulose		
Lignine		
Polyphénols		
Saponines		
Oses		

Dans l'ensemble de ces composés, deux d'entre eux semblent d'après la littérature être très prometteurs en tant qu'agents de biocontrôle soit envers les pathogènes de la vigne pour les saponines (activité antifongique) (Pensec et al., 2013) soit envers les blooms des cyanobactéries toxiques dans les eaux de baignade pour les polyphénols (propriété allélopathique) (Mohamed, 2017). Ainsi, ces deux composés seront détaillés ci-après.

### **I-3) Les saponines : un exemple de composés d'intérêt**

#### **I-3A) Définition**

Le nom « saponine » est dérivé du nom latin *sapo* qui veut dire « savon ». Cela s'explique par le fait que ces molécules forment une solution moussante (propriété tensioactive) dans l'eau. Ils sont souvent connus comme des composés non volatils, tensio-actifs distribués principalement dans le règne végétal (Manase, 2012-2013). Cependant, il est aussi possible d'en retrouver chez les organismes marins (Kougan Nkwokap, 2013).

Comme les composés phénoliques et les alcaloïdes, les saponines font partie des métabolites secondaires, c'est-à-dire des composés qui servent de défense à la plante. D'après la littérature, les saponines existent dans les plantes sous forme biologiquement actives et sont impliquées dans la phyto-protection antimicrobienne (Hostettman, and Marston, 1995 ; Osbourn 1996a,b). Cette catégorie de métabolite secondaire ne possède pas une propriété biologique unique.

#### **I-3B) Structure des saponines**

Les saponines sont des glycosides largement répandus chez les plantes. Elles sont constituées d'une partie aglycone et d'une partie glucidique (Figure 4).

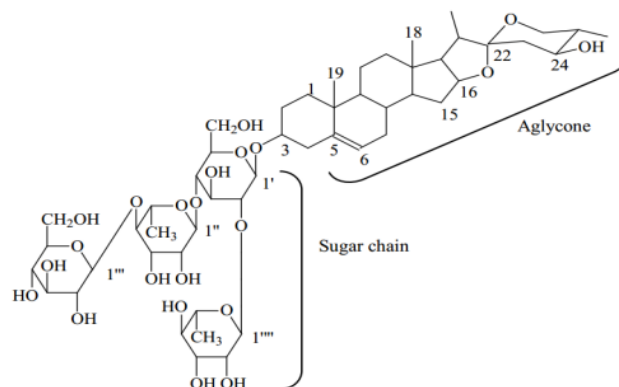


Figure 4 : Structure de saponines

La partie aglycone est constituée d'un squelette triterpénoïde ou stéroïde (Manase, 2013). Ainsi, selon la nature de l'aglycone, les saponines peuvent être classées en deux groupes :

- les saponines triterpéniques, les plus nombreux chez les angiospermes dicotylédones et chez certains animaux marins (Kougan Nkwokap, 2013),



- les saponines stéroïdiques, retrouvées exclusivement chez les angiospermes monocotylédones (Kougan Nkwokap, 2013).

Le L-arabinose, le D-xylose, le D-glucose, l'acide D-glucuronique, le D-galactose, le L-rhamnose et le D-fructose font partie des sucres constituant les saponines. Il faut savoir que la fraction de sucre est liée à l'aglycone par une liaison glycosidique ester ou éther sur un ou deux sites de glycosylation (Moghimipour and Handali, 2014).

### **I-3)B)a) Les saponines triterpéniques**

Les triterpènes sont des composés en C<sub>30</sub> issus d'une cyclisation du 3S-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène ou plus rarement du squalène en lui-même. Le plus souvent ces derniers sont hydroxylés en 3. Les différences majeures entre les triterpènes sont d'ordre configurationnel et liées à la conformation adoptée par l'époxy-squalène (ou le squalène) avant l'étape de cyclisation (Kougan Nkwokap, 2013). Les saponines triterpéniques sont des molécules pentacycliques. Comme on peut le voir sur la figure 5, les oléananes et les ursanes sont les deux squelettes les plus rencontrés dans la nature.

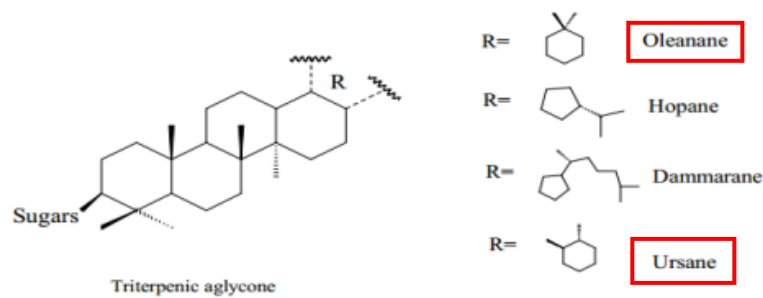


Figure 5 : Structure des saponines triterpéniques

### **I-3)B)a) Les saponines stéroïdiques**

Ils sont généralement constitués d'un squelette présentant 27 atomes de carbone comportant habituellement 6 cycles dont un cycle furanique et pyranique (Figure 6) qui sont la conséquence d'une cétylation intramoléculaire intervenant après l'oxydation d'un précurseur (Kougan Nkwokap, 2013).

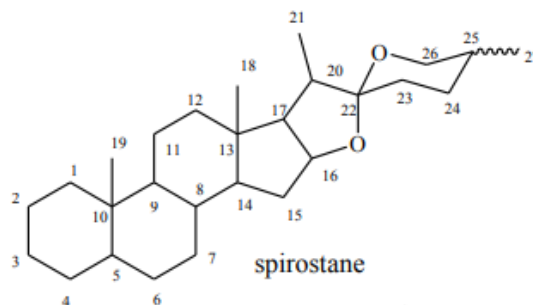


Figure 6 : Exemple de saponines stéroïdiques

### **I-3)C) Caractéristiques particulières des saponines**

Les saponines sont caractérisées par leur propriété tensio-active du fait de leur caractère amphiphile (à la fois hydrophile avec la partie sucre et hydrophobe avec la partie aglycone) formant au contact de l'eau une mousse savonneuse.

Les saponines possèdent de nombreuses propriétés écologiques. En effet, ces dernières permettent de protéger les plantes contre les herbivores en cas d'agression (attaque de ravageurs) (Hussain et al., 2019), elles possèdent aussi des propriétés antifongiques contre certaines maladies notamment celle de la moisissure grise avec le pathogène *Botrytis cinerea* (Stuardo & San Martín, 2008). Les saponines sont une classe importante de composés antifongiques car elles sont présentes à des niveaux relativement élevés dans les plantes saines. De plus, elles ont été impliquées comme déterminant de la résistance des plantes aux attaques fongiques (Stuardo & San Martín, 2008). En effet, ces dernières ont la capacité de se complexer avec les stéroïdes des membranes fongiques provoquant une perte d'intégrité membranaire avec formation de pores transmembranaires. L'activité antifongique des saponines dépend de leur structure chimique, ainsi toutes les saponines ne présentent pas cette propriété.

### **I-3)D) Applications industrielles et commerciales**

Mise à part leur application en agriculture via l'assainissement des sols et des pesticides naturels (Manase, 2012-2013, Chapagain et al, 2007) comme par exemple le biocontrôle vis-à-vis des pathogènes de la vigne, les saponines possèdent diverses autres applications industrielles. En effet, ces composés possèdent des propriétés pharmacologiques et médicinales intéressantes qui en font des composés utiles dans l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de formes galéniques (Manase, 2012-2013). Par exemple, les plantes à saponines peuvent se caractériser par leur action anti-inflammatoire et anti-œdémateuse (PhytoMag, 2022).

Luo et al., 2013 ont montré que des saponines issues de microorganismes pouvaient présenter des activités inhibitrices contre des cyanobactéries. Les saponines trouvent aussi beaucoup d'applications dans le domaine de l'agroalimentaire et cosmétique en raison de leur propriété émulsifiante et moussante.

## **I-4) Les polyphénols : un autre exemple de composés d'intérêt**

### **I-4)A) Définition**

Par définition, les polyphénols sont des dérivés du benzène possédant un groupement hydroxyle (-OH), lié à un atome de carbone du cycle benzénique. On appelle polyphénols des molécules dérivées portant plusieurs fonctions hydroxyles. Ces derniers possèdent de nombreuses

propriétés et activités biologiques, il s'agit comme les saponines de métabolites secondaires. Ils sont produits par les plantes naturellement pour se défendre contre diverses agressions. Dans le monde végétal, il existe plusieurs milliers de polyphénols (Abbas, et al., 2017).

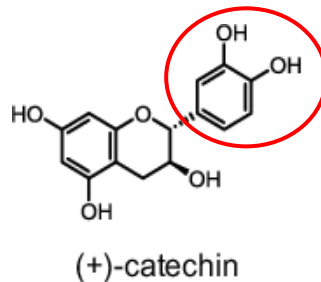



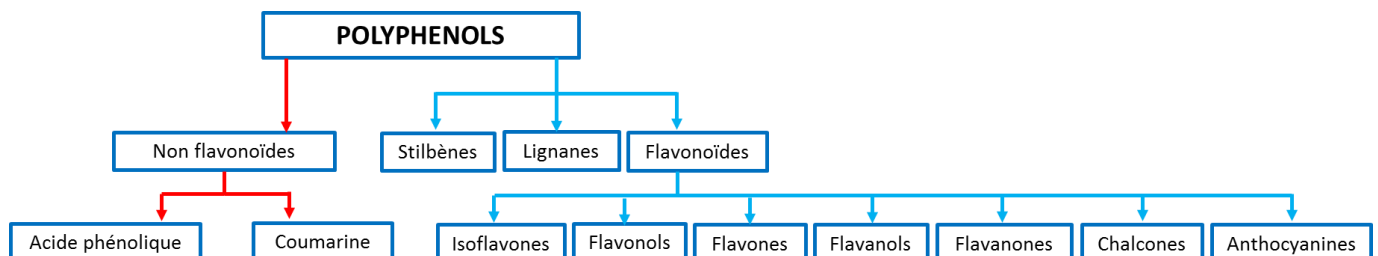
Figure 7 : Structure d'une classe de polyphénols


 Cycle benzène hydroxylé

Comme leur nom l'indique, ils sont caractérisés par au moins deux phénols associés en structures plus ou moins complexes (Laboratoire Lescuyer, 2019). Très peu d'informations sont répertoriées en ce qui concerne la localisation des polyphénols chez ces plantes.

#### **I-4)B) Classification des polyphénols**

Les composés phénoliques sont divisés en plusieurs classes : les non flavonoïdes, les stilbènes, les lignanes et les flavonoïdes (Figure 8) (Soto, et al., 2015, Zhang, et al., 2015).



 Classe des non flavonoïdes

 Classe des stilbènes, lignanes, flavonoïdes

Figure 8 : Schéma des différentes classes de polyphénols

#### **I-4)C) Rôle et intérêt des polyphénols**

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes. Les flavonoïdes possèdent des propriétés variées : antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, estrogénique et/ ou anti-estrogénique, allélopathique. Les polyphénols

peuvent aussi inhiber la croissance algale, notamment celle des cyanobactéries (Nakai, et al., 1996).

#### **I-4)D) Applications industrielles et commerciales**

Les industriels commercialisent des aliments enrichis en polyphénols. En effet, ces derniers peuvent être commercialisés dans le domaine agro-alimentaire. Leur activité antioxydante empêche la peroxydation lipidique afin d'assurer une bonne conservation des aliments. Les polyphénols sont aussi utilisés dans l'industrie cosmétique afin de lutter contre la production de radicaux libres pouvant endommager la peau. D'après Hennebelle et al., 2004, chaque classe chimique est utilisée pour des bénéfices spécifiques.

Ainsi, ces deux types de métabolites secondaires (saponines et polyphénols) peuvent être fractionnés par le biais de diverses méthodes afin de les isoler pour une utilisation dans divers secteurs comme cité ci-dessus.

#### **I-5) Méthodes de fractionnement des métabolites secondaires**

Certaines méthodes de fractionnement ont été trouvées dans la littérature :

##### **I-5)A) Extraction liquide-liquide**

D'après la publication de Pierra J., 2020, des extraits méthanoliques d'*Aralia nudicaulis* ont été traités par extraction liquide-liquide afin de fractionner les saponines et les composés phénoliques. Les extraits ont été dissous dans de l'eau, puis chacune des phases aqueuses a été traitée avec de l'acétate d'éthyle puis du butanol. Ces extractions ont été réalisées 4 à 6 fois par solvant selon le stade d'épuisement en composés dans la phase aqueuse.

Après extraction, Pierra J., 2020 a suivi ces différents extraits par chromatographie sur couche mince. L'éluant était un mélange  $\text{CHCl}_3$  : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  dans les proportions 26 : 14 : 3 (v/v/v). Les plaques ont été révélées avec deux révélateurs différents suivant la famille de molécules ciblées : soit une solution d'acide sulfurique à 20% dans du méthanol pour les saponines soit le réactif de Neu pour les flavonoïdes et autres composés phénoliques. Après révélation, les plaques sont chauffées à 100°C pendant 3 à 5min et sont observées par la suite en UV à 365nm et dans le visible.

##### **I-5)B) Résine d'adsorption XAD**

D'après la publication de Jiao X., et al., 2017, une purification des polyphénols de la myrtille à partir d'une résine macroporeuse XAD7-HP a été effectuée. Pour cela, la résine a été tout

d'abord trempée dans de l'éthanol à 95% pendant 24h puis cette dernière a été lavée à l'eau distillée (éluant clair). La résine est ensuite lavée avec de l'acide chlorhydrique à 5% suivi d'eau distillée (jusqu'à pH neutre). Les échantillons de résine prétraités sont mis dans un four à 60°C pendant 24h. Ils ont ainsi mis en contact la résine prétraitée et l'extrait de myrtille sous agitation à 150rpm à 25°C pendant 24h. Toutes les 2h un aliquot est prélevé. Une fois l'équilibre d'adsorption atteint, la résine est lavée à l'eau distillée et à l'éthanol (95%), la surface de la résine est séchée sur papier filtre.

### **I-5)C) Chromatographie d'exclusion stérique**

La chromatographie d'exclusion s'utilise à l'aide d'une colonne remplie avec une phase stationnaire constituée de billes de polymère poreuses et imprégnées d'une phase mobile (Andriamasinoro, 2019). L'échantillon à analyser est ainsi placé en tête de la colonne, puis la phase mobile est éluée au travers. Les molécules ayant une taille supérieure à celle des pores de la phase stationnaire sont entraînées au travers de la colonne (éluées en premier, cas des tanins). En revanche, les molécules de plus petites tailles (sucres libres) pourront ainsi pénétrer dans les pores du gel et donc seront plus ou moins retardées dans leur traversée de la colonne en fonction de leur taille. Les saponines et les flavonoïdes présentent quant à eux une élution intermédiaire (Hostettman et coll., 1997 ; Marouf et coll., 2013). Les conditions chromatographiques utilisées dans cette publication sont les suivantes : Phase stationnaire Sephadex® LH-20 : gel de dextrane / Phase mobile ; élution isocratique, MeOH (100%) le plus souvent, ou mélange binaire MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1) (v/v).

Le Tableau 3 ci-dessous synthétise les choix méthodologiques que nous avons faits à la lumière de la bibliographie étudiée.

*Tableau 3 : Récapitulatif des choix des différentes méthodes de fractionnement*

<b>Méthodes de fractionnement</b>	<b>Choix</b>	<b>Molécules ciblées</b>
<b>Extraction liquide/liquide</b>	Séparation suivant l'affinité avec le solvant utilisé	Saponines/Polyphénols
<b>Ultrafiltration</b>	Séparation suivant la taille des molécules selon le seuil de coupure de la membrane	Saponines/Polysaccharides
<b>Résine d'adsorption XAD</b>	Adsorption des composés hydrophobes	Polyphénols
<b>Chromatographie d'exclusion</b>	Séparation selon la taille moléculaire décroissante au travers d'un gel poreux	Saponines/Polyphénols/ Polysaccharides/Autres

## **II- MATERIELS ET METHODES**

Durant ce stage, toutes les manipulations ont suivi une suite logique expérimentale. Dans un premier temps, des étapes préliminaires ont été mises en place telles que la préparation du matériel végétal (collecte, séchage, broyage ; au cours de ce stage, seulement un broyage a été effectué, les étapes précédentes avaient été déjà réalisées), des extractions des composés d'intérêt. Dans un second temps, des étapes de caractérisation (matière sèche, dosages des polyphénols, flavonoïdes, sucres, saponines) et de fractionnement (extraction liquide/liquide, ultrafiltration, résine d'adsorption de type XAD, chromatographie d'exclusion) ont été mises en œuvre pour obtenir de façon la plus pure possible les composés d'intérêt recherchés soient principalement les polyphénols et les saponines.

### **II-1) Matériel végétal**

#### **II-1)A) Collecte et séchage des plantes aquatiques**

Les plantes aquatiques ont été collectées dans le lac de Parentis par l'équipe de l'INRAE dans le cadre du projet BECAME, l'un des plus grands lacs landais du littoral de la Nouvelle-Aquitaine. Ces dernières sont récoltées par l'intermédiaire d'un râteau à partir d'une embarcation. Il s'agit d'échantillon pour *E. densa* de 2019 et pour *L. major* de 2018. Les feuilles et les tiges des plantes ont été lavées afin d'éliminer les invertébrés benthiques et le biofilm puis séchées à l'étuve à 70°C jusqu'à obtention du poids sec, et donc jusqu'à ce que le poids soit stable (1 à 3 jours suivant la quantité mise à l'étuve).

Une fois séchées, les plantes sont broyées au CVA à l'aide d'un broyeur à couteaux (RETSCH SM 300) (Figure 9) sur une grille de 1cm.

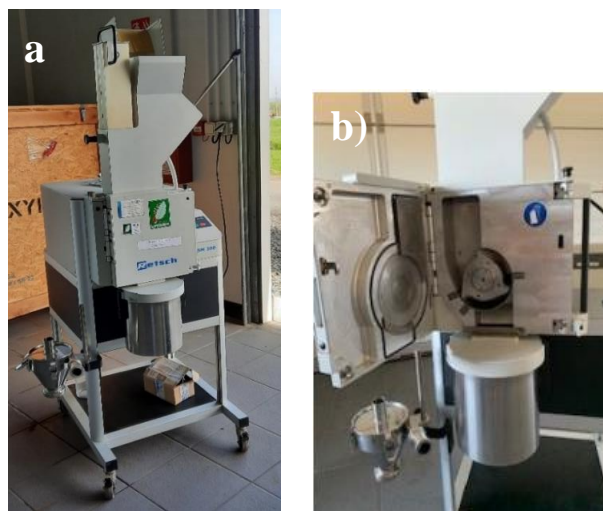


Figure 9 : Broyeur à couteaux (RETSCH SM 300) vu d'extérieur (a) et d'intérieur (b)

## II-2) Préparation de l'« extrait brut »

Les protocoles d'extraction en réacteur agité et thermorégulé ont été au préalable déjà fixés et optimisés pour obtenir un meilleur rendement dans le cadre du projet BECAME.

Les conditions expérimentales de ces protocoles sont différentes suivant la plante aquatique : *Lagarosiphon major* ou *Egeria densa* (Tableau 4).

Tableau 4 : Conditions expérimentales des extractions en réacteur des deux plantes aquatiques

	<i>Egeria densa</i>	<i>Lagarosiphon major</i>
<b>Plantes (MP)</b>	5% MP	10% MP
<b>Volume éthanol/eau (mL)</b>	66/34	66/34
<b>Température (°C)</b>	25	40
<b>Temps (h)</b>	1	4

Comme dit précédemment, ces conditions expérimentales sont réalisées dans des réacteurs c'est-à-dire un récipient apte à la réalisation et à l'optimisation des réactions chimiques. Le réacteur va permettre l'homogénéité du milieu réactionnel au niveau température et mélange des réactifs (Figure 10). Au départ, une extraction a été réalisée pour un volume final de 200mL afin d'établir une première caractérisation de ces extraits (Figure 10a).

Puis, l'extraction a été réalisée à l'échelle pilote (Figure 10b) à l'aide d'un réacteur de 5L pour un volume final de 3L pour *Egeria densa* et 1,5L pour *Lagarosiphon major* (calculs des volumes par rapport à la demande souhaitée par l'INRAE).



Figure 10 : Réacteurs a) échelle laboratoire b) échelle pilote

A la fin de l'extraction, une filtration sous pression est effectuée à l'aide de filtre lenticulaire en profondeur (40µm, 4µm, 0,4µm). A la fin des différentes filtrations et suivant la plante

aquatique, un certain volume est concentré à l'évaporateur rotatif Heidolph. 6 fois pour *Egeria densa* et 3 fois pour *Lagarosiphon major* afin d'obtenir une concentration finale égale à 300g/L (en équivalent plante sèche ; concentration attendue par l'INRAE). En effet, pour ces expériences des extraits à 300g/L de matières premières ont été utilisés (facteur de dilution permettant de préserver l'intégrité des cyanobactéries).

### **II-3) Caractérisation des extraits**

#### **II-3)A) Matière sèche**

La matière sèche est déterminée par pesée de 2mL de chacun des deux extraits dans des béchers au préalable pesés. Cette expérience est réalisée en triplicats pour chacun des extraits. Les béchers sont ainsi mis dans une étuve à 110°C de la marque Firlabo Air Concept pendant 48 heures. Ainsi, après passage à l'étuve, la matière sèche de chacun des extraits sera déduite par moyenne de chacun des triplicats et grâce à la formule suivante :  $MS (\%) =$

$$\frac{\text{masse}_{\text{échantillon sec}}}{\text{masse}_{\text{échantillon humide}}} \times 100$$

#### **II-3)B) Dosages colorimétriques**

Un dosage colorimétrique peut être réalisable d'une part lorsqu'une réaction chimique donne des produits colorés et d'autre part si l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'élément à doser. Ainsi, au fil de ce stage, plusieurs dosages colorimétriques ont permis de déterminer la concentration en composés d'intérêt dans ces extraits. En effet, les dosages de polyphénols totaux, de flavonoïdes, de saponines et d'oses neutres ont été réalisés.

Les protocoles de ces quatre dosages sont reportés en Annexe 1.

##### **II-3)B)a) Polyphénols totaux**

La méthode de Folin-Ciocalteu permet la réalisation du dosage des polyphénols totaux. Avant la réaction, le réactif de Folin-Ciocalteu est de couleur jaune car ce dernier est à l'état oxydé. Les groupements oxydables des composés phénoliques contenus dans l'échantillon à analyser vont ainsi être oxydés via ce réactif en milieu basique. Puis, à l'état réduit, ce réactif devient bleu. L'intensité de la coloration, et par conséquent l'absorbance à 765nm sera proportionnelle à la concentration en composés phénoliques. Les absorbances mesurées pour les différents échantillons seront ainsi comparées à celles d'une gamme d'acide gallique.

##### **II-3)B)b) Flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes est adapté des travaux de Venugopal and Devarajan, 2011. Au cours de ce dosage, les flavonoïdes vont se complexer avec une ou plusieurs molécules d'aluminium



présentant ainsi une absorbance maximale à 381nm. Cette absorbance sera ainsi proportionnelle à la quantité de flavonoïdes contenue dans l'échantillon. La molécule de référence utilisée pour la gamme étalon est la chryisine.

### **II-3)B)c) Saponines**

Les saponines sont des molécules naturelles produites par les plantes et les animaux. Ce sont des hétérosides complexes appartenant aux terpènes cycliques ou aux stéroïdes. Les saponines possèdent des propriétés tensioactives, elles font mousser leur solution et servent de détergent. Ces dernières absorbent à une longueur d'onde égale à 544nm. C'est un dosage à la vanilline sulfurique.

### **II-3)B)d) Oses neutres**

Le dosage colorimétrique selon la méthode de M. Dubois et coll. permet de quantifier les oses neutres dans un échantillon.

L'ajout de deux réactifs : une solution d'acide sulfurique à 95% et une solution phénolique à 5% permet deux déshydratations successives sur les sucres (Figure 11) donnant ainsi une couleur jaune au milieu, proportionnelle à la concentration en oses neutres. Ces déshydratations vont ainsi aboutir à un chromophore absorbant à 492nm.

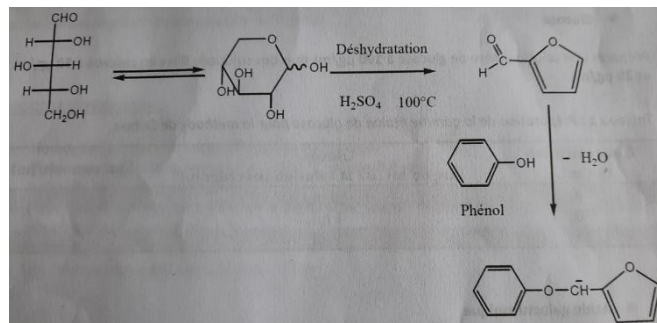


Figure 11 : Principe du dosage des oses neutres par la méthode de Dubois

Les absorbances mesurées seront ainsi comparées à une gamme étalon de glucose.

### **II-4) Fractionnement des extraits bruts**

Pour fractionner les extraits bruts obtenus, plusieurs méthodes ont été mises en place telles que l'extraction liquide/liquide, l'ultrafiltration, la résine d'adsorption XAD et la chromatographie d'exclusion stérique. Ces fractions ont ensuite été caractérisées (dosages des polyphénols et des saponines cf II-3)B)).

#### **II-4)A) Extraction liquide/liquide**

L'extraction liquide/liquide est un procédé de séparation qui consiste en une extraction par transfert entre deux phases liquides.

Ici, l'extraction liquide/liquide est réalisée avec trois solvants différents comportant des degrés de polarité différents (heptane, acétate d'éthyle et butanol). Tout d'abord, dans des tubes à centrifuger, 100mL d'extrait concentré (*E. densa* ou *L. major*) sont introduits. Ensuite, 50mL d'heptane sont ajoutés. Après agitation manuelle par retournement puis centrifugation pendant 5min à 5000rpm à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée de la marque BioServ, la phase organique contenant l'heptane est récupérée. La phase aqueuse est conservée. Cette étape est réalisée 3 fois. Ensuite, la phase organique obtenue est évaporée puis reprise dans un volume de 100mL d'eau afin de réaliser par la suite une caractérisation (matière sèche, dosages).

Les mêmes étapes sont répétées pour l'extraction avec l'acétate d'éthyle et le butanol à partir de la phase aqueuse (appelée résidu). Ainsi, à la fin de cette extraction liquide/liquide, quatre fractions (heptane, acétate d'éthyle, butanol, résidu) sont disponibles pour chaque plante aquatique. Les polyphénols et saponines se répartiront dans les fractions suivant leur affinité avec la polarité du solvant.

#### **II-4)B) Ultrafiltration (UF)**

Par définition, l'ultrafiltration est une filtration membranaire dans laquelle la pression hydrostatique force un liquide contre une membrane semi-perméable. La membrane de filtration utilisée a un seuil de coupure de 10 000Da ce qui va permettre de recueillir uniquement les molécules de tailles importantes contenues dans le rétentat (soit des molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 10 000Da comme les polysaccharides par exemple).

Avant réalisation de cette méthode, la concentration micellaire critique (CMC) des saponines est déterminée afin de connaître quelle est la meilleure concentration de l'extrait à passer en UF pour que les saponines soient sous forme de micelles (taille plus adaptée pour être retenue par la membrane). Ainsi, grâce à l'ajout d'un colorant (ici le bleu de méthylène), les saponines sous forme de micelles vont encapsuler ce dernier, ce qui diminuera l'absorbance du colorant et permettra de déterminer la concentration optimale. Pour cela, une solution de bleu de méthylène (absorbant à 608,8nm) est réalisée à 0.02g/L puis cette dernière (dilué au  $1/10^{\text{ème}}$ ) est ajoutée aux extraits non dilués et dilués au  $1/2$ ,  $1/4$ ,  $1/1.2$ ,  $1/10$ ,  $1/50$  et  $1/100^{\text{ème}}$ . Le spectre entre 250 et 800nm est ainsi tracé et les absorbances sont relevées à 608,8nm.

En ce qui concerne l'UF, 100mL des deux extraits sont insérés dans le récipient adapté. Par le biais d'un système de pompage d'eau, afin de ne pas assécher le réservoir, la solution est ultrafiltrée. Une fois qu'environ cinq fois le volume contenu dans le récipient est obtenu dans le filtrat, l'ultrafiltration est considérée comme terminée. L'appareil est finalement nettoyé à l'aide d'une solution de soude à 0,1mol/L puis avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir un filtrat au pH neutre. L'appareil utilisé au cours de ces manipulations possède une pompe péristaltique de la marque Masterflex de modèle 7516-00 et une membrane de la marque VIVAFLOW 50R et de modèle MWCO HY (Figure 12).



Figure 12 : Appareil d'ultrafiltration utilisé pour fractionner les saponines

#### **II-4)C) Résine d'adsorption XAD**

La résine utilisée est une résine adsorbante de type Amberlite XAD4. Pour chaque plante, 100mL d'extrait sont ajoutés dans deux béchers différents, auquel 10g de résine sont introduits (retient les composés hydrophobes tels que les polyphénols par exemple). Cette dernière est lavée au préalable sur Büchner sous vide (avec 1,5L d'eau distillée et 750mL d'éthanol) puis une agitation pendant 27h est réalisée. Un aliquot est prélevé à  $t_0$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ,  $t_4$  et  $t_{21}$  afin d'être certain que la quantité en polyphénols diminue au fil de l'adsorption. Ensuite, une filtration est réalisée sur fritté sous vide avec de l'eau. La résine est récupérée puis mélangée à 100mL d'éthanol afin de désorber les molécules hydrophobes telles que les polyphénols contenus sur la résine.

#### **II-4)D) Chromatographie d'exclusion stérique**

La chromatographie d'exclusion stérique permet de séparer les constituants d'un mélange par taille moléculaire décroissante au travers d'un gel poreux. Ainsi, 65g de résine Sephadex LH-20 sont mis à gonfler dans un volume d'éthanol à 66% en excès pendant environ 3h. Ce mélange résine/éthanol à 66% est ainsi ajouté dans la colonne chromatographique puis, l'éthanol à 66% est éliminé afin de tasser au maximum la résine. L'extrait à analyser est évaporé puis repris dans un petit volume d'éthanol à 66% (environ 5mL) afin de le déposer en tête de colonne. Au fil de son élution, de l'éluant est rajouté continuellement afin de ne pas assécher la phase stationnaire. Un total de 30-40 fractions sont ainsi collectées puis analysées par CCM (éluant Chloroforme : Méthanol : Eau 26 : 14 : 3 (v :v :v) / révélation pour les saponines avec 20% d'acide sulfurique dans du méthanol puis chauffer sur plaque chauffante). De plus, la réalisation de leur spectre entre 200 et 700nm a été effectuée afin de regrouper le maximum de fractions pour ensuite pouvoir réaliser les dosages.

Ainsi, les saponines et les polyphénols, de taille moyenne, auront donc une élution intermédiaire.

### **III- RESULTATS / DISCUSSION**

#### **III-1) Caractérisation des extraits bruts**

L'objectif est de caractériser les composés d'intérêt dans les extraits bruts des deux plantes, par différentes méthodes telles que la mesure de la matière sèche, des calculs de rendements d'extraction, et différents dosages (polyphénols totaux, flavonoïdes, saponines, oses neutres). Ceci afin d'adapter les méthodes de fractionnement en fonction des molécules d'intérêt présentes.

##### **III-1)A) Matière sèche**

L'extrait d'*E. densa* présente un taux de MS de 2,2% et l'extrait de *L. major*, de 2.7%. Ces valeurs ne peuvent pas être comparées entre elles car pour ces deux plantes les conditions d'extraction, et notamment de concentration, sont différentes (Cf II)2)).

##### **III-1)B) Rendements d'extraction**

Après extraction des deux plantes, les rendements d'extraction par rapport à la matière première (MP) ont été calculés en faisant le rapport entre la masse sèche obtenue et la masse initiale de matières premières. Ainsi, un rendement d'extraction de 6,03% chez *E. densa* a été obtenu contre 5,38% chez *L. major*. Pour les mêmes raisons que dans la partie précédente (III-1)A)), ces deux rendements d'extraction ne peuvent pas être comparés.

##### **III-1)C) Composition en molécules d'intérêt**

Les résultats des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des saponines et des oses neutres, ont permis de déterminer la composition en molécules d'intérêt dans ces deux extraits bruts.

Les résultats obtenus exprimés en teneur par rapport à la MS de l'extrait brut sont représentés sur le graphique ci-dessous (Figure 13) :

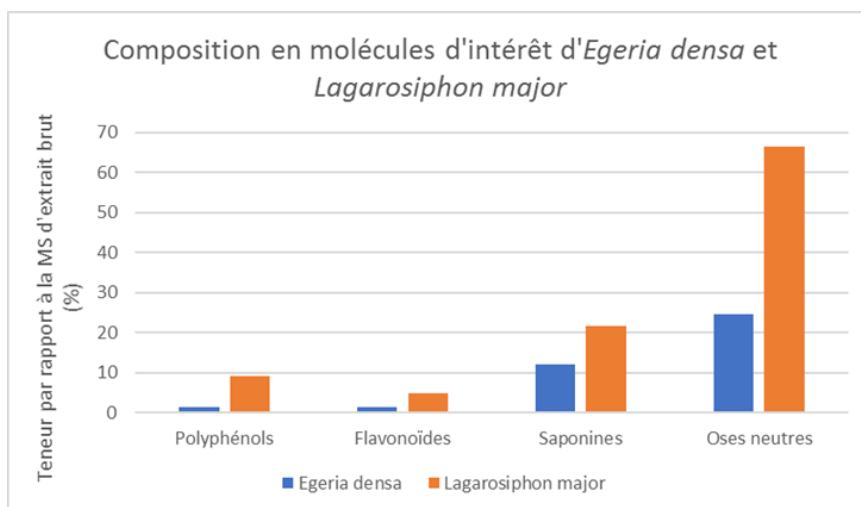


Figure 13 : Graphique représentant la composition en molécules d'intérêt dans les extraits des deux plantes

D'après la figure ci-dessus, on retrouve des composés d'intérêt en plus grandes quantités dans l'extrait de *L. major* par rapport à l'extrait d'*E. densa*. Pour les deux plantes, la teneur en polyphénols (1,46% chez *E. densa* et 9,23% chez *L. major*) est moins importante que la teneur en saponines (12,02% chez *E. densa* et 21,56% chez *L. major*). Ces résultats montrent également, que les flavonoïdes représentent une grande partie des polyphénols et ceci est d'autant plus vrai chez *E. densa* (92,5%) que *L. major* (53,1%). La teneur en oses neutres est relativement importante chez ces deux plantes. Ces oses neutres, pouvant provenir des saponines atteignent environ 66,42% chez *L. major* et 24,64% pour *E. densa*.

### **III-2) Mise au point des méthodes de fractionnement**

Avant fractionnement, des mises au point ont été effectuées dans le but d'optimiser la séparation des saponines en ultrafiltration et d'assurer un suivi correct de l'adsorption des composés d'intérêt sur une résine d'adsorption (Amberlite XAD4) au cours du temps.

#### **III-2)A) Concentration micellaire critique des saponines pour l'UF**

Les résultats de la détermination de la concentration micellaire critique pour *E. densa* et *L. major* sont illustrés sur le graphique ci-dessous (Figure 14) :

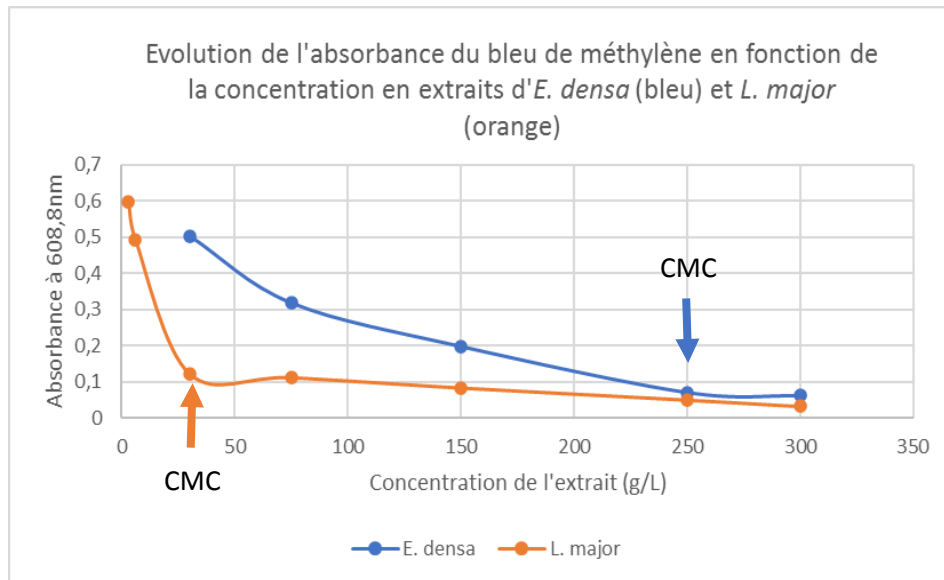


Figure 14 : Evolution de l'absorbance du bleu de méthylène en fonction de la concentration en traits d'*E. densa* (bleu) et *L. major* (orange)

Sur ces deux courbes, comme attendu, l'absorbance à 608,8nm diminue au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente.

Dans l'extrait d'*E. densa*, l'absorbance passe de 0,5 à 0,07 pour des concentrations respectives de 30 et 250g/L (courbe bleue). Puis, de 250 à 300g/L, l'absorbance stagne. Ainsi, cela veut dire qu'à une concentration supérieure à 250g/L (flèche bleue), les saponines sont sous forme de micelles. 250g/L représente alors chez *E. densa* la CMC c'est-à-dire la concentration en tensioactif dans l'extrait au-dessus de laquelle des micelles se forment. En effet, les micelles ont donc bien encapsulé le bleu de méthylène utilisé, ce qui diminue l'absorbance de ce dernier à 608,8nm.

Dans l'extrait de *L. major*, l'absorbance passe de 0,6 à 0,12 pour des concentrations respectives de 3 et 30g/L (courbe orange). Puis, de 30 à 300g/L, l'absorbance stagne. Ainsi, dans l'extrait de *L. major*, la CMC se situe autour de 30g/L (flèche orange).

L'ultrafiltration a été réalisée avec les deux extraits de concentration initiale c'est-à-dire à 300g/L. Aucune dilution ou concentration n'a été effectuée. Néanmoins, pour *E. densa*, l'extrait aurait dû sans doute être concentré afin d'être certain d'avoir une concentration en extrait largement supérieure à la CMC.

### **III-2)B) Adsorption des polyphénols sur la résine d'adsorption**

Les résultats de l'adsorption des polyphénols sur la résine au cours du temps dans l'extrait d'*E. densa* et *L. major* sont illustrés sur le graphique ci-dessous (Figure 15) :

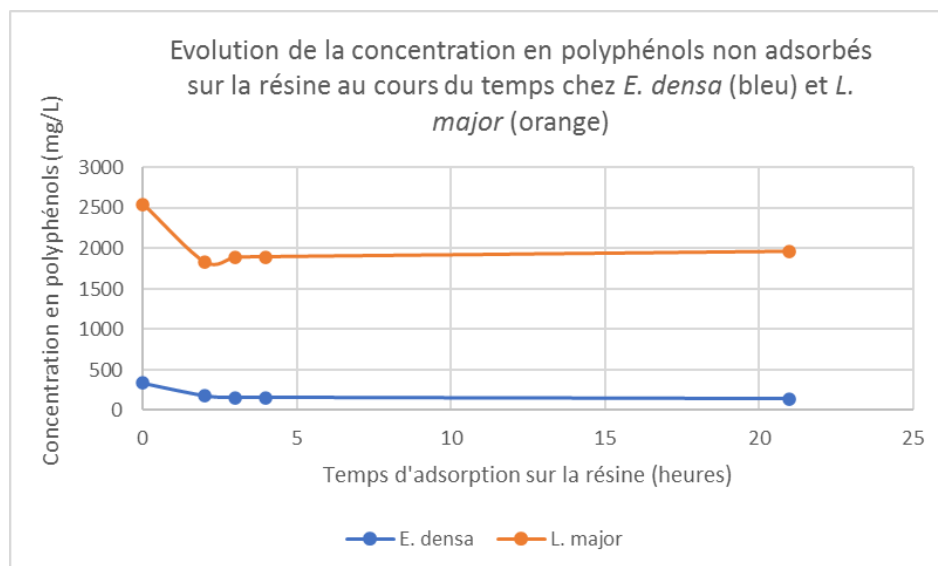


Figure 15 : Evolution de la concentration en polyphénols non adsorbés sur la résine au cours du temps chez *E. densa* (bleu) et *L. major* (orange)

Sur ces deux courbes, de manière attendue, une diminution de la concentration en polyphénols au cours du temps est observée.

Au bout de 3h, le maximum d'adsorption de la résine est atteint car une stabilité de la concentration en polyphénols non adsorbés est observée (156mg/L pour *E. densa* et 1891mg/L pour *L. major*) chez ces deux plantes.

Le suivi de l'adsorption des saponines sur cette résine a aussi été réalisé chez ces deux plantes (Annexe 2). Ainsi, les mêmes observations ont été remarquées que pour les polyphénols, c'est-à-dire une diminution de la concentration en saponines au cours du temps. Puis, au bout de 5h pour *E. densa* et 4h pour *L. major*, le maximum d'adsorption de la résine est atteint. La concentration en polyphénols non adsorbés se stabilisent (1603,1mg/L pour *E. densa* et 4229,7mg/L pour *L. major*).

Cependant, tous les polyphénols et saponines n'ont pas été adsorbés. Deux possibilités peuvent alors se présenter : soit la résine d'adsorption sature (quantité de résine insuffisante au vu de la quantité en polyphénols et saponines), soit il existe une classe de polyphénols ou saponines ayant moins d'affinité avec cette résine.

### **III-3) Caractérisation des fractions obtenues**

A partir des extraits bruts des deux plantes, un fractionnement a pu être réalisé par extraction liquide/liquide successive, ultrafiltration, résine d'adsorption et chromatographie d'exclusion stérique. Ces dernières ont été caractérisées de la même manière que les extraits bruts.

Cependant, par manque de temps, les fractions obtenues par chromatographie d'exclusion stérique (CE) n'ont pas été caractérisées mais le seront dans la suite de ce stage.

### **III-3)A) Rendements d'extraction**

Les résultats des rendements d'extraction par rapport à la MS d'extrait brut des différentes fractions sont présentés sur le graphique ci-dessous (Figure 16) :

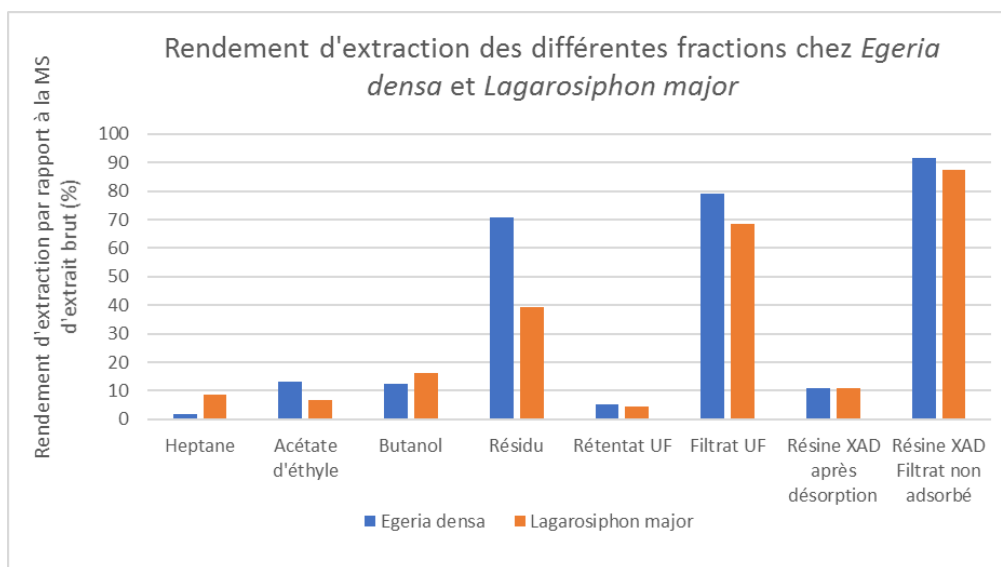


Figure 16 : Graphique présentant les rendements d'extraction des différentes fractions chez les deux plantes

Dans le cas du fractionnement liquide-liquide, et pour les deux plantes (71% pour *E. densa* et 39% pour *L. major*), la majorité des composés restent dans la phase aqueuse, c'est-à-dire le résidu.

En ce qui concerne l'ultrafiltration, le plus fort rendement d'extraction se trouve dans le cas du filtrat (79% contre 5,3% dans le rétentat pour *E. densa* et 68,5% contre 4,6% dans le rétentat pour *L. major*). Enfin, pour le fractionnement par adsorption sur résine, comme vu précédemment (III-2)B)) la majorité de la matière sèche n'a pas été adsorbée sur la résine et se retrouve donc dans le filtrat initial.

### **III-3)B) Caractérisation des fractions**

Toutes les fractions liquides ont été caractérisées par la détermination de la teneur en polyphénols et en saponines.

#### **III-3)B)a) Teneurs en polyphénols dans les différentes fractions obtenues**



Les concentrations en polyphénols retrouvées dans l'ensemble des fractions liquides des deux plantes sont présentées sur le graphique ci-dessous (Figure 17) :

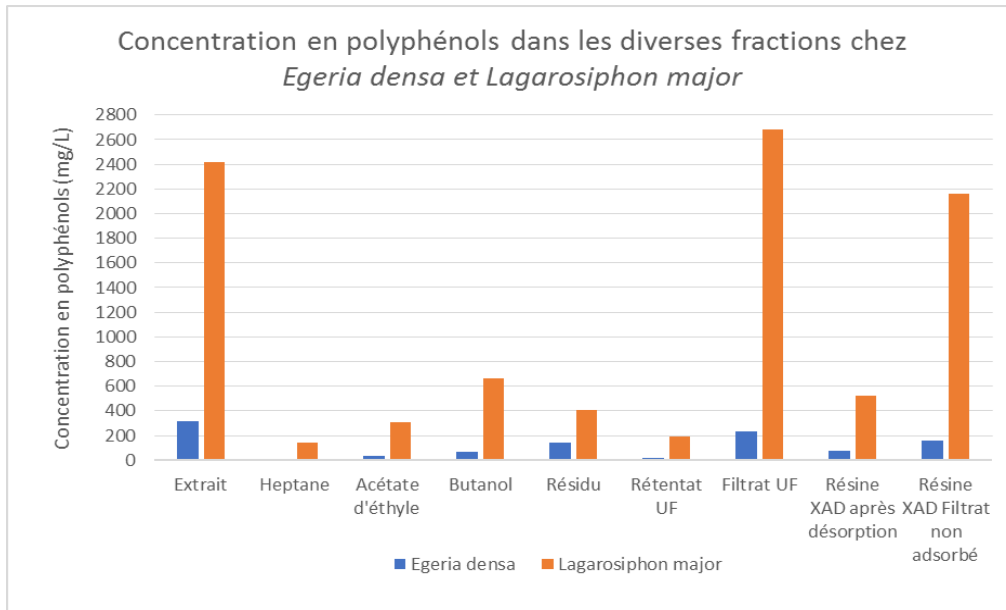


Figure 17 : Graphique représentant les concentrations en polyphénols dans les diverses fractions des deux plantes

Sur ce graphique, la concentration en polyphénols pour l'extrait d'*E. densa* est égale à 318,6mg/L.

Pour les fractions, notamment liquide/liquide, la concentration la plus élevée se retrouve dans la fraction « résidu » avec 143,6mg/L.

Pour l'ultrafiltration, la concentration la plus élevée se retrouve dans le filtrat de l'UF avec une concentration égale à 234,9mg/L contre 18,6mg/L dans le rétentat. Ce résultat était attendu car les polyphénols sont de plus petites molécules que 10 000Da (seuil de coupure de la membrane) donc ils ne sont pas retenus par la membrane.

Pour la résine d'adsorption, c'est dans le filtrat non adsorbé que l'on retrouve la concentration en polyphénols la plus élevée soit 159,1mg/L contre 80mg/L après désorption de la résine. Ceci semble cohérent avec les résultats obtenus pour les teneurs en matière sèche (Figure 16). Cependant, ce résultat n'était pas attendu car la résine devait normalement adsorber les molécules hydrophobes donc les polyphénols aurait dû se retrouver dans la fraction « après désorption ».

En ce qui concerne l'extrait de *L. major*, ce dernier contient 2414,3mg/L de polyphénols. Dans l'ensemble des fractions, les mêmes répartitions que pour *E. densa* sont obtenues mis à part

pour l'extraction liquide/liquide où les concentrations sont plus élevées dans la fraction « butanol » avec 660mg/L de polyphénols. Dans le filtrat, une concentration égale à 2680,7mg/L contre 188,6mg/L dans le rétentat a été obtenue. Enfin, dans le filtrat non adsorbé, 2163,9mg/L de polyphénols a été obtenus contre 522,9mg/L après désorption de la résine.

La proportion de polyphénols retrouvée dans l'ensemble des fractions solides c'est-à-dire par rapport à la MS de chacune des fractions des deux plantes est répertoriée sur le graphique ci-dessous (Figure 18) :

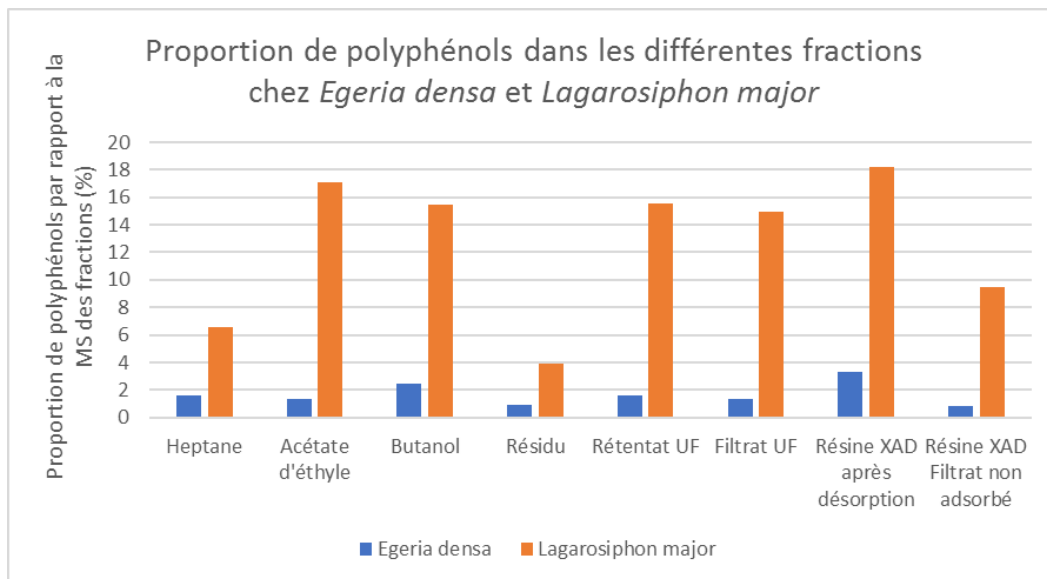


Figure 18 : Graphique représentant la proportion de polyphénols dans les diverses fractions pour les deux plantes

Initialement, l'extrait d'*E. densa* est constitué de 1,5% de polyphénols et *L. major* de 9,2%. Pour *E. densa*, les valeurs intéressantes à noter sont dans la fraction « butanol » pour l'extraction liquide/liquide (2,4% soit une augmentation d'un facteur 1,6) et dans la fraction après désorption de la résine (3,3% soit une augmentation d'un facteur 2,2). Les autres fractions contiennent des proportions peu intéressantes au vu de la proportion dans l'extrait initial. Ainsi, cela veut dire que malgré de faibles concentrations en polyphénols (Figure 17) (probablement dû à une quantité insuffisante de résine), les fractions sont tout de même enrichies en ces composés.

Chez *L. major*, les valeurs intéressantes à noter sont dans la fraction « acétate d'éthyle » pour l'extraction liquide/liquide (17,1% soit une augmentation d'un facteur 1,85) et dans la fraction après désorption de la résine (18,2% soit une augmentation de 2).

On remarque que chez ces deux plantes les fractions enrichies en polyphénols pour l'extraction liquide/liquide sont différentes. Ceci peut être dû à des classes de polyphénols différentes dans ces deux extraits et ayant ainsi une affinité différente avec les solvants.

### III-3)B)b) Teneurs en saponines dans les différentes fractions obtenues

Les concentrations en saponines retrouvées dans l'ensemble des fractions liquides des deux plantes sont présentées ci-dessous (Figure 19) :

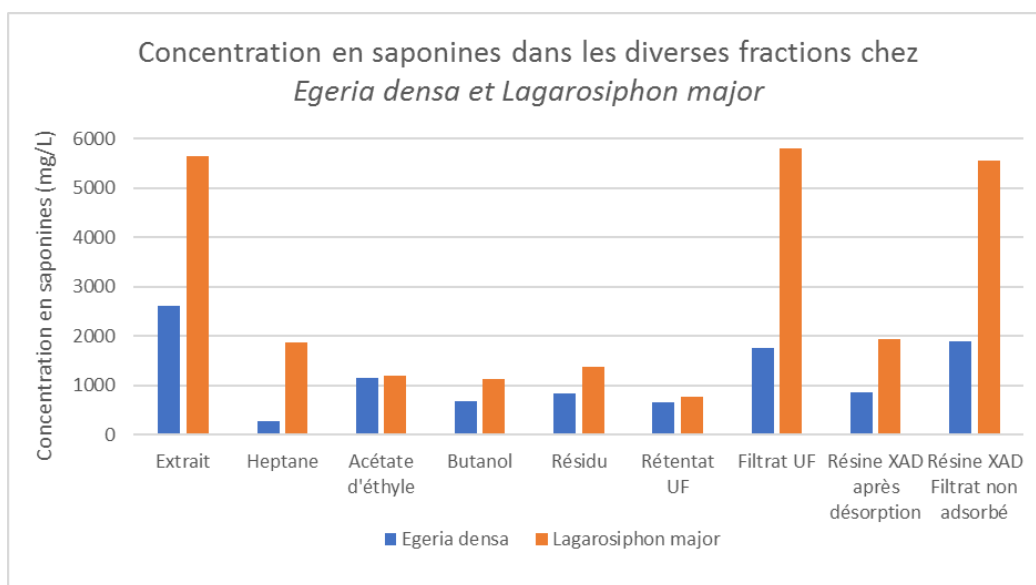


Figure 19 : Graphique représentant les concentrations en saponines dans les diverses fractions des deux plantes

Sur ce graphique, la concentration en saponines pour l'extrait d'*E. densa* est égale à 2622,3mg/L.

Pour les fractions, notamment liquide/liquide, la concentration la plus élevée se retrouve dans la fraction « acétate d'éthyle » avec 1157,2mg/L. Pour l'ultrafiltration, la concentration la plus élevée se retrouve dans le filtrat avec une concentration égale à 1762,3mg/L contre 649,7mg/L dans le rétentat. Pour la résine d'adsorption, c'est dans la fraction non adsorbée que l'on retrouve la concentration la plus élevée soit 1897,2mg/L contre 849,3mg/L après désorption de la résine.

En ce qui concerne l'extrait de *L. major*, ce dernier contient 5639,5mg/L de saponines. Dans l'ensemble des fractions, les mêmes répartitions que chez *E. densa* sont obtenues mis à part pour le fractionnement liquide/liquide où les concentrations sont plus élevées dans la fraction « heptane » avec 1868,5mg/L de saponines. Dans le filtrat de l'UF, 5808,4mg/L de saponines

sont obtenues contre 764,4mg/L dans le rétentat. Enfin, dans le filtrat non adsorbé la concentration en saponines est de 5549,5mg/L contre 1945mg/L après désorption de la résine.

Au vu de ces valeurs, on aurait pu penser le contraire pour l'UF, c'est-à-dire plus de saponines dans le rétentat car les saponines sous forme de micelles sont normalement de taille supérieure à 10 000Da. Les saponines ne sont sûrement pas à leur CMC, notamment pour *E. densa* où il aurait fallu concentrer davantage l'extrait avant de le fractionner par UF.

La somme des concentrations de chacune des fractions d'une méthode de fractionnement pour les polyphénols et les saponines, permet de relativement retrouver la concentration de l'extrait initiale. Pour l'extraction liquide/liquide, des pertes ont pu avoir lieu. Pour l'UF, des composés ont pu probablement rester sur la membrane. Pour la résine, des molécules sont probablement restées adsorbées. En effet, même après désorption, la résine était encore un peu colorée.

La proportion de saponines retrouvée dans l'ensemble des fractions solides des deux plantes est présentée sur la figure ci-dessous (Figure 20) :

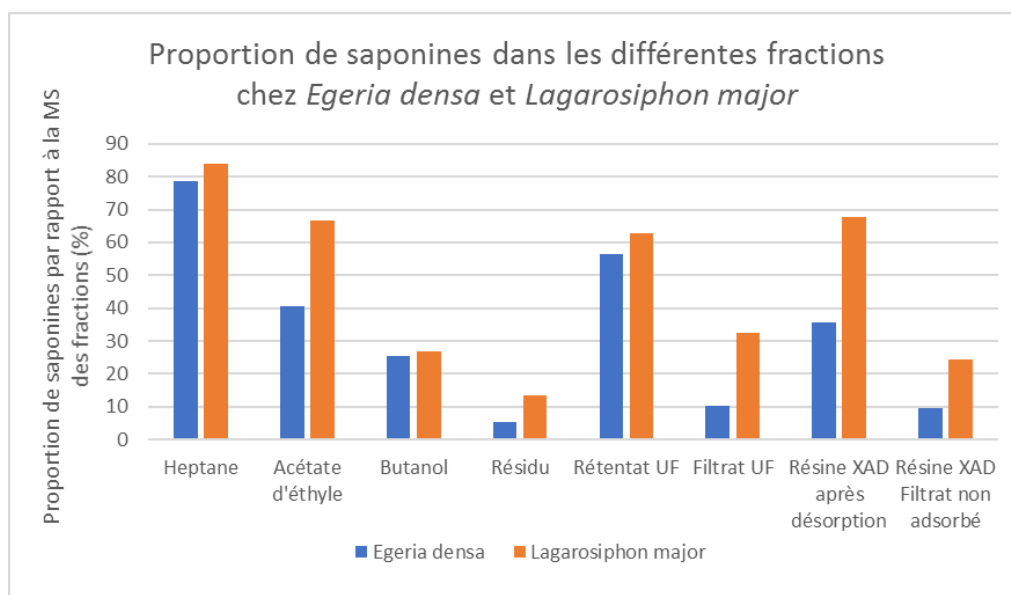


Figure 20 : Graphique représentant la proportion de saponines dans les diverses fractions chez les deux plantes

Ce graphique montre que pour l'extraction liquide/liquide, une proportion élevée de saponines dans la fraction « heptane » est obtenue (78,6% pour *E. densa* et 83,9% pour *L. major*), cela est valable pour les deux plantes. Sachant que cette fraction liquide était très peu concentrée pour *E. densa* (Figure 19), Ainsi, cette fraction est faiblement concentrée en MS mais est donc très enrichie, très pure en ce composé d'intérêt si on le compare à sa MS. La fraction « acétate d'éthyle » contient aussi une proportion relativement importante en saponines (40,62% pour *E.*

*densa* et 66,7% pour *L. major*). Les fractions « butanol » et « résidu » quant à elles, contiennent des proportions plus faibles.

En ce qui concerne l'UF, cette méthode de fractionnement a bien fonctionné car dans le rétentat près de 56,5% de saponines pour *E. densa* sont obtenues et près de 62,9% pour *L. major* alors que l'extrait brut présente des teneurs de 12 et 22% respectivement.

Quant à la résine, cette dernière a bien adsorbé les saponines car après désorption, une proportion de 35,6% pour *E. densa* a été retrouvée et 67,9% pour *L. major* contre 9,5 et 24,3% dans le filtrat non adsorbé.

Pour résumer, les fractions les plus riches en polyphénols sont les fractions « butanol » (*E. densa*), « acétate d'éthyle » (*L. major*), « rétentat de l'UF » et « résine après désorption » et les fractions les plus riches en saponines sont les fractions « heptane », « rétentat de l'UF » et « résine après désorption ».

Grâce à des méthodes adaptées, des fractions riches en molécules cibles ont donc bien été produites bien que certaines fractions soient peu concentrées en matière sèche.

## **CONCLUSION**

Durant ces sept premières semaines de stage au sein du projet EXOBIO de l'INRAE de Bordeaux, l'objectif premier était de mettre au point une méthodologie de fractionnement d'extraits bruts à partir de deux plantes aquatiques invasives se trouvant dans les lacs du Bassin aquitain. Ce fractionnement ayant pour but d'isoler les polyphénols et les saponines afin d'obtenir des fractions relativement pures en vue d'une valorisation tout en participant à la protection de la biodiversité de ces écosystèmes. En effet, deux voies de valorisation semblent donc prometteuses : le biocontrôle des pathogènes de la vigne (activité antifongique des saponines), et le biocontrôle des blooms de cyanobactéries toxiques dans les eaux de baignade.

Les polyphénols et les saponines ont un avenir très prometteur dans différents secteurs économiques, c'est pourquoi de nombreux scientifiques s'y intéressent et cherchent à identifier ces molécules aux propriétés intéressantes.

Ainsi, en ce qui concerne le fractionnement des extraits bruts des plantes aquatiques, celui-ci a été réalisé par le biais de plusieurs méthodes chimiques telles que l'extraction liquide/liquide,

l'ultrafiltration, la résine d'adsorption et la chromatographie d'exclusion stérique. La caractérisation de ces fractions a été effectuée principalement par dosages spectrophotométriques. Les résultats indiquent l'obtention de certaines fractions enrichies en polyphénols et saponines, notamment les fractions « heptane », « butanol » et « acétate d'éthyle », le rétentat de l'ultrafiltration et la fraction qui a été désorbée de la résine. Néanmoins, on obtient des concentrations relativement faibles dans ces fractions, ainsi les méthodologies doivent sûrement être améliorées pour obtenir des résultats plus qualitatifs (par exemple en UF, concentrer ou diluer l'extrait, utiliser une membrane avec un seuil de coupure plus petit que 10 000Da, 1 000Da par exemple, quantité de résine plus importante pour éviter la saturation, élimination du surplus de solvant pour l'extraction liquide/liquide par évaporation et non manuellement, ...). Il serait donc judicieux de reproduire ces expérimentations en changeant certains facteurs comme cités ci-dessus afin de voir si les résultats sont concordants.

L'utilisation de la méthode par HPLC aurait également été pertinente afin d'obtenir la structure de ces différents composés d'intérêt dans l'ensemble de ces fractions. Cependant, par manque de temps, ceci n'a pas pu être réalisé.

Pour les deux mois restants de ce stage, les fractions obtenues par chromatographie d'exclusion seront caractérisées de la même manière que les autres fractions. De plus, toutes ces fractions seront probablement traitées par HPLC. Enfin, il est aussi prévu de faire tester par l'INRAE des fractions issues de protocoles optimisés.

## Annexe 1 : Protocoles des différents dosages

- **Dosage des polyphénols totaux (méthode de Folin-Ciocalteu)**

Préparation de la gamme étalon :

- Préparer une solution mère d'acide gallique à 500mg/L dans l'eau
- Préparer des solutions filles à 200, 100, 50, 20 et 10mg/L (Tableau 5)

Tableau 5 : Préparation des solutions filles pour le dosage des polyphénols totaux

Concentration solutions filles (mg/L)	200	100	50	20	10
Volume de solution mère (µL)	400	200	100	40	20
Volume d'eau (µL)	600	800	900	960	980

- Préparer les milieux réactionnels (Tableau 6)
- Réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10 ; Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 75g/L (soit 3,75g dans 50mL).

Tableau 6 : Préparation des milieux réactionnels pour le dosage des polyphénols totaux

	Blanc	Etalon	Echantillon (au minimum 2 dilutions différentes)
Volume d'eau (µL)	200	/	/
Volume d'acide gallique (µL)	/	200	/
Volume d'échantillon (µL)	/	/	200
Volume de réactif de Folin (mL)	1	1	1
Volume de $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (µL)	800	800	800
A réaliser en triplicat			

- Après ajout du réactif de Folin, attendre 5 minutes à T°C ambiante
- Ensuite, une fois ces milieux prêts, laisser l'ensemble des tubes 2 heures à T°C ambiante et à l'obscurité
- Mesurer l'absorbance à 765nm en microplaque

- **Dosage des flavonoïdes (dosage spectrophotométrique au trichlorure d'aluminium) : sous hotte**

Préparation de la gamme étalon :

- Préparer une solution mère de chrysin à 500mg/L dans de l'éthanol

- Préparer des solutions filles à 50, 40, 20 et 10mg/L (Tableau 7)

Tableau 7 : Préparation des solutions filles pour le dosage des flavonoïdes

Concentration solutions filles (mg/L)	50	40	20	10
Volume de solution mère (µL)	100	80	40	20
Volume d'éthanol (µL)	900	920	960	980

- Préparer les milieux réactionnels (Tableau 8)

- Solution de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) diluée à 2% (soit 1g dans 50mL d'eau).

Tableau 8 : Préparation des milieux réactionnels pour le dosage des flavonoïdes

	Blanc	Etalons	Echantillons aqueux	Echantillons éthanoliques
Volume de chryisine (µL)	/	250	/	/
Volume d'échantillon (µL)	/	/	250	250
Volume d'eau (µL)	250	250	/	250
Volume d'éthanol (µL)	250	/	250	/
Volume d'AlCl <sub>3</sub> 2% (µL)	1000	1000	1000	1000
A réaliser en triplicat				

- Ensuite, une fois ces milieux prêts, laisser l'ensemble des tubes 10min à T°C ambiante et à l'obscurité

- Mesurer l'absorbance à 381nm dans des cuves en plastique

- **Dosage des saponines (dosage spectrophotométrique à la vanilline sulfurique) :**  
**sous hotte**

Préparation de la gamme étalon :

- Préparation d'une solution mère d'acide oléanolique à 1mg/mL dans l'éthanol

- Préparation des solutions filles à 1, 0.5, 0.2, 0.1 et 0.05mg/mL (Tableau 9).

Tableau 9 : Préparation des solutions filles pour le dosage des saponines

Concentration solutions filles (mg/mL)	1	0,5	0,2	0,1	0,05
Volume de solution mère (µL)	1000	500	200	100	50
Volume d'éthanol (µL)	/	500	800	900	950

- Préparer les milieux réactionnels (Tableau 10)



- Vanilline à 8% (soit 2g dans 25mL) ; Acide sulfurique à 72% (28mL d'eau + 72mL d'acide sulfurique).

Tableau 10 : Préparation des milieux réactionnels pour le dosage des saponines

	Blanc	Etalon	Echantillon
Volume d'éthanol (µL)	150	/	/
Volume d'acide oléanolique (µL)	/	150	/
Volume d'échantillon (µL)	/	/	150
Volume de vanilline 8% (µL)	150	150	150
Volume d'acide sulfurique 72% (mL)	1,5	1,5	1,5
A réaliser en triplicat			

- Ensuite, une fois ces milieux prêts, laisser l'ensemble des tubes 15min à 60°C au bain-marie puis les refroidir dans un bain d'eau froide pendant 10 minutes

- Mesurer l'absorbance à 544nm dans des cuves en plastique

- **Dosage des oses neutres (méthode de Dubois) : sous hotte**

Préparation de la gamme étalon :

- Préparation d'une solution mère de glucose à 100µg/mL puis des solutions filles en cascade à 50 et 25µg/mL (Tableau 11)

Tableau 11 : Préparation de la gamme étalon de glucose pour la méthode de Dubois

Concentration (µg/mL)	100	50	25
Glucose (mg ou mL de la solution précédente)	50mg	1mL	1mL
Eau osmosée (mL)	500	1	1

- Préparer les milieux réactionnels (Tableau 12)

- Solution phénolique à 5% (soit 5g dans 100mL d'eau) ; solution d'acide sulfurique à 95%

Tableau 12 : Préparation des milieux réactionnels pour le dosage des sucres neutres

	Blanc	Etalon	Echantillon
Eau (µL)	200	/	/
Solution étalon (µL)	/	200	/
Extrait (µL)	/	/	200
Solution phénolique 5% (µL)	200	200	200
Acide sulfurique 95% (µL)	1000	1000	1000
A réaliser en triplicat			

- Placer les tubes au bain-marie à 100°C pendant 5 minutes, puis les refroidir dans un bain de glace

- Placer les tubes pendant 30 minutes à l'obscurité puis homogénéiser l'ensemble des tubes
- Mesurer l'absorbance à 492nm dans des cuves en plastique

## Annexe 2 : Courbes d'adsorption des saponines sur la résine XAD

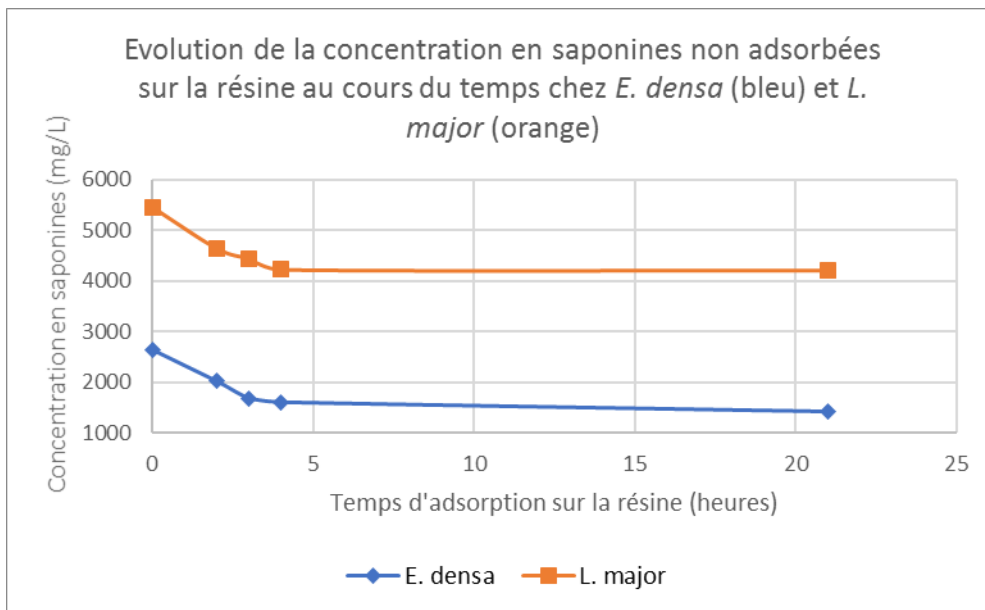


Figure 21 : Evolution de la concentration en saponines non adsorbées sur la résine au cours du temps chez *E. densa* (bleu) et *L. major* (orange)

## **Bibliographie**

- ABBAS M., SAEED F. et al., (2017). Natural polyphenols : An overview. International Journal of Food Properties/Introduction/Pages 1690 et 1691  
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2016.1220393>
- COOK C., and URMI-KÖNIG K. (1984). A revision of the genus *Egeria* (Hydrocharitaceae). Aquatic Botany, 73-96.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304377084900093>
- *Egeria densa* (Elodée dense). Aquaportail  
<https://www.aquaportail.com/fiche-plante-204-egeria-densa.html>
- Espèces Exotiques Envahissantes (2016). Centre de Ressources  
<http://especes-exotiques-envahissantes.fr/espece/lagarosiphon-major/>
- HOSTETTMANN, K., MARSTON, M., HOSTETTMANN, M. (1997). Preparative chromatography techniques : applications in natural product isolation. Springer Verlag Berlin.  
<https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-03631-0>
- HUSSAIN M., DEBNATH B., QASIM M., BAMISILE B., et al. (2019). Role of Saponins in Plant Defense Against Specialist Herbivores. 24(11) : 2067  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6600540/>
- JIAO X., ZHANG X., ZHANG Q. (2017). Optimization of enrichment and purification of polyphenols from blueberries (*Vaccinium* spp.) by macroporous resins XAD-7HP. Emirates Journal of Food and Agriculture 29(8):581-588  
[https://www.researchgate.net/publication/320457672\\_Optimization\\_of\\_enrichment\\_and\\_purification\\_of\\_polyphenols\\_from\\_blueberries\\_Vaccinium\\_spp\\_by\\_macroporous\\_resins\\_XAD-7HP](https://www.researchgate.net/publication/320457672_Optimization_of_enrichment_and_purification_of_polyphenols_from_blueberries_Vaccinium_spp_by_macroporous_resins_XAD-7HP)
- KOUGAN NKOKAP G-B. (2010). Isolement et caractérisation des saponosides de trois plantes de la famille des araliaceae et dracaenaceae et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales. Biologie végétale. Université de Bourgogne.  
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00841944/document>
- *Lagarosiphon major* (African elodea) (2008). Invasive Species Compendium  
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/30548>
- *Lagarosiphon major* (Elodée d'Afrique). Aquaportail  
<https://www.aquaportail.com/fiche-plante-228-lagarosiphon-major.html>
- LESCUYER Laboratoire. La micronutrition source de santé.  
<https://www.laboratoire-lescuyer.com/blog/micronutrition/les-polyphenols#:~:text=Les%20polyph%C3%A9nols%20sont%20une%20famille,trouvent%20dans%20les%20plantes%20comestibles.>

- Les plantes invasives (2020). Agence Nationale Sécurité Sanitaire Alimentaire Nationale (ANSES)

<https://www.anses.fr/fr/content/les-plantes-invasives#:~:text=Quelques%20exemples,hautement%20allergisant%20pour%20l'Homme>

- Les saponosides (2022). PhytoMAG

<https://phytomag.com/saponosides-saponines/>

- LEVY V., WATTERLOT A., BUCHET J., HAUGUEL J-C., TOUSSAINT B. (2015). Plantes exotiques envahissantes du Nord-Ouest de la France : 30 fiches de reconnaissance et d'aide à la gestion. Centre régional de phytosociologie agréé Conservatoire botanique national de Bailleul, 140 p. Bailleul.

[http://cen-normandie.fr/sites/default/files/fichiers/30\\_fiches\\_de\\_reconnaissance\\_-\\_plantes\\_exotiques\\_envahissantes\\_du\\_no\\_de\\_la\\_france\\_-\\_cbnbl-.pdf](http://cen-normandie.fr/sites/default/files/fichiers/30_fiches_de_reconnaissance_-_plantes_exotiques_envahissantes_du_no_de_la_france_-_cbnbl-.pdf)

- LUO J., WANG Y., TANG S., LIANG J., LIN W., LUO L. (2013) Isolation and Identification of Algicidal Compound from *Streptomyces* and Algicidal Mechanism to *Microcystis aeruginosa*. College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Pr China.

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0076444>

- MANASE M. (2013) Etude chimique et biologique de saponines isolées de trois espèces malgaches appartenant aux familles des Caryophyllaceae, Pittosporaceae et Solanaceae. Biologie végétale. Université de Bourgogne.

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01015619/document>

- MOHAMED, Z.A., 2017. Macrophytes-cyanobacteria allelopathic interactions and their implications for water resources management – A review. *Limnologia*, 63: 122–132.

[https://www.researchgate.net/publication/314298868\\_Macrophytes-Cyanobacteria\\_allelopathic\\_interactions\\_and\\_their\\_implications\\_for\\_water\\_resources\\_management\\_-\\_a\\_review](https://www.researchgate.net/publication/314298868_Macrophytes-Cyanobacteria_allelopathic_interactions_and_their_implications_for_water_resources_management_-_a_review)

- MUANDA NSEMI F. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Biologie végétale. Université Paul Verlaine - Metz

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752680/document>

- NAKAI S., HOSOMI M., OKADA M., MURAKAMI A. (1996) Control of algal growth by macrophytes and macrophyte extracted bioactive compounds. *Water Science and Technology*, 34 (7–8): 227-235

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273122396007494>

- OSBOURN, A. E. (1996a). Saponins and plant defence—a soap story. *Trends Plant Science*, 1:4–9. OSBOURN, A. E. (1996b). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *The Plant Cell*, 8:1821–31

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138596800161>

- PENSEC F., MARMONIER A., MARCHAL A., GERSCH S., NASSR N., CHONG J., HENRY M., DEMANGEAT G., BERTSCH C. (2013). Gypsophila paniculata root saponins as an environmentally safe treatment against two nematodes, natural vectors of grapevine fanleaf degeneration. Australian Journal of Grape and Wine Research, 19(3): 439-445.

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01524667>

- PIERRA J. (2020). Analyse des saponines triterpéniques et des composés phénoliques de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Aralia nudicaulis* L. Université du Québec à Chicoutimi  
[https://constellation.uqac.ca/6378/1/Pierra\\_uqac\\_0862N\\_10748.pdf](https://constellation.uqac.ca/6378/1/Pierra_uqac_0862N_10748.pdf)

- SCHOELYNCK J., PUJALON S., MEIRE P., STRUYF E. (2015). Thigmomorphogenetic responses of an aquatic macrophyte to hydrodynamic stress  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25699070/>

- SOTO M., FALQUE E., DOMINGUEZ H. (2015). Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics/[www.mdpi.com/journal/cosmetics/2](http://www.mdpi.com/journal/cosmetics/2). Phenolic Composition, 2.1. Chemical Classification of Phenolic Compounds/Page 261  
<https://www.mdpi.com/2079-9284/2/3/259>

- STUARDO M., SAN MARTIN R. (2008). Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. Industrial Crops and Products, 27(3), 296–302.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669007001598>

- VENUGOPAL S., DEVARAJAN S. (2011). Estimation of total flavonoids, phenols and antioxidant activity of local and New Zealand manuka honey. Journal of Pharmacy Research, 4(2), 464-466  
[https://www.researchgate.net/publication/283427882\\_Estimation\\_of\\_total\\_flavonoids\\_phenols\\_and\\_antioxidant\\_activity\\_of\\_local\\_and\\_New\\_Zealand\\_manuka\\_honey](https://www.researchgate.net/publication/283427882_Estimation_of_total_flavonoids_phenols_and_antioxidant_activity_of_local_and_New_Zealand_manuka_honey)

- ZHANG B., CAI J., DUAN C-Q., REEVES M., HE F. (2015). A Review of Polyphenolics in Oak Woods. International Journal of Molecular Sciences/2. Classification of Plant Polyphenols/Pages 6980, 6981 et 6982  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25826529/>