

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Physiologie et physiopathologie animale

Présenté par :

*CHOUANIA Bisma et BOUKABOUS Amel*

*Thème*

*Optimisation de l'extraction des alcaloïdes  
de lupin blanc (Lupinus albus L)*

Soutenu le : 01 / 07 / 2017

Devant le jury composé de :

*Nom et Prénom*

*Grade*

Mr. DAHMOUNE Farid

MCA

Univ. de Bouira

Président

Mr. REMINI Hocine

MAB

Univ. de Bouira

Promoteur

Mr. KADRI Nabil

MCA

Univ de Bouira

Co-promoteur

Mr. ADRAR Nabil

MAB

Univ. de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2016/201

# *Remerciements*

Nous remercions tout d'abord « Allah » le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous remercions nos chers parents qui nous ont aidés à être ce que nous sommes et Qui nous ont entourés avec tant d'amour et d'affection. On remercie leur dévouement, leur consacre de temps et leur présence constante au cours de toutes ces années d' « études ». On ne saurait jamais les remercier assez pour leur bien. « Merci, ce travail est la vôtre ». On vous aime...

On remercie tendrement notre famille et nos frères pour leur soutien et leur encouragement, et un merci du fond du nos cœurs à nos sœurs qui ont été toujours à notre côtés, qui nous ont soutenue et sur tout nous ont supportées au moment difficiles.

Nous tenons à remercier notre promoteur Mr. REMINI Hocine qui a accepté de nous encadrer et qui nous a guidés dans la réalisation de ce travail.

Nous tenons également à remercier notre co-promoteur Mr. KADRI Nabil, d'avoir accepté de diriger ce travail

Nos sincères remerciements vont aussi à Mr DAHMOUNE Farid , de nous avoir fait l'honneur de présider le jury ,et Mr ADRAR Nabil , d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions tous nos amis en particulier les étudiants de l'option « MPPA ». Finalement, on est profondément reconnaissantes à toute personne qui nous a aidés de près ou de lo, directement ou indirectement durant ce passage.

**AMEL ET BESMA**

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**AT:** alcaloïdes totaux

**GHZ:** Giga Hertz

**GABA:** Gamma Amino Butyric Acid

**HIV:** Virus de l'Immunodéficience Humaine

**HPLC:** la chromatographie liquide à haute performance

**KHz:** kilohertz

**MAE:** Microwave Assisted Extraction

**MHz:** Méga Hertz

**MS :** matière sèche

**nm:** nanomètre

**SIDA:** Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise

**TH:** taux d'humidité

**UAE:** Ultrasonic Assisted Extraction

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Classification des alcaloïdes	09
<b>II</b>	Plan d'expérience proposé pour l'optimisation de l'extraction des alcaloïdes.	22
<b>III</b>	Taux d'humidité	26
<b>IV</b>	Résultat de l'optimisation de la teneur en alcaloïdes totaux	26
<b>V</b>	l'estimation des coefficients du modèle relatif au rendement en alcaloïdes	27
<b>VI</b>	les concentrations des alcaloïdes totaux	annexe

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1.	<i>Lupinus albus.</i>	03
2.	composition biochimique de la graine de lupin	05
3.	Principe de l'extraction des alcaloïdes en milieu alcalin	13
4.	Représentation du spectre électromagnétique et positionnement des micro-ondes domestiques	15
5.	Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation	16
6.	Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide	16
7.	Schéma général des différentes étapes de la procédure expérimentale.	19
8.	Les graines du lupin blanc ( <i>Lupinus albus L</i> )	20
9.	Tamis de granulométrie de 200µm	21
10.	La poudre de graine séchée de <i>Lupinus albus L.</i>	21
11.	Le filtrat de l'extrait d'alcaloïdes à partir du lupin blanc.	23
12.	La décantation de l'extrait brut	24
13.	Protocole de dosage des alcaloïdes totaux.	25
14.	représentations tridimensionnelles des effets des facteurs sur le rendement en alcaloïdes	29
15.	l'estimation de la qualité d'ajustement des points expérimentaux .	30
16.	Courbe d'étalonnage de l'atropine	annexe

## GLOSSAIRE01 : TERMES MEDICAUX

**Analgésique** = médicament qui prévient ou diminue la sensation de douleur.

**anti-allergique** = un médicament que l'on administre pour lutter contre les allergies

**anti-cholinergique** = une substance qui s'oppose à l'action de l'acétylcholine.

**Antihypertenseur** = utilisés pour rétablir une tension artérielle (TA) normale en cas d'hypertension.

**antiparasitaire** = Les antiparasitaires sont les médicaments utilisés pour traiter les maladies dues aux parasites.

**antipyrétique** = médicament utilisé dans le traitement de la fièvre.

**anti-tumeur** = empêche la multiplication des cellules cancéreuses et de détruire les tumeurs.

**Asthme** = trouble respiratoire chronique.

**Bronchite** = une inflammation des bronches respiratoire.

**diurétique** = est une substance qui entraîne une augmentation de la sécrétion urinaire.

**Euphorisante** = Se dit des substances qui procurent l'euphorie.

**Fièvre** = est une température corporelle anormalement élevée, qui dépasse 38 °C.

**Hypnotique** = est un médicament qui déclenche le sommeil.

**Malaria** = ou Le paludisme est une maladie qui peut être mortelle, due à des parasites. Les parasites du genre Plasmodium sont transmis par des moustiques de type Anopheles infectés.

**Odontologie** = se décline en plusieurs spécialités, parmi lesquelles l'orthodontie (alignement des dents), la parodontologie (étude des tissus voisins de la dent) ou la mise en place de prothèses dentaires.

**rythme cardiaque** = définit le nombre de battements du coeur par minute.

**tumeurs** = sont des excroissances dues à une prolifération anormale de cellules.

**vasodilatateur** = sont des médicaments qui permettent de dilater les vaisseaux sanguins .

## GLOSSAIRE 02 :THERME BOTANIQUES

**Apicule** = Qui est terminé au sommet en pointe courte et aigüe.

**Calice** = est constitué par l'ensemble des sépales.

**Folioles** = petite feuille, parfois appelé penne, est une pièce foliaire constituant une des parties du limbe d'une feuille composée

**Glabres** = Se dit d'un organe végétal dépourvu de poils.

**Gousse** = Fruit des plantes du groupe des légumineuses, à péricarpe sec et déhiscent, qui s'ouvre généralement à la maturité par deux fentes, ce qui partage le fruit en deux valves, dont chacune emporte avec elle une rangée de graines.

**Lenticulaires** = Qui a la forme d'une lentille

**Oblongues** = désigne une forme qui est plus longue que large et dont les angles sont arrondis.

**Obovale** = Qui a la forme d'un ovale renversé ; qui est plus large à son extrémité qu'à son origine.

**Pédicelle** = est un petit pédoncule solitaire ou pédicule en forme de tige.

**Tribu** = il se dit d'une Division de la classification qui prend place entre la famille et le genre.

**Velue** = Couvert de poils.

**Herbacé** = Se dit d'une plante non ligneuse (dont la tige n'a pas la consistance du bois).

# Sommaire

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

## Partie bibliographique

### Chapitre I : l'état de l'art de *Lupinus albus L.*

I.1.Introduction.....	02
I.2. Historique .....	02
I.3.Description et Systématique.....	02
I.4.Origine et habitat.....	04
I.5.Composition chimique.....	04
I.6.Les différentes applications de lupin blanc.....	05
I.7.Toxicité.....	06

### Chapitre II : Généralité sur les alcaloïdes

II.1.Introduction.....	07
II.2.Définition.....	07
II.3.Les types et classification des alcaloïdes.....	08
II.3.1.les alcaloïdes vrais.....	08
II.3.2. Les pseudo_ alcaloïdes.....	08
II.3.3.Les proto_ alcaloïdes .....	08
II.4. Localisation des alcaloïdes .....	10
II.5. Extraction des alcaloïdes.....	11
II.5.1.Extraction conventionnelle.....	11

II.5.1.1.L'extraction des alcaloïdes par un solvant en milieu alcalin.....	11
II.5.1.2.Extraction par un solvant en milieu acide .....	13
II.5.1.3.Fractionnement et purification des alcaloïdes.....	14
II.5.2. Extraction non conventionnelle.....	14
II.5.2.1.L'extraction par micro-ondes (MAE, MicrowaveAssisted Extraction).....	14
II.5.2.2.L'extraction assistée par ultra-sons (UAE, Ultrasonic Assiste Extraction).....	15
II.6. Le Rôle des alcaloïdes .....	17
II.6.1. Effet pharmacologique des alcaloïdes .....	17
II.6.2. Effet sur la plante .....	17

## **Partie pratique**

### **Chapitre III : Matériels et Méthodes**

III.1. Matériels.....	18
III.1.1.Matériels du laboratoire.....	18
III.1.2.Matériel végétal.....	18
III.2.Méthodes.....	19
III.2.1. Echantillonnage du matériel végétal.....	19
III.2.1.1. Séchage.....	20
III.2.1.2. Broyage et le tamisage.....	20
III.2.2.Taux d'humidité.....	21
III.2.3. Optimisation de l'extraction des alcaloïdes.....	22
III.2.4. L'extraction des alcaloïdes totaux.....	23
III.2.5. Dosage des alcaloïdes totaux.....	24

III.3. Analyse statistique et traitement de données.....	25
--	----

## **Chapitre IV :Résultats Et Discussion**

IV.1. Taux d'humidité.....	26
IV.2. Résultat de l'optimisation de la teneur en alcaloïdes totaux.....	26
IV.3. Model mathématique des résultats d'essais.....	26
IV.4 .Les surface de réponse pour les interactions entre les facteurs deux par deux ...	28
IV.4.1. Analyse graphique des résultats par l'utilisation des surfaces de réponses.....	29
V.5. Modalité d'ajustement qualitatif.....	30
V.6. Discussion .....	31
<b>Conclusion.....</b>	<b>32</b>

### **Référence bibliographiques**

### **Annexe**

# *Introduction*

## Introduction

La nature, ou comme l'appelle **Pierre Potier** « le Magasin du Bon Dieu », avec 250000 à 500000 espèces de plantes, ses micro-organismes et ses produits marins, est la source d'une formidable diversité de molécules, possédant parfois des propriétés thérapeutiques, mais servant aussi de modèles à l'imagination des chimistes, pour créer des molécules plus actives. Seule une poignée de ces richesses a été explorée (**Krief, 2003**).

Les végétaux supérieurs ont la capacité de synthétiser, par des voies métaboliques complexes des métabolites dites secondaires. Ces composés sont utilisés par les plantes pour diverses fonctions adaptatives notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir (**Thomas, 2011**).

Ces métabolites sont situées dans l'un des trois classes, des polyphénols, des alcaloïdes et des terpénoïdes. De nombreuses études ultérieures ont prouvé la bio-activité de ces molécules, citant les activités anti-tumorales, antivirales, antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires..., etc. due à l'usage des plantes renfermant ces métabolites dans divers domaines : thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (**Thomas, 2011, Rispaïl et al., 2005**).

Cette large vertu d'utilisation des métabolites secondaires implique leur identification. Cette dernière nécessite une démarche procédurale, commençant par l'extraction des métabolites à partir de matériel végétal, séparation et purification de ces métabolites et enfin leur identification structurale.

C'est dans cette optique que se situe ce présent travail, dont l'objectif est l'optimisation de l'extraction des alcaloïdes à partir d'une plante locale « *Lupinus albus L* ».

La démarche suivie est scindée en quatre chapitres, le premier porte sur l'état de l'art de *Lupinus albus L*, alors que le deuxième présente des généralités sur les alcaloïdes. Matériels et méthodes et résultats et discussion font l'objet du troisième et quatrième chapitre de la partie expérimentale.

# *Chapitre I*

*L'Etat de l'art de Lupinus albus L*

## I.1. Introduction

Le lupin est une plante herbacée appartient à la famille des Fabacées, dont différentes espèces sont cultivées depuis plus de 4000 ans comme aliment ou fourrage, engrais vert ou plantes ornementales pour leurs grappes de fleurs aux multiples couleurs (**Sbabou, 2009**).

Les graines de lupin blanc, lisses et comprimées sont les plus consommées, car elles sont exemptes de substances toxiques et ne nécessitent pas une longue préparation. Cette plante protéagineuse, parfaitement adaptée aux climats méditerranéen, est d'un grand intérêt agronomique, économique et nutritionnelle. en tant que ressource en protéines végétales et en huiles ce qui lui confère une bonne valeur énergétique (**Sbabou, 2009**).

## I.2. Historique

Les lupins ont une longue tradition d'utilisation comme nourriture dans les cultures méditerranéennes et andines. Les utilisations médicinales des lupins (probablement *L. albus*) ont été mentionnées par **Hippocrate de Cos (00-356 Bc) (Hanelt, 1960)**.

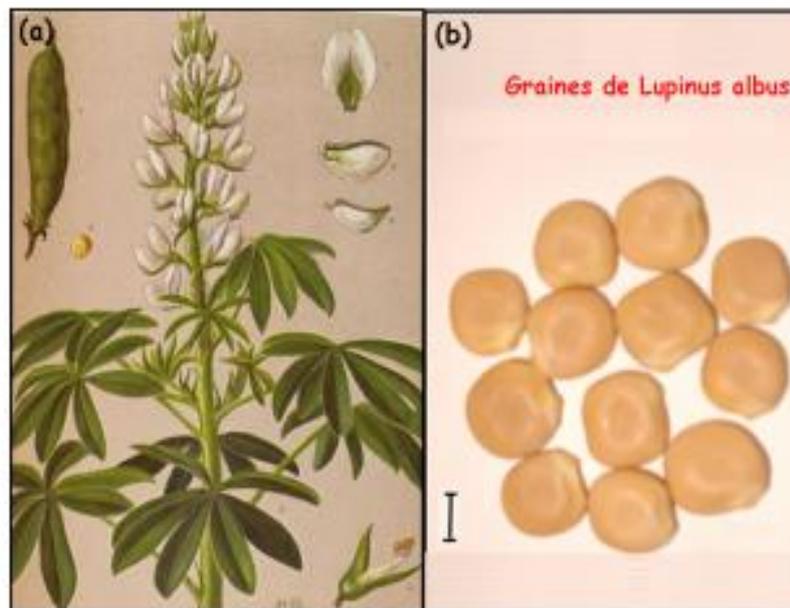
À l'époque romaine, ils ont été utilisés comme cadeaux et ont même représenté de l'argent dans les jeux, donc *nummuslupinus* «lupin money» (**Guillaume 1923**, cité dans **Gladstones, 1998**).

Il existe des rapports fréquents de leur utilisation comme culture améliorant le sol en rotation avec le blé pendant la période romaine (**Hondelmann, 1996**). Néanmoins, leur développement en tant que culture alimentaire a été sévèrement limité par les alcaloïdes qui devaient être éliminés avant la consommation. Les Lupins plus tard ont été considérés dans beaucoup de régions en tant que nourriture pour les personnes les plus pauvres, en Italie, *L. angustifolius* sauvage a été mangé en période de famine, conduisant au nom commun *lupinosalvatico* (**Gladstones, 1974 ; Cowling (1984)** a appris des villageois du nord de la Grèce que *L. angustifolius* était aussi (probablement après avoir été écrasé) dans des périodes très difficiles au début du 20ème siècle, connu par certains comme "café sauvage" . Une culture de *L. albus* amer, destinée à faire du café a été notée par **Simpson et MoGibbon (1982)** en Yougoslavie .

## I.3. Description et systématique

Le genre *Lupinus* rassemble des plantes à fleurs appartenant à la famille des Fabaceae, à la sous-famille des Faboideae et à la tribu des Genisteae (**Schrire et al., 2005**).

Le lupin blanc ou *Lupinus albus* est une plante annuelle (**Lindley, 1836**) de 20-40 cm, couverte de poils appliqués ou dressés-étalés, folioles obovales-oblongues, glabres en dessus, poilues en dessous, fleurs blanches, teintées de bleu au sommet, alternes ou géminées, non verticillées, en grappes courtes, pédicelles plus courts que le calice, calice à lèvre supérieure entière, égalant presque l'inférieure à peine tridentée, gousse velue, largement linéaire, apiculée, à suture supérieure droite (Figure 1a), à 4-6 graines grosses (jusqu'à 0.45g/graine) (**Presson et Louveaux, 1984**), lenticulaires, lisses, blanches à tendance rosâtre (Figure 1b) selon la concentration en alcaloïdes. Ses graines sont les plus larges graines des lupins avec 8 à 12 mm de diamètre, 10 à 14 mm de long et 3 à 5 mm d'épaisseur. La floraison commence le juin et les graines sont fixées en octobre (**Clapham et Elbert-May, 1989**).



**Figure 01:** *Lupinus albus*. (a) plante avec feuilles, fleurs blanches et gousse. (b) graines.

Unité = 0,5 cm (**Sbabou, 2009**).

Le lupin blanc appartient au :

**Règne :** Plantae

**Ordre :** Fabales

**Famille :** Fabaceae

**Sous-famille :** Faboideae

**Tribu :** Genisteae

**Genre** : *Lupinus L.*

**Espèce** : *albus* (Ainouche et al.,2004 ; Spichiger et al., 2002).

**Dénomination botanique** : *Lupinus albus L*

**Noms vernaculaires** : Lupin blanc , lupin (Fr) . White lupin ,Egyption lupin (En) .

Tremoceiro ,termoceirobranco , termoceiro de Beira , termoço (Po)(**Brink et Belay , 2006**). L.Termis (EGY) (**Sbabou , 2009**)

#### **I.4. Origine et Habitat**

Le lupin blanc est originaire du sud-est de l'Europe et de l'Asie occidentale où des types sauvages sont encore présents. Sa culture est connue depuis l'antiquité en Grèce, en Italie, en Egypte et à Chypre. Au cours de l'histoire de sa culture, son importance a souvent fluctué, actuellement, il a quasiment disparu d'Europe centrale , alors qu'il est de plus en plus répandu en Amérique. De nos jours, c'est un légume sec traditionnel secondaire, cultivé autour de la méditerranée et de la mer Noire, dans la vallée du Nil, jusqu'au soudan et en Ethiopie. Il est aussi parfois cultivé ailleurs, par ex au Kenya, en Tanzanie, au Zimbabwe, en Afrique du sud, à l'île Maurice, aux Etats-Unis et en Amérique du sud (essentiellement au Brésil et au Chili) (**Brink et Belay,2006**).

#### **I.5 .Composition chimique**

Le grain du lupin est composé d'eau, 35 % de protéines (lysine, méthionine, cystine et tryptophane), soit autant que le soja et beaucoup plus que le pois (25%) et la féverole (29%). De plus, le lupin ne contient que 1% d'amidon (Figure 02), contrairement au pois (50%), à la féverole (40%) et au soja (10%) (**Anonyme 1**).

Bien pourvu en minéraux :

Sodium, cuivre, magnésium, fer, calcium, phosphore, potassium, manganèse et zinc, sélénium, également en vitamines A et C et toutes les vitamines du groupe B (**Anonyme 2**).

Les graines de lupin ont une valeur énergétique élevée avec une concentration de lipides comprise entre 10 et 15 (**Guillaume et al., 1987**).

Les graines de lupin blanc sont généralement classées comme sucrées ou amères en fonction de la teneur en alcaloïdes, qui est de 0,01 à 4% (**Bhardwajand, 2012**). Les graines

amères contiennent les alcaloïdes de quinolizidine, la lupanine et la spartéine (Cowlings *et al.*, 1998).

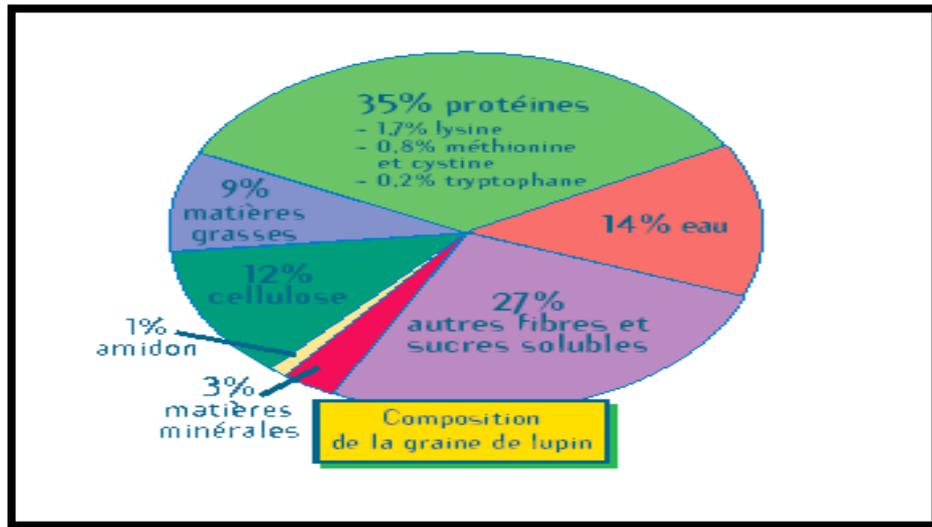


Figure 02: composition biochimique de la graine de lupin (Anonyme 1 ).

## I.6. Les différentes applications de lupin blanc

Dans la médecine traditionnelle, les graines de lupin sont utilisées pour guérir des vers, réduire les furoncles et les affections cutanées (Jansen, 2006), repousser les insectes, améliorer la tolérance au sucre chez les diabétiques et soigner les plaies (Duke, 1981). La farine de lupin mélangée à du miel ou du vinaigre est utilisée en cure contre les vers (Brink et Belay , 2006).

Un des alcaloïdes du lupin blanc est la spartéine qui a une action très forte sur la plupart des muscles lisses (Huyghe et Papineau,1996).

Le lupin blanc est cultivé traditionnellement pour la consommation humaine, comme engrais vert et comme plante fourragère. Avant d'être consommées, les graines sont tout d'abord mises à tremper 1-3 jours dans de l'eau courante afin d'éliminer les alcaloïdes amers et toxiques (Brink et Belay,2006) .

Une consommation habituelle de lupin prévient l'hypertension et réduit le niveau de cholestérol dans le corps (Anonyme 2) .

Le lupin est une bonne alternative pour les végétariens grâce à son très grand pourcentage de protéines végétales. Les lupins peuvent être consommés sous différentes formes, tels que cuits comme des pois chiches, en conserve et ajouté à des salades et à divers plats, et broyé dans

une farine très fine pour faire des pains et des gâteaux à haute teneur en protéines (**Meredith, 1991**).

Le lupin blanc est une bonne plante mellifère double d'une plante ornementale attrayante (**Brink et Belay,2006**).

### **I.7.toxicité**

Les graines et les parties vertes du lupin blanc contiennent des alcaloïdes qui sont toxiques pour les humains et le bétail. Comme la plupart des alcaloïdes du lupin blanc sont hydrosolubles, les niveaux d'alcaloïdes peuvent être diminués en les trempant dans de l'eau courante, de la saumure ou de l'écaillage (**Erbas *et al.*, 2005**).

# *Chapitre II*

## *Généralité sur les alcaloïdes*

## II.1.Introduction

La recherche sur les substance naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques, toujours à la recherche de nouveaux composés actifs, se tournent de plus en plus vers l'indentification et la caractérisation de molécules issues de matrices naturelles, et s'inspirent de leur structure moléculaire pour imaginer de nouveaux médicaments (**Verpoorte,1986**).

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces, ils sont biosynthétisés à partir des métabolites primaire et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante et son environnement, contribuent ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème.

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes, parmi ceux-ci : les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (**Bruneton ,1993 ;Tyler *et al.*,1981; Guignard,1996**).

Les alcaloïdes, largement existant dans les plantes naturelles, sont des composés contenant des atomes d'azote basiques. La plupart des alcaloïdes sont des ingrédients pharmacologiquement actifs dans de nombreuses plantes médicinales en raison de leur activité physiologique. De nombreux alcaloïdes peuvent être extraits de matériaux végétaux naturels et purifiés par Techniques de séparation modernes (**Al-Shahwany *et al* ,2003**)

## II.2. Définition

Le terme « alcaloïde » a été introduit par **W. Meisner** au début du XIXe siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases. Il n'existe pas de définition simple et précise des alcaloïdes et il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes et les autres métabolites azotés naturels. Ainsi, Bruneton en 1999 définit un alcaloïde comme « un composé organique hétérocyclique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées ». Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 structures différentes. Les alcaloïdes sont des composés que l'on retrouve essentiellement chez

les angiospermes, la plupart des alcaloïdes (« alcaloïdes vrais ») sont biosynthétiquement dérivés d'un acide aminé (d'une amine) (**Bruneton, 1999; Zenk et Juenger, 2007**).

### **II.3. Classification des alcaloïdes**

Plusieurs composés naturels ont été identifiés comme alcaloïdes, chaque année, une centaine de nouvelles molécules seraient ajoutées par les scientifiques du monde entier. Afin de mieux maîtriser cette grande liste, trois types de classification des alcaloïdes ont été proposées, selon l'activité biologique et écologique, leurs structures chimiques ou leur voie de biosynthèse (**Tadeusz,2007**).

Les alcaloïdes sont généralement classés en fonction de la nature du cycle qui prédomine dans la molécule, cependant malgré leurs structures extrêmement variées, les alcaloïdes proviennent d'un petit nombre de précurseurs simples. La plupart des alcaloïdes sont synthétisés à partir d'un petit nombre d'acides aminés ordinaires (Tyrosine, Tryptophane, ornithine ou arginine et lysine) (**Hopkins,2003**).

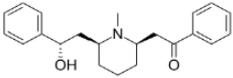
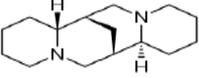
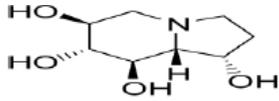
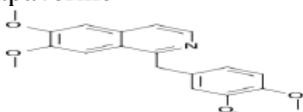
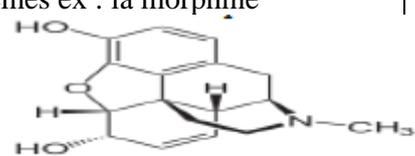
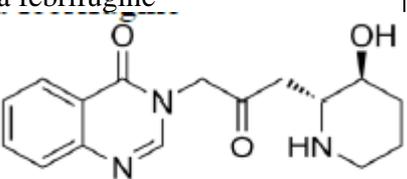
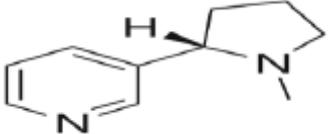
Les alcaloïdes sont généralement classés en 3 types, selon leurs structures moléculaires et l'origine de biosynthèse :

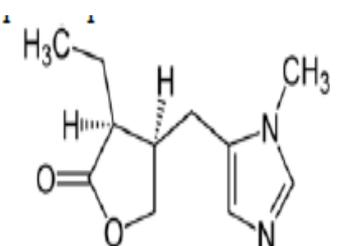
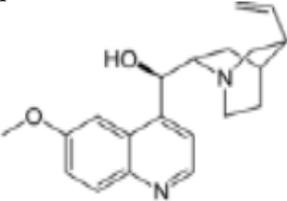
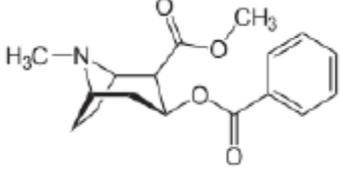
**II.3.1.Alcaloïdes vrais** : ils présentent un azote inclus dans l'hétérocycle , il sont synthétisés à partir d'un petit nombre d'acide aminés essentiels (tryptophane, arginine,et lysine),ils sont classés selon la nature de leurs cycles (**Guignard,2000**).

**II.3.2.Proto alcaloïdes** :ce sont des alcaloïdes qui ne possèdent pas un atome d'azote intra cyclique, ils ont une structure simple, proche des amines , ces substances sont dérivées à partir d'un acide aminé (**Guignard,2000**).

**II.3.3.Pseudo alcaloïdes** : présentant le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés.ils s'agissent dans la majorité des cas connus d'alcaloïdes terpéniques : alcaloïdes mono terpéniques et sesquiterpinéques, il existe également des substances azotées hétérocycliques issues du métabolisme de l'acétate :c'est le cas de la conine; principe toxique de la ciguë (**Bruneton,1999**).

**Tableau I : Classification des alcaloïdes (Mauro, 2006 ; Wilhelm, 1998)**

Les dérivés des alcaloïdes	Exemple	Les propriétés
<b>Alcaloïdes dérivés de la lysine</b>	<p>Composés piperidinique ex : la lobéline</p>  <p>Composés quinolizidines ex : la spartéine</p>  <p>Composés indolizidinique ex : la castanospermine</p> 	<p>-Utilisée dans les préparations pour lutter contre les tabagismes l'extrait brut de la plante est largement employé dans le traitement de l'asthme et de la bronchite.</p> <p>-Très toxique mais le sel de sulfate correspondant est utilisé en médecine comme agent stimulant de rythme cardiaque. - utilisée pour provoquer la contraction de l'utérus au cours de l'accouchement.</p> <p>-Leur action contre le virus du SIDA(HIV).</p>
<b>Alcaloïdes dérivés de la tyrosine et de la phénylalanine</b>	<p>Composés monocyclique ex : l'éphédrine</p>  <p>Les isoquinoléines ex : la papavérine</p>  <p>Les benzyltétrahydroisoquinoléines ex : la morphine</p> 	<p>-Utilisée dans le traitement de l'asthme bronchique Médicament analgésique et anti-allergique.</p> <p>-Une activité vasodilatatrice Propriétés hypnotiques et analgésique.</p> <p>-A un effet calmant sur des zones du système nerveux central.</p> <p>-Inhibe la sensation de douleur. -Effet analgésique associé a un effet euphorisant.</p>
<b>Alcaloïdes dérivés de l'acide anthranilique</b>	<p>La fébrifugine</p> 	<p>-Propriétés antipyrétiques et antiparasitaires.</p> <p>-Une activité antitumorale sur différents modèles de tumeurs humaines du poumon du colon et des ovaires.</p>
<b>Alcaloïdes dérivés de l'acide nicotinique</b>	<p>La nicotine</p> 	<p>-Effet contre les attaques des herbivores et des insectes Stimulant respiratoire.</p> <p>-Agent aidant le processus de sevrage tabagique.</p>

<p><b>Alcaloïdes dérivés de l'histidine</b></p>	<p>La pilocarpine</p> 	<p>-Utilisée en ophtalmologie dans le traitement du glaucome.</p>
<p><b>Alcaloïdes dérivés du tryptophane</b></p>	<p>La quinine</p> 	<p>-Utilisée dans les traitements de la crampe nocturne de la jambe. -Tue les mérozoïtes de l'agent vecteur de la malaria, et empêche les accès de fièvre.</p>
<p><b>Alcaloïdes dérivés de l'ornithine</b></p>	<p>La cocaïne</p> 	<p>-Utilisée dans le domaine de l'odontologie. - Elle étouffe les symptômes de fatigue et d'épuisement et permet alors des grandes performances physiques.</p>

## II.4. Localisation des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont localisés dans les tissus périphériques ; cellules épidermiques des feuilles, téguments de la graine, dans les assises situées sous le liège des écorces des tiges et des racines (**Vallet,1996**).

Si, au niveau cellulaire, tous les alcaloïdes s'accumulent dans les vacuoles, leur répartition dans la plante se fait différemment suivant les espèces : par exemple, tous les organes végétatifs et le péricarpe du fruit du pavot contiennent des alcaloïdes, tandis que chez le colatier et le cafier, seules les graines en renferment (**Guignard,1979**).

Fréquemment les alcaloïdes s'accumulent en des emplacements différents de leur lieu de synthèse, par exemple, chez le tabac, la nicotine est synthétisée au niveau des racines et migre vers le feuillage. Chez de nombreuses plantes, à la floraison et la fructification, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, dans les fruits ou les graines (**Guignard,2000**).

## **II.5. Extraction des alcaloïdes**

L'extraction des alcaloïdes est fondée, en règle générale, sur le fait qu'ils existent habituellement dans la plante à l'état de sels, et sur leur basicité, c'est-à-dire sur la solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau d'une part et dans les solvants organiques d'autre part (**Bruneton, 1999**).

Le matériel végétal renferme souvent des quantités appréciables. De graisses « c'est particulièrement vrai pour les grains » mais aussi de cires, de terpènes, de pigment et d'autres substances lipophiles qui peuvent perturber le processus extractif, notamment. Induisant la formation d'émulsion. On évitera plus ou moins totalement ces problèmes technologiques en procédant à une délipidation préalable de la drogue broyée. L'éther de pétrole ; l'hexane ; conviennent bien pour Cette opération : il est exceptionnel que les alcaloïdes soient extractibles par ces solvant lorsqu'ils sont employés en milieu neutre (**Bruneton, 1999**).

### **II.5.1. Extraction conventionnelle**

#### **II.5.1.1. L'extraction des alcaloïdes par un solvant en milieu alcalin**

##### **Première étape**

La drogue pulvérisée et délipidée est mélangée à une solution aqueuse alcaline qui déplace les alcaloïdes de leur combinaisons saline : les bases ainsilibérées sont ensuite, solubilisées dans un solvant organique l'agent d'alcalinisation est très souvent l'ammoniaque, si la structure des alcaloïdes à extraire comporte un élément fragile, par exemple une fonction ester, l'ammoniaque sera remplacé par un carbonate alcalin.

Le solvant organique peut être un solvant chloré (dichlorométhane, chloroforme, benzène ou dioxyde d'éthyle) (**Brunton, 1999**).

##### **Deuxième étape**

Le solvant organique contenant les alcaloïdes bases est séparé du marc (phase non organique) et concentré partiellement pour distillation à pression réduite. La phase organique est agitée avec une solution aqueuse acidifiée (fortement diluée à 5%) : les alcaloïdes se solubilisent dans la phase aqueuse sous forme de sels tandis que les imputés neutres restent dans la phase organique Il est indispensable d'épuiser la phase organique par l'eau acidifiée, c'est-à-dire que l'opération est répétée autant de fois qu'il est nécessaire jusqu'à ce que la phase organique n'en contienne plus d'alcaloïdes (test de Mayer).

Les acides utilisés sont très variables (chlorhydrique, sulfurique, sulfamique, tartrique...ect.),Mais Sont Toujours Employés En Solution Très Diluées(1-5%)  
**(Bovnias,1983)**

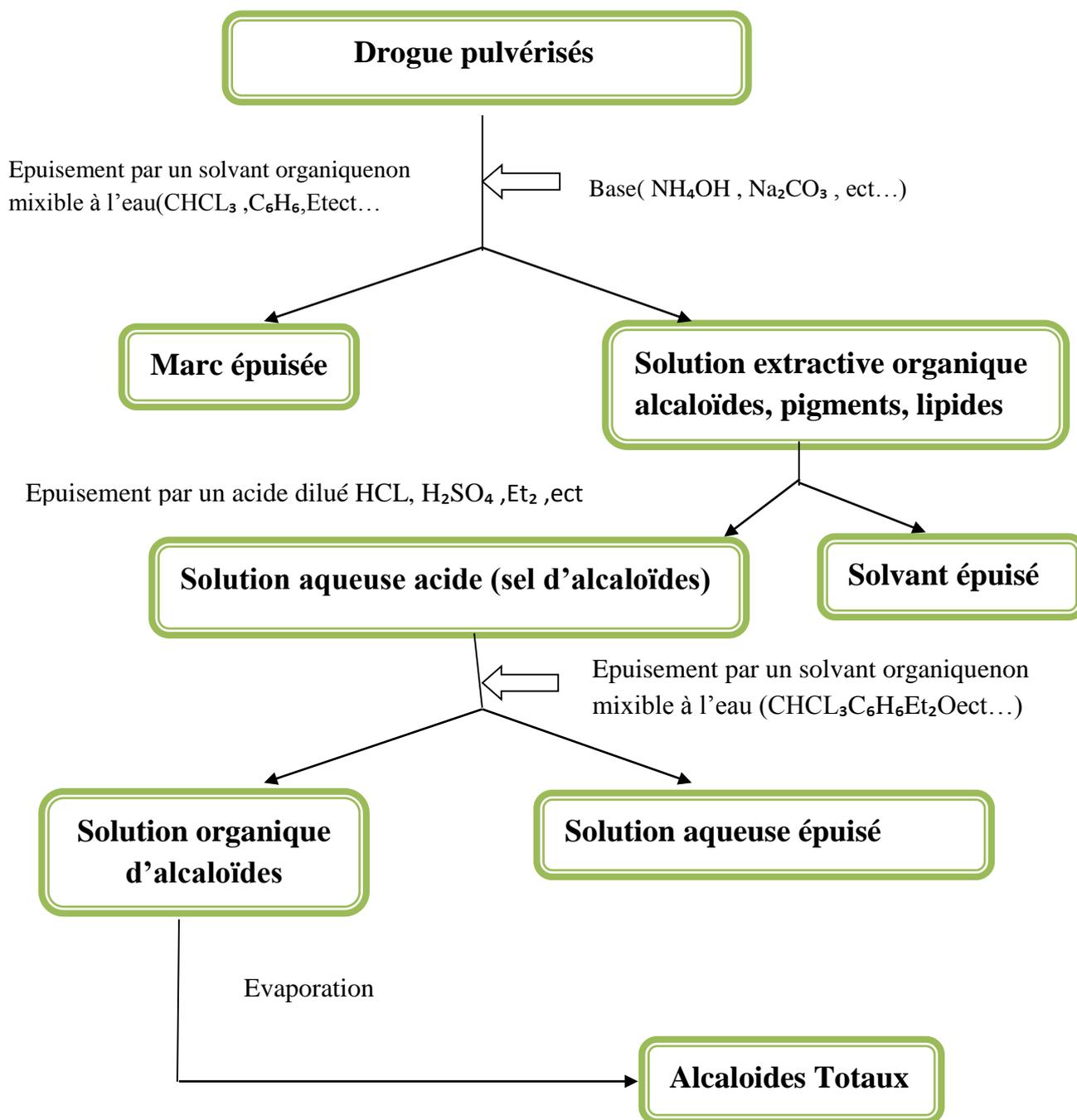
### **Troisième Etape**

Les solutions aqueuses de sels d'alcaloïde sont alcalinisées par une base (hydroxyde de sodium) en présence d'un solvant organique chloré non miscible à l'eau. L'apparition d'une émulsion peut être palliée par le lavage de la phase aqueuse, avec un solvant apolaire comme l'hexane.

Les alcaloïdes bases précipitent et se dissolvent dans la phase organique pour reprendre la même opération jusqu'à épuiser la phase aqueuse en faisant repasser tous les alcaloïdes en phase organique. L'épuisement de la phase aqueuse en alcaloïdes est vérifié par un test de mayer  
**(Brunton ,1999).**

### **Quatrième étape**

En dernier lieu, le solvant organique contenant les alcaloïdes bases est décanté, débarrassé de traces d'eau qu'il peut renfermer par déshydratation sur un sel anhydre (par exemple sulfate de sodium) et évaporé sous pression réduite; il reste alors un résidu sec qui représente les alcaloïdes totaux (AT) **(Bruneton ,1999).**



**Figure 03** :Principe de l'extraction des alcaloïdes en milieu alcalin (Bruneton,1999)

### II.5.1.2. Extraction par un solvant en milieu acide

Deux cas peuvent se présenter dans le premier, la plante ou partie de la plante pulvérisée est directement épuisée par de l'eau acidifiée ; dans le second cas, c'est avec une solution alcoolique ou hydro-alcoolique acidifiée que l'épuisement est réalisé, dans ce dernier cas, l'extraction est suivie d'une distillation sous vide qui élimine l'alcool et laisse une solution

aqueuse acide de sels d'alcaloïdes. Dans les deux, on a donc une solution aqueuse de sels d'alcaloïdes qu'il faut purifier :

- Alcaliniser la solution extraite des bases par un solvant organique non miscible ;
- Fixer sélectivement les alcaloïdes contenus dans la solution sur une résine échangeuse d'ions puis les éluer à l'aide d'un acide fort ;
- Précipiter les alcaloïdes sous la forme d'iodomercurates. Le complexe formé et récupéré par filtration, solubilisé dans un mélange hydro-alcool-acétonique est décomposé par passage sur une résine échangeuse d'ions (**Bruneton,1999**).

### **II.5.1.3. Fractionnement et purification des alcaloïdes**

Les produits obtenus lors des extractions sont des mélanges qu'il importe de fractionner pour obtenir des alcaloïdes à l'état pur. On opère par cristallisation progressive dans les solvants adéquats, par extraction successive en milieu acide à l'aide de solutions de pH décroissant, en pratiquant une séparation par contre-courant d'un solvant non miscible, et surtout par chromatographie. Les méthodes de chromatographie consistent à séparer les divers constituants d'un mélange en fonction de leur affinité pour un absorbant au sein d'un solvant choisi. On fait appel ici à la chromatographie d'absorption sur colonne (silice, alumine) avec sa variante récente, à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et aux diverses modalités de chromatographie en couche mince (Paquet, 2000).

Dans de très nombreuses circonstances, il est obligatoire de recourir aux méthodes classiques de résolution d'un mélange complexe, en particulier aux méthodes chromatographiques (sur silice, sur résine échangeuse d'ions, ... etc ) (**Bruneton ,1999**).

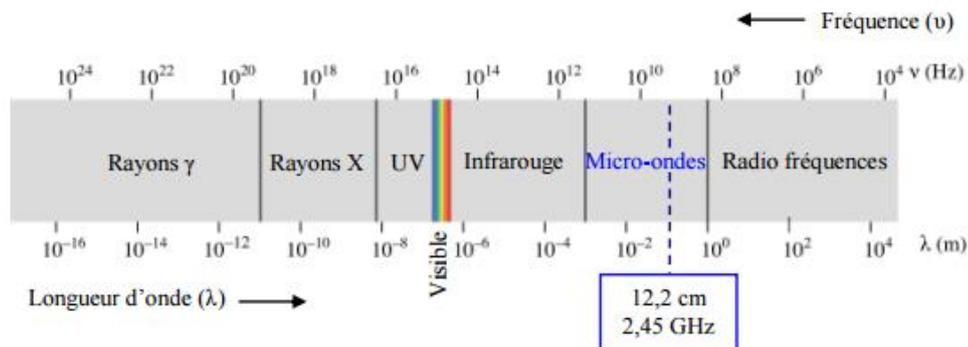
## **II.5.2. Extraction non conventionnelle**

### **II.5.2.1. L'extraction par micro-ondes (MAE, Microwave Assisted Extraction)**

#### **Principe de l'extraction MAE**

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques, possédant un champ électrique et magnétique perpendiculaires l'un par rapport à l'autre qui se propagent dans le vide avec des fréquences situées entre 300 MHz et 300 GHz. Néanmoins, dans le but d'éviter des interférences avec les radiocommunications et les radars, les micro-ondes domestiques et

industrielles sont généralement utilisées à une fréquence de 2,45 GHz ( **Camel, 2001**). Les micro-ondes sont positionnées sur le spectre électromagnétique entre les infra-rouges et les radiofréquences, avec des valeurs de longueurs d'ondes comprises entre 1 m et 1 cm (Fig.4).

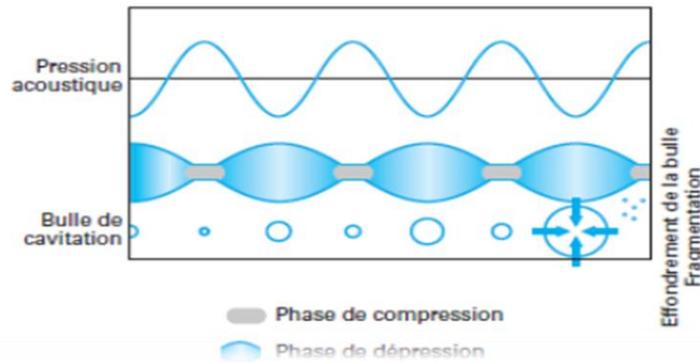


**Figure.04:** Représentation du spectre électromagnétique et positionnement des micro-ondes domestiques ( **Camel, 2001**).

### II.5.2.2. L'extraction assistée par ultra-sons (UAE, Ultrasonic Assisted Extraction)

#### Principe de l'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) (**Wang et Weller,2006**). 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 (Fig.5). La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité d'énergie (**Pétrier et al., 2008**).



**Figure 05:** Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation (Pétrier *et al.*, 2008)

Lorsque les bulles de cavitation sont formées à proximité d'une surface solide (Fig.6) 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 (Wang et Weller,2006).



**Figure 06:** Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide, adapté de (Pétrier *et al.*, 2008) .

L'UAE est une technique peu onéreuse, utilisable avec n'importe quel type de solvant et simple à mettre en place. 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 (Vinatoru, *et al.* ,1997 ; Wang et Weller,2006). 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. Cependant une dispersion non homogène de la phase solide peut contribuer à l'atténuation des ondes ultrasons, et la zone

qui subit les ultrasons est alors restreinte à une zone localisée près de l'émetteur ce qui peut réduire le rendement d'extraction (**Wang et Weller, 2006**).

## **II.6. Le Rôle des alcaloïdes**

### **II.6.1. Effet pharmacologique des alcaloïdes**

les alcaloïdes sont utilisées dans plusieurs médicaments, ils affectent chez l'être humain le système nerveux particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acétyl choline, norepinephrine , acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), dopamine et la serotonine.

D'autres effets pharmacologiques sont attribués également aux alcaloïdes telles que l'effet analgésique (cocaïne), anti-cholinergique (atropine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (réserpine), antitussive (codéine), stimulant centrale (caféine), dépressant cardiaque et diurétique narcotique (morphine), anti-tumeur et sympathomimétique (éphédrine) (**Badiaga, 2011**).

### **II.6.2. Effet sur la plante**

Les alcaloïdes tout d'abord, ont des effets bénéfiques sur la plante synthétisante, parmi ces effet, selon Da Conceicao en (**2010**) : Ils Régulent la croissance et le métabolisme interne des végétaux, ils désintoxiquent et transforment les substances nocives au végétal, ils protègent la plante contre les rayons ultraviolets comme ils ont des effets contre les herbivores (**Mauro, 2006**).

# *Chapire III*

## *Matériels et Méthodes*

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche de Gestion et Valorisation des Ressources Naturelles et Assurance Qualité (LGVRNAQ), et le laboratoire de Biochimie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre (SNVST), pôle universitaire Akli Mohand Oulhad – Bouira, durant la période d'encadrement des PFE.

Ce travail vise à optimiser les conditions et paramètres de l'extraction des alcaloïdes à partir du Lupin blanc, appelés facteurs : Température (°C), Temps (min), Ratio solide/liquide.

### **III.1. Matériels**

#### **III.1.1. Matériels du laboratoire**

##### **✓ Principaux équipements**

- Agitateur magnétique (STUART)
- Agitateur vortex
- Bain-marie réglable (NÜVEbath)
- Balance (OHAUS)
- Dessiccateur
- Etuve (Memmert)
- Hotte ( CRUMA FL-2)
- Moulin à café (COBRA)
- Réfrigérateur ( CONDOR)
- Tamiseur électrique
- Spectrophotomètre (OPTIZEN 3220 UV).

##### **✓ Réactifs et produits chimiques**

- Acide chlorhydrique : HCl
- Ammoniaque : NH<sub>4</sub>OH
- Hexane : C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>/ Ether : C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O
- Réactif de Dragendorff (tétra-iodobismuthate de potassium )

### III.1.2. Matériel végétal

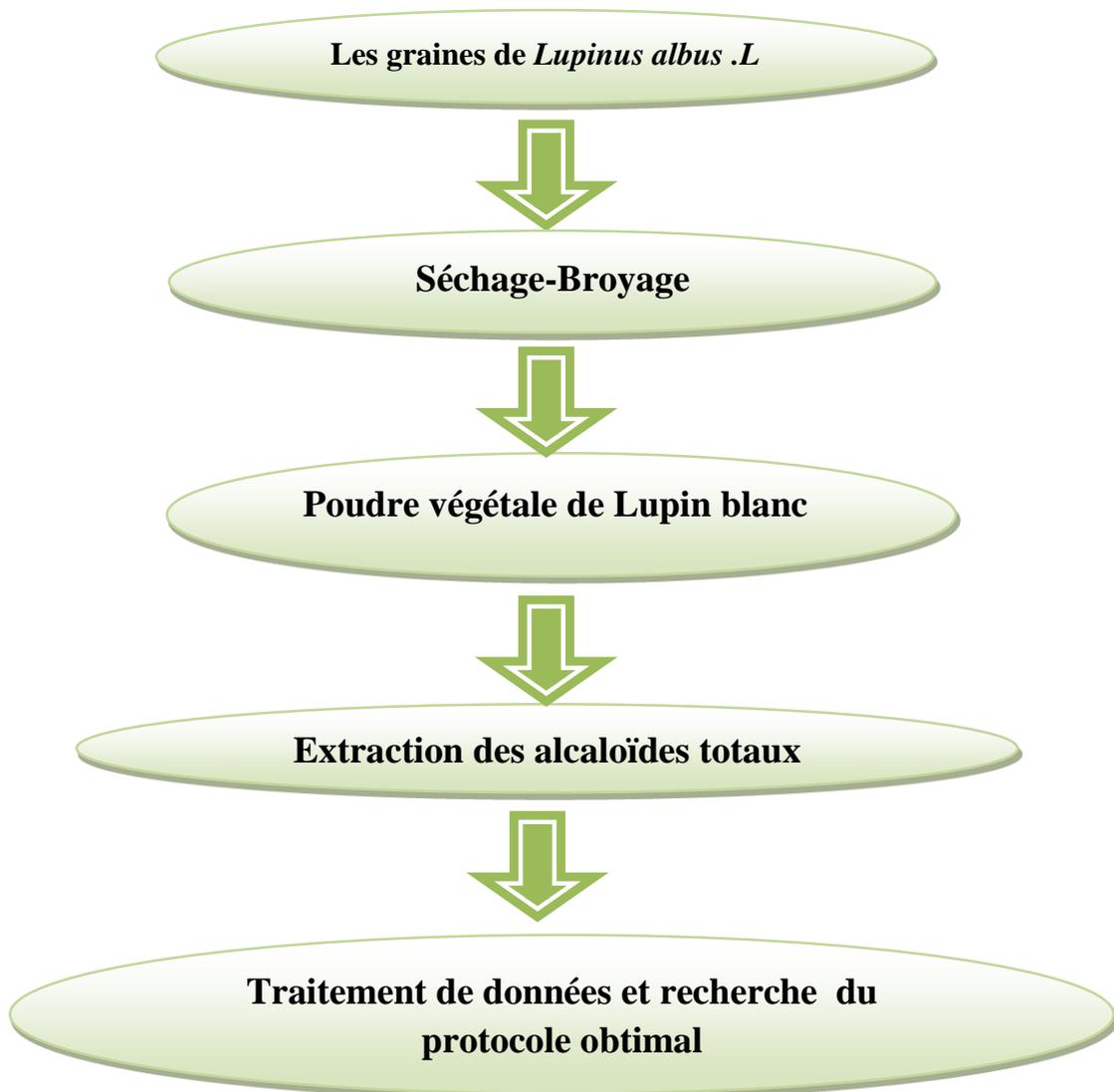
Le choix de la plante est basé sur :

- Une recherche bibliographique (état de l'art).
- Utilisations de la plante dans la médecine traditionnelle dans la région.

Le matériel végétal objet de cette étude sont les graines de *Lupinus albus*.

### III.2. Méthodes

Le schéma suivant résume la méthodologie de travail entretenue.



**Figure07.** Schéma général des différentes étapes de la procédure expérimentale.

### III.2.1. Echantillonnage du matériel végétal

#### III.2.1.1. Récolte

Les graines du lupin blanc ont été achetées chez un herboriste local.

Les gousses de lupin ne s'ouvrent pas à maturité sur la plante, ce qui facilite la récolte.

Dates de récolte :

- le lupin d'hiver se récolte à partir de fin juillet
- le lupin de printemps se récolte de mi-août à mi-septembre ( **Anonyme 3** )

#### III.2.1.2. Séchage

Les graines sont bien lavées et débarrassées de poussière et autres impuretés (Figure 08), puis mis à sécher dans une étuve à une température de 40°C jusqu'à stabilisation de la perte de masse.



**Figure 08.** Les graines du lupin blanc (*Lupinus albus*).

#### III.2.1.3. Broyage et le tamisage

Ont été réalisés respectivement à l'aide d'un moulin à café de marque COBRA et d'un tamiseur électrique avec un tamis de granulométrie 200 µm (Figure 09).



**Figure 09.** Tamis de granulométrie de 200 $\mu$ m.



**Figure 10.** La poudre de graine séchée de *Lupinus albus*.L.

La poudre résultante (Figure 10) a été récupérée puis conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité dans un bocal en verre hermétiquement fermé.

### III.2.2. Taux d'humidité

Un échantillon des graines de lupin blanc de poids  $m_i$  est séché à l'étuve ( $103 \pm 2$  °C) pendant 3 heures et demi, suivi des cycles de 30 min jusqu'à la stabilisation du poids ( $m_f$ ). Cela permet le calcul du taux d'humidité de l'échantillon frais. Le taux d'humidité (TH « % ») est calculé selon la formule :

$$TH (\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

Où :

$m_i$  = masse initiale (en g).

$m_f$  = masse finale (en g) ( après déssiccation )

### III.2.3. Optimisation de l'extraction des alcaloïdes

Afin de déterminer certaines conditions optimales pour l'extraction des alcaloïdes de lupin blanc. Un plan d'expérience a été établi avec trois paramètres (facteurs) avec des intervalles (des valeurs codées au niveau haut « +1 » et au niveau bas « - 1 ») déterminés à partir de la bibliographie :

- Le rapport solide /liquide (1/10, 1/30) ;
- Le temps d'extraction (30 min, 150 min) ;
- La température (25°C, 45 °C).

Le plan d'expérience proposé contient dix essais avec deux valeurs au centre pour l'évaluation de la teneur en alcaloïdes totaux (**Wei X *et al.*, 2016**)

**Tableau II.** Plan d'expérience proposé pour l'optimisation de l'extraction des alcaloïdes.

	Ratio Solide/liquide	Temps (min)	Température (°C)
1	1/10	150	25
2	1/30	150	25
3	1/10	30	25
4	1/10	150	45
5	1/30	30	25
6	1/30	30	45
7	1/10	30	45
8	1/30	150	45
9	1/20	90	35
10	1/20	90	35

### III.2.4. L'extraction des alcaloïdes totaux

#### III.2.4.1. Principe

Les alcaloïdes -base sont solubles dans les solvants organiques (éther, chloroforme...etc.)et pratiquement insoluble dans l'eau ; leurs sels, au contraire, se dissolvent bien dans l'eau et sont généralement insolubles dans les solvants organiques (**Faugeras G., 1965** ) .

#### III.2.4. Le protocole d'extraction des alcaloïdes totaux

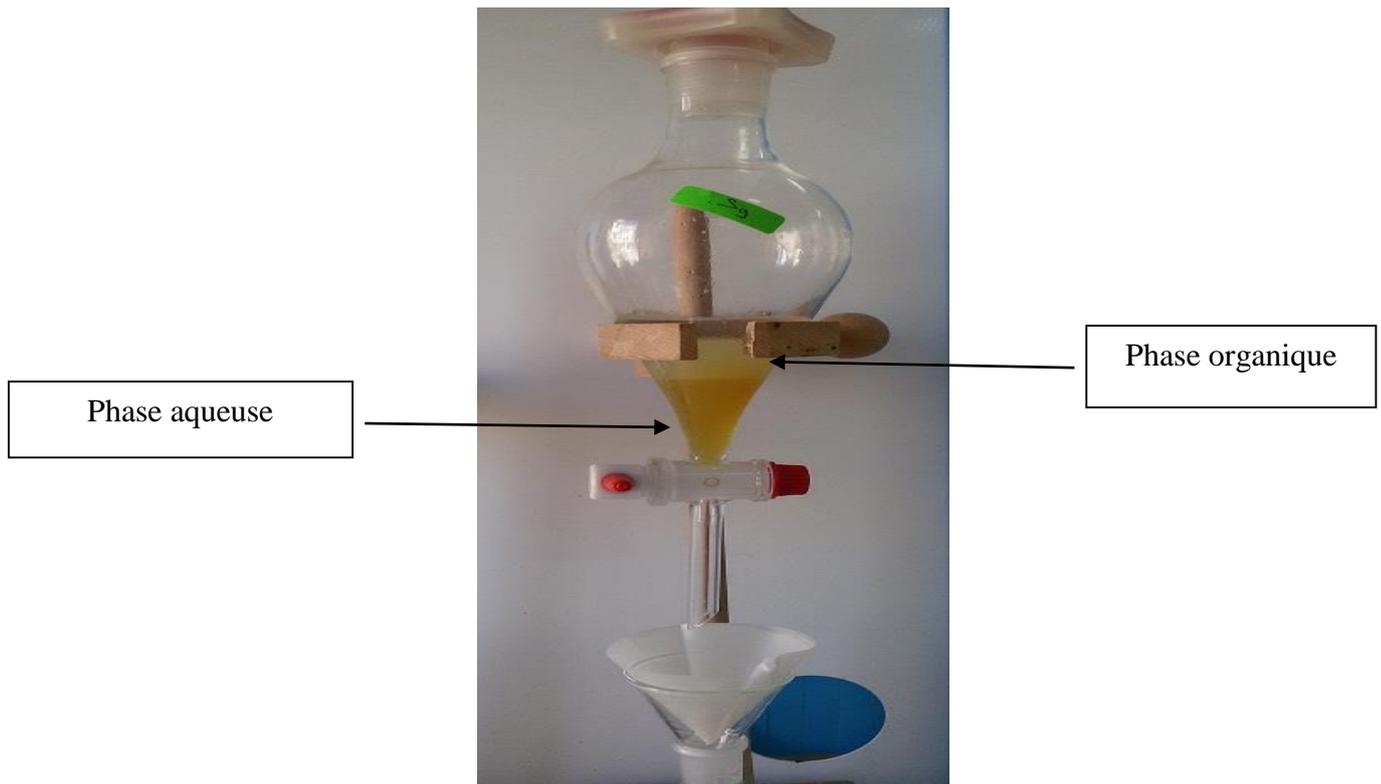
Pour extraire les alcaloïdes à partir des graines du lupin blanc, le protocole décrit par (**Faugeras G, 1965** ) .a été suivit avec quelques modifications :

- 1- Dans une petite fiole conique, placer 1g de poudre de graines de *Lupinus albus* ;
- 2- Verser 10à 30ml d'ammoniaque diluée au  $\frac{1}{2}$ .
- 3- Ajouter 10ml d'éther pur et agiter.
- 4- Laisser macérer de 30à 150min(selon l'essai proposé dans le plan d'expérience)
- 5- Filtrer sur un tampon de coton.



**Figure 11.** Le filtrat de l'extrait d'alcaloïdes à partir du lupin blanc.

- 6- Verser le filtrat dans une petite ampoule à décanter.
- 7- Ajouter 3 ml d'une solution d'acide chlorhydrique environ 1 N. Agiter.
- 8- Soutirer la phase inferieure aqueuse et la filtrer sur un petit filtre mouillé en recueillant le filtrat dans un petit tube à essai (solution 1, 2 ,3, ..... , 10).



**Figure 12.** décantation de l'extrait brut.

### III.2.5. Dosage des alcaloïdes totaux

Les alcaloïdes précipitent sous l'action de certains réactifs appelés « les réactifs généraux des alcaloïdes ». Cette réaction est fondée sur la capacité des alcaloïdes à se combiner aux métaux lourds (Bismuth, Mercure, Iode...) en milieu aqueux légèrement acide,

Il en existe plusieurs types :

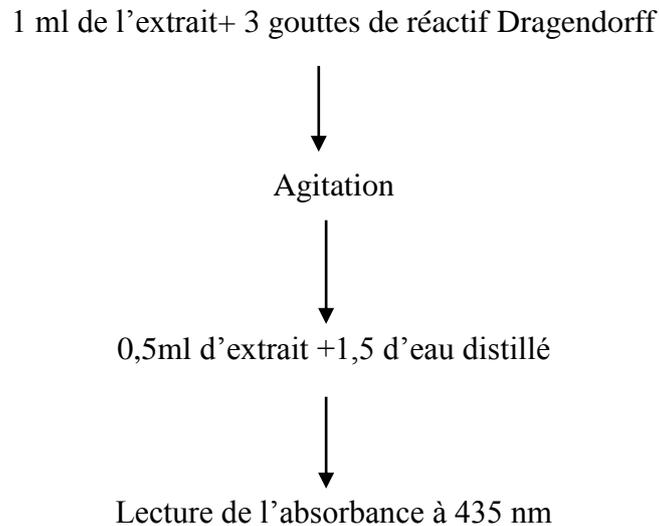
- ✓ Réactif de Valser-Meyer (tétra-iodomercurate de potassium): précipité blanc jaunâtre ;
- ✓ Réactif de Dragendorff (tétra iodobismuthate de potassium): précipité rouge orangé ;
- ✓ Réactif de Bouchardat (Iodoiodurée de potassium): précipité brun ;
- ✓ Réactif de Bertrand (réactif Silicotungustique) : précipité blanc jaunâtre (**Faugeras G, 1965** )

Le dosage des alcaloïdes totaux de lupin blanc est effectué par la méthode utilisant le réactif de Dragendorff qu'est une solution saturée de bismutho-iodure de potassium. Il donne un précipité rouge orangé en présence des alcaloïdes (**Vigor C et al., 2011**)

L'absorbance est mesurée à 435nm (**Narasimhan S , Shanta M, 2003**)

## • Mode opératoire

Les différentes étapes du dosage sont représentées dans la Figure 14.



**Figure 13.** Protocole de dosage des alcaloïdes totaux (Vigor C *et al.*, 2011).

### III.3. Analyse statistique et traitement de données

Les différents résultats de l'optimisation de l'extraction des alcaloïdes par les plans d'expérience ont été traités et complétés par une étude statistique de la variance (**Test de Tukey-HSD**) en utilisant le logiciel **JMP (version 7, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)**.

Pour l'optimisation l'analyse a été effectuée par la Méthode de Surface de Réponse en utilisant le modèle du premier degré qui adapte un modèle mathématique polynomial de premier degré dont l'équation est la suivante :

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{i < j}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

Où  $X_i$  et  $X_j$  sont des variables (ou facteurs) indépendantes influençant la réponse  $Y$  ;  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ij}$ , sont les coefficients de régression des paramètres pour des limites d'interception, linéaires et d'interaction, respectivement ;  $k$  est le nombre de paramètres ( $k = 3$ ).

# *Chapitre IV*

## *Résultats et Discussion*

## IV.1. Taux d'humidité

Le taux d'humidité de *Lupinus albus* est rapporté dans le tableau III.

**Tableau III .** Le taux d'humidité

P <sub>1</sub> (g)	P <sub>0</sub> (g)	ΔP (g)	TH (%)
100	91,72	8,28	8,28

Le taux d'humidité de la plante est de **8.28%**, ce qui témoigne d'une faible teneur en eau. Même résultat a été obtenu par (**Jacques P, Michel Lenoble et Jean-Louis P en 1983**), qui ont montré que le taux d'humidité de lupin blanc varie de **7 à 9,5%** .

## IV.2. Résultat de l'optimisation de la teneur en alcaloïdes totaux

Les résultats obtenus du plan d'expérience sont présentés dans le tableau IV.

les résultats sont exprimés en mg équivalent d'atropine par gramme de la matière sèche (mg eq atropin/ gMs). La courbe d'étalonnage est rapportée dans **l'annexe**

**Tableau IV.** Résultat de l'optimisation de la teneur en alcaloïdes totaux

Essai	Modèle	Ratio Solid/liquide	Temps (min)	Température (°C)	La concentration (mg eq atropine/g MS)
1	--	1/10	150	25	26,69
2	++	1/30	150	25	16,03
3	---	1/10	30	25	39,11
4	+++	1/10	150	45	19,19
5	+-	1/30	30	25	19,50
6	++	1/30	30	45	19,30
7	+-	1/10	30	45	19,14
8	+++	1/30	150	45	17,67
9	000	1/20	90	35	17,10
10	000	1/20	90	35	17,76

D'après ces résultats on peut remarquer à priori que les réponses obtenus du premier et troisième essais sont les plus élevés, donc on peut prétendre que l'interaction entre les trois facteurs en niveau bas de l'intervalle (essai 03), où la concentration est de 39,11 mg/g qui représente la plus haute concentration donne les meilleurs teneurs en alcaloïdes.

### IV.3. Le Modèle mathématique des résultats d'essais

L'analyse mathématique consiste essentiellement à identifier les « a » (coefficients du modèle) à partir des résultats des expériences réalisées. Les résultats ont été générés en utilisant le logiciel JMP (version 7, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Les coefficients du modèle permettent d'écrire l'équation qui relie la réponse aux trois facteurs  $X_1, X_2, X_3$  étudiés donnant la valeur optimale des réponses choisies, ce qui facilite ainsi le calcul de toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligés d'en faire beaucoup d'expériences.

L'équation s'écrit comme suit :

$$Y = a_0 + a_1 \times X_1 + a_2 \times X_2 + a_3 \times X_3 + a_{12} \times X_1 X_2 + a_{13} \times X_1 X_3 + a_{23} \times X_2 X_3 + a_{123} \times X_1 X_2 X_3$$

$$a_0 = 21,149$$

**Tableaux V.** L'estimation des coefficients du modèle polynomial du premier degré relatif au rendement en alcaloïdes

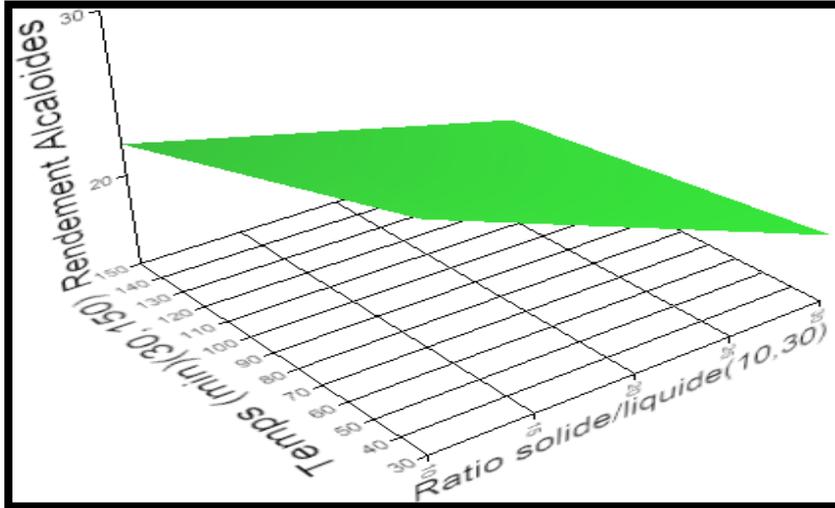
Les facteurs	Coefficients du modèle
$X_1$ = ration solide /liquide [1/10, 1/30]	$a_1 = - 3,953$
$X_2$ = le temps (min)[30, 150]	$a_2 = -2,183$
$X_3$ = températures(°C)[25, 45]	$a_3 = - 3,253$
$X_1 X_2$ = ratio solide /liquide*temps	$a_{12} = 0,908$
$X_1 X_3$ = ratio solide /liquide* températures	$a_{13} = 3,613$
$X_2 X_3$ = le temps* la température	$a_{23} = 1,788$
$X_1 X_2 X_3$ = ration solide /liquide* le temps* la température	$a_{123} = - 1,328$

L'application numérique pour la teneur en alcaloïdes :

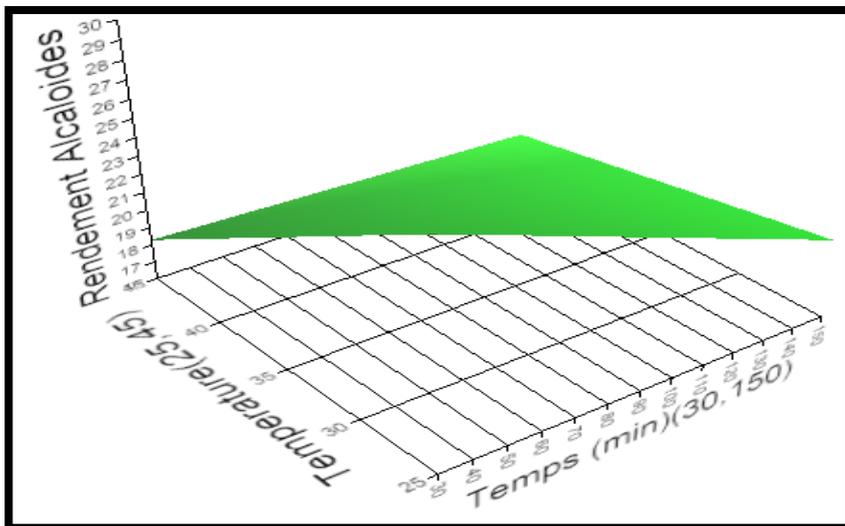
$$Y = 21,143 - 3,953X_1 - 2,183X_2 - 3,253X_3 + 0,908X_1X_2 + 3,613 X_1X_3 + 1,788X_2X_3 - 1,328 X_1X_2X_3$$

#### IV.4. Les surfaces de réponse pour les interactions entre les facteurs.

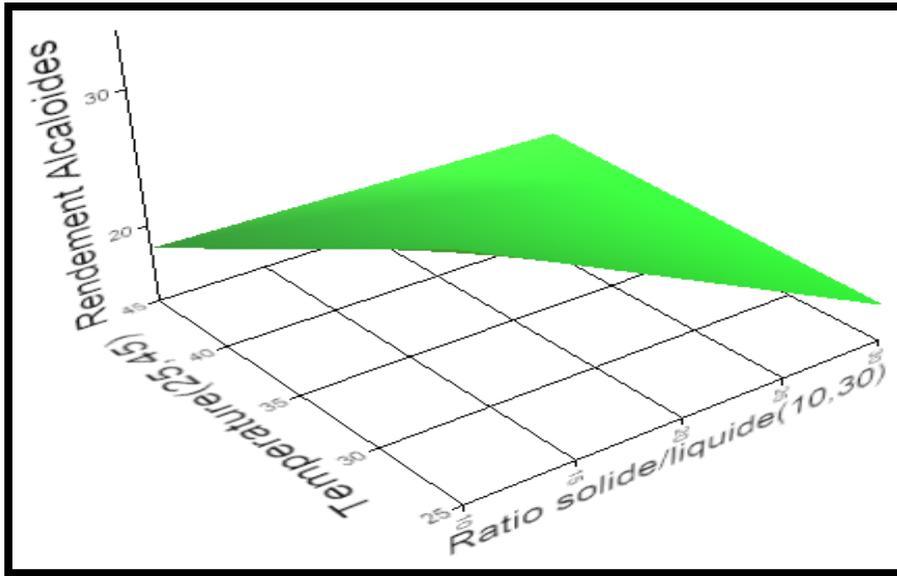
- A) la variation du rendement en alcaloïdes en fonction des deux facteurs ration solide / liquide et temps



- B) la variation du rendement en alcaloïdes en fonction des deux facteurs Température et temps



- C) la variation du rendement en alcaloïdes en fonction des deux facteurs ration solide / liquide et température.



**Figure 14.** Représentations tridimensionnelles des effets des facteurs sur la teneur en alcaloïdes

#### **IV.4.1. Analyse graphique des résultats par l'utilisation des surfaces de réponses**

Les surfaces de réponses peuvent présenter les variations des réponses en fonction de seulement de deux facteurs à la fois. La figure 15 représente les surfaces de réponses du rendement en alcaloïdes.

La figure (A) représente la variation du rendement en alcaloïdes en fonction des deux facteurs ration solide / liquide et temps .D'après ce graphe on déduit que l'interaction entre ratio solide/liquide et le temps influence le moins positivement sur le rendement en alcaloïdes

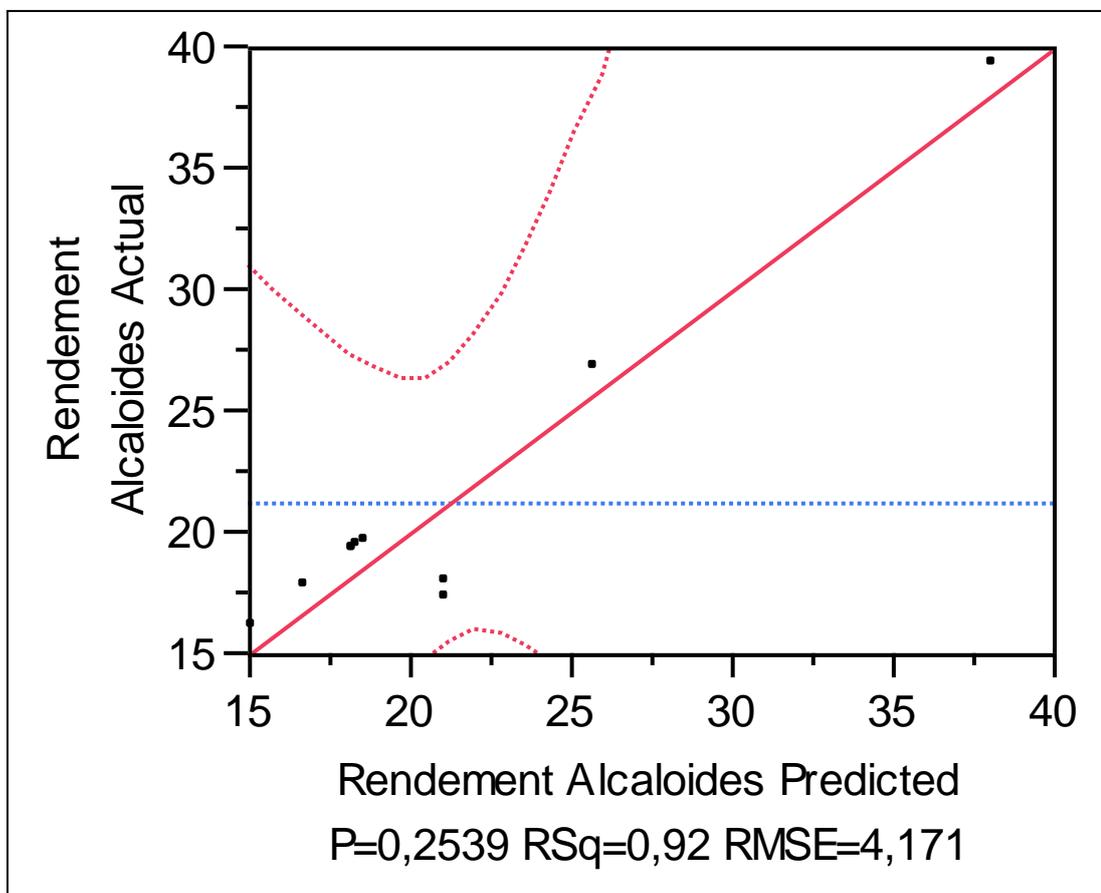
La figure (B) représente la variation du rendement en alcaloïdes en fonction des deux facteurs Température et le temps. D'après ce graphe on déduit que l'interaction entre la température et le temps influence un peu plus positivement sur le rendement en alcaloïdes.

La figure (C) représente la variation du rendement en alcaloïdes en fonction des deux facteurs ration solide / liquide et la Température. D'après ce graphe on déduit que l'interaction entre ration solide / liquide et la Température influence le plus positivement sur le rendement en alcaloïdes.

Les conditions optimales a été obtenue par le logiciel **JMP** qui correspond à la valeur optimales de l'extraction des alcaloïdes est :

- ✓ **Ratio solide / liquide** = 1/19
- ✓ **Temps** = 35 min
- ✓ **Température** = 26 °C

### V.5. La qualité d'ajustement du modèle



**Figure 15.** L'estimation de la qualité d'ajustement des points expérimentaux ( la teneur en alcaloïdes par rapport au modèle mathématique (l'équation) ).

La figure 16 représente un alignement des nuage de points très proche de la droite (le modèle), ce qui témoigne de la bonne qualité et de la robustesse du modèle, avec un  $R^2= 0,92$ .

## V.6. Discussion

Ce travail a pour but d'étudier et optimiser l'extraction des alcaloïdes à partir des graines de *Lupinus albus L* par extraction en milieu alcalin. En effet, pour déterminer les conditions d'extraction des alcaloïdes, nous avons utilisé plusieurs facteurs : ratio (solide/liquide), temps, température. Afin de choisir les meilleures conditions d'extraction nécessaires qui nous donnent la meilleure extraction.

### Rapport solide/liquide

L'impact du rapport solide/liquide sur l'extraction des alcaloïdes de lupin blanc est mesuré avec les rapports 1/10, 1/20, 1/30. En augmentant le rapport solide/liquide, celui-ci a un effet négatif sur l'extraction. En effet, le rapport solide/liquide de 1/19 est celui qui permet d'extraire le meilleur rendement. Au-delà de ce rapport, le rendement diminue.

### Temps d'extraction

L'influence des temps sur l'extraction des alcaloïdes de *Lupinus albus L* est étudiée avec les temps 30min, 45 min, 150 min.

D'après les résultats de l'analyse de variance à deux facteurs (facteur 1 : le ratio solide/liquide, facteur 2 : le temps d'extraction) (figure 14), l'interaction entre les deux facteurs étudiés influence le moins positivement sur le rendement en alcaloïdes ce qui nous permet de dire que la prolongation du temps d'extraction décroît le rendement de l'extraction. Le temps optimal d'extraction trouvé est de 35 min.

### Température

Le rendement en alcaloïdes a été diminué considérablement quand la température d'extraction a été augmentée. Nous constatons que l'augmentation de la température, fait donc décroître le rendement,

D'après les résultats de l'analyse de variance à deux facteurs (facteur 1 : le ratio solide/liquide, facteur 2 : température) (figure 14), l'interaction entre les deux facteurs étudiés influence le plus positivement sur le rendement en alcaloïdes. La température optimale pour l'extraction des alcaloïdes de lupin blanc est 26°C. Ce paramètre est en relation étroite avec le ratio solide/liquide.

L'explication qu'on peut donner est liée à la possibilité de dégradation des alcaloïdes favorisée respectivement par les taux élevés de ratio solide/liquide, de la température, et par la prolongation de temps d'extraction.

# *Conclusion*

## CONCLUSION

Depuis des milliers d'années, l'humanité utilise des plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologique.

L'extraction des alcaloïdes est une étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs, elle dépend de la méthode et du solvant approprié qui préservent leurs propriétés biologiques.

La première étape du travail a consisté à établir une base de données expérimentale fondée sur des recherches bibliographiques, indispensable pour l'établissement et la validation des modèles mathématiques. Cette base comporte les résultats de dosage et descriptives réalisés sur notre échantillon, ainsi que les valeurs des conditions opératoires d'extraction.

Pour une extraction efficace et optimale des alcaloïdes de graine de *Lupinus albus*, en résumant les différentes étapes d'extraction menées sous différentes conditions.

- La fraction solide /liquide affecte de façon significative la teneur en alcaloïdes totaux ; la meilleure fraction trouvée est 1/19.
- Le temps d'extraction optimale pour l'extraction des alcaloïdes 35min .
- La température optimale est de 26°C.

D'autres paramètres qui ne sont pas étudiés dans ce travail et qui peuvent être influents sur le rendement d'extraction, peuvent servir de perspectives pour optimiser au mieux l'extraction en vue de son utilisation à l'échelle industrielle.

# **Références bibliographiques**

## A

**Ainouche A.K., Bayer R.J. et Misset M.T**, 2004. Molecular phylogeny, diversification and character evolution in *Lupinus* (Fabaceae) with special attention to Mediterranean and African lupines. *Plant Syst. Evol.* Vol. 246 ,p211–222.

**Al-Shahwany A, Al-Hemiri A, Khalid A** , 2013. Comparative Evaluation of Alkaloids Extraction Methods from the Root Bark of *Punica granatum* Linn. *Advances in bio research*, p33-39.

**Anonyme 1** : Fiche technique. Cultiver des légumineuses en culture seule ou en association. Disponible sur ( : <http://inpact37.org/> ).

**Anonyme 2** : Disponible sur (<http://www.mr-plantes.com/2014/04/le-lupin-a-son-pourcentage-eleve-en-proteines/>

**Anonyme 3** : Disponible sur (<http://www.terresinovia.fr/publications/guides-de-culture/guide-de-culture-lupin-2016/> )

## B

**Badiaga M**, 2011. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako, p10 .

**Bhardwaj, H.L, Hamama A.A**, 2012. Cultivar and growing location effects on white lupin immature green seeds. *J. of Agricultural Science* 4(2): 135-138.

**Bovnias M**, 1983. Analyse biochimique quantitative par monochromatographie en couche mince .Ed :MASSON.p :150-163.

**Brink M., Belay G**, 2006. céréale et légumes secs, ressources végétales de l'Afrique tropicale 1. Céréale et légumes secs. Fondation PROTA, Wageningen, pays-Bas, p108.

**Bruneton J**, 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Editions techniques et documentation, Paris

**Bruneton** ,1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, partie n°4 : Alcaloïdes. 3<sup>e</sup> édition LAVOISIER (1120P). p784,873.

**Bruneton J**, 1993. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation .Lavoisier,Paris,p 915 .

## C

**Camel, V.** 2001.Recent extraction techniques for solid matrices-supercriticalfluid extraction, pressurizedfluid extraction and microwave-assistedextraction:theirpotential and pitfalls. Analyst, 126(7), p1182-1193.

**Christian Huyghe, Jacques Papineau**,1996. Recherches sur le lupin. INRA, station de Génétique et d'Amélioration des plantes 86600 Lusignan : n°8.

**Clapham. W. and Elbert-May M.D**, 1989. Influence of population on white lupinmorphology and yield. Canadian Journal of Plant Science 69,p 161-170.

**Cowling W.A, Buirchell B.J et Tapia M.E**, 1998. Lupinus spp. Promoting the conservation and use of underutilised and neglected crops. 23. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Resources, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. p105 .

**Cowling W.A.**,1984.Report of a mission to collect wild lupinus in Greece. departement of agriculture, western australian, perth.

## d

**Duke J.A**, 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York.

## E

**Erbas M, Certel M, et Uslu. M.K**, 2005. Some chemical properties of white lupin seeds (Lupinusalbus L.) Food Chemistry 89,p341-345.

## F

**Faugeras G**, 1965 .guide de travauxpratique da matièremédicale pharmacognosie. N°163-4<sup>ème</sup>trimester .p 52-53 .

## G

**Gladstones J.S**,1998.Distribution, origin, taxonomy, history,importance. In lupinus as crop plants :Biologie, production and utilization ( J.S. Gladstones, C.A. Attins and J.Hamblin, eds.) CAB international,oxon (in press ).

**Gladstones J.S**, 1974. lupins of the Mediterranean region and Africa. Technical Bulletin Number 26, westernAustralianDepartement of agriculture, perth.

**Guignard J.L**,1979.Les alcaloïdes et les dérivés de l'acidecyanhydrique.abrégé de biochimie végétale 2eme édition MASSON .p214-231.

**Guignard J.L**, 2000. Substance azotés, biochimie végétale .Ed :MASSON ,p201-209

**Guignard J.L**, 2000.Biochimievégétale 2eme Edition Dunod.p201-283.

**Guignard, J.L**,1996. *Biochimie végétale*. Masson, Paris, p255 .

**Guillaume B, Otterby D.E, Linn J.G. et Stern M. D**, 1987. Comparison of sweet whielupin seeds wlth soybean meeal as a protein supplementfo lactating dairy cows. J. Dairy. Sci. 70,p 2339-2348.

## H

**Hanelt P**,1960. The lupinus (in German ) . A. Ziemsens, wittenberg, Germany.

**Hondelmann W**,1996. The lupins( in German ). landbauforschungvollkenrode ,Sonderheft 162. Bundesfors .chundsanstaltfirelandwirtschaftBaunschweig .volkenrode( FAL ).38116, Baunschweig, Germany.

**Hopkins W.G**, 2003.Physiologies végétales. Edition de Boeck .p281-283.

## J

**Jacques P, Michel L et Jean-Louis P**,1983. Dosage rapide des diff'érents alcaloïdes de Lupinus albus L. et de Lupinus mutabilis Sweet pour la s'élection. Agronomie, EDP Sciences, 3 (4), p392.

**Jansen P. C. M**, 2006. Lupinusalbus (L.) Record from Protabase. Brink, M. & Belay, G. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressourcesvégétales de l'Afrietropicale), Wageningen, Netherlands.

## K

**Krief S**, 2003. Métabolites secondaires des plantes et comportement animale, these de doctorat .Muséum national d'histoire naturelle , p14

## L

**Leclercq J.Q**, 2002. Le voyage insolite de la plante au médicament .Journal de la pharmacie de Belgique .(57),p11-20.

**Lindley J**, 1836. Fabaceae Lindley. Intr. Nat. Syst. Bot. ,ed. 2. Vol. 148: 1- 38, 42-44.

## M

**Mauro N.M**, 2006. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine, thèse doctorat, l'université Joseph Fourier Grenoble, p13, 16-28.

**Meredith, M.L**, 1991. White lupin (*Lupinus albus*) field nutrition studies. In: Prospects for Lupins in North America: A Symposium Sponsored by the Centre for Alternative Plant and Animal Products. University of Minnesota. St. Paul, MN. March 21-22, p111-117.

## N

**Narasimhan S , Shanta M**, 2003. Spectrophotometric Method for Estimation of Alkaloids Precipitable with Dragendorff's Reagent in Plant Materials. Journal of AOAC International vol. 86, no. 6 . p1125.

## P

**Paquet M**, 2000. cours de chimie organique de l'ergotamine. disponible sur <http://www.alexandre.vallet.multimedia.com/vallet02/rapportDEA.htm>.

**Pétrier C, Gondrexon N et Boldo P**, 2008. Ultrasons et sonochimie. Techniques de l'ingénieur, AF6310, 1-14.

**Presson P, Louveaux J**, 1984. Pollinisation et production végétales. INRA, Paris. p 299-303.

## R

**Rispail R.J**, 2005.Secondary métabolite profiling, p341.348.

## S

**Sbabou L**, 2009. Thèse de doctorat .Diversité génétique du lupin au Maroc et etude du développement racinaire du lupin blanc sous stress abiotique par des approches de génomique fonctionnelle abiotique par des approches de génomique fonctionnelle,Université Mohamed v - AGDAL,faculté des sciences ,Rabat. p1,5,8 .

**Schrire B.D, Lavin M, Lewis G.P**, 2005. Global distribution patterns of the Leguminosae: insights from recent phylogenies. *Biological Skrifter* p 55, 375-422.

**Simpson M.J.A, McGibbon R.R**, 1982. Lupinus collection in Greece and Yugoslavia plant Genet. Resour. Newsl. 52 ,p 28-30.

**SparrEskilsson C, Björklund E**, 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction.*Journal of Chromatography A*, 902(1),p 227-250.

**Spichiger R.E, Savolainen V.V, Figeat M et Jeanmonod D** ,2000. Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. Presses polytechniques et universitaires romandes,p 202-204.

## T

**Taddeusz A**, 2007.Alkaloids secrets of life, alkaloidschemistry, Biologicalsignificance, applications and ecologicalrole. Edition Elsevier.p1-73.

**Thomas M**. 2011.Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophaë rhamnoides) thèse de doctorat. Université Toulouse.

**Tyler V.E, Brady, L.R, Robbers, J.E**,1881. Pharmacognosy. Lea&Febiger, Philadelphia, p520 .

## V

**Vallet A**,1996.Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques.

**Verpoorte R**,1986. Methods for the structure elucidation of alkaloids. *Journal of Natural products*. (49), p1-25.

**Vigor C, Vercauteren J, Montels J** , 2010-2011. Les substances naturelles dans “ la chaîne du médicament ”. Travaux pratiques de pharmacognosie .1<sup>ère</sup> partie . 3<sup>ème</sup> année de la FCB ,p6-8.

**Vinatoru M, Toma M, Radu O, Filip P.I, Lazurca D et Mason T.J**, 1997. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. Ultrasonics-Sonochemistry, 4(2), p135-139.

## **W**

**Wang L, Weller C.L**,2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science &Technology, 17(6), p300-312.

**.Wei X, Xianqiang C, Guangping L, Dejun H, Jing Z et Shaoping L**,2016. Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive alkaloids from lotus plumule using response surface methodology. Journal of Pharmaceutical Analysis,6 ,p382-388.

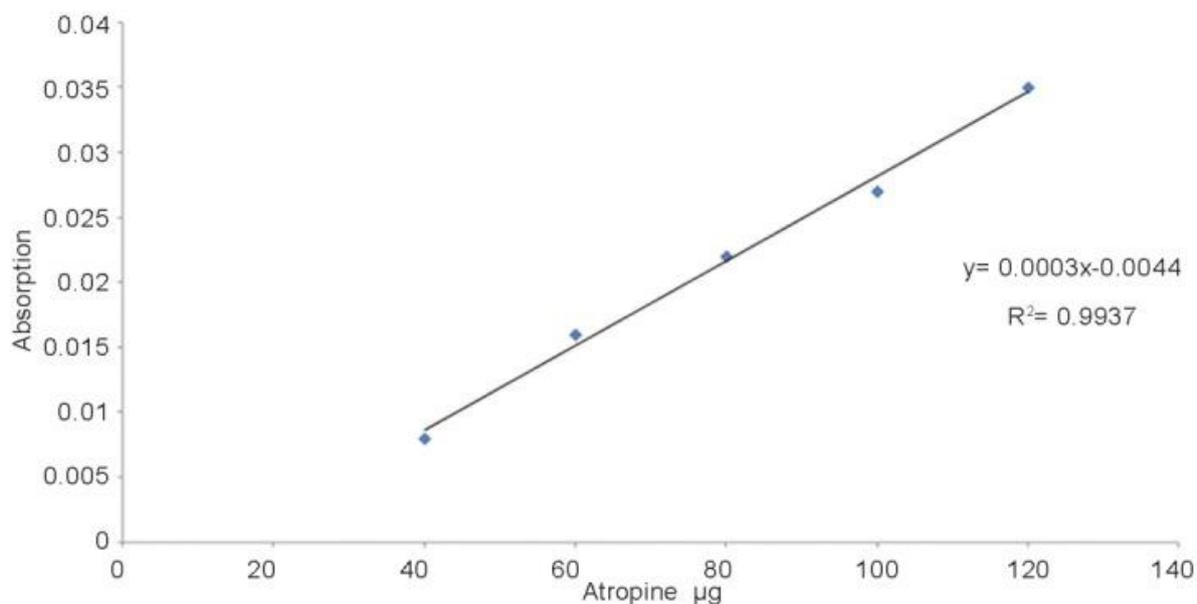
**Wilhelm N**, 1998. Botanique générale. 10<sup>ème</sup> Ed. De boeck. Paris, bruxelles. p319.

## **Z**

**Zenk M.H, Juenger M**, 2007. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. Phytochemistry Review 68, p2757 – 2772.

## La courbe d'étalonnage de l'atropine

La concentration des alcaloïdes totaux pour chaque extrait est calculée à partir de l'équation de régression d'une gamme d'étalonnage en milieu aqueux (0 à 140 µg/ml), établie avec l'atropine dans les mêmes conditions opératoires que les extraits. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'atropine par ml d'extrait (mg E atropine / ml d'extrait)



**Figure 16** : Courbe d'étalonnage de l'atropine

**Tableau VI** : les concentrations des alcaloïdes totaux

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Absorbance	1.173	0.703	1.721	0.842	0.856	0.847	0.84	0.775	0.75	0.779
Concentration mg/ml	3924.666	2358	5751.333	2821.333	2868	2838	2814.666	2598	2514.666	2611.333

## Résumé

Lupin blanc "*Lupinus albus L*" est une plante méditerranéenne largement utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés biologiques attribuées essentiellement aux alcaloïdes . Ce travail a pour but d'étudier et optimiser les conditions et paramètres d'extraction des alcaloïdes à partir des graines de lupin blanc par extraction en milieu alcalin . afin de choisir le meilleur rendement , nous avons étudié plusieurs facteurs, ratio (solide/liquide) , température et le temps d'extraction .une approche méthodologique pour la modélisation du procédé de l'extraction des alcaloïdes a été suivi a fin de trouver les paramètres optimaux , par l'utilisation de plans d'expériences .

Les teneurs en alcaloïdes totaux (AT) les plus élevées ont été obtenues dans les conditions suivantes : ratio ( solide /liquide) est de (1/19) et l'extraction optimale des alcaloïdes se fait dans un temps de 35 min et dans une température de 26°C.

**Mots clés:** Graines de lupin blanc (*lupinus albus L*), extraction en milieu alcalin , optimiser, alcaloïdes totaux (AT) , modélisation .

## Abstract

White Lupine "*Lupinus albus L*" is a Mediterranean plant widely used in traditional medicine for its biological properties attributed essentially to alkaloids. The purpose of this work is to study and optimize the conditions and parameters for extraction of alkaloids from white lupine seeds by extraction in an alkaline medium. In order to choose the best yield , we studied several factors, ratio (solid / liquid), temperature and extraction time. A methodological approach for the modeling of alkaloids' extraction processes was followed in order to find the optimal parameters , Through the use of experimental plans.

The highest total alkaloid contents (AT) were obtained under the following conditions: ratio (solid / liquid) was (1/19) and the optimal extraction of the alkaloids occurred in a time of 35 minutes and in Temperature of 26 ° C.

**Key words:** White lupine (*Lupinus albus L*), alkaline extraction, optimization, total alkaloids (AT), modeling.

## ملخص

الترمس الابيض هو نبات من منطقة البحر الأبيض المتوسط يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي لخصائصه البيولوجية و يرجع ذلك أساسا إلى احتوائه على القلويدات.

والغرض من هذا العمل هو دراسة وتحسين الظروف والمعاملات لاستخراج القلويدات من بذور الترمس الأبيض عن طريق الاستخراج في وسط قلوي. ومن أجل اختيار أفضل عائد ، درسنا عدة عوامل؛ النسبة (صلب/سائل)، درجة الحرارة ، ووقت الاستخراج. تم اتباع مقاربة منهجية لنمذجة عمليات استخراج القلويدات من أجل إيجاد الشروط المثلى، من خلال استخدام مخطط تجريبي محدد .

تم الحصول على أعلى محتويات قلوية إجمالية في الحالات التالية: النسبة (صلب / سائل) كانت (19/1) وكان الاستخلاص الأمثل للقلويدات في زمن مقداره 35 دقيقة وفي درجة حرارة 26 درجة مئوية.

**الكلمات المفتاحية:** بذور الترمس الأبيض ، الاستخراج في وسط قلوي ، التحسين، مجموع القلويدات ، النمذجة