



HAL
open science

Les solvants eutectiques comme milieu d'extraction de composés polaires bioactifs à partir de sons céréaliers

Mélina Robert

► **To cite this version:**

Mélina Robert. Les solvants eutectiques comme milieu d'extraction de composés polaires bioactifs à partir de sons céréaliers. 2017, 68 p. hal-01603214

HAL Id: hal-01603214

<https://hal.science/hal-01603214>

Submitted on 5 Jun 2020

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License



Méline ROBERT

M2 Chimie des biomolécules

Synthèse Appliquée Séparation et Analyse (SASA)

Les solvants eutectiques comme milieu d'extraction de
composés polaires bioactifs à partir de sons céréaliers

Du 01/03/17 au 31/08/17

INRA (Institut National de la Recherche Agronomique)

2 Place Viala, SupAgro

34060 Montpellier

Encadrants : C. BOURLIEU (Chargée de recherches INRA), E. Durand (Chercheur CIRAD), V. Vié (Maître de conférence IPR Rennes)



Remerciements

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à Claire Bourlieu pour m'avoir encadrée quotidiennement tout au long de mon stage. Un grand merci pour son encadrement et son implication dans mon travail mais également à Erwann Durand pour son co-encadrement. Merci également à Véronique Vié de m'avoir accueillie pendant plus de deux semaines dans son équipe à Rennes et d'avoir contribué à ce projet.

J'aimerais également remercier toutes les personnes ayant participé au projet : Pierre Villeneuve, Valérie Lullien-Pellerin, Cécile Barron, Frédéric Carrière, Maria Figueroa, Valérie Micard, Johanna Reichling.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Alain Morère de m'avoir permis de réaliser ce stage.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire de l'UMR IATE m'ayant permis de travailler dans une bonne ambiance amicale et pour leur bonne humeur.

Enfin, je tiens également à remercier l'équipe technique MS (UM Montpellier) pour les analyses effectuées.

Sommaire

Abréviations	
Code couleur	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des graphiques	
Avant-propos.....	7
Introduction.....	9
I. Bibliographie.....	11
A. Solvants eutectiques profonds (Deep eutectic solvents).....	11
1. Définitions	11
2. Propriétés physico-chimiques	14
a. Point de fusion, viscosité et conductivité.....	14
b. Toxicité et biodégradabilité.....	15
B. Composés phénoliques	17
1. Définitions	17
2. Les composés phénoliques du blé.....	18
3. Extractions composés phénoliques du blé.....	20
a. Extractions avec les solvants organiques	20
b. Extractions avec les DES	21
C. Interaction aux interfaces	22
1. L'ellipsométrie.....	22
a. L'appareil.....	22
b. Principe.....	23
c. Interaction lumière-surface.....	24
2. Isothermes de compression	25
II. Résultats et discussion	26
A. Caractérisation des matières premières	26
1. Préparation et analyse des (Na)DES.....	26
2. Analyse des coproduits.....	28
B. Mise en place des conditions expérimentales	30
1. Sélection de la méthode HPLC	30
2. Choix des conditions de références	31

C.	Caractérisation des extraits.....	32
1.	Identification des composés.....	32
2.	Teneurs des différents extraits organiques.....	33
a.	Teneur maximale de référence	33
b.	Différentes teneurs en composés phénoliques	34
3.	Caractérisation des extraits DES.....	35
a.	Profils chromatographiques	35
b.	Teneur en acide férulique dans les extraits DES	36
4.	Influence du broyage.....	37
D.	Microscopie	37
E.	Analyse DPPH	38
F.	Caractérisation aux interfaces.....	40
1.	Indice de réfraction	40
2.	Comparaison entre DES 1 et DES 3 à une interface liquide/air.....	40
3.	Effet de la concentration du DES à l'interface air/liquide	41
4.	Comportement des DES sous un film de Langmuir (DOPC/DPPC 50 :50)	41
5.	Cuve à compression.....	42
	Conclusion	43
	Matériel et méthodes.....	45
A.	Fractionnement.....	45
B.	Préparation des DES	45
C.	Extractions avec différents solvants.....	45
D.	Méthode d'hydrolyse	45
E.	Procédure de caractérisation HPLC.....	46
F.	Procédure analyse masse	46
G.	Analyses DPPH.....	47
H.	Ellipsométrie.....	47
I.	Microscopie	48
	Bibliographie.....	49
	Annexes	53

Abréviations

ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF	Acide férulique
AL	Aleurone
ChCl	Chlorure de cholinium
CV	Coefficient de variation
CIRAD	Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
DES	Deep Eutectic Solvent
DLH	Donneur de Liaisons Hydrogène
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholine
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
EDTA	Acide ethylenediaminetetraacétique
FAB-MS	Fast atom bombardment mass spectroscopy
HOESY	Heteronuclear Overhauser Effect Spectroscopy
IL	Ionic Liquid
INRA	Institut national de recherche agronomique
IPR-BioMIF	Institut de Physique de Rennes- Plateforme BioMolécules aux Interfaces Fluides
Mp	Melting Point
NaDES	Natural Deep Eutectic Solvent
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SBB	Son broyé Bermude
UMR IATE	Unité Mixte de Recherches Ingénierie des Agro-polymères et technologies Émergentes
Trolox	Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylique

Code couleur

	■ Ethanol : eau (60:40 v/v)
	■ Isopropanol : eau (70:30 v/v)
	■ Acetone : eau (50:50 v/v)
	■ DES 1
	■ DES 1 15h
	■ DES 2
	■ DES 2b
	■ DES 3
	■ DES 3b
	■ DES 4b
	■ DES 5b

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : COMPOSITION DES DIFFERENTS TYPES DE DES (D'APRES ABBOTT ET AL. 2007), DLH=DONNEUR DE LIAISONS HYDROGENE	12
TABLEAU 2 : COMPOSITION DES DIFFERENTS DES SYNTHETISES, * CHLORURE DE CHOLINIUM	26
TABLEAU 3 : RESULTATS DES MESURES A_w , KARL FISHER ET PH, AVEC Σ = ECART TYPE ET CV= COEFFICIENT DE VARIATION	27
TABLEAU 4 : CONDITIONS UTILISEES POUR LE CHOIX DES SOLVANTS DE REFERENCE, ¹ : D'APRES WANG ET AL. 2008 ; ² : D'APRES ABOZED ET AL. 2014.....	31
TABLEAU 5 : IDENTIFICATION DES COMPOSES PHENOLIQUES, TR= TEMPS DE RETENTION	32
TABLEAU 6 : RESULTATS D'HYDROLYSE ET QUANTITE D'AF DETERMINEE DANS LES HYDROLYSATS, AVEC AF= ACIDE FERULIQUE AL= ALEURONE	33
TABLEAU 7 : QUANTITE D'ACIDE FERULIQUE EXTRAIT ET POURCENTAGE EXTRACTIBLE ASSOCIE	35
TABLEAU 8 : CONDITIONS UTILISEES POUR LES MESURES DE CARACTERISATION AUX INTERFACES, AVEC Σ = ECART TYPE...	40
TABLEAU 9 : GRADIENT UTILISÉ AVEC A: H ₂ O + 0.1% FORMIC ACID, B: METHANOL + 0.1% FORMIC ACID	46

Liste des figures

FIGURE 1 : NOMBRE D'ARTICLES PAR ANNEE EN RECHERCHANT "DEEP EUTECTIC SOLVENT" DANS LA BASE DE DONNEES SCIFINDER	9
FIGURE 2 : INTERACTION ENTRE UN DLH ET LE CHCL (SEL D'AMMONIUM QUATERNAIRE), OBTENUE DE LI ET AL. 2016	11
FIGURE 3 : A : DIAGRAMME DE PHASE POUR DEUX COMPOSES A ET B, AVEC MP = MELTING POINT	12
FIGURE 4 : SYNTHESE DE POLYMERES BIOACTIFS A BASE DE SELS D'AMMONIUM OU DE PHOSPHONIUM (CHCL, TETRAETHYLAMMONIUM BROMIDE, HEXADECYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE OU METHYLTRIPHENYLPHOSPHONIUM BROMIDE, ADAPTEE DE GARCIA-ARGÜELLES 2013	13
FIGURE 5 : ARBORESCENCE DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	17
FIGURE 6 : REACTION D'OXYDATION.....	17
FIGURE 7 : STRUCTURE DU GRAIN DE BLES ET DIFFERENCES ENVELOPPES COMPOSANT LE SON DE BLE. D'APRES BARRON ET AL, « ACCES A DES MOLECULES D'INTERET PAR FRACTIONNEMENT PAR VOIE SECHE <i>INNOVATIONS AGRONOMIQUES</i> 19 (2012), 51-62 ».....	18
FIGURE 8 : FRACTIONNEMENT PAR VOIE SECHE DE SONS, ADAPTE DE BARRON ET AL. 2012.....	19
FIGURE 9 : LOCALISATION DES ACIDES PHENOLIQUES DANS LE BLE ; * PRESENCE, ** CONCENTREE, *** TRES CONCENTREE ; NISTRUM ET AL. 2007, AVEC AL= ALEURONE	19
FIGURE 10 : SCHEMA D'ACIDES FERULIQUES LIES A UNE CHAINE ARABINOXYLANE	20
FIGURE 11 : COMPARAISON DES CONCENTRATIONS EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX OBTENUES PAR DIFFERENTES METHODES (OUFNAC ET AL. 2007) [54]	21
FIGURE 12 : DIFFERENTS MONTAGES D'APPAREILS ELLIPSOMETRIQUES	22
FIGURE 14 : FORCE APPLIQUEE SUR LE PAPIER FILTRE PAR LA METHODE DE WILHELMY	23
FIGURE 13 : EFFET D'UN FILTRE POLARISANT SUR LA LUMIERE.....	23
FIGURE 15 : INTERACTION D'UNE ONDE INCIDENTE AVEC UNE INTERFACE	24
FIGURE 16 : AIRE MOLECULE EN FONCTION DE LA PRESSION EXERCEE SUR UNE MONOCOUCHE LIPIDIQUE	25

FIGURE 17 : RESULTATS A_w OBTENUS POUR LES DES ET MATIERES SECHES	28
FIGURE 18 : SPECTRE UV-VIS D'UN PHENOL.....	30
FIGURE 19 : SPECTRES UV DE L'ACIDE FERULIQUE ET DE L'ACIDE COUMARIQUE.....	30
FIGURE 20 : EFFET DU CHOIX DE LA LONGUEUR D'ONDE A 280 NM ET 320 NM SUR LES ETALONS (DANS L'ORDRE D'ELUTION : ACIDES GALLIQUE, VANILLIQUE, FERULIQUE, COUMARIQUE, SINAPIQUE ET HEXYLRESORCINOL) DE 5 A 21MIN	30
FIGURE 21 : IDENTIFICATION DES COMPOSES SUR UN SPECTRE HPLC (EXTRAIT SUR ALEURONE : ÉTHANOL/EAU 60 :40 V/V), 40°C, 25 MIN).....	32
FIGURE 22 : HISTOGRAMME REPRESENTANT LA TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES (HEXYLRESORCINOL, ACIDES COUMARIQUE/SINAPIQUE , ACIDE FERULIQUE ET ACIDE VANILLIQUE) DANS DIFFERENTS EXTRAITS ORGANIQUES DE SON BROYE BERMUDE (2MIN) ESBB OU D'ALEURONE (EA) EN MODE AGITATION ORBITALAIRE OU AVEC BARREAU .	34
FIGURE 23 : PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES ET EXTRACTIONS REALISEES AVEC LES DES SUR SBB (2MIN) ($\lambda = 280\text{NM}$)	36
FIGURE 24 : PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES ET EXTRACTIONS REALISEES AVEC LES DES SUR ALEURONE ($\lambda = 280\text{NM}$)....	36
FIGURE 25 : COMPARAISON DE TENEUR EN AF OBTENU AVEC LES DES SUR ALEURONE ET SBB	37
FIGURE 26 : REDUCTION DU DPPH EN FONCTION DE LA LONGUEUR D'ONDE	38
FIGURE 27 : COMPARAISON DE L'ABSORBANCE ENTRE LES 3 EXTRAITS ORGANIQUES DE REFERENCE SUR SBB ET LE TROLOX 1.1 μM	38
FIGURE 28 : ABSORBANCE DES DES SEULS EN COMPARAISON AVEC L'EXTRAIT ETHANOLIQUE SUR SBB	39
FIGURE 29 : ABSORBANCE DES EXTRAITS DES EN COMPARAISON AVEC L'EXTRAIT ETHANOLIQUE SUR SBB.....	39
FIGURE 30 : ABSORBANCE DES DES A DIFFERENTES DOSES EN COMPARAISON AVEC L'EXTRAIT ETHANOLIQUE SUR SBB.....	39

Liste des graphiques

GRAPHIQUE 1 : A. COMPARAISON DES COURBES GRANULOMETRIQUES DE L'ALEURONE EN VOIE SECHE ET HUMIDE B. COMPARAISON DES COURBES GRANULOMETRIQUES DU SON BERMUDE BROYE 2 MIN EN VOIE SECHE ET HUMIDE	29
GRAPHIQUE 2 : COURBES GRANULOMETRIQUES DU SON BERMUDE BROYE 2, 5 ET 10 MIN EN VOIE SECHE	29

Avant-propos

Contribuant à la recherche sur les fonctionnalités des produits végétaux l'Unité Mixte de Recherches Ingénierie des Agro-polymères et technologies Émergentes (UMR-IATE) est constituée de d'agents dépendants de quatre tutelles : l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) agents du département CEPIA et MIA, le CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) agents du département PERSYST, l'Université Montpellier II et enfin l'École Nationale supérieure d'Agronomie, SupAgro. Au sein de cette UMR cinq axes de recherche sont développés :

- Axe 1 : Fractionnement des agro-ressources
- Axe 2 : Structuration sous contraintes des agro-polymères et réactivité des poudres
- Axe 3 : Transfert de matière et réactions dans les systèmes aliment/emballage
- Axe 4 : Biotechnologie microbienne et enzymatique des lipides et des agro-polymères
- Axe 5 : Ingénierie des connaissances pour améliorer l'usage des agro-ressources

Chaque axe a pour but d'augmenter les performances des produits végétaux et de leurs dérivés, pour des usages alimentaires et non alimentaires. L'UMR comptait au dernier bilan AERS 80 permanents et un effectif équivalent de non permanents. Son objectif général est « d'améliorer les connaissances sur les fonctionnalités des produits végétaux et de leurs constituants dans le but d'optimiser leurs performances tant pour des usages alimentaires que non alimentaires ». Cet objectif est poursuivi dans un contexte général de raréfaction des ressources fossiles, de changement climatique et de pressions lourdes sur l'environnement. Ce contexte légitime totalement les démarches de production et de consommation de bioproduits issus de ressources renouvelables, et selon des procédés durables.

Fondé en 1984, le CIRAD compte plus de 1800 agents dont 800 chercheurs et plus de 300 doctorants¹. Avec pour tous, six axes de recherches prioritaires : intensification écologique, biomasse énergie, alimentation, santé animale, maladie émergente, politiques publiques, espaces ruraux. Ces différents axes s'inscrivent dans la perspective d'un développement durable des régions tropicales et méditerranéennes. Les connaissances produites par le CIRAD permettent d'accompagner le développement agricole et de contribuer aux enjeux agricoles et alimentaires².

L'INRA quant à lui a été fondé en 1946, ses missions sont articulées autour du triptyque Alimentation, Environnement, Agriculture et ont pour but de :

- Produire et diffuser des connaissances scientifiques
- Former à la recherche et par la recherche
- Éclairer les décisions publiques
- Contribuer à l'innovation par le partenariat et le transfert
- Élaborer la stratégie de recherche européenne et nationale
- Contribuer au dialogue entre Science et Société

¹ <https://www.ird.fr/les-partenariats/principaux-partenaires-scientifiques/tutelles-des-unites-de-recherche-de-l-ird/cirad>

² <https://theconversation.com/fr/partners/cirad>

Parmi les pôles scientifiques, celui de Montpellier mène des recherches pour une alimentation adaptée, pour un environnement préservé et pour une agriculture compétitive et durable dans le contexte des productions agricoles méditerranéennes. Ces agents travaillent principalement sur l'optimisation du fractionnement, de la déconstruction et de la fonctionnalisation des agro-ressources végétales en développant des procédés verts et durables, économiques en eau et énergie.

Utilisant le blé dur comme modèle, l'INRA de Montpellier vise à revaloriser et dynamiser la filière blé dur en France et plus généralement à valoriser au mieux les coproduits céréaliers.

Introduction

Considérés longtemps comme des nutriments de moindre importance, les phytonutriments sont aujourd'hui connus pour être de puissants antioxydants et protégeraient contre le cancer, les maladies cardiovasculaires et le vieillissement prématuré [1]. Ces composés phytochimiques peuvent être classés en différentes familles, dont les principales sont celles des terpènes, alcaloïdes et composés phénoliques. Cette dernière est la plus vaste famille, comprenant aussi bien les acides phénoliques simples que les anthocyanes, les coumarines, les polyphénols ou encore les tannins [2]. La famille des composés phénoliques a longtemps été associée à des effets néfastes pour la santé et considérée comme anti-nutritionnelle, notamment en raison de la présence des tanins qui diminuent l'activité des enzymes digestives ou encore en abaissent l'assimilation des minéraux. Ce point de vue a néanmoins été nuancé dans de nombreuses études, qui ont démontré les multiples vertus des composés phénoliques [3].

Présents dans les fruits et légumes mais également dans les graines de les céréales ou d'oléoprotéagineux, les herbes, épices et les thés, les composés phénoliques ont été isolés, identifiés et quantifiés. Les méthodes classiques d'extraction sont associées à l'utilisation de solvants organiques, en grandes quantités. Dans le cadre de la chimie verte, les méthodes classiques ont laissé place à des méthodes plus respectueuses de l'environnement. Pour cela, l'utilisation de solvants non conventionnels de type liquides ioniques (IL) a dans un premier temps été considérée comme une alternative possible aux solvants organiques dans les synthèses, séparations ou extractions de composés phénoliques. Les IL sont composés d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique, ce qui permet une multitude de combinaisons $> 10^{18}$ [4]. Grâce à leurs propriétés uniques (liquides à température ambiante, non volatils, stabilité thermique et chimique [5], [6], ou une pression de vapeur négligeable [7]) ces solvants ont pris une importance grandissante dans l'industrie chimique.

Néanmoins, la toxicité de ces solvants a récemment été remise en cause. En effet, il a été prouvé que les IL entraînent des dommages sur l'ADN [8]. De plus leurs procédures de préparation restent complexes. Ces défauts des solvants ioniques usuels ont favorisé l'émergence d'une nouvelle génération de ILs les solvants eutectiques ou DES (« deep eutectic solvent »).

Introduit pour la première fois en 2003-2004 par Abbott *et al.* [5], [6], les DES ont pris une

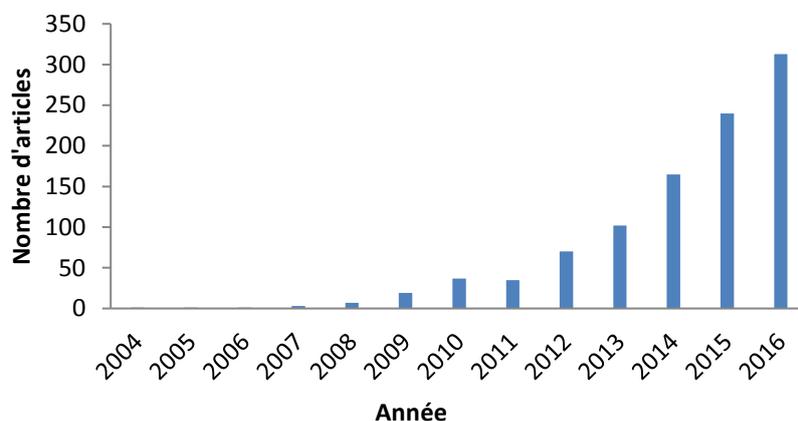


Figure 1 : Nombre d'articles par année en recherchant "Deep eutectic solvent" dans la base de données Scifinder

importance grandissante (Figure 1) et ont fait l'objet d'études comme milieu privilégié pour conduire des réactions de catalyses, biotransformation, synthèse de nanoparticules etc.

Les membres de l'Axe 4 de l'UMR IATE s'intéressent à l'application des DES pour l'extraction et la fonctionnalisation de composés secondaires (polaires à amphiphiles) à partir de coproduits végétaux. En effet, il a pu être démontré que les solvants eutectiques, peuvent servir de milieu d'extraction de certains composés polaires notamment *via* les liaisons hydrogène qu'ils permettent d'induire avec les molécules à extraire. En outre, ces solvants semblent favoriser la stabilité de certains composés phénoliques extraits par rapport à des solutions éthanoliques *via* la force des liaisons hydrogène établies entre les molécules du NaDES (Natural Deep Eutectic Solvent) et les molécules solubilisées [9].

Les travaux réalisés dans l'équipe du CIRAD [10] mais aussi à l'extérieur [4], [9], [11]–[13] ont montré que les composés polaires tels que des composés phénoliques pouvaient être extraits en utilisant des DES. A la lumière de résultats plus récents qui ont montré la possibilité d'extraire les composés polaires à partir de coproduit de café ou de cacao, nous avons envisagé, dans ce travail, d'étudier les possibilités d'extraire de tels composés à partir de coproduits céréaliers comme le blé, le seigle ou encore des enveloppes de riz rouge. Ce stage s'inscrit dans un petit projet incitatif de type Action Nouvelle Soutenue (ANS) financé par le département CEPIA de l'INRA qui doit se dérouler sur 2 ans (2017-2018).

L'objectif de ce stage est de réaliser dans un premier temps l'extraction de composés polaires à partir de sons céréaliers de blé. Ces matières premières seront soumises à différents prétraitements puis seront extraites grâce à des DES. Enfin, les résultats obtenus seront comparés à ceux obtenus par des méthodes classiques (solvants organiques décrits dans la littérature). Dans un second temps, les propriétés de ces solvants aux interfaces seront testées afin de déterminer si leur pouvoir d'extraction est lié à un effet détergent et des propriétés tensioactives spécifiques.

I. Bibliographie

A. Solvants eutectiques profonds (Deep eutectic solvents)

1. Définitions

Les ILs ont fait l'objet de nombreuses études quant à leur toxicité [8], [14], [15]. Il a été montré que plusieurs propriétés de ces solvants pouvaient limiter leur applications : ainsi leur toxicité, dégradabilité, ou encore leur coût de revient ont été remis en question [16]. Les DES sont des ILs possédant des propriétés spéciales. Il s'agit d'un IL, dont le cation est remplacé par un accepteur d'hydrogène (ALH), il s'agit généralement d'un ammonium quaternaire et qui interagit avec un donneur d'hydrogène (DLH) introduit à un ratio molaire donné. Le mélange crée présente un point de fusion inférieur à ceux des composés individuels [5]. Ainsi, les deux espèces mises en commun sont capables de former des liaisons intramoléculaires non covalentes, de type hydrogène généralement (par échanges de protons/électrons), permettant de créer une diminution énergétique et ainsi une diminution de la température de fusion du mélange d'où le terme de « mélange eutectique ».

Les liaisons hydrogène ou les forces de Van Der Waals interfèrent avec les propriétés de cristallisation des composants. Une étude menée par Li *et al.* en 2016 [17] a montré que la diminution de la température de fusion est corrélée à la contribution du DLH avec l'espèce polaire mise en commun [18]. Lorsque l'ALH est à proximité d'un DLH, ces interactions vont protéger la charge de l'ALH et ainsi interférer avec les propriétés de cristallisation (Figure 2).

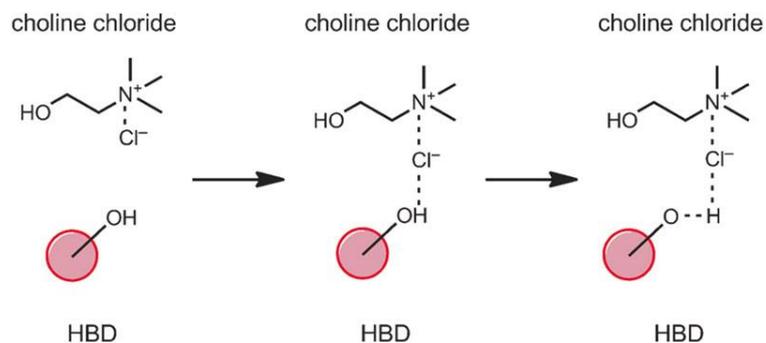


Figure 2 : Interaction entre un DLH et le ChCl (sel d'ammonium quaternaire), obtenue de Li *et al.* 2016

Une bonne illustration de cette aptitude à créer un mélange eutectique, est illustrée par le mélange de chlorure de cholinium (ChCl) et d'urée en ration molaire (1:2). « Un mélange eutectique est composé de deux ou plusieurs corps purs, qui mis en mélange se comportent comme un corps pur du point de vue de la fusion » (Figure 3a). Le point de fusion du ChCl et de l'urée est respectivement de 302°C et 133°C, alors que mélange présente une température de fusion abaissée à 12°C [5] (Figure 3b).

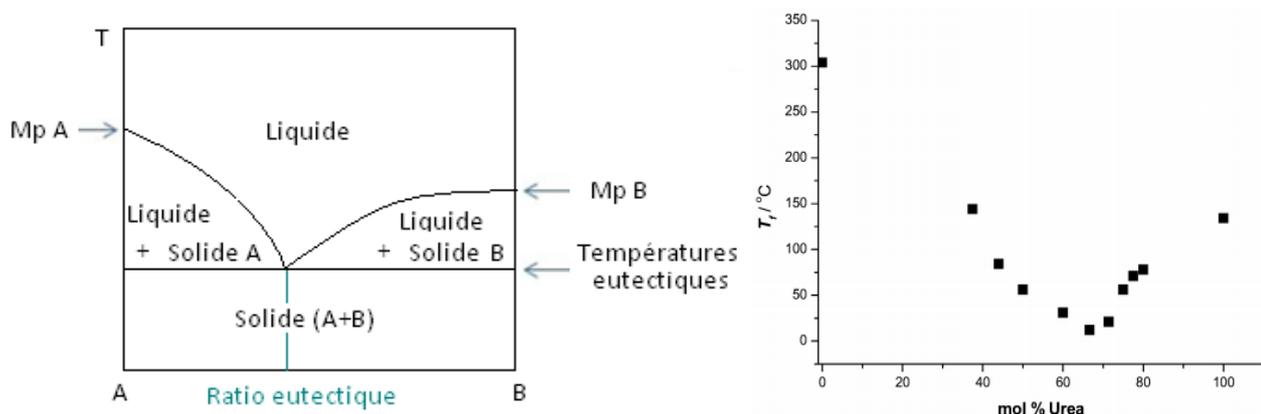


Figure 3 : a : Diagramme de phase pour deux composés A et B, avec Mp = Melting Point

b : Diagramme de phase du ChCl et de l'eau en ratio 1:2

Les DES sont classés en quatre catégories (Tableau 1) selon leurs compositions [19]. Cette alternative aux ILs classiques peut être décrite suivant la formule suivante : $R_1R_2R_3R_4N^+X. zY$, avec les différentes possibilités de substituant décrites dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Composition des différents types de DES (d'après Abbott et al. 2007), DLH=Donneur de liaisons hydrogène

Type I	Sel d'ammonium quaternaire	Sels de métaux ($Y=MCl_x$, $M=Zn, Sn, Fe, Al, Ge$)
Type II		Sels de métaux hydratés ($Y= Y=MCl_{x,y} \cdot H_2O$)
Type III		DLH ($Y=RZ$, $Z=CONH_2, COOH, OH$)
Type IV	Sels de métaux hydratés	DLH

En 2003, un DES était obtenu à partir d'un sel d'ammonium quaternaire avec un sel de métal ou un DLH (amine ou acide carboxylique). La famille s'est élargie avec un autre type : un sel de métal hydraté en présence d'un DLH de type urée, éthylène glycol, acétamide ou hexanediol.

Les liaisons hydrogène formées dans les DES ont été observées par RMN par Abbott et al. [5]. D'autres études ont démontré cette relation, par exemple entre le 1,2-propanediol et le ChCl (Annexe 1). Les spectres NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) ont montré l'implication entre les protons du groupe hydroxyle du 1,2-propanediol et les carbones du ChCl [20]. De plus, il a été démontré une relation entre ces deux composants et l'eau. En effet, l'eau participe à la structure supramoléculaire du DES.

Par opposition aux solvants organiques, Les DES sont donc des solvants peu chers, faciles à préparer, relativement biodégradables et dont le nombre ne cesse d'augmenter [20]. Les domaines d'applications des DES ne cessent également d'augmenter, que ce soit pour la séparation/extraction de biodiesel ou encore la synthèse de polymères bioactifs [21]. Ces polymères trouvent des applications en chirurgie, où l'implantation de matériels médicaux peut toujours entraîner des complications liées à des infections bactériennes. Pour parer à cela, des chercheurs se sont intéressés au développement de polymères à visée thérapeutique (biodégradables et antibactériens) en utilisant les DES. Lorsque les microorganismes se développent, ils forment des biofilms intégrés dans

les matrices extracellulaires où ils deviennent résistants aux antibiotiques. Les auteurs de cette publication ont développé des polymères biodégradables (poly (octanediol-co-citrate) polyesters) à base de DES (sels d'ammonium quaternaire ou sels de phosphonium) (Figure 4).



Figure 4 : Synthèse de polymères bioactifs à base de sels d'ammonium ou de phosphonium (ChCl, tetraethylammonium bromide, hexadecyltrimethylammonium bromide ou methyltriphenylphosphonium bromide, adaptée de García-Argüelles 2013

En 2010, le terme NaDES fait son apparition afin d'expliquer certains mécanismes biologiques et phénomènes cellulaires qui étaient jusqu'alors difficiles à comprendre, comme la biosynthèse, la solubilisation, le stockage et le transport de molécules peu ou pas hydrosolubles [20]. Les NaDES pourraient également expliquer les phénomènes de survie dans des conditions extrêmes (sécheresse, froid ou encore salinité).

Les NaDES sont composés de métabolites primaires (acides organiques, sucres, alcools, amines, acides aminés etc.), qui sont abondamment représentés chez les plantes. Cette abondance et cette diversité laisse supposer que les NaDES, intrinsèquement présents dans les organismes, joueraient un rôle biologique comme par exemple la biosynthèse de molécules insolubles comme la cellulose, la lignine etc. D'après Choi *et al.* [20] les NaDES (acide lactique:glucose, chlorure de choline:glucose, et fructose:glucose:sucrose) peuvent extraire des composés phénoliques à partir de fleurs (Carthame). Grâce à leur capacité à donner ou accepter des protons et électrons, les DES peuvent former des liaisons hydrogène et ainsi augmenter leur capacité de dissolution. Ainsi les propriétés individuelles du DES (composition, viscosité, polarité etc.) auront une grande influence sur l'extraction.

Les DES pourraient également augmenter la solubilité de molécules insolubles dans l'eau telles que l'acide benzoïque, griseofulvine, danazol, itraconazole. La solubilité de ces molécules dans des DES seraient augmentée jusqu'à 22000 fois en comparaison avec de l'eau [22].

Lorsque la plante est confrontée à des conditions extrêmes, elle produit une importante quantité de métabolites primaires, notamment la proline. La production de cet acide-aminé, connu pour être un cryoprotectant, est augmentée jusqu'à dix fois lorsque la plante rencontre des conditions de stress (Montré sur *Selaginella* [23], ou sur *Arabidopsis* [24]). La proline peut provoquer l'évaporation de l'eau non gelée et ainsi éviter une infection [25].

En cas de sécheresse, la plante peut survivre longtemps sans eau (plante du désert) grâce à la formation de cristaux liquides, impliquant des NaDES, ce qui permettrait de conserver une certaine quantité d'eau. En effet, les NaDES seraient présent à proximité des membranes cellulaires, en équilibre dynamique avec la phase aqueuse (comme liés aux échangeurs d'ions), et pourraient former une matrice résistante qui protégerait contre la dénaturation des membranes [26].

2. Propriétés physico-chimiques

a. Point de fusion, viscosité et conductivité

Les propriétés des DES sont similaires à celles des ILs en certains points. Elles dépendent notamment des propriétés individuelles des composants. En faisant varier ces entités, ainsi que leurs proportions, il est possible d'obtenir des mélanges aux propriétés désirées.

Abbott *et al.* [5], [6] ont été les premiers à caractériser les propriétés physiques des DES en balayant une grande variété de DLH comme les acides, les amines ou encore les alcools.

Grâce à des études plus poussées (HOESY (Heteronuclear Overhauser Effect, Spectroscopy), RMN (Résonance magnétique nucléaire), FAB-MS (Fast atom bombardment mass spectroscopy)), ces auteurs ont établi un lien entre les interactions entre ion chlorure (fourni par le sel ALH) et une molécule de 1-2propane-diol (Annexe 1) et le point eutectique [11]. En effet, seuls les composés capables de former des liaisons hydrogène avec les ions chlorures ont réussi à former les liquides homogènes avec une chute du point de fusion. Les amides (urée et thio-urée) ont montré la plus grande diminution du point de fusion avec le ChCl. De plus, ils ont démontré que lorsque la symétrie du cation est diminuée, le point de fusion des mélanges diminue. La nature de l'anion associée au sel de cholinium influence aussi le point de fusion : selon l'ordre suivant : $F^- > NO_3^- > Cl^- > BF_4^-$, ce qui montre une corrélation entre la force du DLH et la température de fusion. D'après leurs recherches, le DLH complexe l'espèce anionique augmentant sa taille et diminuant les interactions avec le cation et abaissant ainsi un point de fusion du mélange. Plus la capacité de ces donneurs/accepteurs de liaisons augmente, plus le point de fusion diminue.

Les auteurs de cette même étude [5] ont également porté leur attention sur la conductivité du mélange. Ils ont démontré que ces solvants étaient hautement conducteurs et pouvaient dissocier l'espèce ionique (qui peut se déplacer indépendamment). La conductivité augmente avec la température contrairement à la viscosité qui elle chute lorsque la température est augmentée. Les valeurs de viscosités rapportées dans la littérature pour les ILs sont similaires à celles obtenues pour les DES. Celle-ci dépend de la température et de la composition du mélange (principalement du DLH). C'est le réseau tridimensionnel imposé par les DLH et les interactions (Van Der Waals ou électrostatiques) qui diminuent la fluidité du mélange [27]. Lorsque les ions présents sont de petite taille (petits cations d'ammonium quaternaires ou DLH de type fluoré), l'espace qu'ils occupent est de ce fait plus petit que celui occupé par des ions volumineux, et il y a donc plus d'espace libre pour l'insertion de molécules, et donc une fluidité plus élevée.

Il n'existe pas de paramètre unique pouvant expliquer la multiplicité des interactions moléculaires. Toutefois, il est connu que la polarité d'un solvant influence les propriétés de solvation d'espèces. L'un des moyens d'étudier la polarité est d'observer l'évolution des *maximas* d'absorption colorants de référence (méthode de Reichardt). Ceci permet d'évaluer la différence d'énergie de molécules entre l'état excité et fondamental. Différents DES ont été étudiés (ChCl et 1,2-éthanediol ou glycérol ou urée ou acide malonique ; ratio 1:2) et il a été prouvé que plus la capacité du DLH augmentait et plus la polarité augmentait [28]. Cette observation est corrélée à l'importance du réseau de liaisons hydrogène.

Un autre paramètre important concernant les DES est leur tension superficielle, permettant d'aborder l'influence moléculaire et les interactions dans un mélange. Ce paramètre joue un rôle essentiel dans les transferts de masse comme les séparations, extraction etc. Différentes méthodes

existent en fonction des phases concernées (interface solide / gaz, solide / liquide, liquide / gaz ou liquide / liquide) permettent de déterminer la tension superficielle. Ainsi deux méthodes (du Parachor et celle basée sur l'équation d'Othmer) décrites par *K. Shabaz et al.* [29] ont été appliquées aux DES.

b. Toxicité et biodégradabilité

La toxicité et la biodégradabilité des DES ont fait l'objet de très nombreux articles ou revues de synthèse sur les cinq dernières années [16], [30], [31]. Les données récentes remettent partiellement en cause leur non toxicité et biodégradabilité. Les DES ont d'abord été jugés comme non-toxiques, biodégradables, respectueux de l'environnement [6], [30], [32], [33]. Mais ces jugements étaient basés sur les propriétés individuelles de chaque composant du DES. Concernant le ChCl, présent dans beaucoup d'aliments, et essentiel pour le développement cellulaire, ce composé a été classifié comme nutriment essentiel par le USDA (*United States Department of Agriculture*) et comme complément alimentaire par la FDA (*Food Drug Administration*). Consommé dans les proportions recommandées (550 mg à 3.5g/jour) le ChCl est depuis longtemps considéré comme non génotoxique, non toxique pour la reproduction et le développement, et est autorisé dans l'alimentation animale.

Néanmoins, il a été démontré qu'en mélange, la cytotoxicité des DES était augmentée par rapport au composé individuel [16], [30]. Ce comportement est aussi modulé en fonction de la nature de l'ALH. Ainsi le comportement toxicologique de DES à base d'ammonium, déterminé sur les bactéries Gram positives et négatives, n'a démontré aucune toxicité contrairement au DES à base de phosphonium [30].

Plus récemment, des études plus poussées ont été menées sur la biodégradabilité et cytotoxicité de plusieurs DES à base de ChCl et choline acétate (ChAc) [31], [34]. Il a été démontré que les DES possédaient une cytotoxicité, légère à modérée en fonction des constituants: le ChCl en présence d'acide oxalique possède une toxicité modérée [34].

Selon une étude de *Mbous et al.* [35], les NaDES seraient moins toxiques que des DES.

De plus, les ratios molaires utilisés dans le mélange de constituants du DES sont d'importants déterminants dans la toxicité. Des études sur des bactéries (*E. Coli*) avec des ratios molaires 1:3 (ChCl/d'urée ChCl/glycérol, ChCl/acétamide, ChCl/éthylène glycol) *versus* 1:1, n'entraînent pas les mêmes résultats [16], [30], [31]. En utilisant des DES à base de ChCl et d'un DLH *e.g.* urée, ou glycérol, ou éthylène glycol en ratio molaire 1:3, *Hayyan et al.*[16], [30] n'ont pas observé de toxicité, contrairement à *Wen et al.* [31] qui, en présence de ChCl/urée, ChCl/glycérol, ChCl/acétamide, ChCl/éthylène glycol, ont démontré une toxicité pour un ratio molaire de 1:1. Les ratios molaires ont donc un impact sur le caractère cytotoxique des DES. Néanmoins, en raison de leur biodégradabilité et de leur toxicité moindre, les DES montrent un potentiel d'utilisation de ces solvants en tant que solvants « verts » [34].

Plusieurs chercheurs ont utilisé les solvants eutectiques pour extraire différents composés comme les terpènes (gingérol à partir de gingembre [36]), sucres (à partir de d'ignames [37]), de manganèse (à partir de végétaux [38]) ou encore de terpènes (à partir de feuilles [39]). Pour la

première fois, les DES ont été utilisés pour extraire l'Ochratoxin A (toxine produite par des champignons) à partir de blé [40]. Pour cela, les auteurs ont utilisé deux DES à base de ChCl (ChCl/glycérol 1:2 v/v) et ChCl/urée (1:2 en présence d'eau 40% v/v). Ils ont ainsi pu obtenir un rendement d'extraction de 89% comparé à 93% en utilisant une extraction classique (acétonitrile/eau ratio 6 :4 v/v).

D'autres chercheurs ont concentré leurs recherches sur l'extraction des composés phénoliques de différentes matrices comme les raisins [4], les feuilles [11], [41] ou d'autres produits agroalimentaires comme les oignons, olives [12] etc.

En comparaison avec les solvants organiques pouvant être utilisés dans les mêmes conditions, ces solvants présentent l'avantage d'être relativement « verts ». La biodégradabilité de chaque mélange dépendra de la nature des éléments qui le compose. Par exemple, le ChCl possède une dégradabilité de plus de 93% en 14 jours. Il est connu que les solvants organiques requièrent des précautions particulières pour la santé, le stockage et la gestion des déchets et leur utilisation a été largement restreinte par la directive REACH³. Outre leurs cotés néfastes pour la santé (cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques), ces solvants ont un effet sur l'effet de serre, la contamination des nappes phréatiques etc.

³https://echa.europa.eu/addressing-chemicals-of-concern/restrictions/substances-restricted-under-reach?p_p_id=disslists_WAR_disslistsportlet&p_p_lifecycle=1&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&disslists_WAR_disslistsportlet_javax.portlet.action=search DissLists

B. Composés phénoliques

1. Définitions

Les plantes synthétisent de nombreux composés organiques appelés métabolites primaires ou secondaires. Non indispensables à la vie, les métabolites secondaires, ne participent pas directement au fonctionnement cellulaire vital mais interviennent en situation de stress. Les métabolites secondaires peuvent être classés en trois grandes familles (terpènes, alcaloïdes et composés phénoliques) dont la plus vaste est celle des composés phénoliques (Figure 5). Cette famille regroupe aussi bien la lignine, les flavonoïdes que les tanins.

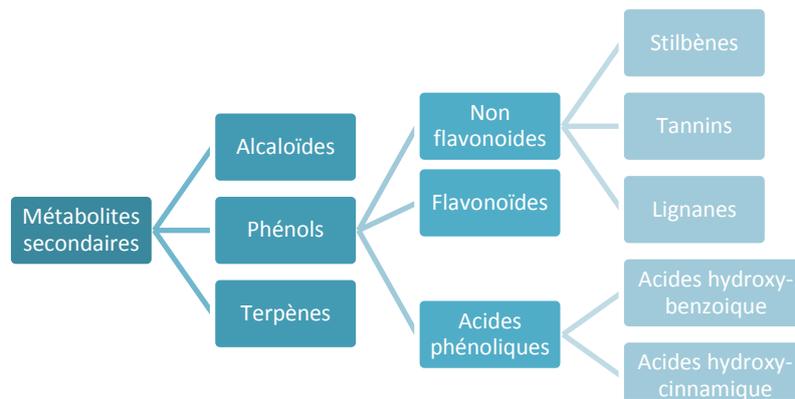


Figure 5 : Arborescence des composés phénoliques

Les polyphénols, largement représentés chez beaucoup de plantes, se distinguent par leur solubilité dans l'eau, poids moléculaires (500 à 3000 ± 4000 D) complexation intermoléculaire, etc. [42]. Certains de ces composés ont des propriétés intéressantes, notamment les composés phénoliques. La curcumine (polyphénol non flavonoïde) possède notamment une activité antioxydante reconnue pour être aussi puissante que la vitamine E.

Naturellement présents dans les systèmes biologiques et nécessaires à la vie, les réactions d'oxydation peuvent produire des radicaux libres. Ces espèces qui possèdent un nombre impair d'électrons par gain ou perte d'un électron (Figure 6), deviennent instables et peuvent entraîner des réactions en chaîne (stress oxydant) pouvant oxyder différentes cibles (ADN, protéine, lipides, etc).

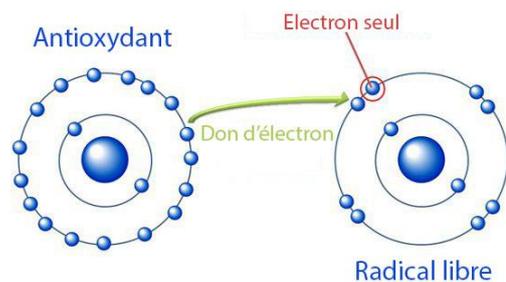


Figure 6 : Réaction d'oxydation

La principale caractéristique d'un antioxydant est de neutraliser les radicaux libres. En effet l'activité antioxydante est définie comme la capacité d'un organisme à se protéger contre les radicaux libres. Différents tests permettent de mesurer cet indice, comme le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), ABTS ou encore l'indice ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) qui permet d'évaluer la capacité antioxydante d'un aliment. Cette capacité est généralement mesurée grâce à l'étude de la fluorescence ou de l'absorbance en présence ou non d'antioxydant, en comparaison avec un antioxydant de référence. Le Trolox (Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchromane-2-carboxylique) analogue hydrophile de la vitamine E est souvent utilisé.

2. Les composés phénoliques du blé

Le grain de blé, composant central de l'alimentation humaine, est composé de différentes parties : le son (enveloppes externes, 14 % poids du grain), le germe et l'endosperme (Figure 7). Ce grain est principalement constitué de glucides (65-75% amidon et fibres), protéines (7-12%) de lipides (2-6%) et des micronutriments. Les composés phytochimiques y sont répartis de façon non uniforme [43]. En effet, ce sont les sons et le germe qui contiennent généralement la plus grande concentration de composés bioactifs. Les sons regroupent différents tissus : le péricarpe, le testa, la couche hyaline et la couche à aleurone (AL) (6-9% poids du grain), avec pour chacune des spécificités de composition (Figure 7). Le regain d'attention pour les composés phénoliques est en partie dû à leur activité antioxydante et leurs bénéfices pour la santé humaine.

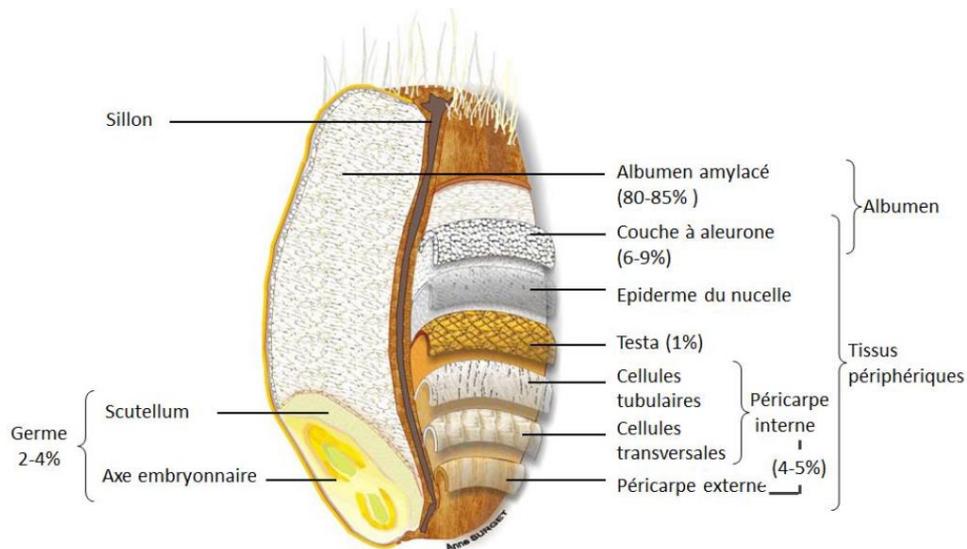


Figure 7 : Structure du grain de blés et différences enveloppes composant le son de blé. D'après Barron et Al, « Accès à des molécules d'intérêt par fractionnement par voie sèche *Innovations Agronomiques 19 (2012), 51-62* »

Le grain de blé (albumen et germe) est composé d'une graine unique soudée à son enveloppe (tissus périphériques). Le germe est principalement composé de lipides mais également de minéraux, vitamines B, α -tocophérols et de stérols. L'albumen amylicé quant à lui contient de l'amidon et des protéines de réserve. Ce sont les tissus périphériques (14% massique) qui contiennent des minéraux et la principale portion de fibres (75% des fibres totales) telles que la lignine, des arabinoxylanes et des β -glucanes.

Les grains sont presque toujours transformés avant d'être utilisés. Pour cela ils peuvent être mouturés (procédé de récupération de l'amande avec une faible contamination des parties périphériques) et servir de base pour l'alimentation. Ce procédé broie et trie les particules selon leur taille et propriétés aérodynamiques (Figure 8). Les sons ainsi obtenus contiennent les tissus périphériques (l'AL jusqu'au péricarpe externe) et une petite portion de l'albumen.

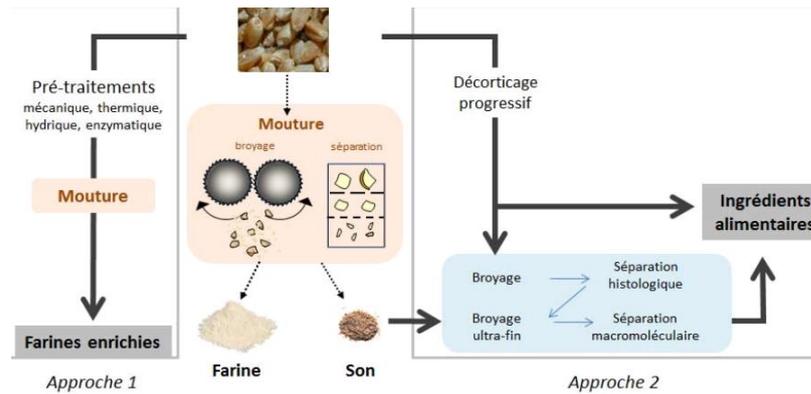


Figure 8 : Fractionnement par voie sèche de sons, adapté de Barron et al. 2012

Or la majorité de phytonutriments d'intérêt se trouve dans les parties périphériques. D'après plusieurs études menées sur le blé, les composés phénoliques se retrouvent principalement concentrés dans les sons qui constituent un coproduit agricole issu de la meunerie du blé produit à hauteur de 90 million de T/an au niveau mondial. Toutefois, ce coproduit n'est pas encore pleinement valorisés.

Il existe des différences importantes dans les teneurs en phytonutriments reportés dans les sons dans la littérature. Ces différences peuvent s'expliquer par les méthodes d'analyses/prétraitements des sons ou encore des facteurs agronomiques (variétés, culture, conditions climatiques etc).

Les composés principalement retrouvés dans le blé sont des acides hydroxy-benzoïques (acides hydroxybenzoïque, acide vanillique et acide syringique), des acides hydroxycinnamique (acide p-coumarique, acide férulique (AF) et dérivés), et des flavonoïdes [44]. Plusieurs rapports décrivent la répartition en composés phénoliques selon ces différentes couches (Figure 9) [45].

Péricarpe interne	Péricarpe externe	Testa + couche hyaline	AL	Embryon (Germe)	Albumen
**	**	***	***	**	*

Figure 9 : Localisation des acides phénoliques dans le blé ; * Présence, ** Concentrée, *** Très concentrée ; Nistrom et al. 2007, avec AL= Aleurone

La présence du groupe $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ sur certains acides hydroxy-cinnamiques permettrait une activité antioxydante plus importante que ceux du groupe des acides hydroxybenzoïques (COOH) [46]. Certains auteurs avancent que l'activité antioxydante du blé serait principalement due à la présence d'AF [47]. Toutefois, la contribution de chaque composé participant à l'activité antioxydante globale ne peut être déterminée précisément [46].

Ces acides féruliques, comme beaucoup d'acides phénoliques sont présents sous forme liée à des sucres (arabinoxylanes et autres polysaccharides), acides gras ou des protéines [48] dans les sons. Or leur bio-accessibilité dépend principalement de la proportion libre, puisque sous forme liée ils ne sont pas assimilables directement par le tractus gastro-intestinal supérieur [49]. Ainsi, le colon bénéficierait de ces antioxydants grâce à la flore capable de digérer et relarguer ces composés sous l'effet d'estérases qui vont pouvoir hydrolyser les fonctions esters [3], [50].

De plus, il a été prouvé qu'il existait une corrélation entre les acides phénoliques et l'activité d'un facteur de transcription (NF- κ B : Nuclear factor kappa B), responsable des procédés

immunitaires, l'apoptose, la prolifération cellulaire [51]. L'effet de l'ensemble de ces composés peut être renforcé par une consommation à plus forte dose qu'aux niveaux naturellement présents dans les produits alimentaires végétaux voire par une fonctionnalisation, d'où la nécessité de les extraire. Cette extraction doit être envisagée comme un prétraitement du co-produit céréalier permettant par la suite d'autres étapes de valorisation du résidu.

3. Extractions composés phénoliques du blé

a. Extractions avec les solvants organiques

Différents solvants organiques ont été utilisés pour extraire les composés phénoliques à partir de différentes matrices que ce soit des graines, des feuilles ou de la paille. Plusieurs facteurs influencent les rendements d'extractions comme la composition des solvants [52], la température, le temps, le ratio solide/solvant utilisé, la surface de contact avec le solvant...

Les composés phénoliques présents dans le blé sont essentiellement retrouvés sous forme liée (liaison ester) aux composants de la paroi cellulaire (cellulose, lignine et protéines) (Figure 10). Cette portion de composés phénoliques représente 90% des composés phénoliques totaux [53].

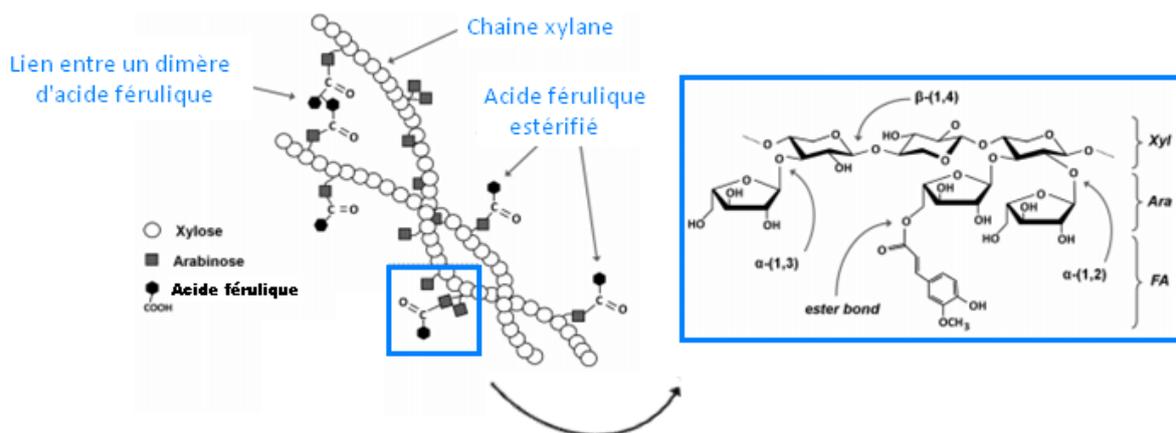


Figure 10 : Schéma d'acides féruliques liés à une chaîne arabinoxylyane

Seuls les composés sous forme libre sont accessibles lors des extractions à pH neutre. Une méthode simple pour récupérer tous les composés phénoliques présents consiste à hydrolyser la matière première afin de rompre les liaisons ester et libérer les acides phénoliques.

Toutefois, de nouvelles méthodes ont été testées pour augmenter les rendements et temps d'extraction, comme les micro-ondes (microwave-assisted extraction), les réactions enzymatiques ou encore les ultra-sons.

Les ultrasons permettent de contribuer aux processus d'extraction en apportant l'énergie nécessaire à la diffusion et en diminuant la perméabilité des particules solides par le solvant, rendant les composés d'intérêt accessibles [54]. L'utilisation des ultrasons est connue pour être reproductible, rapide, facile à manipuler, peu coûteuse et pouvant améliorer la pureté des extraits [55].

L'utilisation de micro-ondes est une technique peu coûteuse qui permet de réaliser des extractions avec une bonne efficacité. Plusieurs auteurs ont prouvé que les micro-ondes augmentaient le rendement d'extraction avec des solvants conventionnels pour les composés

phénoliques totaux [56]. Couplés à une élévation de température, ces micro-ondes pourraient permettre de largement améliorer l'extraction des composés phénoliques [57] (Figure 11).

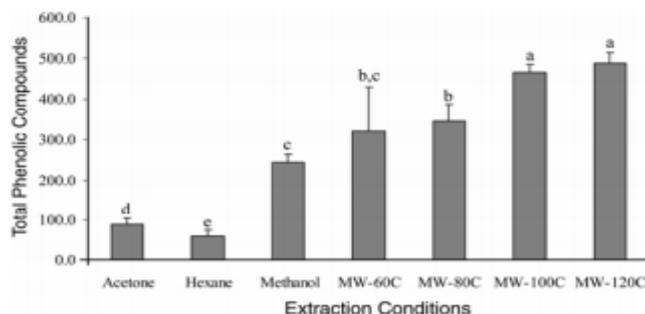


Figure 11 : Comparaison des concentrations en composés phénoliques totaux obtenues par différentes méthodes (Oufnac et al. 2007) [54]

b. Extractions avec les DES

Récemment, les DES ont été employés dans diverses applications comme la synthèse, la catalyse, des réactions enzymatiques, des extractions mais peu d'applications ont pour l'instant été reportées relatives à l'extraction de composés actifs provenant de plantes. Une étude a porté sur l'extraction de cinq composés phénoliques (acide chlorogénique, acide caféique, acide 3,5-dicaffeoylquinique, acide 3,4-dicaffeoylquinique et acide 4,5-dicaffeoylquinique) à partir du chèvrefeuille [58]. Dans cette étude, douze DES associés aux micro-ondes ont été utilisés pour l'extraction de composés phénoliques, et ont permis de conclure qu'ils étaient de bons milieux d'extraction notamment le ChC/1,3-butanediol (ratio 1:6).

Une autre étude a montré l'efficacité des DES pour extraire les composés phénoliques (acide chlorogénique et caféique) à partir d'une herbe (*Artemisiae Scopariae*) [59]. Plus récemment, Xia et al. [60], se sont intéressés à l'extraction de composés phénoliques (acide rosmarinique et salviaflaside). Les rendements reportés étaient supérieurs à ceux obtenus par les méthodes classiques d'extraction. Les DES (selon leur composition) permettent de solubiliser un grand nombre de molécules polaires polyfonctionnelles telles que des biomolécules ou des agents de surface et pourraient encapsuler des médicaments et ainsi les transporter. Riches en composés phénoliques, les coproduits céréaliers tel que les sons de blé pourraient servir de matrice aux extractions.

Il a été démontré que les NaDES peuvent s'accumuler autour des membranes des cellules, en formant des liaisons intermoléculaires avec les têtes polaires des phospholipides, et ainsi stabiliser la membrane [11]. Aux interfaces, les DES ont des propriétés encore peu explorées et certainement dépendantes des composants du DES (longueur de chaîne du cation et de l'anion et de la stabilité du DLH)[61]. Nous nous sommes proposés dans ce stage de commencer à explorer ces propriétés aux interfaces afin de déterminer s'il y a avait une relation entre efficacité d'extraction et leur comportement aux interfaces.

C. Interaction aux interfaces

1. L'ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique spectroscopique précise, non destructive, très sensible et applicable à de nombreux domaines ainsi qu'à une large gamme d'échelle de mesure (de quelques micromètres jusqu'à une partie de couche monoatomique). En effet un montage ellipsométrique permet d'estimer la quantité de matière à une interface. Cette méthode consiste à mesurer la modification de la polarisation d'un faisceau après réflexion sur une surface plane. Ainsi l'ellipsométrie permet de caractériser les interactions aux interfaces liquide-solide ou liquide-liquide. Elle peut également permettre l'interprétation de la rugosité d'une surface, l'homogénéité ou de mesurer des constantes optiques des matériaux.

Ce n'est que récemment que cette méthode a connu une expansion avec l'apparition des micro-ordinateurs ainsi que les commandes électroniques des moteurs ce qui a permis d'automatiser les expériences.

a. L'appareil

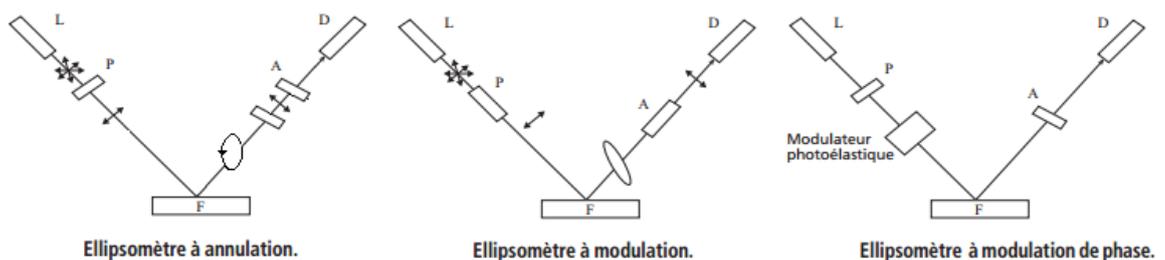


Figure 12 : Différents montages d'appareils ellipsométriques

Un ellipsomètre est constitué de différents instruments permettant d'obtenir les angles ellipsométriques, qui dépendent de l'épaisseur de la couche ainsi que des propriétés optiques. Il existe différents ellipsomètres : à annulation, à modulation ou à modulation de phase (Figure 12).

L'ellipsomètre utilisé à L'IPR-BioMIF (Institut de Physique de Rennes- Plateforme BioMolécules aux Interfaces Fluides) (Annexe 2) est un ellipsomètre à annulation (méthode à zéro), qui est composé de :

- **Une source lumineuse** : La source de lumière utilisée à l'IPR-BioMif est un laser He-Ne qui émet dans le rouge (longueur d'onde $\lambda=632,8$ nm).
- **Un polariseur** : L'onde lumineuse émise par le laser passe par un polariseur qui permet de sélectionner spécifiquement une orientation des vibrations qui composent les ondes vectorielles (ondes qui peuvent osciller selon plusieurs orientations) (Figure 13).

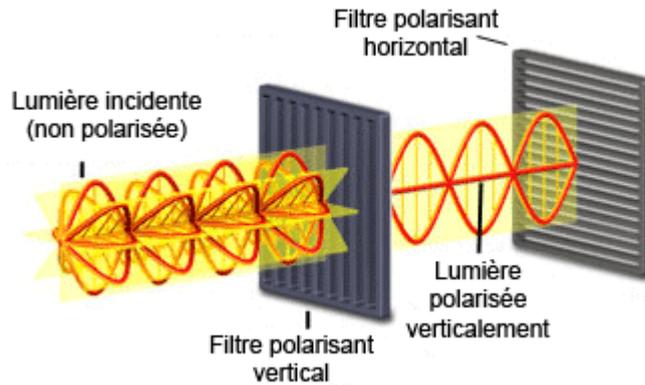


Figure 13 : Effet d'un filtre polarisant sur la lumière

- **Une lame quart d'onde** : La polarisation linéaire obtenue après le polariseur est rendue elliptique après passage sur l'échantillon. L'orientation de la lame quart d'onde permet d'obtenir une polarisation linéaire après son passage.
- **Un analyseur** : Il est orienté de façon à conduire à l'extinction du faisceau. Pour cela il est orienté pour être croisé avec la polarisation linéaire obtenue précédemment.
- **Un détecteur**

b. Principe

Le principe de l'ellipsométrie est basé sur l'utilisation d'un angle d'incidence précis : angle de Brewster permettant d'obtenir les minimas détectables par le polariseur et analyseur avant réflexion (Ψ) et après réflexion (Δ).

Dans un premier temps les réglages sont effectués sur l'eau pure, ce qui permet d'obtenir les zéros (réflexion du laser presque éteinte). Lorsque l'extrait est placé dans la cuve, il induit un déphasage et donc une réflexion. Les polariseurs tournent jusqu'à l'extinction de la lumière émergente (arrivant au détecteur).

La mesure de pression de surface π (obtenue par la méthode de Wilhelmy) est réalisée en plongeant un papier film filtre perpendiculairement à l'interface (Figure 14), légèrement plongé dans la sous-phase. Elle s'exprime selon la formule suivante :

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \text{ avec } \gamma_0 \text{ la tension superficielle initiale}$$

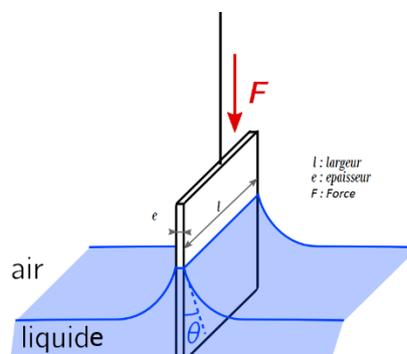


Figure 14 : Force appliquée sur le papier filtre par la méthode de Wilhelmy

La résultante des forces qui s'exerce sur le papier film s'écrit :

$$F = P + P_A + f$$

(P_A = Poussée d'Archimède, P = poids du papier, f = force interfaciale résultante du mouillage).

Lorsque l'on projette cette relation sur un axe z (perpendiculaire à l'interface air/liquide) on obtient F_z^{eau} . Si l'angle de mouillage n'est pas (ou peu) modifié par la présence d'un film à la surface, la pression π est alors liée à la différence entre les forces sur le papier filtre avec ou sans film à l'interface.

$$\pi = \frac{F_z^{film} - F_z^{eau}}{2(e + l)}$$

c. Interaction lumière-surface

Lorsque l'onde incidente monochromatique obtenue après passage par le polariseur entre en contact avec l'interface une partie est réfléchiée et l'autre partie est absorbée par la surface (onde transmise ou réfractée). E^i (le champ électrique de l'onde incidente) est égal à la somme de deux composantes orthogonales, la polarisation (p) d'amplitude complexe E_p^i , et la polarisation s , d'amplitude complexe E_s^i . De même pour l'onde réfléchiée (Figure 15).

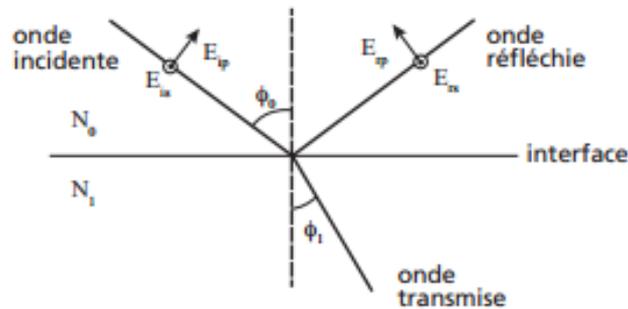


Figure 15 : Interaction d'une onde incidente avec une interface

La réflexion sur l'échantillon est caractérisée par deux valeurs : R_s et R_p , qui sont les coefficients de Fresnel :

$$R_p = \frac{E_p^r}{E_p^i} = \frac{|E_p^r|}{|E_p^i|} e^{i(\delta_p^r - \delta_p^i)} = |r_p| e^{i\delta_p}$$

$$R_s = \frac{E_s^r}{E_s^i} = \frac{|E_s^r|}{|E_s^i|} e^{i(\delta_s^r - \delta_s^i)} = |r_s| e^{i\delta_s}$$

Le but d'une mesure ellipsométrique est d'obtenir les paramètres ellipsométriques : Δ et Ψ .

$$\rho = \frac{R_p}{R_s} = \tan \psi e^{i\Delta}$$

Avec : Rapport des modules : $\tan \psi = \frac{|R_p|}{|R_s|}$

$$\text{Différence de phase : } \Delta = \delta_p - \delta_s$$

2. Isothermes de compression

La mesure d'une isotherme de compression s'effectue dans une cuve à barrières permettant par action mécanique de réduire la surface de la cuve. Il en résulte une modification des interactions moléculaires du film de molécules à l'interface air/liquide. Selon une isotherme théorique, quatre phases peuvent être détectées et caractérisées chacune par une pression constante mais par une aire moléculaire spécifique. Ainsi on observe, lorsque la pression est la plus faible, une phase gazeuse (G), puis lorsque la cuve a barrière diminue en surface une phase liquide (LE), puis une phase liquide condensé (LC) et enfin une phase solide (S) (Figure 16).

Lorsque la pression est trop élevée, les molécules se condensent de la façon la plus dense possible jusqu'au débordement (pression d'effondrement) et à l'apparition éventuelle de multicouches. C'est donc à la pression d'effondrement qu'on obtient la surface minimale d'une molécule.

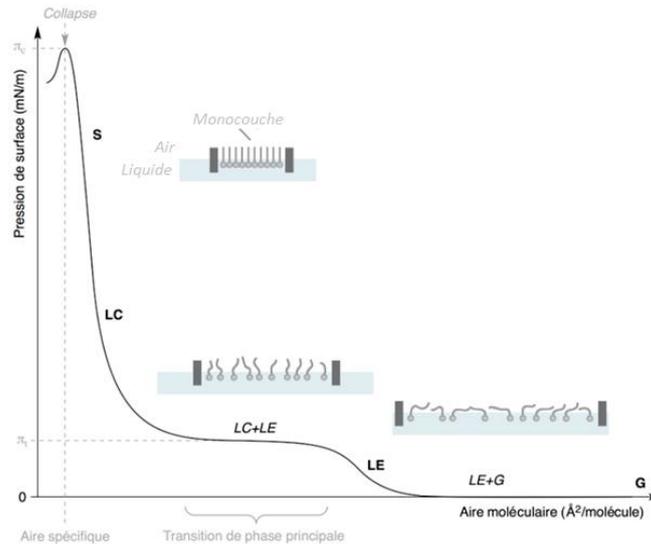


Figure 16 : Aire molécule en fonction de la pression exercée sur une monocouche lipidique

Pour effectuer ces mesures, la cuve à barrière est remplie d'une solution aqueuse sur laquelle une monocouche est déposée délicatement à la surface. Les molécules dites amphiphiles, telles que les lipides, possédant une partie hydrophile et une autre hydrophobe, peuvent s'adsorber spontanément aux interfaces. C'est le cas à l'interface air/eau, la partie hydrophile de ces molécules sera soluble dans l'eau, alors que la partie hydrophobe formera un film monomoléculaire limitant ainsi son contact avec l'eau, on parle alors de « film de Langmuir ». Ces molécules vont ainsi diminuer l'énergie superficielle.

L'action mécanique des barrières permet de réduire l'espace occupé par la monocouche. La pression de surface est mesurée grâce à un papier filtre selon la méthode de la plaque de Wilhelmy. Celle-ci est ensuite tracée en fonction de l'aire moléculaire qui peut être déterminée en divisant le nombre de molécules par la surface totale (dans notre cas 660 cm²).

II. Résultats et discussion

A. Caractérisation des matières premières

Les premiers résultats de ce rapport traitent de la caractérisation des solvants DES et de la matière première. Dans un premier temps, les extractions ont été réalisées sur un lot de son de blé ancien (*son de variété Soisson*) afin de mettre au point les conditions expérimentales, puis dans un second temps sur un son plus récent (*son de variété Bermude*). Ces blés sont des blés tendres panifiables supérieurs de nature « hard » c'est-à-dire présentant un indice de dureté important donnant une meilleure séparation de l'amande et du son et donc peu d'amidon dans les sons (contrairement aux « soft »). En effet, les variétés de blé tendre sont classées suivant leur indice de dureté d'une part et leur valeur boulangère d'autre part. L'indice de dureté comporte trois catégories (hard, médium hard, soft) qui représentent la friabilité et la granulométrie du grain. Le blé hard est plus dur et présente une granulométrie plus grossière que le soft. Le soft convient mieux à la mouture pour la panification parce qu'il se fragmente plus facilement et évite ainsi d'endommager les granules d'amidon.

Pour ce qui est des différents tissus, les expériences réalisées et décrites ci-dessous portent sur l'utilisation de la couche à AL isolée industriellement par broyage (*aleurone industrielle, Bühler, Uzwil, Suisse*). Cette couche a été choisie car c'est le tissu des sons le plus riche en composés phénoliques.

1. Préparation et analyse des (Na)DES

Différents DES ou NaDES ont été préparés selon différents rapports molaires, par simple agitation à faible température (cf *partie matériel et méthode*), avec pour certains (DES 2, 3, 4 et 5) formulation d'une version anhydre et une version hydratée (DES 2b, 3b, 4b et 5b ; [Tableau 2](#)).

Tableau 2 : Composition des différents DES synthétisés, * Chlorure de cholinium

Nom échantillon	Composant 1	Composant 2	Composant 3	Ratio molaire
DES 1	ChCl*	1,2-propanediol	eau	1:1:1
DES 2	ChCl	Glycérol	x	1 :2
DES 2b	ChCl	Glycérol	eau	1:2:2
DES 3	ChCl	Ac. Lactique	x	1 :10
DES 3b	ChCl	Ac. Lactique	eau	1:10:6
DES 4	ChCl	Ac. Citrique	x	1 :2
DES 4b	ChCl	Ac. Citrique	eau	1:2:3
DES 5	Bétaïne	Ac. Citrique	x	1 :1
DES 5b	Bétaïne	Ac. Citrique	eau	1:1:2

Les dilutions des DES par l'eau permettent d'en diminuer la viscosité, d'augmenter leur polarité et en conséquence affecte leur pouvoir d'extraction.

Les DES 4 et 5 malgré des temps d'agitation très long n'ont pas abouti à la formation d'un mélange eutectique puisque des cristaux restaient observables dans le mélange. Ils ont donc été

retirés de la liste. Sur les sept DES restant, des analyses de teneur en eau, pH et A_w ont été effectuées.

L' A_w sert à caractériser l'activité de l'eau. Cette mesure estime la proportion d'eau libre dans un produit. En effet un produit est composé d'eau libre (réactive), d'eau absorbée en surface (peu réactive) et l'eau liée (non réactive). L'eau libre peut favoriser diverses réactions de dégradations (Annexes 3). Plus la mesure de l' A_w est élevée et plus il y a d'eau disponible pour le développement de micro-organismes (Annexes 3). Le produit est placé dans une micro-enceinte à température constante, lorsque l'équilibre entre la pression de vapeur de l'eau dans le produit et la pression partielle de vapeur d'eau de la micro-enceinte est atteint, l'appareil communique la valeur de l' A_w , avec :

$$A_w = \frac{\rho}{\rho_0} = \frac{RH}{100} \quad ; \quad 0 < A_w < 1$$

Avec ρ = Pression de vapeur de l'eau présente dans le produit ;

ERH = Humidité relative moyenne et ρ_0 = pression de vapeur de l'eau pure

La méthode de titration Karl Fisher, permet quant à elle de déterminer le pourcentage d'eau présente dans divers produits. Cette titration se réalise dans une solution d'hydroxyde de méthane (méthanol + base de type RN) où une oxydation du dioxyde de soufre par l'iode se produit selon la réaction suivante :



Cette réaction peut être appliquée à des échantillons à fort taux d'humidité mais également à des échantillons contenant de faibles quantités de l'échelle des ppm. Le pH quant à lui est directement relié au nombre de moles d'ions H^+ par litre d'eau libre ($pH = -\log [H^+]$). Les molécules d'eau s'organisent autour des ions H^+ , elles sont donc non utilisables pour réagir. Ainsi les résultats suivant ont été obtenus (Tableau 3) :

Tableau 3 : Résultats des mesures A_w , Karl Fisher et pH, avec σ = écart type et CV= coefficient de variation

Nom échantillon	A_w	σ	CV	KF	σ	CV	pH mesuré
DES 1	0,51	0,03	0,05	7,2	0,50	0,07	5,42
DES 2	0,12	0,01	0,12	0,2	0,01	0,03	3,90
DES 2'	0,13	0,02	0,17	0,4	0,01	0,01	3,95
DES 3	0,29	0,00	0,01	6,3	0,25	0,04	-0,77
DES 3'	0,41	0,01	0,03	13,6	0,25	0,02	-0,34
DES 4							
DES 4'	0,36	0,00	0,01	13,3	0,38	0,03	-0,90
DES 5							
DES 5'	0,38	0,03	0,09	10,1	1,27	0,12	2,36

Plus il y a d'eau dans les DES et plus l'eau est susceptible d'être réactive. En effet, on remarque que plus il y a d'eau présente et plus la valeur de l' A_w est élevée, à l'exception du DES 1 qui semble être caractérisé par une isotherme de sorption d'eau plus basse que les autres DES.

L'ensemble des DES élaborés présentent des A_w incompatibles avec le développement microbien ($A_w < 0.6$) (Figure 17)

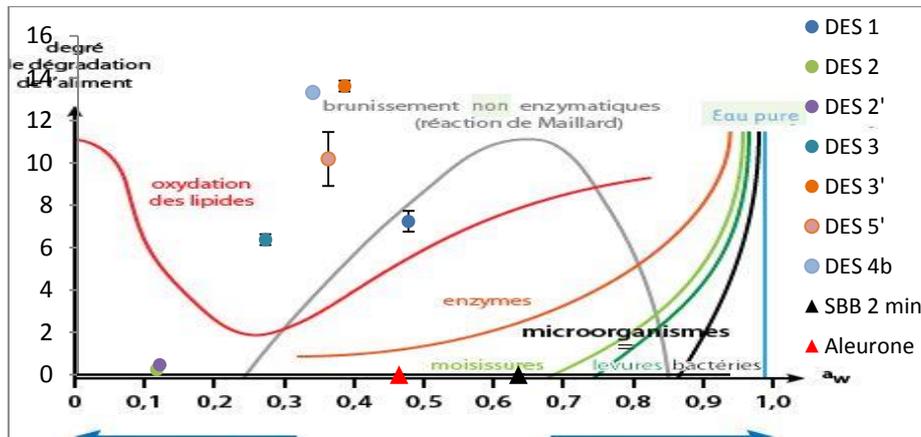


Figure 17 : Résultats A_w obtenus pour les DES et matières sèches

2. Analyse des coproduits

Les matières premières utilisées lors de ce stage sont de l'AL et du son de blé. L'AL a été récupéré sous forme de poudre et le son sous forme de gros son. Pour permettre une meilleure extraction et une manipulation plus simple, les gros sons ont été cryobroyés avec un broyeur à billes (modèle pulvérisette, Fritsch, Allemagne) suivant plusieurs barèmes (temps, intensité). Les deux types de coproduits (AL et sons broyés) ont été caractérisés en termes de distribution de taille. Ces analyses granulométriques ont été réalisées sur un granulomètre Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestshire, Royaume-Uni) en voie sèche et en voie humide en présence d'éthanol comme liquide dispersant.

L'appareil utilisé est un granulomètre à diffraction laser. Celui-ci est basé sur la diffraction de la lumière. Les particules passent au travers d'un rayon laser fixe et diffractent la lumière selon un angle qui est propre à la taille de la particule. Cette lumière diffractée est recueillie par un détecteur multiélément qui la transforme en courbe de distribution (selon la théorie de Fraunhofer), selon le diamètre d'une sphère équivalente. Cette théorie explique que les particules diffractent la lumière avec la même efficacité quel que soit leur taille mais avec des intensités de rayonnement différents.

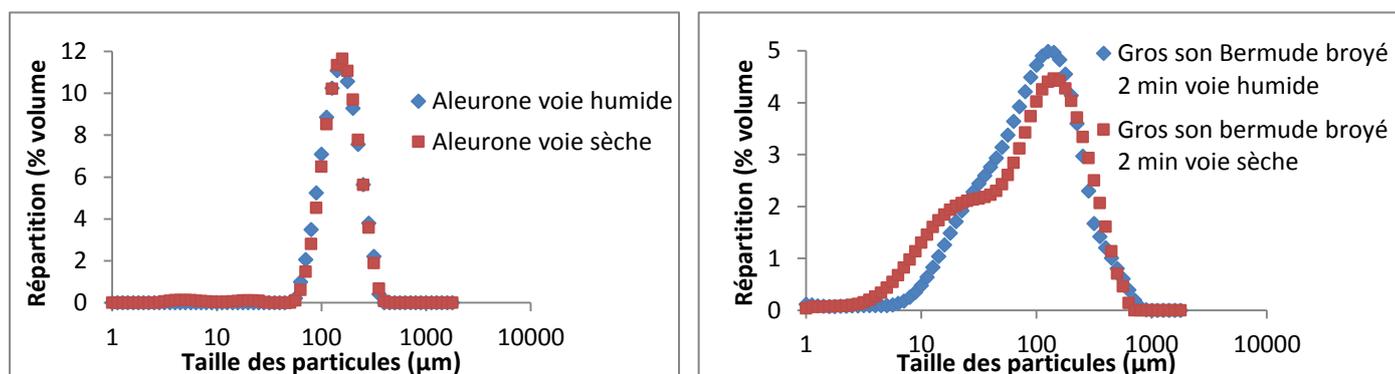
Cette théorie n'est toutefois applicable qu'aux particules de diamètre supérieur à celles de la longueur d'onde du laser. Selon la théorie de Mie⁴ les particules ne diffractent pas seulement la lumière mais la réfléchissent et la diffusent.

L'analyse granulométrique de l'AL montre une répartition monomodale des différentes particules avec un mode à $162 \pm 2.7 \mu\text{m}$. Ce mode semble correspondre à des agrégats de trois cellules végétales assez typiques d'une AL industrielle. Les mesures ont également été réalisées en voie humide (dans de l'éthanol) afin de comparer les modalités de détermination de tailles. Ce changement des modalités de mesure n'affecte que très peu le profil : une distribution toujours monomodale avec mode à $160 \pm 2.7 \mu\text{m}$ est observée (Graphique 1a).

Les sons présentent également une répartition monomodale mais avec un fort épaulement ($\sim 20 \mu\text{m}$) en voie sèche alors que cet épaulement s'estompe en voie humide (Graphique 1b). Pour des raisons de praticité, la voie sèche a donc été conservée, même si des artéfacts (agglomérats

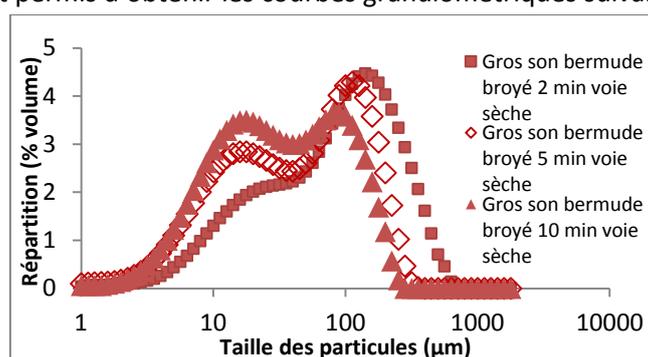
⁴ <http://www.fritsch-france.fr/granulometrie/base-de-connaissances-fritsch/theorie-de-mie/>

apparus sous l'effet de l'électricité statique $\sim 1000 \mu\text{m}$) ont pu être observés lors de certains tests (Annexe 4).



Graphique 1 : a. Comparaison des courbes granulométriques de l'aleurone en voie sèche et humide b. Comparaison des courbes granulométriques du son Bermude broyé 2 min en voie sèche et humide

L'effet du temps de broyage sur la distribution granulométrique des sons a ensuite été étudié. Trois temps de broyages ont été comparés : 2, 5 et 10 minutes. Les résultats obtenus pour les différents broyages ont permis d'obtenir les courbes granulométriques suivantes (Graphique 2) :



Graphique 2 : Courbes granulométriques du son Bermude broyé 2, 5 et 10 min en voie sèche

On s'aperçoit que lorsque le son Bermude est broyé 2 min (SBB 2 min) il y a un léger épaulement de la courbe aux alentours de 20 μm et une population majoritaire de taille de particules vers 160 μm . Sur les deux autres courbes, l'épaulement se définit mieux et laisse apparaître une courbe bimodale (modes principaux aux alentours de 20 μm et de 100 μm). Plus le temps de broyage est long et plus la poudre tend vers une répartition bimodale avec un plus fort poids du premier mode correspondant aux petites particules. Ces plus petites particules sont importantes pour l'extraction ; en effet, lors de la mise en contact entre le solvant et la matière sèche, elles contribuent à développer une surface de contact importante avec le solvant. En outre, une réduction de taille des particules peut s'accompagner d'une augmentation des fractures des parois cellulaires favorisant ainsi l'accessibilité à leur contenu. Ainsi, nous pouvons poser l'hypothèse que les temps de broyages plus long (10 min > 5min > 2 min) devraient permettre une meilleure extraction des différents composés bioactifs.

B. Mise en place des conditions expérimentales

1. Sélection de la méthode HPLC

Les composés phénoliques possédant un groupement chromophore, ils peuvent être détectés en UV. La chaîne HPLC permet d'observer des absorbances situées entre 200 et 500 nm. Les spectres ont été analysés à des longueurs d'onde de 280 nm et 320 nm.

Un spectre UV ou visible ne permet pas l'identification d'un produit mais celle du groupement chromophore qu'il contient. Les composés phénoliques présentent tous un groupement phénol qui présente un maximum d'absorbance vers 280 nm (Figure 18).

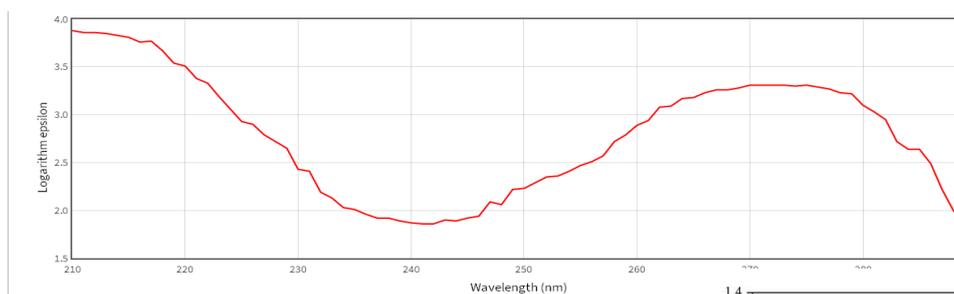


Figure 18 : Spectre UV-VIS d'un phénol

Toutefois, certains composés phénoliques possèdent un maximum d'absorbance à une longueur d'onde plus élevée, comme l'AF, qui possède un maximum d'absorbance à 324 nm (Figure 19).

La longueur d'onde choisie permet donc une sélectivité de détection vis-à-vis des différents composés phénoliques (Figure 20).

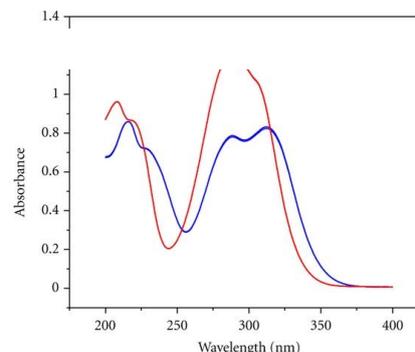


Figure 19 : Spectres UV de l'acide férulique et de l'acide coumarique

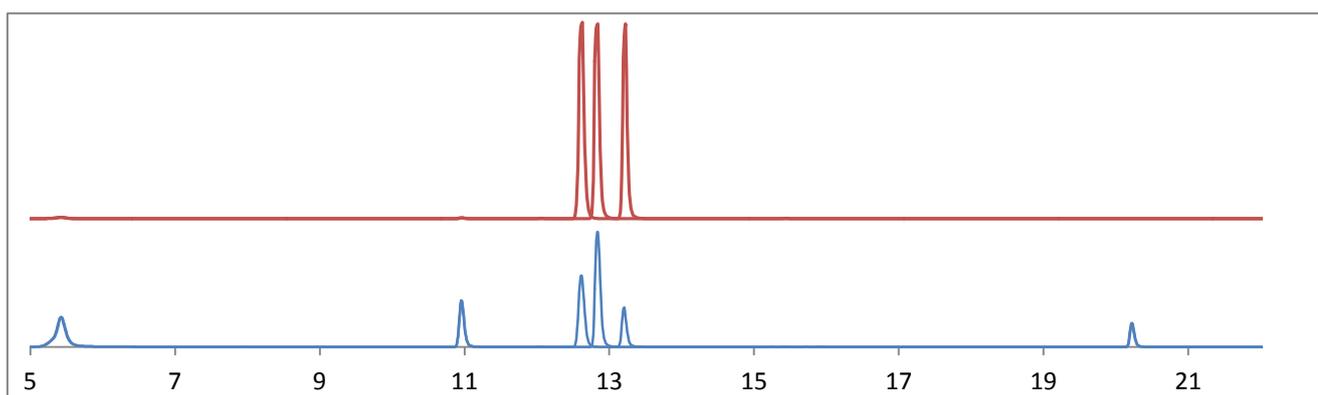


Figure 20 : Effet du choix de la longueur d'onde à 280 nm et 320 nm sur les étalons (dans l'ordre d'élution : Acides gallique, vanillique, férulique, coumarique, sinapique et hénylrésorcinol) de 5 à 21min

Vu la plus grande abondance de composés phénoliques répondant à 280 nm dans les extraits et par souci de simplification, les analyses ci-dessous seront systématiquement présentées à 280 nm.

Les deux longueurs d'onde ont néanmoins été prises en compte tout au long du projet. Un pic à un temps de rétention de 38 min correspondant à un artefact a été éliminé en fin de run.

2. Choix des conditions de références

Les premières extractions ont été effectuées dans différentes conditions (composants, pourcentages, températures, de temps et d'agitation), sur l'AL et sur le son *Soisson* avec la *méthode A*. Ces différentes conditions, résumées dans le tableau ci-dessous ([Tableau 4](#)), sont basées sur la littérature [62], [63]. Le choix de certains solvants (*e.g.* 12) devant permettre d'extraire plus efficacement certains composés plus hydrophobes tels que les alkylrésorcinsols.

Tableau 4 : Conditions utilisées pour le choix des solvants de référence, ¹: d'après Wang *et al.* 2008 ; ²: d'après Abozed *et al.* 2014

Solvants utilisés	Pourcentage	Température	Temps, agitation
(1) Éthanol/eau	70:30	75°C	25 min agitation orbitalaire
(2) Éthanol/eau	60:40	75°C	25 min agitation orbitalaire
(3) Éthanol/eau ¹	60:40	60°C	25 min agitation orbitalaire
(4) Acétone/eau ²	50:50	25°C	15 h agitation orbitalaire
(5) Éthanol/eau	50:50	25°C	25 min agitation orbitalaire
(6) Acétone/eau	50:50	75°C	25 min agitation orbitalaire
(7) Éthanol/eau ²	70:30	25°C	15h agitation barreau
(8) Éthanol/eau	70:30	25°C	15h agitation orbitalaire
(9) Éthanol/eau	70:30	25°C	25 min agitation orbitalaire
(10) Méthanol/eau	70:30	75°C	25 min agitation orbitalaire
(11) Acétone	100	75°C	25 min agitation orbitalaire
(12) n-propanol/eau	70:30	75°C	25 min agitation orbitalaire

La comparaison entre les expériences (2) et (3), n'a pas indiqué de différence significative entre les spectres obtenus (mêmes intensités et succession de pics)([Annexe 5](#)). La comparaison entre les expériences (1) et (2), (5) et (9), (6) et (11), (1) (10) et (12) ou (4) et (8) n'a pas montré une influence du pourcentage de solvant utilisé ([Annexe 6](#)). De même les expériences (1) et (2) n'ont pas montré d'influence du ratio d'éthanol utilisé. Les agitations entre modalité avec barreau magnétique (400 rpm, 15h) ou agitation orbitalaire (400 rpm, 15h) ont montré des spectres ([Annexe 7](#)) avec une légère augmentation des concentrations (pour l'AF) sous agitation avec barreau.

Ainsi trois solvants ont été sélectionnés, et repassés en HPLC avec la *méthode B*: acétone/eau (50:50 v/v), n-propanol/ eau (70:30 v/v) et éthanol/eau (60:40 v/v). Comme attendu, l'utilisation de différents solvants avec différentes polarités permet d'extraire les composés avec différents rendements ([Annexe 8](#)).

Les trois solvants sélectionnés ont ensuite été testés sur un temps d'extraction de 25 min à deux températures : 25°C et 40°C. Au vu des résultats, la température de 40°C a été introduite car elle permet d'abaisser la viscosité des DES ce qui favorise leur manipulation. Afin de déterminer l'influence réelle de l'agitation, ces trois solvants ont utilisés sur AL et SBB (2 min) en présence de barreaux magnétiques ou sous agitation orbitalaire ([Annexes 9 à 14](#)).

Les extractions avec les DES seront réalisées en présence de barreaux magnétiques, pendant 25 min à 40°C, et comparées à celles effectuées avec les solvants organiques dans les mêmes conditions.

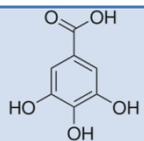
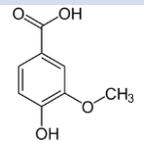
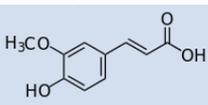
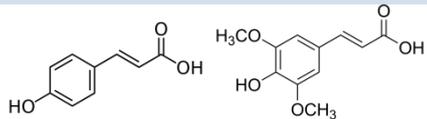
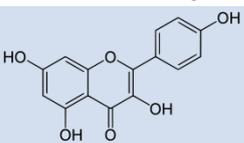
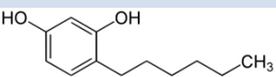
C. Caractérisation des extraits

1. Identification des composés

Il existe une grande variabilité dans les quantifications des phytonutriments des sons de blé reportées dans la littérature. Cette variabilité s'explique par des paramètres biologiques (variété, origine, stade, état physiologique) ainsi que des paramètres liés aux conditions d'extraction (solvant utilisé, température, condition d'extraction etc.).

Pour identifier les composés présents dans les extraits, en complément des analyses HPLC, des analyses de spectrométrie de masse (cf *partie matériel et méthodes*), ont été nécessaires. Les composés supposés présents dans le blé, ont ainsi pu être identifiés (Tableau 5 et Figure 21).

Tableau 5 : identification des composés phénoliques, Tr= temps de rétention

Tr standards seul en HPLC (min)	Tr des composés dans l'extrait en HPLC (min)	m/z (Da)	Nom du (des) composé(s)	Structure
3.5	3.5	170.12	Acide gallique	
11.3	11.4	168.14	Acide vanillique	
13.1	12.7	194.18	Acide férulique	
13.6/13.8	13.2	164.16/ 224.21	Acide coumarique/sinapique	
18.3	18.4	286.24	Kampférol	
20.5	20.4	194.27	Héxylrésorcinol	

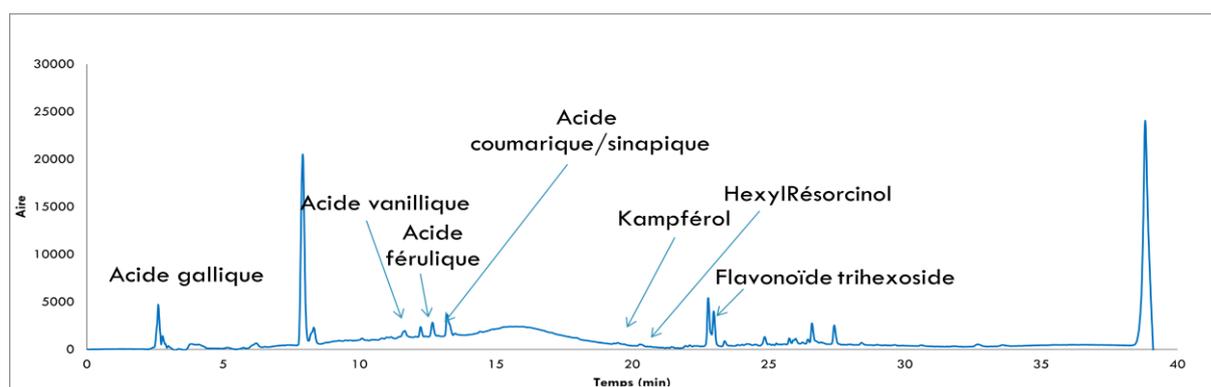


Figure 21 : Identification des composés sur un spectre HPLC (Extrait sur aleurone : Éthanol/eau 60 :40 v/v), 40°C, 25 min)

L'analyse de masse n'a pas permis de déterminer la nature du composé qui sort au temps de rétention de 7.94 min. Il pourrait s'agir de composés de la famille des flavonoïdes, ou encore de composés estérifiés (liée aux composants de la paroi cellulaire (cellulose, lignine et protéines) (Figure 9). Des analyses complémentaires par fractionnement MS2 seront entreprises pour avancer dans l'identification. Plusieurs hypothèses peuvent néanmoins être émises au vu des différentes masses obtenues, il pourrait s'agir d'un flavonoïde (Naringenin) pour $m/z=203.08$ Da du 7-desoxyganate/heptamethoxyflavone/8-p-coumaroyl-3,4-dihydro-5,7-dihydroxy-4-phenylcoumarin pour le $m/z=341.11$ Da, et pour $m/z=549.17$ Da il pourrait s'agir d'une quercetine glycosylée et pour le $m/z=711.22$ Da il pourrait s'agir de phosphatidylsérine (Annexe 15).

2. Teneurs des différents extraits organiques

a. Teneur maximale de référence

Les acides phénoliques présents dans le blé sont principalement retrouvés sous formes liée à des sucres, acides gras ou des protéines. Plusieurs méthodes d'hydrolyse ont été décrites pour quantifier les composés phénoliques totaux. La méthode utilisée dans ce rapport est basée sur les travaux de Nardini *et al.* [64]. Afin d'éviter la dégradation des composés phénoliques pendant l'hydrolyse, des essais en présence d'EDTA (acide ethylenediaminetetraacétique) et d'acide ascorbique ont été réalisés. Néanmoins, les résultats obtenus ne montrent pas de différence de l'influence de ces deux composés (Tableau 6). Les quantités sont exprimées en masse fraîche.

Les analyses HPLC et MS révèlent la présence d'un pic majoritaire correspondant à un $m/z=194$ Da correspondant à l'AF.

Tableau 6 : Résultats d'hydrolyse et quantité d'AF déterminée dans les hydrolysats, avec AF= acide férulique AL= aleurone

Nom échantillon		Quantité d'AF (g/100g)	
AL	NaOH	0,51	± 0,04
	NaOH + EDTA/VIT C	0,50	± 0,01
Son	NaOH	0,30	± 0,02
	NaOH + EDTA/VIT C	0,33	± 0,01

L'aleurone présente une plus grande quantité d'AF totale (monomère, dimère, trimère) que le son, ce qui est en accord avec la littérature. Anson *et al.* présentent également des teneurs en AF totales de 0.68 g/100 dans l'aleurone et 0.57 g/100 g dans les sons [48]. Également en accord avec ces résultats, des revues plus larges présentent des gammes de valeurs en AF monomère de 0.66-0.82 g/100 g dans l'aleurone et de 0.5-0.7 g/100 g dans les sons [65]. D'après Moore *et al.* [53] la quantité totale d'AF dans le blé est de 0.45-0.62 g/100g, et s'élève jusqu'à 1.34g/100 g d'après Zhao *et al.* [66]. Les résultats obtenus sont en accord la littérature et pourront être considérés comme les concentrations maximales extractibles.

b. Différentes teneurs en composés phénoliques

Les composés qui ont pu être identifiés précédemment (acides vanillique, coumarique, sinapique et l'héxylrésorcinol) ont également été quantifiés. L'acide gallique ayant un temps de rétention inférieur à 5 min, sa quantification est difficile à réaliser puisqu'il est élué avec le solvant en début de run. Quant à l'héxylrésorcinol, il n'est pas toujours extrait en quantité suffisante pour être détecté notamment pour les extraits aleurone.

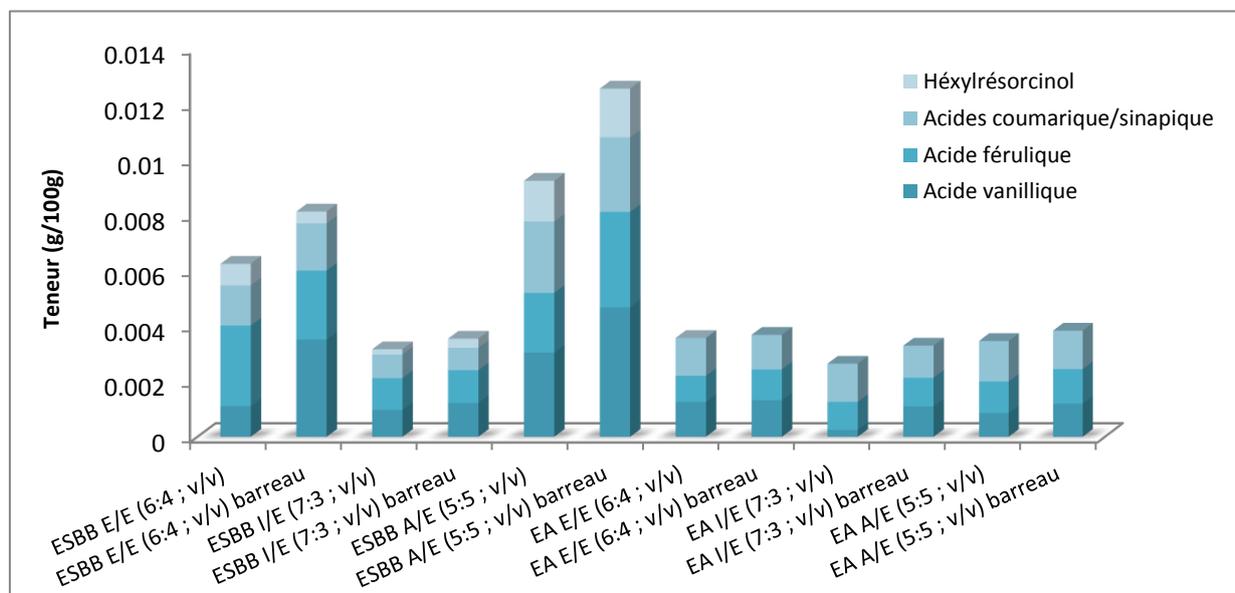


Figure 22 : Histogramme représentant la teneur en composés phénoliques (Héxylrésorcinol, acides coumarique/sinapique, acide férulique et acide vanillique) dans différents extraits organiques de son broyé Bermude (2min) ESBB ou d'aleurone (EA) en mode agitation orbitale ou avec barreau

Les résultats montrent que la matrice joue également un rôle puisque le SBB est plus riche en composés phénoliques extractibles que l'aleurone. Effectivement, les quantités obtenues sur le SBB sont deux fois plus abondantes pour l'extrait éthanolique et trois fois plus abondantes pour l'extrait à l'acétone. Les extraits acétone/eau permettent une meilleure extraction que les deux autres solvants. En effet, la quantité de composés phénoliques atteint jusqu'à 0.013 g/100g pour le SBB, contre 0.009 g/100g et 0.004g/100g pour respectivement l'éthanol/eau et l'isopropanol/eau. Encore une fois, la présence d'un barreau semble améliorer l'extraction des composés phénoliques par rapport à une simple agitation orbitale (Figure 22).

Quantités d'AF obtenues montrent un faible potentiel extractible (0.23 à 0.69 % obtenus par rapport aux maximums extractibles déterminés par la méthode d'hydrolyse) (Tableau 7). En effet, les quantités extractibles reflètent la quantité d'AF libre dans la matrice et non aux fractions liées (estérifiées), qui est en plus grande quantité dans l'aleurone que dans le son. D'après Anson *et al.* [48], la quantité d'AF libre extractible représente 0.24 % dans l'aleurone et 0.34 % dans les sons. Les quantités obtenues sont en accord, voire supérieures avec celle de la littérature (0.38% maximum pour l'aleurone et 0.69% pour le son).

Tableau 7 : Quantité d'acide férulique extrait et pourcentage extractible associé

	Quantité (g/100g)	Pourcentage extractible (%)
ESBB E/E (6:4 v/v)	0.0029	0.58
ESBB E/E (6:4 v/v) barreau	0.0025	0.50
ESBB I/E (7:3 v/v)	0.0012	0.23
ESBB I/E (7:3 v/v) barreau	0.0012	0.24
ESBB A/E (5:5 v/v)	0.0022	0.43
ESBB A/E (5:5 v/v) barreau	0.0034	0.69
EA E/E (6:4 v/v)	0.0009	0.29
EA E/E (6:4 v/v) barreau	0.0011	0.34
EA I/E (7:3 v/v)	0.0010	0.31
EA I/E (7:3 v/v) barreau	0.0010	0.31
EA A/E (5:5 v/v)	0.0011	0.35
EA A/E (5:5 v/v) barreau	0.0013	0.38
Quantité maximale extractible Son	0.5000	100
Quantité maximale extractible Aleurone	0.3300	100

D'après Rosa *et al.* [67], la couche aleurone serait plus riche en acides coumarique et sinapique, or les résultats obtenus ne sont pas en accord avec ceux-ci. En effet le SBB est plus riche en composés phénoliques que l'aleurone, sauf les valeurs pour l'extrait I : E qui sont similaires pour les extraits SBB vs AL.

Potentiellement, les composés phénoliques sont susceptibles d'être oxydés au cours du stockage de l'aleurone. De plus, la surface spécifique des sons est plus importante (contribution petites particules centrées autour de 20 μm) ce qui peut favoriser l'extraction des composés phénoliques.

3. Caractérisation des extraits DES

a. Profils chromatographiques

Les sept DES ont été utilisés sur aleurone et sur SBB 2 min dans les mêmes conditions que celles sélectionnées pour les extractions en conditions organiques (cf *partie matériel et méthode*).

Les résultats obtenus montrent des profils très variables. En effet les DES 1, 2 et 2b semblent avoir le même profil que les solvants organiques. Au contraire, les autres DES semblent extraire d'autres composés supplémentaires. Les DES 3 et 3b permettent en effet d'extraire un grand nombre de composés (pics plus nombreux et plus divers) (Figure 23 et 24 et Annexe 17). En effet, ils permettent l'extraction de flavonoïdes, de quinones, de résorcinols et de molécules de petits poids moléculaires etc. (Annexe 15).

Les résultats sont similaires pour les extractions réalisées sur son et sur aleurone, seuls les flavonoïdes trihexosides semblent être plus présent dans l'aleurone sauf pour le DES 4b (Figure 23). Pour ce qui est des composés aux temps de rétention compris entre 25 et 30min, ils semblent être mieux extraits sur aleurone pour les DES 1, 2, 2b 3 et 3b contrairement aux DES 4b et 5b qui ont permis une meilleure extraction de ces composés sur SBB (Figure 24). Pour les DES 1 15h et 3b aucune différence n'est observée.

Pour ce qui est du temps d'extraction, lorsque le contact entre la matière est plus long (15h) le rendement d'extraction semble être amélioré contrairement à ce qui était obtenu dans les conditions organiques (Annexe 16).

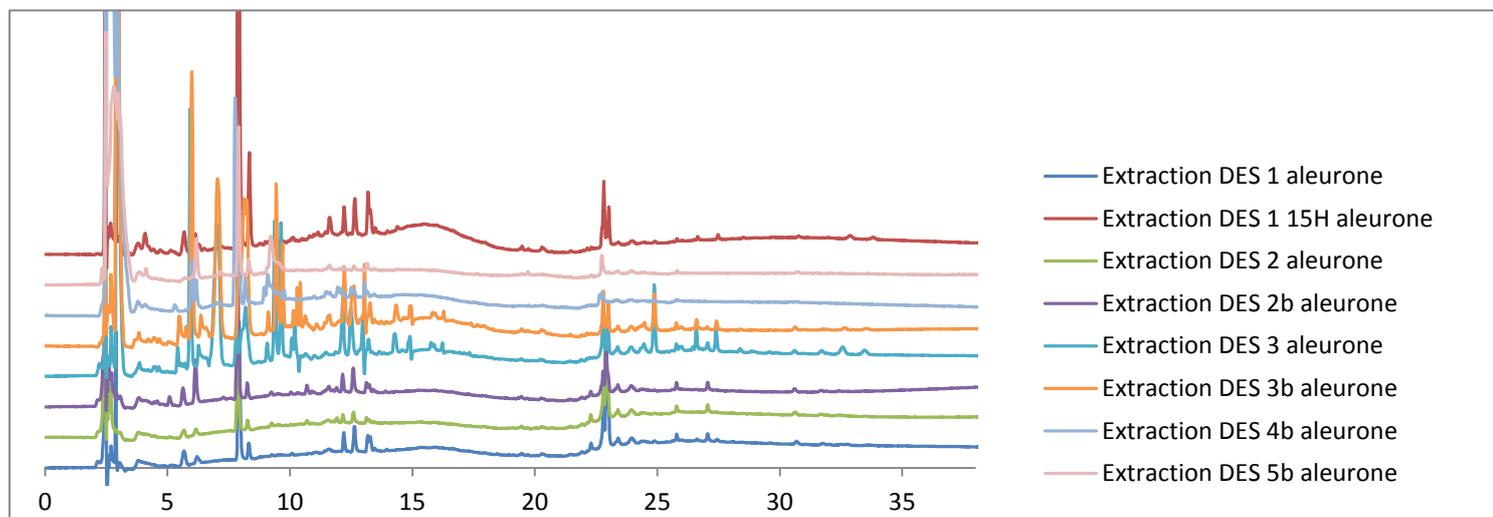


Figure 23 : Profils chromatographiques et extractions réalisées avec les DES sur SBB (2min) ($\lambda = 280\text{nm}$)

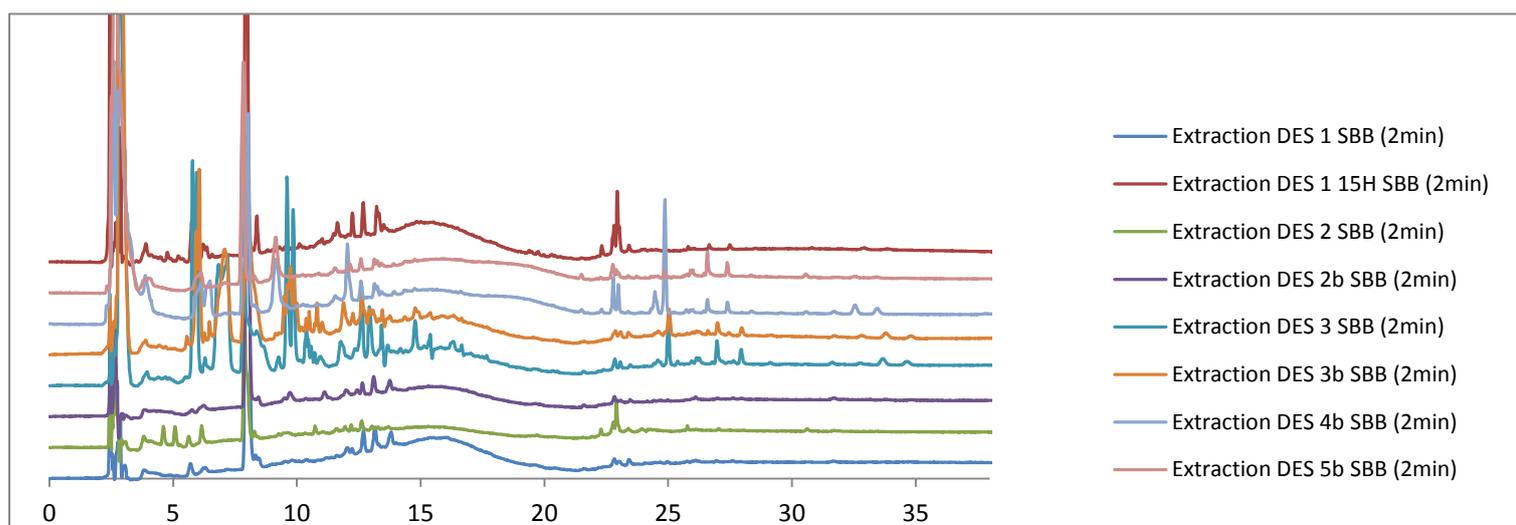


Figure 24 : Profils chromatographiques et extractions réalisées avec les DES sur aleurone ($\lambda = 280\text{ nm}$)

b Teneur en acide férulique dans les extraits DES

L'AF est un composé phénolique est plus biodisponible que les flavonoïdes et composés monophénoliques [68]. Nous avons choisi de doser ce composé pour sa large gamme de propriétés intéressantes: anti-inflammatoire, antidiabétique, neuroprotecteur etc. De plus il s'agit du composé supposé contribuer le plus à l'activité anti-oxydante du blé.

Les DES 3 et 3b permettent une meilleure extraction de l'AF (Figure 25). Selon les DES utilisés, on retrouve plus d'AF dans l'aleurone (DES 1 15h, DES 2b, DES 3 et DES 3b) que dans les sons. Malgré les profils similaires pour les DES 1 et 1 15h, on remarque que pour l'aleurone plus le temps d'extraction est long et plus la quantité d'AF est importante (0.005 g/100g vs 0.017 g/100g)

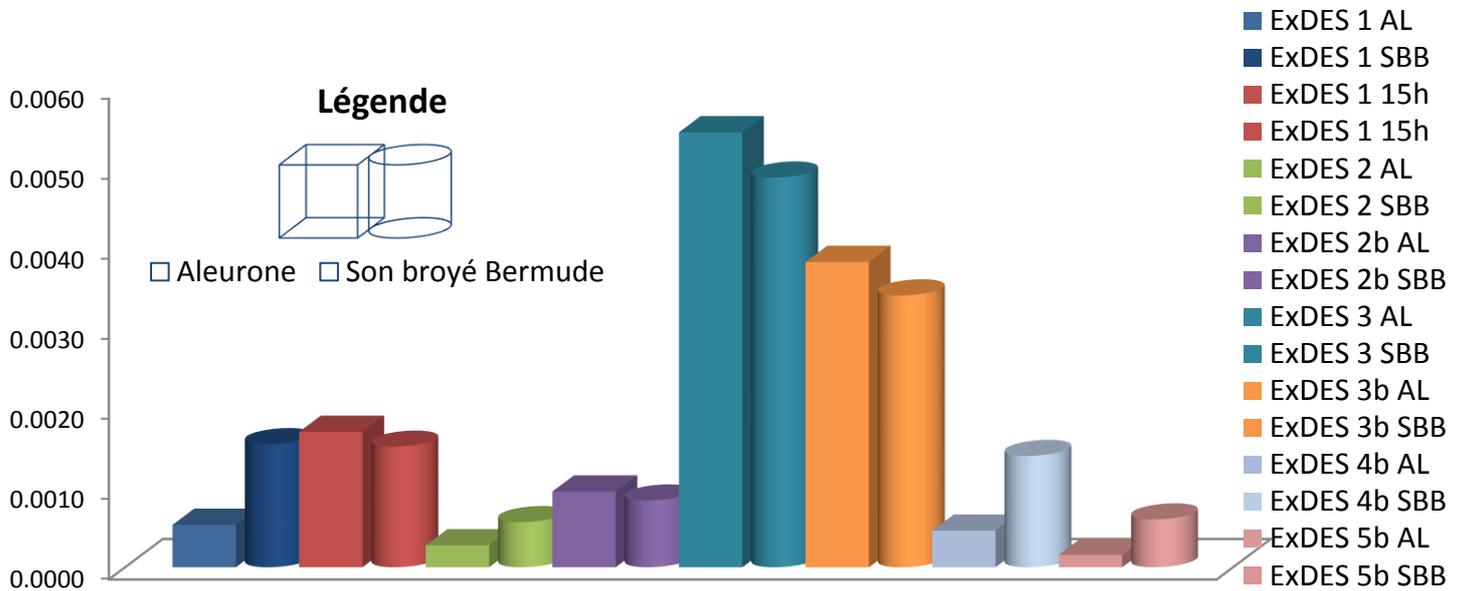


Figure 25 : Comparaison de teneur en AF obtenu avec les DES sur aleurone et SBB

4. Influence du broyage

Deux autres temps de broyage ont été réalisés afin de tester l'efficacité sur les rendements d'extraction (2 min, 5 min et 10 min). En effet des particules de plus petites tailles devraient augmenter la surface de contact et permettre une meilleure accessibilité.

Les résultats obtenus permettent de conclure que la durée du broyage augmente les rendements d'extraction de certains composés. Cette efficacité est d'autant plus importante pour les composés plus apolaires (vers $T_r=20\text{min}$) qui semblent être mieux extraits avec un temps de broyage plus long. En effet, ceux-ci semblent être mieux extraits lorsque les particules sont broyées plus longtemps (10 min > 5 min > 2 min) (Annexe 18 à 22).

Toutefois pour les composés phénoliques, ils semblent être mieux extraits pour un temps de broyage de 5 min (sauf pour les extraits obtenus avec le DES 3).

D. Microscopie

Les différentes structures ont été observées à l'aide d'un microscope optique. L'objectif de cette partie est d'étudier l'effet des DES sur les structures. Pour cela différentes photos ont été prises à différents temps (25 min et 15h) de mise en contact entre la matière première et le DES. Les sept DES ont été testés sur aleurone ainsi que sur le SBB 2min.

On remarque que pour tous les DES utilisés, les structures des tissus ne semblent pas être modifiées de la même manière par le solvant. En effet on discerne encore les parois des cellules après 15h passées en contact avec le solvant mais une observation plus fine permet de discerner une

décoloration au centre des cellules, au niveau du corps protéique pour les DES 2, 3, 3b et 4b. (Annexes 23 et 24). Au vu des profils obtenus pour le DES 3 et DES 3b, on pouvait suspecter que les structures étaient plus endommagées que pour les autres DES favorisant ainsi l'extraction de composés.

E. Analyse DPPH

Le test DPPH est basé sur l'activité antioxydante d'un DLH qui va permettre la réduction du DPPH. Ce test a été appliqué pour caractériser l'activité antioxydante de nos extraits.

En effet, le DPPH dans sa forme oxydée possède un électron libre sur un de ses azotes qui pourra se délocaliser, et ainsi empêcher la molécule de former des dimères. Un antioxydant sera capable de donner un électron singulet au radical synthétique

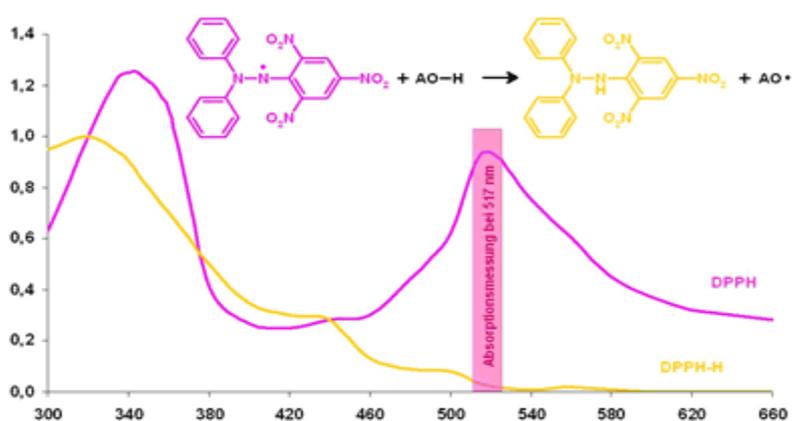


Figure 26 : Réduction du DPPH en fonction de la longueur d'onde

DPPH. La molécule de DPPH va se transformer en DPPH-H. Le DPPH va ainsi changer de couleur en se réduisant et va passer du violet au jaune (Figure 26). L'activité antioxydante des composés est donc proportionnelle à l'absorbance. Ce test, réalisé au maximum d'absorbance du DPPH à 517 nm, suit donc la décroissance d'absorption. Le DPPH a été l'un des premiers radicaux libres à être utilisé pour les mesures d'activité antioxydante des composés phénoliques.

La mesure effectuée est comparée à celle de l'antioxydant de référence : le Trolox. Dans un premier temps les mesures ont été effectuées sur le SBB (2min) puis sur l'AL.

Tous les extraits organiques (éthanol/eau ; acétone/eau ; isopropanol/eau) de référence ont une absorbance nette supérieure à celle du Trolox à 1.1 μ M. L'extrait obtenu par éthanol/eau (60:40 v/v) permet une meilleure activité antioxydante que le Trolox à 1.1 μ M (Figure 27).

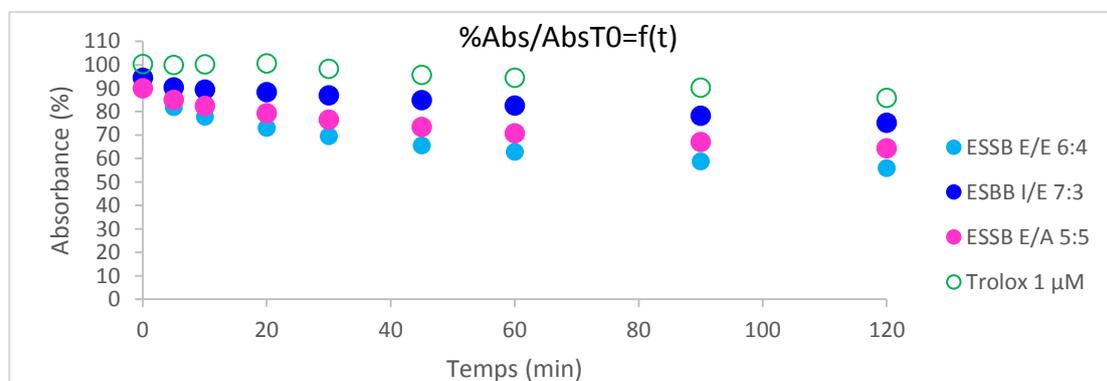


Figure 27 : Comparaison de l'absorbance entre les 3 extraits organiques de référence sur SBB et le Trolox 1.1 μ m

Il est à remarquer que certains DES utilisés seuls ($C_{\text{contrôleDES3}}=CD3$, $C_{\text{contrôleDES4b}}=CD4b$ et $C_{\text{contrôleDES5b}}=CD5b$), présente une meilleure activité que le Trolox (1.1 μM). Toutefois l'extrait éthanolique éthanol/eau (60:40 v/v) présente une meilleure efficacité (Figure 28).

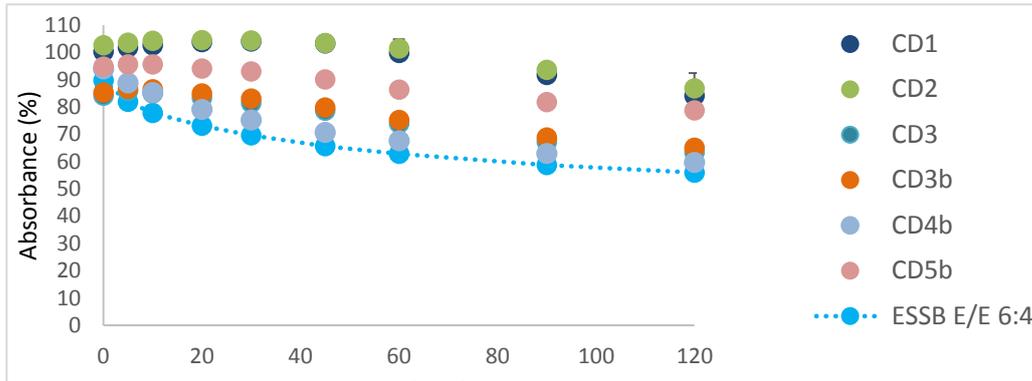


Figure 28 : Absorbance des DES seuls en comparaison avec l'extrait éthanolique sur SBB

Lorsque les extraits sont présents dans les DES on obtient les mêmes profils, mais avec une amplification de l'activité réductrice pour la majorité des DES. Seul le DES 4 échappe à cette amplification : il n'y a pas de différence entre l'extrait obtenu avec le DES4b et le CD4b (Figure 29).

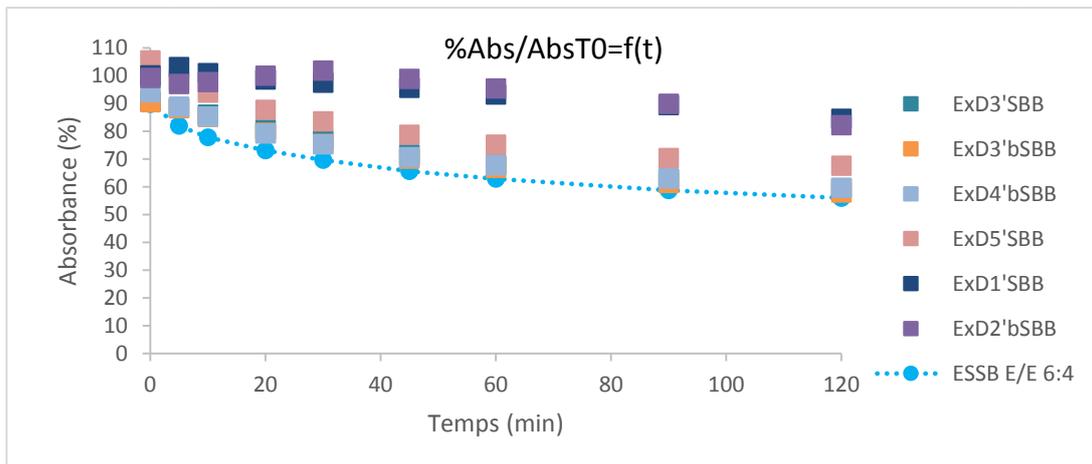


Figure 29 : Absorbance des extraits DES en comparaison avec l'extrait éthanolique sur SBB

Pour ce qui est de la dose, différents dépôts ont été effectués afin de comparer les extraits DES entre eux. Ainsi, on remarque que pour les DES 3, 3b, 4b et 5b plus la dose augmente, meilleure est l'activité. A l'inverse, pour les DES1 et DES 2 ou aucun dose n'est visible (Exemple sur DES 4b Figure 30).

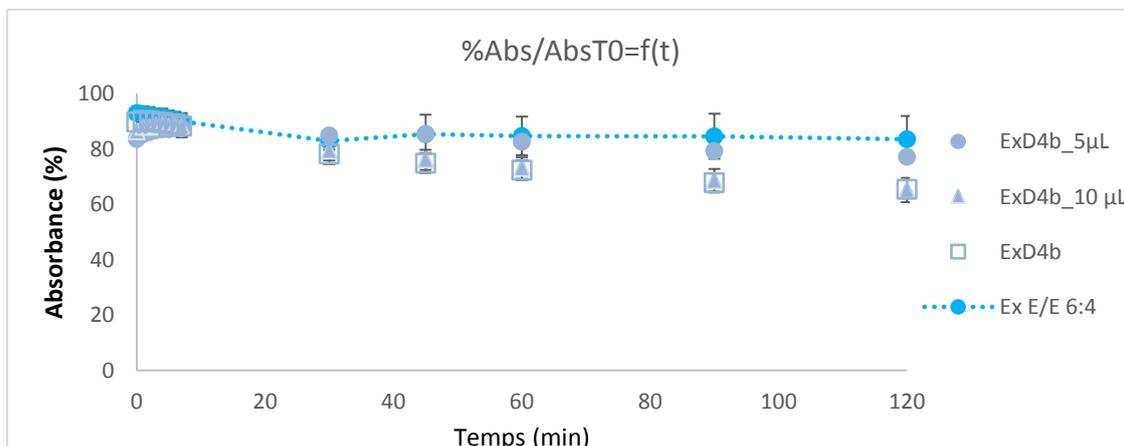


Figure 30 : Absorbance des DES à différentes doses en comparaison avec l'extrait éthanolique sur SBB

F. Caractérisation aux interfaces

Au vue des premiers résultats, les deux DES (1 et 3) les plus prometteurs ont été testés en termes de comportement aux interfaces. Ces caractérisations ont été conduites en milieux aqueux dilués puisque ces expériences biophysiques nécessitent des interfaces liquide/air. Plusieurs réactions ont été donc effectuées en mettant les DES 1 et DES 3 (0.5% à 5%), en présence ou non d'AF (0.5 mg/mL) en milieu aqueux tamponné (pH 7, tampon TRIS ou phosphate). L'évolution du milieu réactionnel est suivie au cours du temps par ellipsométrie.

1. Indice de réfraction

Les valeurs des angles ellipsométriques sont reliées à l'indice de réfraction du milieu étudié (le laser est réfracté différemment selon l'indice du milieu ([Figure 12](#))). Les différentes conditions utilisées sont résumées dans le tableau ci-dessous ([Tableau 8](#)) :

Tableau 8 : Conditions utilisées pour les mesures de caractérisation aux interfaces, avec σ = écart type

Tampon	Mélange		Nombre de mesures	Indice de réfraction	σ
	Solution				
	Nom	%			
Phosphate	-		2	1.3346	0
	DES 1	0.5	2	1.3350	0
	-		3	1.3345	0.002
	DES 1	0.5	3	1.3352	0.001
TRIS		5	5	1.3415	0.007
		0.05	4	1.3347	0.001
	DES 3	0.5	5	1.3352	0.002
		5	2	1.3401	0.002
	ChCl	0.06	2	1.3348	0
	Acide Lactique	0.40	2	1.3352	0.002

Lorsque le pourcentage de DES mis en mélange augmente, l'indice de réfraction augmente légèrement. Cette même augmentation est observée lorsque les constituants du DES 3 sont utilisés séparément. En cas d'utilisation séparée, l'augmentation est pondérée par leur teneur dans le DES 3 (résultat à confirmer pour le DES 1).

2. Comparaison entre DES 1 et DES 3 à une interface liquide/air

Quand les DES 1 et 3 sont mis dans la phase aqueuse, ils entraînent très rapidement une augmentation de l'angle ellipsométrique ([Annexe 25](#)). Cette augmentation se fait sur 4 heures environ pour le DES 1 qui atteint un angle de 2° à l'équilibre. L'augmentation d'angle est beaucoup plus rapide pour le DES 3 : après 30 min, l'angle du DES 3 passe de 0° à 1.5° ; des valeurs proches de l'équilibre à 2.6° sont atteintes en 2 heures environ.

Cette augmentation d'angle ellipsométrique traduit la montée des DES proches de l'interface. Cette montée s'accompagne également d'une augmentation de la pression de surface dans les minutes qui suivent l'addition des DES. La pression d'équilibre atteinte par les DES 1 est de 3.6 mN/m avec les DES 1 et de 20.8 mN/m avec le DES 3. Cette tension de surface indique que les

DES s'adsorbe à l'interface et modifie la cohésion des molécules à cette interface. Des pressions similaires peuvent être trouvées quand des protéines s'adsorbent à l'interface.

Un agent tensio-actif ou agent de surface, sont des molécules amphiphiles (comme les lipides) qui modifient la tension entre deux surfaces. Lorsqu'une molécule tensio-active arrive à la surface, elle diminue la tension superficielle et augmente la pression de surface. Le DES 3 présente donc une tensio-activité plus marquée que le DES 1. L'augmentation de pression forte (20.8 mN/m) pour une augmentation d'angle ellipsométrique faible (2.6°C) indique qu'une faible épaisseur de molécules à l'interface modifie fortement la cohésion des molécules à l'interface liquide/air.

3. Effet de la concentration du DES à l'interface air/liquide

Le DES 1 a été étudié à deux concentrations (0.5% et 5%). On remarque que lorsque le DES 1 est utilisé à plus faible concentration, le signal correspondant à l'angle ellipsométrique est bruité. L'augmentation de pression associée est moindre.

Un comportement très similaire est observé pour les DES 3 qui quant à lui a été étudié à trois concentrations différentes (0.05%, 0.5% et 5%) (Annexe 26). On distingue très nettement un effet de la quantité non seulement sur les augmentations d'angle ellipsométrique et de pression mais également sur l'allure de la courbe représentant l'évolution de l'angle ellipsométrique. Le début de courbe est lisse (t=0 jusqu'à t=120min) puis se bruite (film discontinu en surface). De même que pour le DES 1, l'amplitude du bruitage diminue lorsque la concentration augmente : à 0.05% l'amplitude du bruit est d'environ 7°, de 4° pour 0.5% et de 3° pour 5%.

Ces résultats semblent indiquer une organisation très discontinue du DES à faible concentration qui se condensent et s'organisent de façon beaucoup plus homogène en épaisseur à 5%.

Les composés du DES 3 ont été testés dissociés afin d'étudier leur comportement aux interfaces et contribution relative au comportement de l'association. Les expériences ont donc été réalisées en présence de ChCl dans du tampon TRIS et en présence d'acide lactique dans du tampon TRIS (utilisés aux pourcentages respectifs du DES 3 à 0.5%). L'acide lactique semble être le plus gros contributeur au comportement tensioactif du DES 3 avec quand utilisé à 0.4 % une augmentation de l'angle delta à 2.1° et une augmentation de la pression à 12 mN/m.

4. Comportement des DES sous un film de Langmuir (DOPC/DPPC 50 :50)

Des films de Langmuir lipidiques (DOPC/DPPC 50:50) ont été formés à deux pressions (18 mN/m et 30 mN/m). Sous ces films, les DES 1 et 3 ont été injectés seuls ou en présence d'AF. Les évolutions de l'angle ellipsométrique et de la tension de surface suite à l'injection en sous-phase étaient suivies. Pour la plus basse pression de la monocouche (18 mN/m), l'injection des DES a entraîné une augmentation bruitée de l'angle ellipsométrique, ce qui traduit une arrivée de matière à l'interface (Annexe 27). L'aspect bruité de l'angle traduit des différences d'épaisseur à l'interface qui peuvent être expliquées par une hétérogénéité de la surface une fois que le DES est adsorbé. Pour la plus haute pression de la monocouche (30 mN/m), on observe encore une fois ce comportement bruité et l'augmentation de l'angle est vraiment décalée au-delà de 2 heures après

une première phase de chute de l'angle et de la pression. A plus forte pression, le DOPC/DPPC forme un film plus cohésif limitant l'arrivée de matière à l'interface contrairement aux lipides à plus faible pression ([Annexe 27](#)).

Pour ce qui est de l'AF, celui-ci entraîne une augmentation plus rapide de l'angle ellipsométrique (dès $t=120$ min) versus ($t=200$ min) lorsque le DES est utilisé seul dans le tampon. Malgré cette constatation, les résultats ne permettent pour l'instant de conclure sur la réelle influence de l'AF. Des expériences complémentaires seront réalisées pour mieux comprendre son influence.

5. Cuve à compression

Différents prélèvements ont été effectuée à des pressions différentes afin d'étudier les différentes phases. Ces prélèvements ont été placés au dessiccateur et seront analysés prochainement par microscopie (AFM).

Conclusion

Dans ce travail, différentes conditions ont été testées afin d'extraire au mieux des composés polaires à partir de blé (tests réalisés sur son *Soisson* et aleurone *Bulher (AL)*, avec *méthode A*). À l'issue de ces tests, trois solvants organiques ont retenus comme solvants de référence : acétone/eau (50:50 v/v), n-propanol/eau (70:30 v/v) et éthanol/eau (60:40 v/v). Sept solvants innovants ont été testés afin d'extraire ces mêmes composés dans les mêmes conditions que les solvants organiques.

Diverses analyses ont été réalisées afin de caractériser ces extraits et cinq différents composés phénoliques ont pu être identifiés et quantifiés dans les extraits obtenus à partir de deux matrices. Les deux matrices étaient du son (variété *Bermude*) (SBB) et de l'AL. Pour le SBB différents temps de broyages ont été réalisés afin de tester leurs effets sur les rendements d'extractions (2 min, 5 min, 10 min). Il a été démontré que plus on augmentait la surface de contact et plus l'accessibilité aux composés phénoliques était augmentée. Cette efficacité est d'autant plus importante pour les composés plus apolaires (vers $T_r=20$ min) qui semblent être mieux extraits avec un temps de broyage plus long (extraits organiques et DES 1 et 3). Néanmoins, 5 min de broyage semblent être suffisantes pour extraire le maximum de composés phénoliques. Le DES 3 quant à lui extrait de la même manière les composés phénoliques quel que soit le broyage.

Les analyses HPLC et par spectrométrie de masse ont montré un réel intérêt des DES. Ceux-ci sont capables pour certains (DES 1, 2 et 2b), d'extraire les mêmes composés que ceux obtenus en condition « solvants organiques classiques ». D'autres ont permis d'extraire plus de composés (DES 3, 3b, 4b, 5b) en plus des composés phénoliques, probablement en lien avec leur caractère acide.

L'observation des résidus secs après extractions ont permis de caractériser les structures des cellules de sons et d'AL de blé. En accord avec les résultats obtenus par HPLC, les DES 3 et 3b permettant les extractions les plus efficaces, ont été ceux qui affectaient le plus les structures.

Les composés phénoliques présents dans certains extraits, grâce à leurs structures chimiques, peuvent former un radical phénoxy stabilisé par résonance ([Annexe 28](#)). Ce radical est stable de par la délocalisation possible des charges avec l'oxygène mais également sur la molécule entière. Cette stabilité participe à l'activité antioxydante d'autant plus que le radical phénoxy est capable d'initier ou de propager une réaction en chaîne [\[69\]](#). Les propriétés de ces différents composés peuvent être corrélées à leur capacité antioxydante. Ainsi, plus les composés phénoliques sont présents et plus l'activité pourra être grande. Les extraits obtenus par les méthodes d'extraction en présence de solvants organiques montrent une activité anti-oxydante supérieure à celle de l'antioxydant de référence (Trolox 1.1 μM). Pour les extraits DES, les DES 3 et 3b montrent une plus grande activité que les autres DES. De plus, les analyses des interactions de surface montrent que le DES 3 s'adsorbe fortement au niveau de l'interface liquide/air. De plus, sa cinétique d'adsorption est plus rapide que celle du DES 1. L'ensemble de ces éléments, test activité antioxydante et forte capacité d'adsorption à une interface laisse supposer que le DES 3 est plus bioactif que le DES 1.

Dans la continuité de ce stage, d'autres coproduits vont être analysés (enveloppes de riz noir et rouge). Des extractions vont être réalisées en présence de certaines hydrolases (xylanases, phospholipase et estérases). En ce qui concerne les propriétés tensioactives, les DES seront mis en

mélange dans des « films de Langmuir » basés sur des mélanges de lipides polaires imitant les membranes cellulaires. Des images AFM permettront de caractériser l'aspect de ces structures.

Plus largement en année 2 de l'ANS, les extraits seront lipophilisés par estérification avec des alcools gras de longueur de chaîne croissante. On obtiendra ainsi par fonctionnalisation *in situ* des molécules antioxydantes lipophilisées, connues sous le terme de « phénolipides », qui présentent des activités deux à cinq fois plus puissantes que les molécules de départ.

Matériel et méthodes

A. Fractionnement

Les différents lots de sons (Sons Soisson et Bermude) ont été broyés avec un broyeur à bille (Pulvérisette broyeur Fritsch). Le son Bermude a été broyé selon différents temps (2,5 et 10 min) afin d'obtenir différentes populations de tailles de particules. Ces particules ont ensuite été analysées avec un granulomètre (Granulomètre laser Malvern, Mastersizer 2000, voie sèche : Scirocco ; voie humide : Hydro-g).

B. Préparation des DES

Les DES ont été préparés en mettant les différents composants en mélange à 60°C sous agitation orbitale pendant 45 min, à 400rpm. Les DES 4' et 5'sont laissés 24h supplémentaires sous agitation dans les mêmes conditions. Leurs teneurs en eau (Coulomètre Karl Fisher GRS 2000, KF TITRATOR, Bioblock scientific) ainsi que l'activité de l'eau (A_w , Aqualab) ont été déterminées. L'aqualab a été calibré sur des solutions saturées de LiCl ($A_w=0.11$), NaCl ($A_w=0.75$).

C. Extractions avec différents solvants

La matière sèche (20mg d'AL et 100mg de son) sont placés dans des vials puis le solvant est ajouté (0.4 mL pour les extractions réalisées sur l'AL et 2mL pour celles réalisées sur le son). Les vials sont agités pendant différents temps et une certaine température à 400 rpm. Les vials sont ensuite refroidit à température ambiante puis centrifugés 5 min à 4000 rpm. Le liquide surnageant est filtré sur filtres 0.45 μm puis placé sous courant d'azote jusqu'à obtention d'un résidu sec puis stockés à -4°C ainsi que les résidus solides.

Chaque expérience d'extraction est réalisée en triplicat.

D. Méthode d'hydrolyse

Procédure d'hydrolyse : Les composés phénoliques (1.5mg dans 1.5 mL de MeOH/eau, soit 50 mg de son et 20 mg d'AL) sont placés dans des tubes et 1.5 mL de méthanol/eau (2 :1 ; v/v) puis 13.5 mL de soude (NaOH 2N) sont ajoutés. Les tubes sont placés à 30°C sous agitation orbitale pendant 30min. Les blancs sont réalisés dans les mêmes conditions mais de l'eau est ajoutée à la place de la soude. Chaque expérience est réalisée en double avec ajout d'EDTA (10mM) et 1% d'acide ascorbique dans l'une des deux expériences.

Extraction : A la fin de l'incubation, les solutions sont acidifiées jusqu'à pH=3 par ajout d'HCl (4N). 0.5 mL de solution est prélevé et 300 mg de NaCl sont ajoutés afin d'augmenter le partage de phase. Les solutions sont extraites 3 fois à l'acétate d'éthyle (2mL x 3) et placés sous agitation orbitale. Après chaque agitation les tubes sont centrifugés 5 min à 4000 rpm. Les flacons sont placés sous flux d'azote et congelé en attendant d'être passés en HPLC.

Les expériences d'hydrolyse ont été réalisées en duplicat pour chaque condition.

E. Procédure de caractérisation HPLC

Les extraits obtenus par les différentes méthodes sont analysés par HPLC. Pour cela, les échantillons obtenus par les extractions en solvants organiques classiques (et hydrolyses) sont repris dans un mélange MeOH/eau (2/1 ; v/v), pour les échantillons issus du son, ils sont filtrés sur filtres 0.45 μm . Ceux obtenus par extractions avec les DES sont dilués au 5^e dans de l'eau et injectés. Les triplicats sont ensuite passés en HPLC. La chaîne HPLC est équipée d'un détecteur UV à barrettes de diode (PDA) (190-600 nm). La séparation est effectuée sur une colonne de silice greffée C18.

- Colonne : Kinetex Highpurity, Thermo Electron, 5 μm , C18, 100A, Dim (mm) 250 X 4.6
- Appareil: Shimadzu, LC-20AD
- Détecteur : DAD SPO-M20A
- Four : CTO-10AS_{vp} (Shimadzu)
- Phase mobile : A : MeOH (0.1% acide acétique) ; B : Eau (0.1% acide acétique)
- Débit : 1mL/min

Gradient première méthode (méthode A) : 0-2 min : gradient isocratique à 30% de B ; **2-25min** : gradient linéaire jusqu'à 100% de B ; **25-35 min** gradient isocratique à 100% de B ; **35-36 min** gradient linéaire jusqu'à 30% de B ; **36-40 min** : équilibration à 30% de B.

Gradient méthode choisie pour les extractions finales (méthode B) : 0-5 min : gradient isocratique à 10% de B ; **5-20min** : gradient linéaire jusqu'à 100% de B ; **20-30 min** gradient isocratique à 100% de B ; **30-35 min** gradient linéaire jusqu'à 10% de B ; **35-42 min** : équilibration à 10% de B.

F. Procédure analyse masse

Les analyses sont effectuées sur une UPLC Acquity H-Class (Waters), équipée d'une colonne Kinetex C18 100A 100 x 2.1, 2.6 μm (Phenomenex). Le chromatogramme UV est enregistré sur PDA détecteur entre 200 et 400nm. Le spectromètre couplé à la chaîne chromatographique est un Synapt G2-S (Waters) équipé d'une source ESI. Le spectre de masse est enregistré en mode positif, entre 100 et 1500 Da. La tension de capillaire est de 3000 V et la tension de cône de 30 V. Les températures de sources et de désolvatation sont respectivement de 140°C et 450°C. Le rôle de l'analyseur, à temps de vol est d'ensuite séparer les différents analytes en fonction du temps qu'ils mettront à atteindre le détecteur. Cette durée dépend de leur rapport m/z.

Température de la colonne : 25°C ; volume injection : 1 μL ; Débit : 0.5 mL/min ; gradient (Tableau 9)

Tableau 9 : Gradient utilisé avec A: H₂O + 0.1% Formic acid, B: Methanol + 0.1% Formic acid

Temps (min)	% A	% B
0	100	0
5	100	0
6	95	5
9	95	5
11	0	100
12	0	100
12.1	100	0
16	100	0

ajusté à pH=7 par ajout de Na_2HPO_4 (~58mL) puis le volume est ajusté à 500mL avec de l'eau distillée. La solution est ensuite filtrée sur filtre (Corning, 0.22 μm) puis stockée.

I. Microscopie

Le microscope utilisé est un microscope optique. Les photographies prises (20x, luminosité 80 μs) sont obtenues à partir d'un appareil Olympus.

L'observation des structures a été réalisée sur deux matières premières AL et SBB 2min (20mg) mis en présence des différents DES (1mL) pendant 25 min et 15h. Les matières premières céréaliers sont mises dans une plus grande quantité de solvant que pour les extractions afin de mieux disperser les structures et mieux les observer.

Pour chaque matière première un blanc est réalisé en remplaçant le solvant d'extraction par de l'huile de paraffine. Chaque condition est photographiée en 3 exemplaires.

Bibliographie

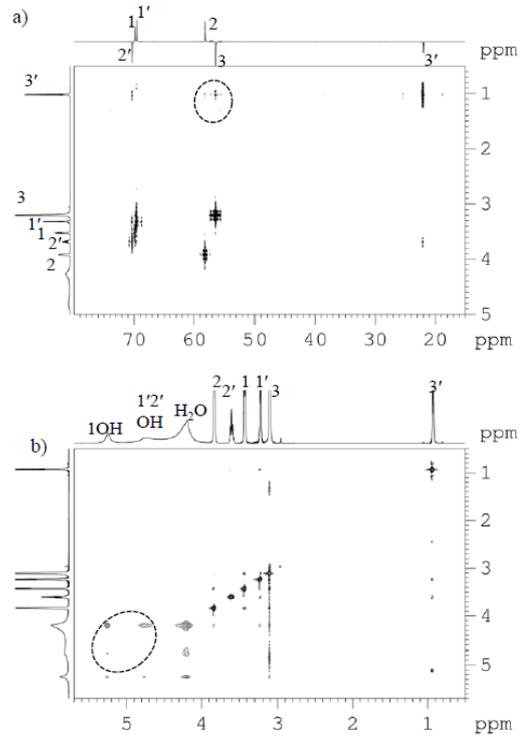
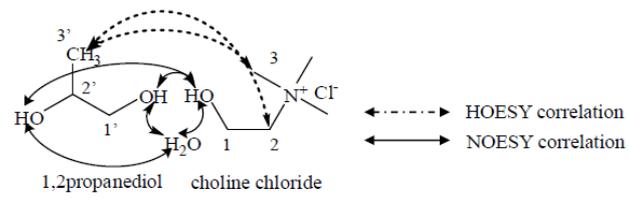
- [1] J. Slavin, D. Jacobs, and L. Marquart, "Whole-grain consumption and chronic disease: protective mechanisms," *Nutr. Cancer*, vol. 27, no. 1, pp. 14–21, 1997.
- [2] J. B. Harborne and J. J. Corner, "Plant polyphenols. 4. Hydroxycinnamic acid-sugar derivatives," *Biochem. J.*, vol. 81, pp. 242–250, Nov. 1961.
- [3] M. F. Andreasen, A.-K. Landbo, L. P. Christensen, A. Hansen, and A. S. Meyer, "Antioxidant Effects of Phenolic Rye (*Secale cereale* L.) Extracts, Monomeric Hydroxycinnamates, and Ferulic Acid Dehydrodimers on Human Low-Density Lipoproteins," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 8, pp. 4090–4096, Aug. 2001.
- [4] M. Cvjetko Bubalo, N. Curko, M. Tomašević, K. Kovacevic Ganic, and I. Radojčić Redovniković, "Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents," *Food Chem.*, vol. 200, pp. 159–166, Jun. 2016.
- [5] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, and V. Tambyrajah, "Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures Electronic supplementary information (ESI) available: spectroscopic data. See <http://www.rsc.org/suppdata/cc/b2/b210714g/>," *Chem. Commun.*, no. 1, pp. 70–71, Dec. 2003.
- [6] A. P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D. L. Davies, and R. K. Rasheed, "Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 29, pp. 9142–9147, Jul. 2004.
- [7] O. Aschenbrenner, S. Supasitmongkol, M. Taylor, and P. Styring, "Measurement of vapour pressures of ionic liquids and other low vapour pressure solvents," *Green Chem.*, vol. 11, no. 8, pp. 1217–1221, Aug. 2009.
- [8] M. Kumar, N. Trivedi, C. R. K. Reddy, and B. Jha, "Toxic Effects of Imidazolium Ionic Liquids on the Green Seaweed *Ulva lactuca*: Oxidative Stress and DNA Damage," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 24, no. 11, pp. 1882–1890, Nov. 2011.
- [9] Y. Dai, J. van Spronsen, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, and Y. H. Choi, "Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology," *Anal. Chim. Acta*, vol. 766, pp. 61–68, Mar. 2013.
- [10] M. Ruesgas-Ramón, M. C. Figueroa-Espinoza, and E. Durand, "Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 18, pp. 3591–3601, May 2017.
- [11] Y. Dai, *Natural deep eutectic solvents and their application in natural product research and development*. S.l.: s.n., 2013.
- [12] E. Mouratoglou, V. Malliou, and D. P. Makris, "Novel Glycerol-Based Natural Eutectic Mixtures and Their Efficiency in the Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Polyphenols from Agri-Food Waste Biomass," *Waste Biomass Valorization*, vol. 7, no. 6, pp. 1377–1387, Dec. 2016.
- [13] M. Jablonský, A. Škulcová, L. Kamenská, M. Vrška, and J. Šíma, "Deep Eutectic Solvents: Fractionation of Wheat Straw," *BioResources*, vol. 10, no. 4, pp. 8039–8047, Oct. 2015.
- [14] N. Weyhing-Zerrer, T. Gundolf, R. Kalb, R. Omer, P. Rossmanith, and P. Mester, "Predictability of ionic liquid toxicity from a SAR study on different systematic levels of pathogenic bacteria," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 139, pp. 394–403, May 2017.
- [15] B. L. Gadilohar and G. S. Shankarling, "Choline based ionic liquids and their applications in organic transformation," *J. Mol. Liq.*, vol. 227, pp. 234–261, Feb. 2017.
- [16] M. Hayyan *et al.*, "Are deep eutectic solvents benign or toxic?," *Chemosphere*, vol. 90, no. 7, pp. 2193–2195, Feb. 2013.
- [17] X. Li and K. H. Row, "Development of deep eutectic solvents applied in extraction and separation: Liquid Chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 39, no. 18, pp. 3505–3520, Sep. 2016.

- [18] Z. Li and P. I. Lee, "Investigation on drug solubility enhancement using deep eutectic solvents and their derivatives," *Int. J. Pharm.*, vol. 505, no. 1–2, pp. 283–288, May 2016.
- [19] A. P. Abbott, G. Capper, K. J. McKenzie, and K. S. Ryder, "Electrodeposition of zinc/tin alloys from deep eutectic solvents based on choline chloride," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 599, no. 2, pp. 288–294, Jan. 2007.
- [20] Y. H. Choi *et al.*, "Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?," *PLANT Physiol.*, vol. 156, no. 4, pp. 1701–1705, Aug. 2011.
- [21] S. Garcia-Arguelles *et al.*, "Deep Eutectic Solvent-Assisted Synthesis of Biodegradable Polyesters with Antibacterial Properties," *Langmuir*, vol. 29, no. 30, pp. 9525–9534, Jul. 2013.
- [22] H. G. Morrison, C. C. Sun, and S. Neervannan, "Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles," *Int. J. Pharm.*, vol. 378, no. 1–2, pp. 136–139, Aug. 2009.
- [23] V. Pandey *et al.*, "Desiccation-induced physiological and biochemical changes in resurrection plant, *Selaginella bryopteris*," *J. Plant Physiol.*, vol. 167, no. 16, pp. 1351–1359, Nov. 2010.
- [24] F. Kaplan *et al.*, "Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content," *Plant J.*, vol. 50, no. 6, pp. 967–981, Jun. 2007.
- [25] Z. Kovács, L. Simon-Sarkadi, C. Sovány, K. Kirsch, G. Galiba, and G. Kocsy, "Differential effects of cold acclimation and abscisic acid on free amino acid composition in wheat," *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.*, vol. 180, no. 1, pp. 61–68, Jan. 2011.
- [26] J. P. Moore, N. T. Le, W. F. Brandt, A. Driouch, and J. M. Farrant, "Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance," *Trends Plant Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 110–117, Feb. 2009.
- [27] E. Durand, "Solvants de type eutectiques profonds: nouveaux milieux réactionnels aux réactions de lipophilisation biocatalysées par les lipases?," 2013.
- [28] J. T. Gorke, F. Srienc, and R. J. Kazlauskas, "Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents," *Chem. Commun. Camb. Engl.*, no. 10, pp. 1235–1237, Mar. 2008.
- [29] K. Shahbaz, F. S. Mjalli, M. A. Hashim, and I. M. AlNashef, "Prediction of the surface tension of deep eutectic solvents," *Fluid Phase Equilibria*, vol. 319, pp. 48–54, Apr. 2012.
- [30] M. Hayyan, M. A. Hashim, M. A. Al-Saadi, A. Hayyan, I. M. AlNashef, and M. E. S. Mirghani, "Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents," *Chemosphere*, vol. 93, no. 2, pp. 455–459, Sep. 2013.
- [31] Q. Wen, J.-X. Chen, Y.-L. Tang, J. Wang, and Z. Yang, "Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents," *Chemosphere*, vol. 132, pp. 63–69, Aug. 2015.
- [32] H.-R. Jhong, D. S.-H. Wong, C.-C. Wan, Y.-Y. Wang, and T.-C. Wei, "A novel deep eutectic solvent-based ionic liquid used as electrolyte for dye-sensitized solar cells," *Electrochem. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 209–211, Jan. 2009.
- [33] B. Singh, H. K. Sharma, and B. C. Sarkar, "Optimization of extraction of antioxidants from wheat bran (*Triticum spp.*) using response surface methodology," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 49, no. 3, pp. 294–308, Jun. 2012.
- [34] K. Radosevic, M. Cvjetko Bubalo, V. Gaurina Srček, D. Grgas, T. Landeka Dragičević, and I. Radojčić Redovniković, "Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 112, pp. 46–53, Feb. 2015.
- [35] Y. P. Mbous, M. Hayyan, W. F. Wong, C. Y. Looi, and M. A. Hashim, "Unraveling the cytotoxicity and metabolic pathways of binary natural deep eutectic solvent systems," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 41257, Feb. 2017.
- [36] M. Rajan, A. Prabhavathy, and U. Ramesh, "Natural Deep Eutectic Solvent Extraction Media for *Zingiber officinale* Roscoe: The Study of Chemical Compositions, Antioxidants and Antimicrobial Activities," *Nat. Prod. J.*, vol. 5, no. 1, pp. 3–13, Apr. 2015.

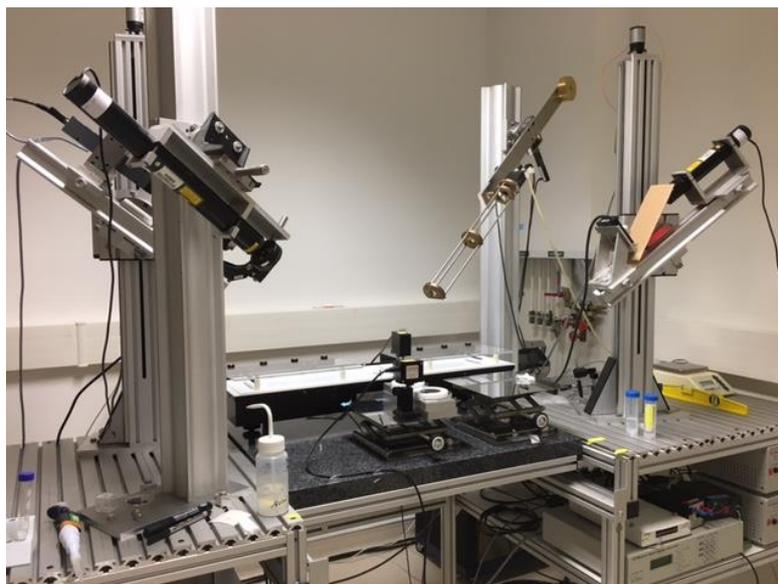
- [37] L. Zhang and M. Wang, "Optimization of deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb.," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 95, pp. 675–681, Feb. 2017.
- [38] E. Bağda, H. Altundağ, and M. Soylak, "Highly Simple Deep Eutectic Solvent Extraction of Manganese in Vegetable Samples Prior to Its ICP-OES Analysis," *Biol. Trace Elem. Res.*, Feb. 2017.
- [39] B. Tang, H. Zhang, and K. H. Row, "Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples: Other Techniques," *J. Sep. Sci.*, vol. 38, no. 6, pp. 1053–1064, Mar. 2015.
- [40] L. Piemontese, F. Perna, A. Logrieco, V. Capriati, and M. Solfrizzo, "Deep Eutectic Solvents as Novel and Effective Extraction Media for Quantitative Determination of Ochratoxin A in Wheat and Derived Products," *Molecules*, vol. 22, no. 1, p. 121, Jan. 2017.
- [41] J. Cao, M. Yang, F. Cao, J. Wang, and E. Su, "Well-Designed Hydrophobic Deep Eutectic Solvents As Green and Efficient Media for the Extraction of Artemisinin from *Artemisia annua* Leaves," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 5, no. 4, pp. 3270–3278, 2017.
- [42] E. Haslam, *Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*. New York: Cambridge University Press, 2005.
- [43] C. Barron *et al.*, "Accès à des molécules d'intérêt par fractionnement par voie sèche," *Innov. Agron.*, vol. 19, pp. 51–62, 2012.
- [44] L. Hernandez, D. Afonso, E. M. Rodriguez, and C. Diaz, "Phenolic Compounds in Wheat Grain Cultivars," *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 66, no. 4, pp. 408–415, Nov. 2011.
- [45] C. M. Liyanapathirana, "Phenolic and polyphenolic compounds of wheat (*Triticum* spp.): extraction and antioxidative properties.," Library and Archives Canada = Bibliothèque et Archives Canada, Ottawa, 2007.
- [46] K. Kim, R. Tsao, R. Yang, and S. Cui, "Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions," *Food Chem.*, vol. 95, no. 3, pp. 466–473, Apr. 2006.
- [47] M. P. Kähkönen *et al.*, "Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, no. 10, pp. 3954–3962, Oct. 1999.
- [48] N. Mateo Anson, R. van den Berg, R. Havenaar, A. Bast, and G. R. M. M. Haenen, "Bioavailability of ferulic acid is determined by its bioaccessibility," *J. Cereal Sci.*, vol. 49, no. 2, pp. 296–300, Mar. 2009.
- [49] W. Stahl *et al.*, "Bioavailability and metabolism," *Mol. Aspects Med.*, vol. 23, no. 1, pp. 39–100, Feb. 2002.
- [50] P. A. Kroon, C. B. Faulds, P. Ryden, J. A. Robertson, and G. Williamson, "Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, no. 3, pp. 661–667, 1997.
- [51] A. S. Hole, S. Grimmer, M. R. Jensen, and S. Sahlstrøm, "Synergistic and suppressive effects of dietary phenolic acids and other phytochemicals from cereal extracts on nuclear factor kappa B activity," *Food Chem.*, vol. 133, no. 3, pp. 969–977, Aug. 2012.
- [52] N. G. T. Meneses, S. Martins, J. A. Teixeira, and S. I. Mussatto, "Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 108, pp. 152–158, Apr. 2013.
- [53] J. Moore, Z. Hao, K. Zhou, M. Luther, J. Costa, and L. (Lucy) Yu, "Carotenoid, Tocopherol, Phenolic Acid, and Antioxidant Properties of Maryland-Grown Soft Wheat," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 17, pp. 6649–6657, Aug. 2005.
- [54] M. D. Vetal, V. G. Lade, and V. K. Rathod, "Extraction of ursolic acid from *Ocimum sanctum* by ultrasound: Process intensification and kinetic studies," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 69, pp. 24–30, Jul. 2013.
- [55] F. Chemat, Zill-e-Huma, and M. K. Khan, "Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 18, no. 4, pp. 813–835, Jul. 2011.
- [56] B. N. Dar and S. Sharma, "Total Phenolic Content of Cereal Brans using Conventional and Microwave Assisted Extraction," *Am. J. Food Technol.*, vol. 6, no. 12, pp. 1045–1053, Dec. 2011.

- [57] D. S. Oufnac, Z. Xu, T. Sun, C. Sabliov, W. Prinyawiwatkul, and J. S. Godber, "Extraction of Antioxidants from Wheat Bran Using Conventional Solvent and Microwave-Assisted Methods," *Cereal Chem. J.*, vol. 84, no. 2, pp. 125–129, Mar. 2007.
- [58] X. Peng *et al.*, "Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicera japonica* Flos with deep eutectic solvent," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 157, pp. 249–257, Jan. 2016.
- [59] H. E. Park, B. Tang, and K. H. Row, "Application of Deep Eutectic Solvents as Additives in Ultrasonic Extraction of Two Phenolic Acids from *Herba Artemisiae Scopariae*," *Anal. Lett.*, vol. 47, no. 9, pp. 1476–1484, Jun. 2014.
- [60] B. Xia *et al.*, "Determination of phenolic acids in *Prunella vulgaris* L.: a safe and green extraction method using alcohol-based deep eutectic solvents," *Anal. Methods*, vol. 7, no. 21, pp. 9354–9364, Oct. 2015.
- [61] S. J. Bryant, R. Atkin, and G. G. Warr, "Effect of Deep Eutectic Solvent Nanostructure on Phospholipid Bilayer Phases," *Langmuir*, Jun. 2017.
- [62] J. Wang, B. Sun, Y. Cao, Y. Tian, and X. Li, "Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran," *Food Chem.*, vol. 106, no. 2, pp. 804–810, Jan. 2008.
- [63] S. S. Abozed, M. El-kalyoubi, A. Abdelrashid, and M. F. Salama, "Total phenolic contents and antioxidant activities of various solvent extracts from whole wheat and bran," *Ann. Agric. Sci.*, vol. 59, no. 1, pp. 63–67, Jun. 2014.
- [64] M. Nardini, E. Cirillo, F. Natella, D. Mencarelli, A. Comisso, and C. Scaccini, "Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis," *Food Chem.*, vol. 79, no. 1, pp. 119–124, Oct. 2002.
- [65] N. N. Rosa, C. Dufour, V. Lullien-Pellerin, and V. Micard, "Exposure or release of ferulic acid from wheat aleurone: Impact on its antioxidant capacity," *Food Chem.*, vol. 141, no. 3, pp. 2355–2362, Dec. 2013.
- [66] M. Zhao, Q. Yang, L. Lin, B. Sun, and Y. Wang, "Intracellular antioxidant activities of selected cereal phenolic extracts and mechanisms underlying the protective effects of adlay phenolic extracts on H₂O₂-induced oxidative stress in human erythrocytes," *J. Funct. Foods*, vol. 31, pp. 160–171, Apr. 2017.
- [67] N. Rosa-Sibakov, K. Poutanen, and V. Micard, "How does wheat grain, bran and aleurone structure impact their nutritional and technological properties?," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 2, pp. 118–134, Feb. 2015.
- [68] G. R. Beecher, "Nutrient content of tomatoes and tomato products," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N.*, vol. 218, no. 2, pp. 98–100, Jun. 1998.
- [69] M. Srinivasan, A. R. Sudheer, and V. P. Menon, "Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property," *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 40, no. 2, pp. 92–100, Mar. 2007.
- [70] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 28, no. 1, pp. 25–30, Jan. 1995.

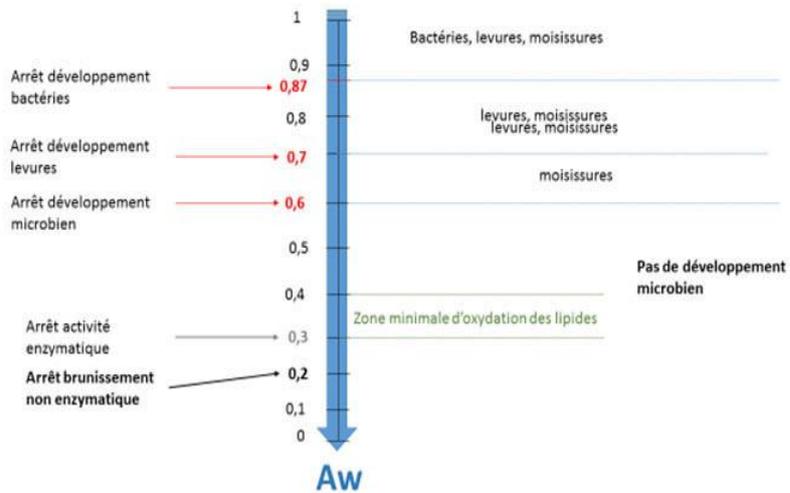
Annexes



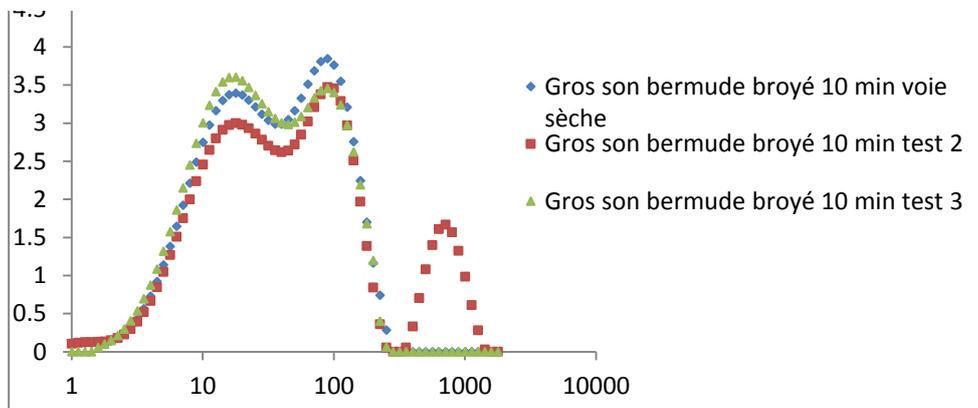
Annexe 1 : Analyse HOESY/NOESY entre le propane-diol et le ChCl (Choi et Al. 2011)



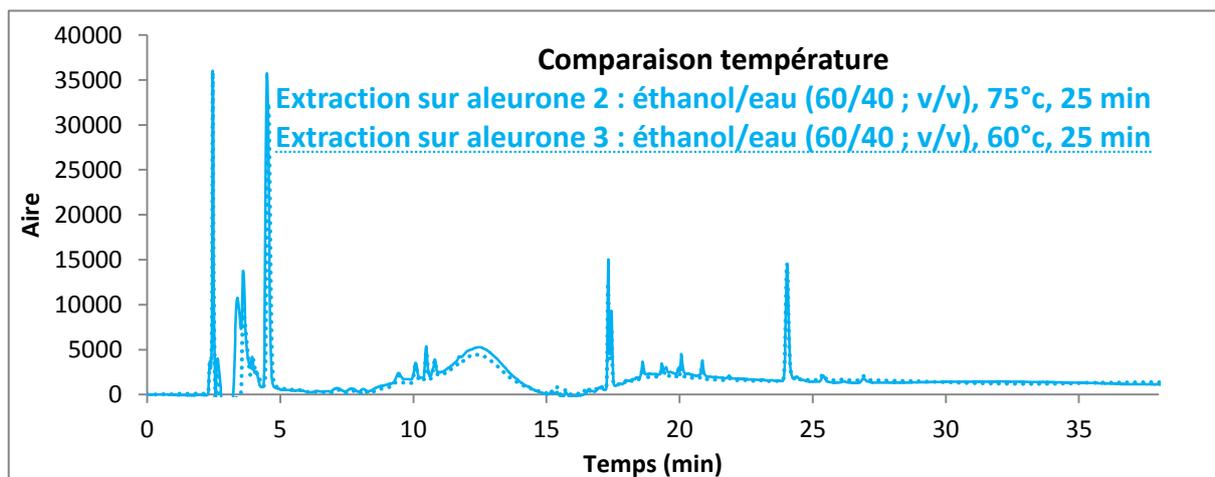
Annexe 2 : Photographie du montage ellipsométrique de Rennes



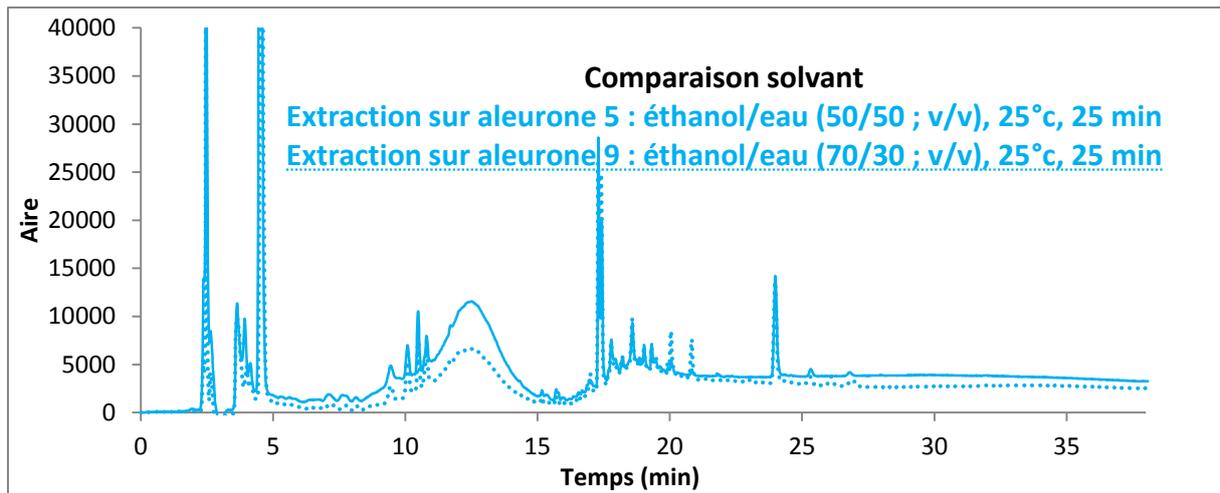
Annexe 3 : Effet de l'Aw sur le développement de microorganismes (<http://www.agir-crt.com/blog/mesure-aw/>)



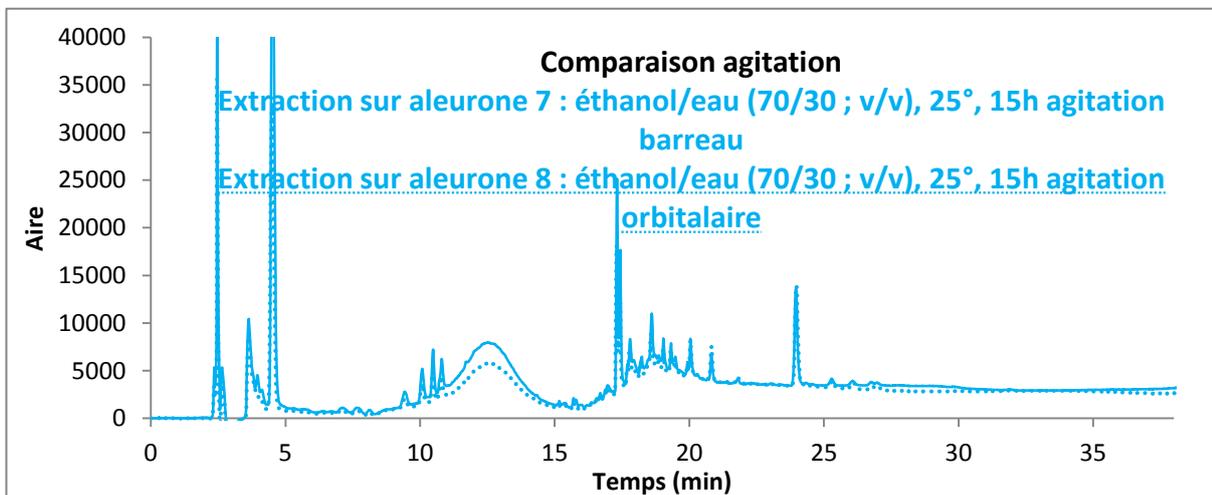
Annexe 4: Analyse granulométrique du son broyé Bermude 10 min présentant un artéfact sur courbe "test 2" vers 1000 µm



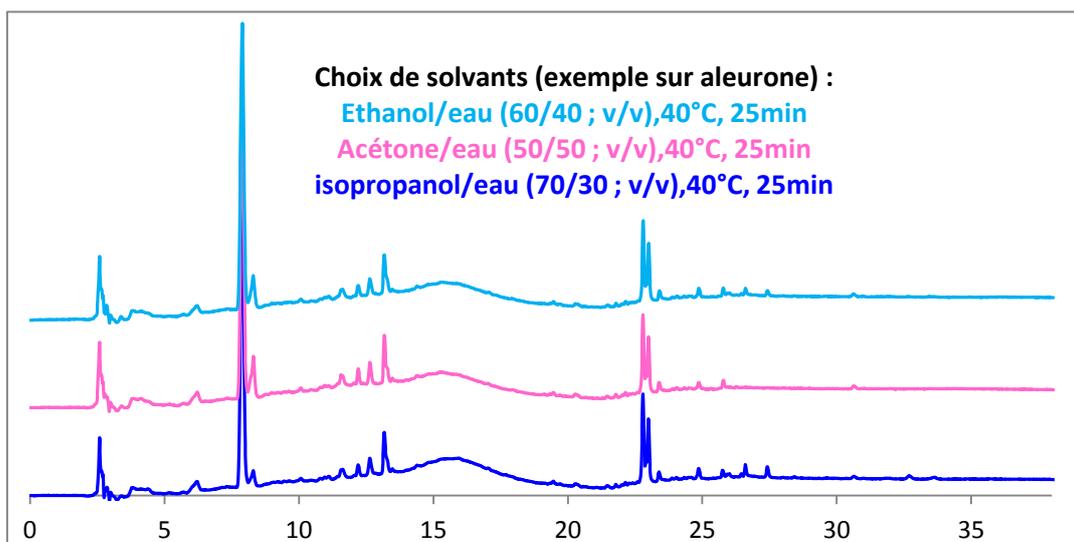
Annexe 5 : Comparaison de températures ($\lambda=280\text{nm}$)



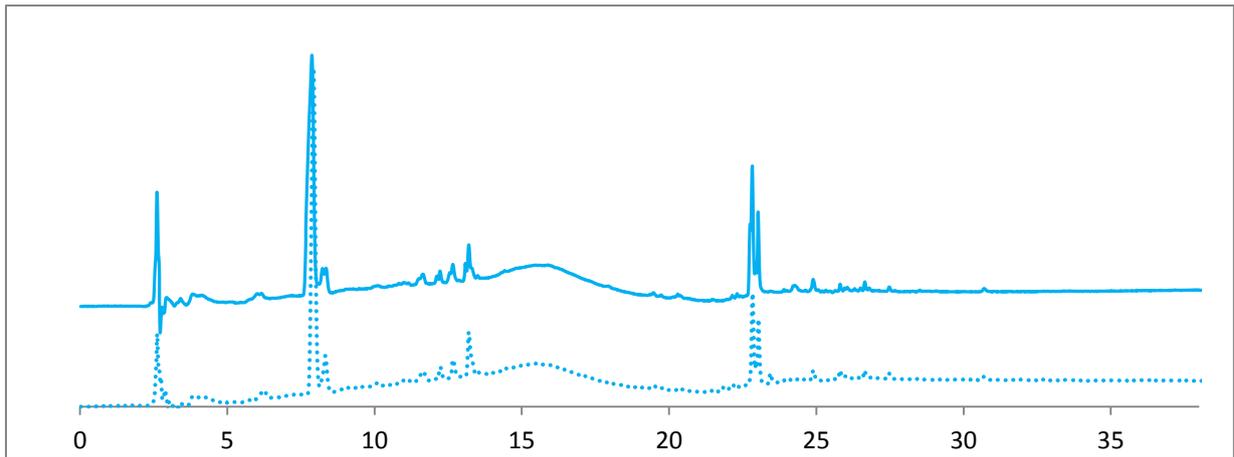
Annexe 6 : Comparaison de solvant ($\lambda=280\text{nm}$)



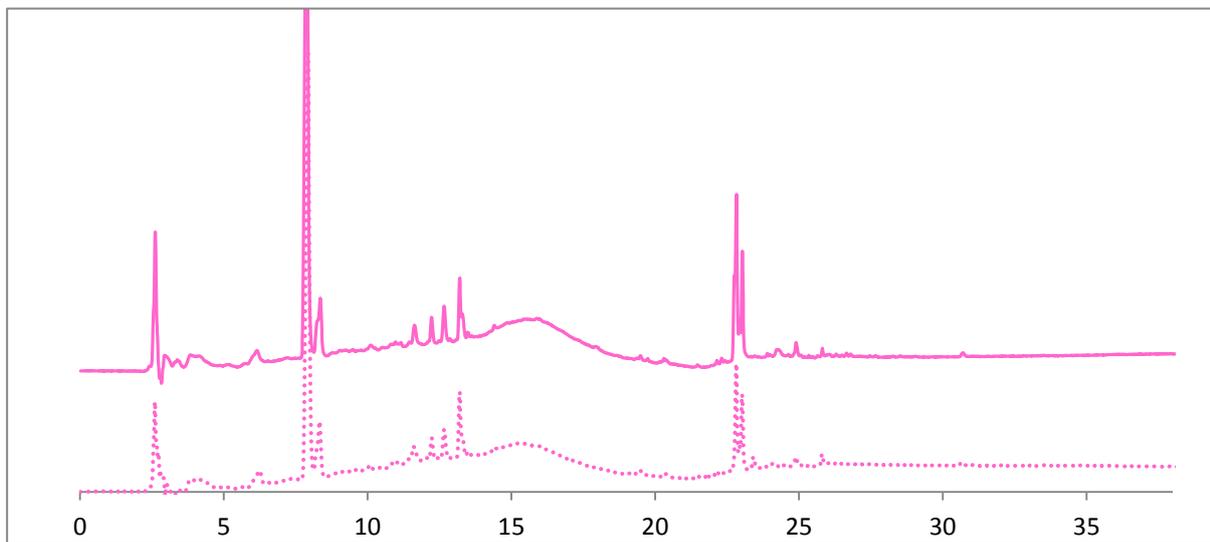
Annexe 7 : Comparaison d'agitation ($\lambda=280\text{nm}$)



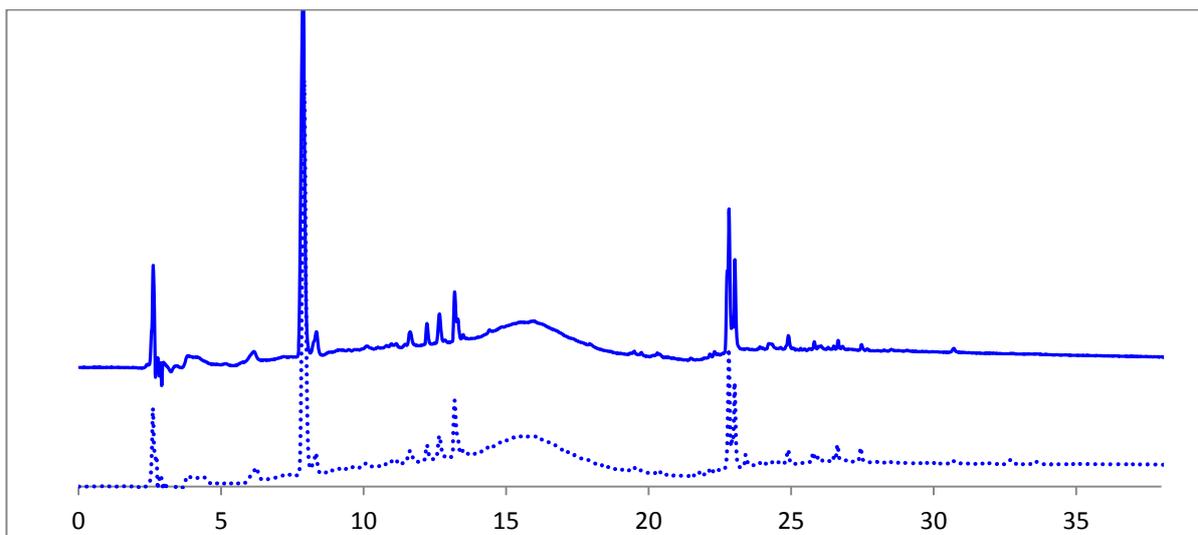
Annexe 8 : Choix des solvants ($\lambda=280\text{nm}$)



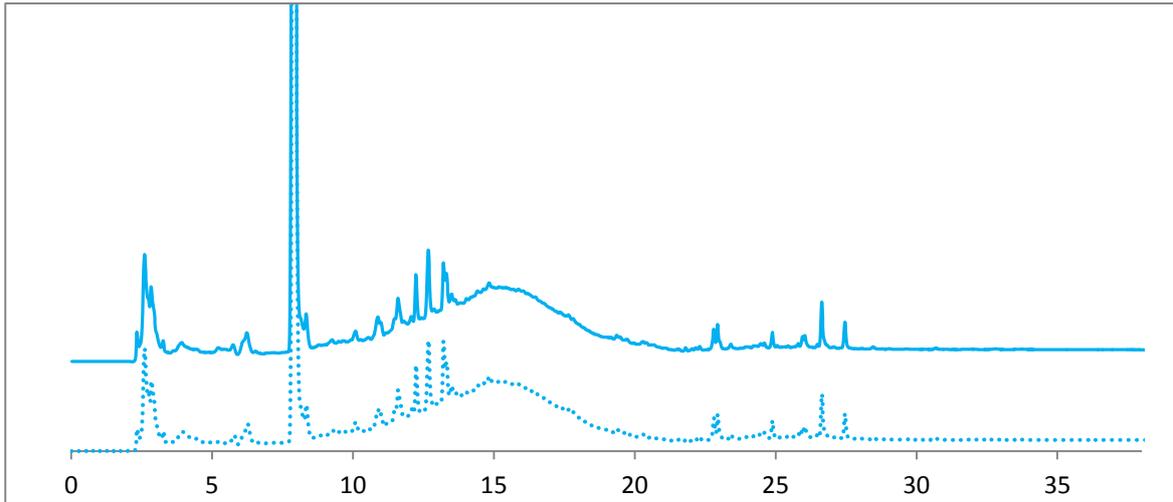
Annexe 9 : Comparaison extraction E:E avec/sans barreau sur AL ($\lambda=280\text{nm}$)



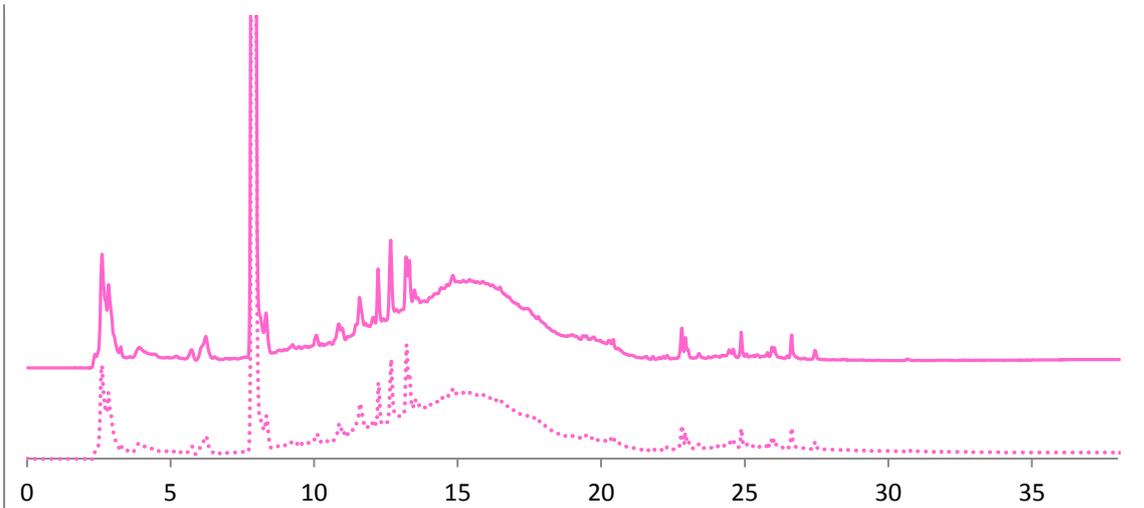
Annexe 10 : Comparaison extraction A:E avec/sans barreau sur AL ($\lambda=280\text{nm}$)



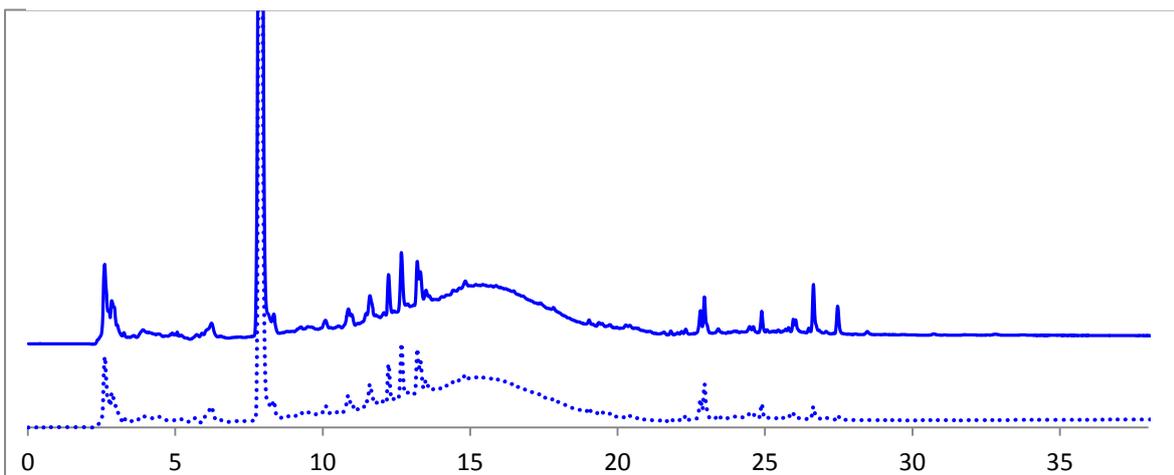
Annexe 11 : Comparaison extraction I:E avec/sans barreau sur AL ($\lambda=280\text{nm}$)



Annexe 13 : Comparaison extraction E:E avec/sans barreau sur SBB ($\lambda=280\text{nm}$)



Annexe 12 : Comparaison extraction A:E avec/sans barreau sur SBB ($\lambda=280\text{nm}$)



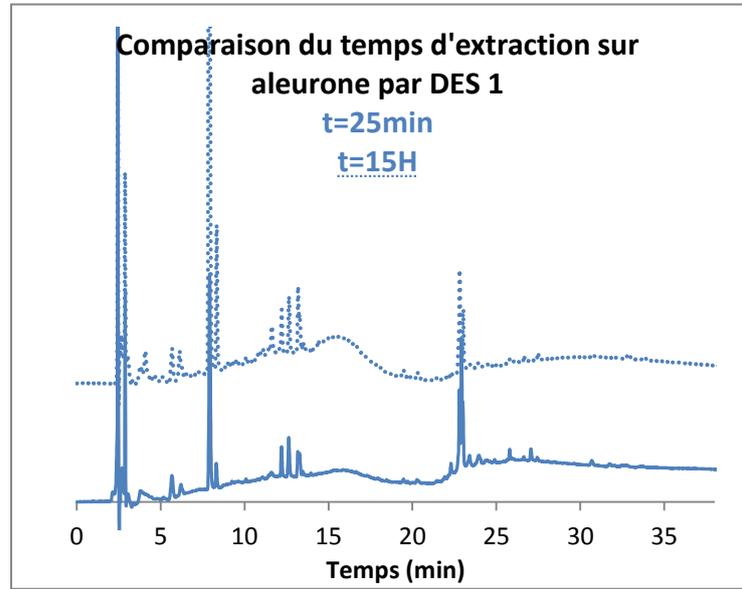
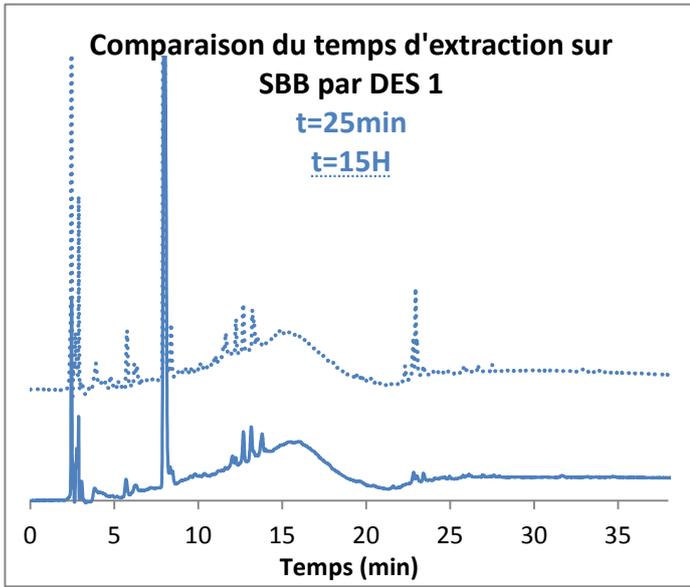
Annexe 14 : Comparaison extraction I:E avec/sans barreau sur SBB ($\lambda=280\text{nm}$)

extract	TR	UV	m/z	identité / famille supposée (ref ou base)
DES 1 SBB	2.42	O	194.18	AF
DES 1 SBB	2.5	N	239.08	amino-acid (L-cystine, L-homocarnosine)
DES 1 SBB	3.43	O	223.03	AS
DES 1 SBB	3.8	O	293.17	4-coumaroyl-3-hydroxyagmatine
DES 1 SBB	4.54	N	265.15	
DES 1 SBB	5.9	N	509.36, 587.34, 665,35	
DES 1 SBB	6.59	N	665.35, 809.45, 587.34	
DES 1 SBB	7.8	N	809.45	
DES 1 ALEU	2.42	O	194.18	AF
DES 1 ALEU	2.72	N	187.1	10-Hydroxydecanoic acid ou diaminobenzenesulfonic acid ?mass bank
DES 1 ALEU	3.31	N	327.22	2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one-glc (zhu; 2017); flavonoides (Respect; saponarin 594.52; MS2)
DES 1 ALEU	3.46	N	329.3	flavonoides (Respect; syringetin-3-O-galactoside 508.43; MS2)
DES 1 ALEU	3.61		171.10, 327.22	
DES 1 ALEU	3.68		329.23	flavonoides (Respect; syringetin-3-O-galactoside 508.43; MS2)
DES 1 ALEU	3.82		236.11	
DES 1 ALEU	3.98		311.22	13S-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadienoic acid (m/z=312.23, massbank)
DES 1 ALEU	4.14		313.24	
DES 1 ALEU	4.22	O	311.22	
DES 1 ALEU	4.38	O	293.21	flavonoides (Respect; vitexin-2''-O-rhamnoside 578.53; MS2)
DES 1 ALEU	4.56	O	295.23	
DES 1 ALEU	4.7	O	293.21	
DES 2 SBB	2.42	O	194.18	AF
DES 2 SBB	3.31	N	327.22	
DES 2 SBB	3.46	N	329.23	flavonoides (Respect; syringetin-3-O-galactoside 508.43; MS2)
DES 2 SBB	3.66	O	329.23	flavonoides (Respect; syringetin-3-O-galactoside 508.43; MS2)
DES 2 SBB	3.82	N	293.18, 236.11, 221.15	
DES 2 SBB	3.98	N	311.22, 293.21	
DES 2 SBB	4.12	N	313.24	
DES 2 SBB	4.2	N	313.24	
DES 2 SBB	4.37	O	293.21	
DES 2 SBB	4.56	O	295.23	
DES 2 SBB	4.7	O	293.21	flavonoides (Respect; vitexin-2''-O-rhamnoside 578.53; MS2)
DES 2 ALEU	2.42	O	194.18	AF
DES 2 ALEU	3.32	N	327.22	
DES 2 ALEU	3.45	N	329.23	flavonoides (Respect; syringetin-3-O-galactoside 508.43; MS2)

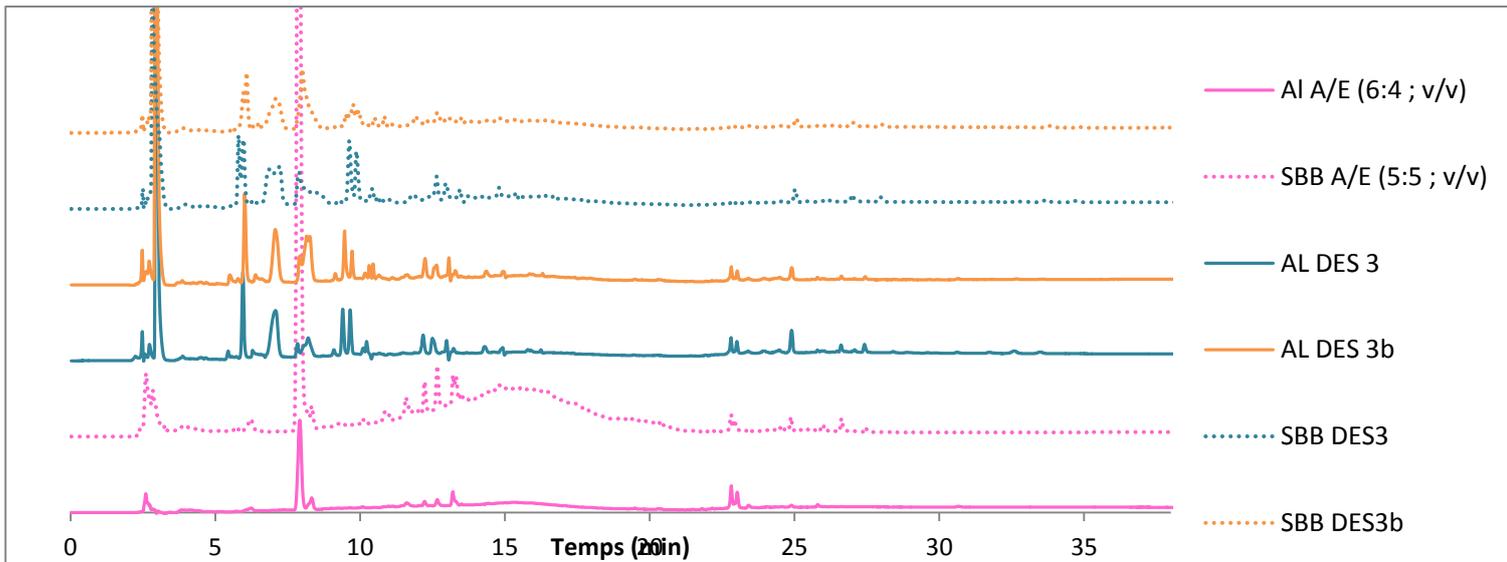
DES 2 ALEU	3.97	N	311.22	
DES 2 ALEU	4.12	N	313.24	
DES 2 ALEU	4.55	O	295.23	
DES 2 ALEU	4.67	O	293.21	
DES 3 SBB	0.843	O	161.04, 498.22	
DES 3 SBB	1.058	O	570.24, 642.26, 786.31	
DES 3 SBB	2.065	N	1002.36, 89.02, 161.05	
DES 3 SBB	2.183	N	886.35, 674.24	
DES 3 SBB	2.38	O	89.02, 161.05, 305.09, 714.28	89.02= acide lactique
DES 3 SBB	2.42	O	194.18	AF
DES 3 SBB	2.95	N	89.02, 377.11, 305.09, 161.05	
DES 3 SBB	3.29	N	449.13	
DES 3 SBB	3.58	N	521.15	
DES 3 SBB	3.78	N	593.17	
DES 3 SBB	3.942	N	665.19	
DES 3 SBB	4.107	N	737.21	
DES 3 SBB	4.228	N	881.26	
DES 3 SBB	4.34	N	809.23	
DES 3 SBB	4.65	N	595.3	
DES 3 SBB	4.78	N	595.3	
DES 3 SBB	4.99	N	476.3	
DES 3 SBB	5.083	N	476.28	
DES 3 SBB	5.213	N	571.3	
DES 3 ALEU	0.51	O	272.95, 158.98, 386.94	387= 4,7-Dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one-2- beta-D-glucopyranoside
DES 3 ALEU	0.76	O	161.04, 426.20, 89.02, 498.22, 570.24	426 (sterol; 7-ketositosterol 428)
DES 3 ALEU	1.14	O	570.24, 786.30, 89.02	571=MS2 3-O-glucopyranosyl-7-ketostigmaterol m/z=589
DES 3 ALEU	2.25	O	886.35	
DES 3 ALEU	2.54	O	89.02, 161.04, 333.08	89.02= acide lactique; 333= MS2 resorcinol m/z 374
DES 3 ALEU	2.66	O	333.08, 89.02, 161.05	89.02= acide lactique; 333= MS2 resorcinol m/z 375
DES 3 ALEU	2.83	N	89.02, 161.05, 319.10, 742.31	743=glucopyranosyl-hydroxyicosanoyl-sphingénine
DES 3 ALEU	2.98	N	89.02, 377.11, 305.09	378= 7-hydroxysecoisolariciresinol
DES 3 ALEU	3.22	N	391.12, 89.02, 319.10	
DES 3 ALEU	3.33	N	449.13, 377.11, 161.04	449=cyanidin 3-galactoside, 377=resorcinol ?, 161.04 dichlorophenol (161.96) ou dérivés dans spectre catechin/epicatechin
DES 3 ALEU	3.56	O	521.15	
DES 3 ALEU	3.78	N	593.17	
DES 3 ALEU	3.97	N	665.19	4 hexoses (C24H42O21, 666.22)
DES 3 ALEU	4.11	N	737.21	possiblement phosphatidylglyceride

DES 3 ALEU	4.225	N	809.24	
DES 3 ALEU	4.777	O	595.29	Delphinidin-3-O-(2''-O-beta-xylopyranosyl-beta-glucopyranoside (M:Z=597.14, massbank)
DES 3 ALEU	5.083	N	476.28, 197.81	
DES 3 ALEU	5.2	N	571.29	présent ds spectre kampférol (massbank)
DES 3 ALEU	5.51	O	279.23	linoleic acid
DES 3b SBB	0.755	O	161.05, 498.22	methyl cinnamate (162.07)
DES 3b SBB	1.1	O	656.28, 642.26, 516.18, 89.02, 161.04	656 bergenin (C-glycoside of 4-O-methyl gallic acid) dimere (m/z=328.07, massbank)
DES 3b SBB	1.34	O	570.24, 89.02, 489.12, 642.26	
DES 3b SBB	2.27	N	886.35, 674.24	
DES 3b SBB	2.55	O	161.05, 89.02	
DES 3b SBB	2.87	N	89.02, 175.1, 319.10	
DES 3b SBB	3	N	377.11, 89.02, 305.09, 161.04	
DES 3b SBB	3.34	N	449.13	
DES 3b SBB	3.56	N	521.15	
DES 3b SBB	3.79	N	593.17	
DES 3b SBB	3.96	N	665.19	
DES 3b ALEU	0.68		187.04, 89.02	187.04 (catechin-epicatechin, MS2, massbank) or 10-hydroxydecanoic acid (massbank)
DES 3b ALEU	0.77		161.04, 426.20, 89.02, 498.22, 570.24	
DES 3b ALEU	1.21		570.24, 786.30, 89.02	
DES 3b ALEU	2.18		598.27, 197.81, 161.05, 335.10	
DES 3b ALEU	2.257		886.36, 598.27	
DES 3b ALEU	2.52		89.02, 161.05, 305.09, 714.28	89.02= acide lactique
DES 3b ALEU	2.86		89.02, 161.04, 742.31, 319.10	89.02= acide lactique
DES 3b ALEU	2.97		89.02, 377.11, 305.09, 161.04	89.02= acide lactique
DES 3b ALEU	3.234		391.12, 89.02, 319.10	89.02= acide lactique
DES 3b ALEU	3.32		449.13	
DES 3b ALEU	3.58		521.15	
DES 3b ALEU	3.77		593.17	
DES 3b ALEU	3.95		665.19	
DES 3b ALEU	4.17		313.24	
DES 3b ALEU	4.77		595.29	
DES 3b ALEU	5.15		571.29	
DES 4 SBB	6.163		191.02, 111.01, 205.04	citric acid 191.02, 111.01 => MS2 L-quinat (111.18), dopaquinone (111.22)
DES 5 SBB	0.571	O	191.02, 111.01	citric acid 191.02, 111.01 => MS2 L-quinat (111.18), dopaquinone (111.22)
DES 4b ALEU	0.751	O	191.02, 111.01	citric acid 191.02, 111.01 => MS2 L-quinat (111.18), dopaquinone (111.22)
DES 4b ALEU	3.26	N	191.02, 111.01	citric acid 191.02, 111.01 => MS2 L-quinat (111.18), dopaquinone (111.22)

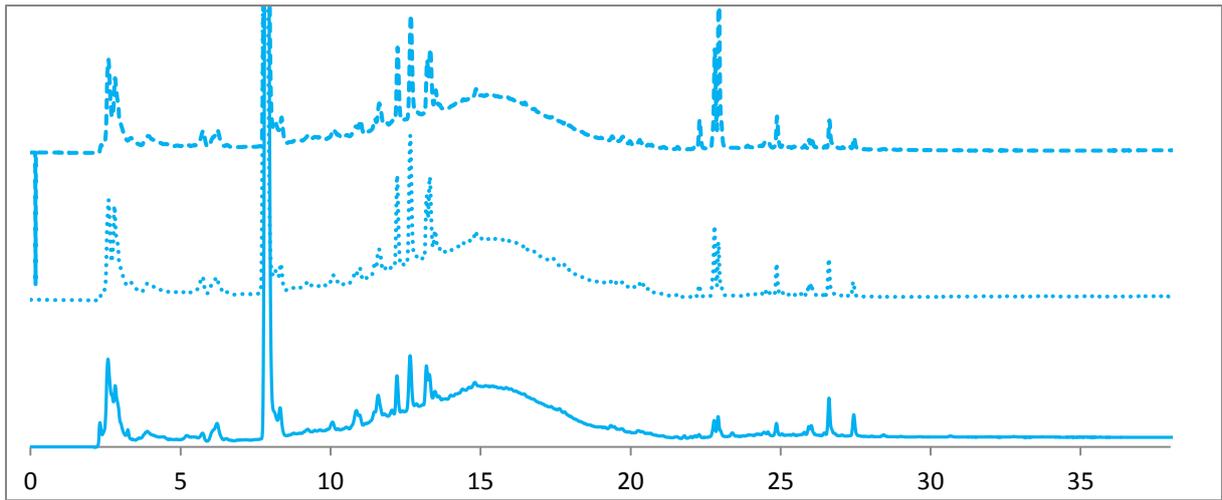
Annexe 15 : Tableau récapitulatif des masses obtenues, résultats en cours de traitement



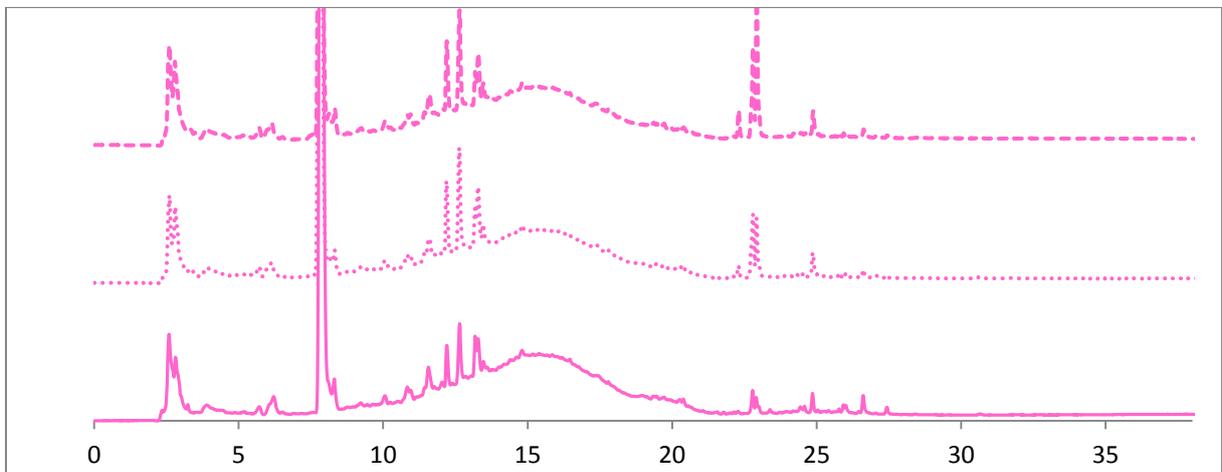
Annexe 16: SBB Comparaison temps d'extraction sur SBB et Al pour le DES ($\lambda=280\text{nm}$)



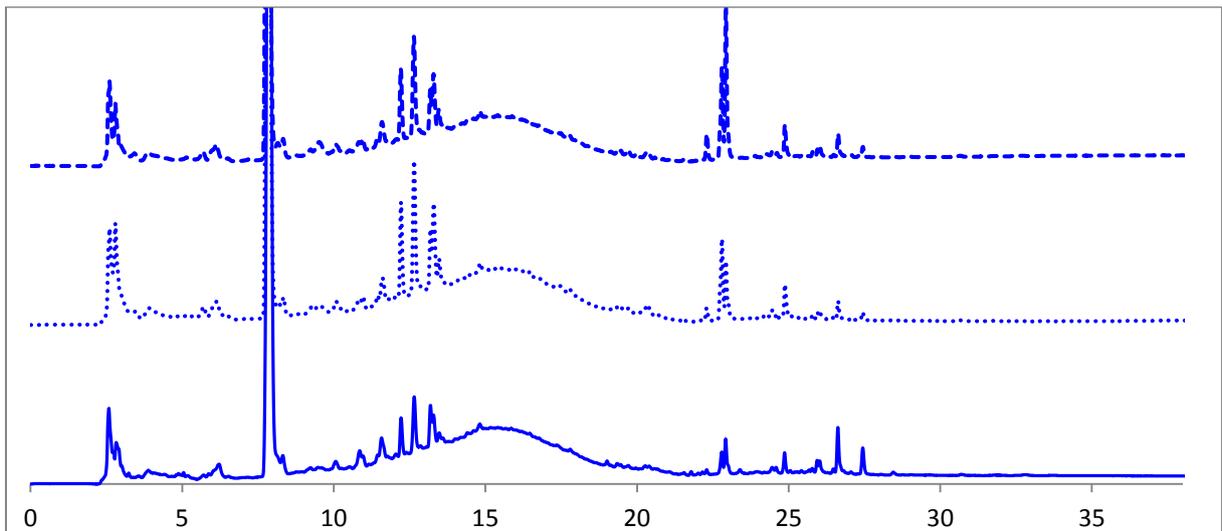
Annexe 17 : Comparaison du meilleur extrait organique vs DES 3 et 3b sur AL et SBB ($\lambda=280\text{nm}$)



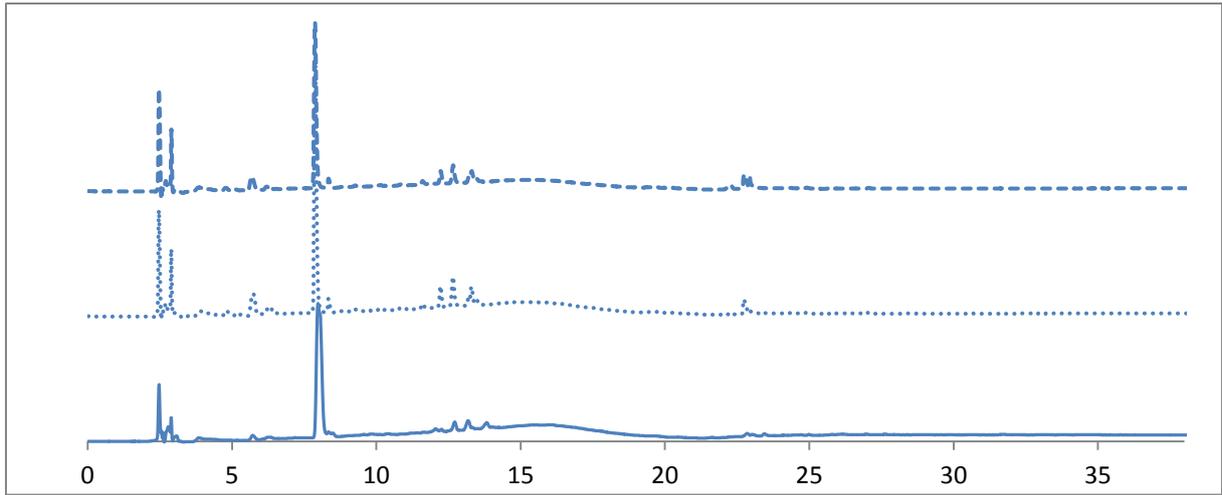
Annexe 18 : Comparaison temps de broyage sur SBB (2min/5min/10min de bas en haut), extrait E:E ($\lambda=280\text{nm}$)



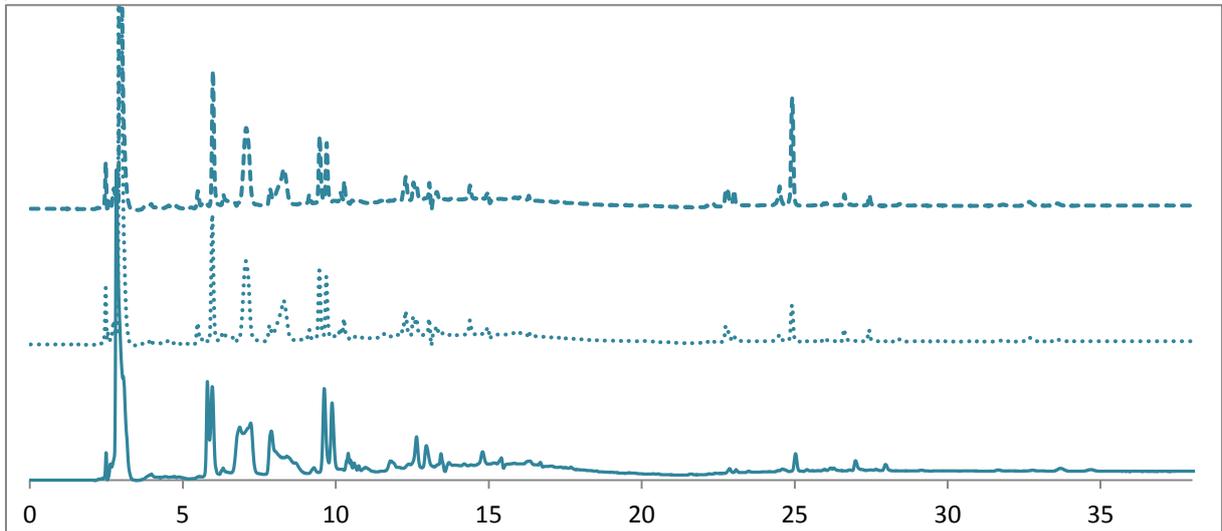
Annexe 19 : Comparaison temps de broyage sur SBB (2min/5min/10min de bas en haut), extrait A:E ($\lambda=280\text{nm}$)



Annexe 20 : Comparaison temps de broyage sur SBB (2min/5min/10min de bas en haut), extrait I:E ($\lambda=280\text{nm}$)



Annexe 21: Comparaison temps de broyage sur SBB (2min/5min/10min de bas en haut), extrait DES 1 ($\lambda=280\text{nm}$)

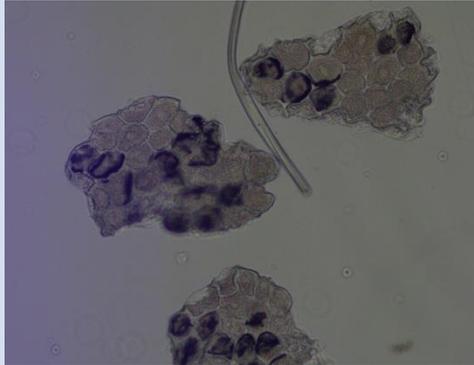
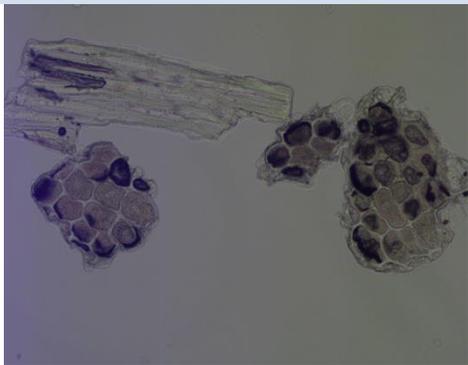
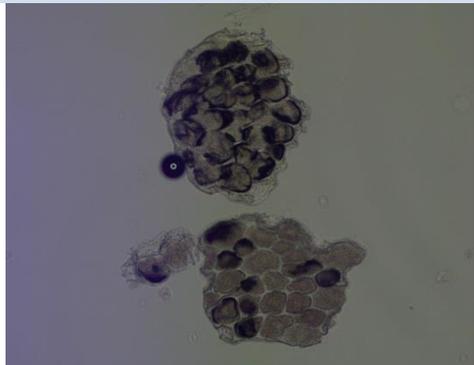
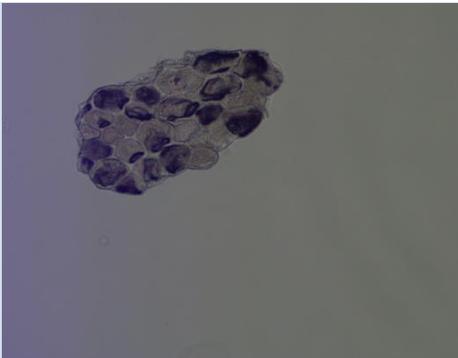
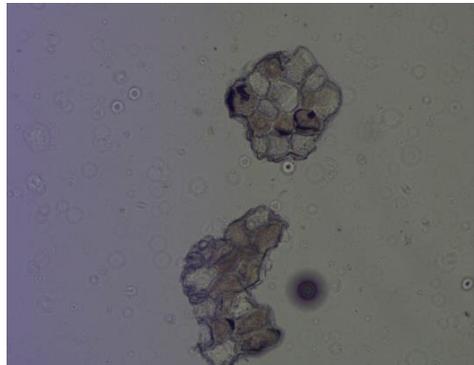


Annexe 22 : Comparaison temps de broyage sur SBB (2min/5min/10min) , extrait DES 3 ($\lambda=280\text{nm}$)

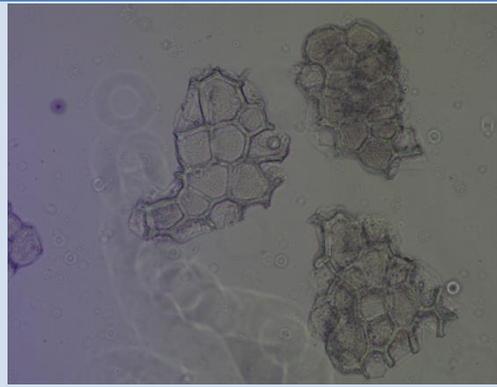
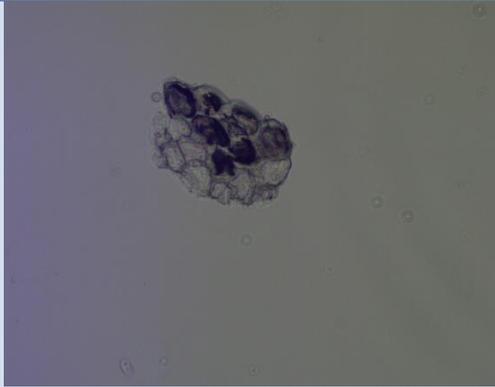


Wheat endosperm. Cross section. Light microscopy, toluidine blue

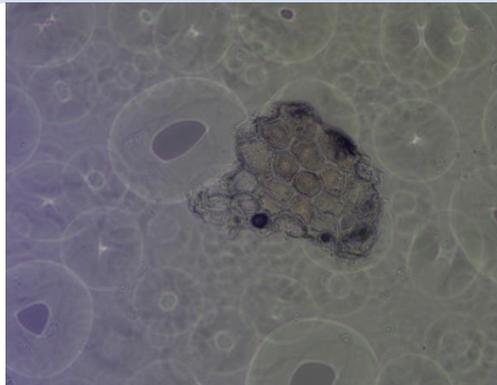
Annexe 23: Photographie d'une coupe de l'endosperme du blé

Nom du DES utilisés	Photo à t=25min	Photo à t=15h
DES 1		
DES 2		
DES 2b		
DES 3		

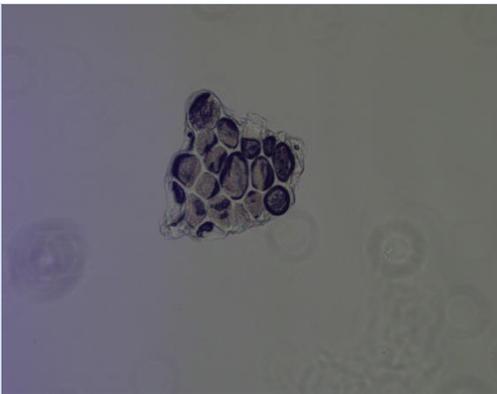
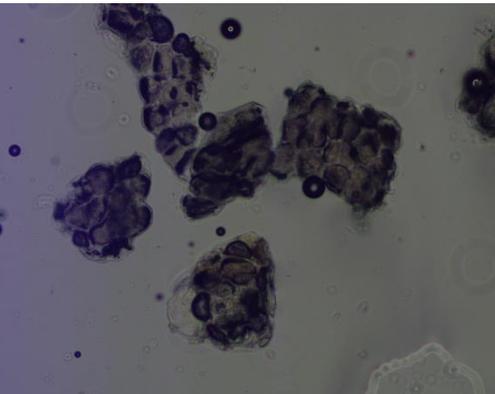
DES 3b



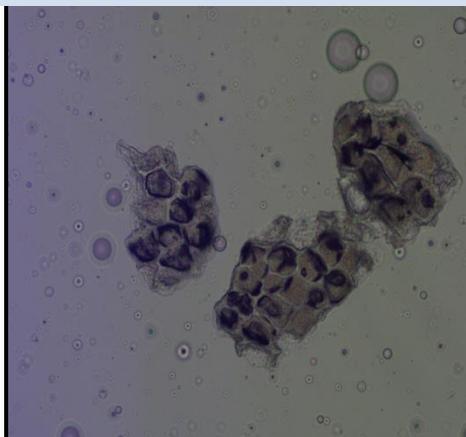
DES 4b



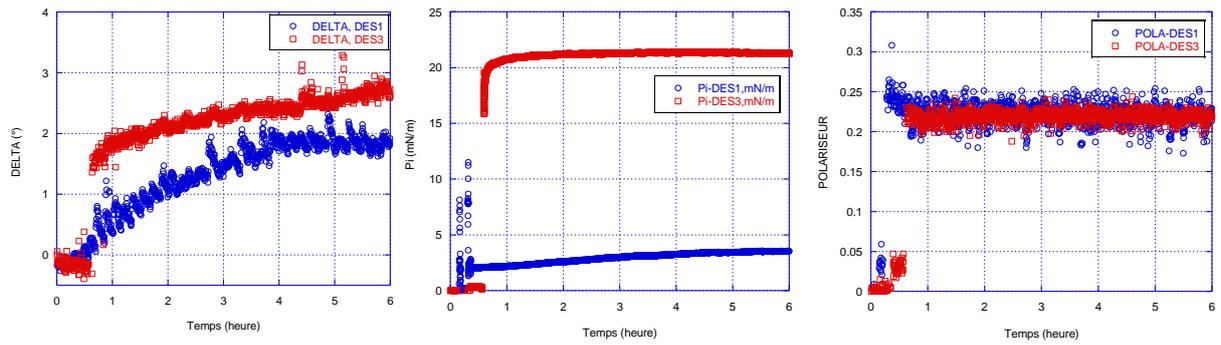
DES 5b



Blanc



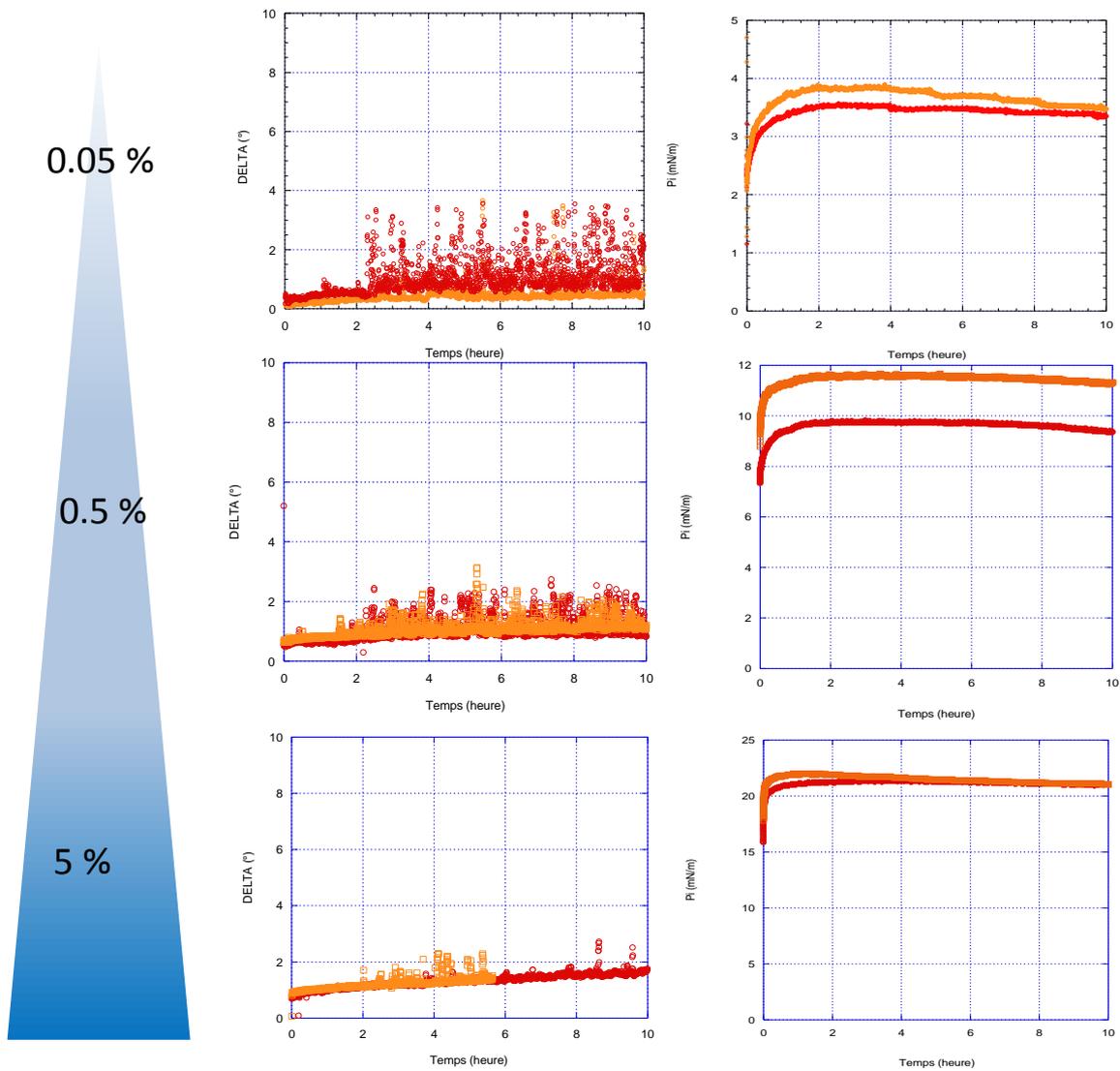
Annexe 24 : photographies des résidus secs d'aleurone après 25 min et 15 h de contact avec les différents DES, 20x



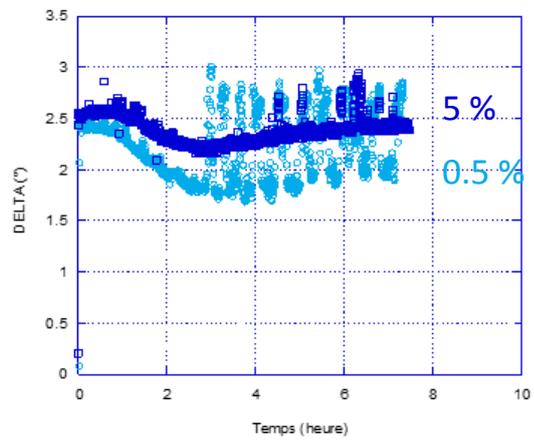
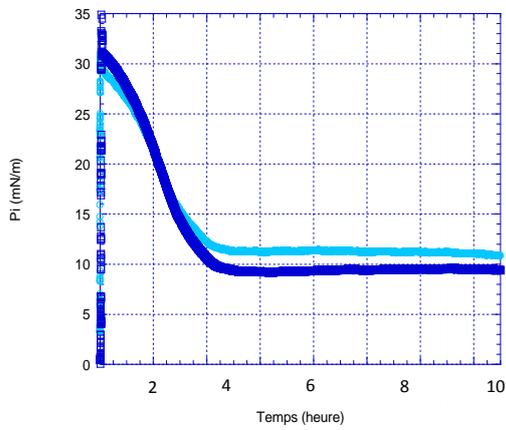
Annexe 25 : Comparaison entre le DES 1 et 3

Tampon TRIS + DES 1 (0.5%)

Tampon TRIS + DES 3 (0.5%)



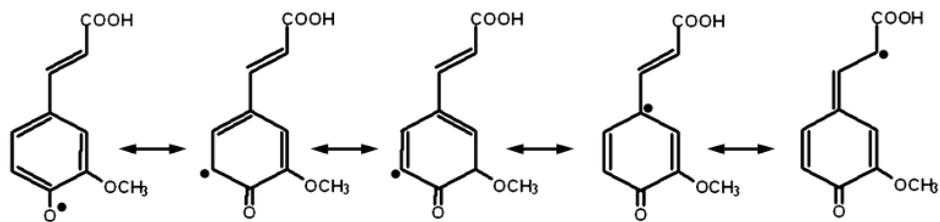
Annexe 26 : Comparaison des différentes concentrations sur le DES 3



Annexe 27 : Comparaison concentration

Tampon TRIS + DES (0.5%)

Tampon TRIS + DES (5%)



Annexe 28 : Délocalisation de charge sur l'acide férulique