

# Remerciement

الحمد لله بجميع ما قدمه و الثناء عليه بما هو أهله و الصلاة و السلام على رسوله  
المصطفى . وآله.

*Ce mémoire a été réalisé au sein de l'université de Tlemcen, au laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), sous la direction de Monsieur le Docteur Hocine ALLALI.*

*Toutes mes reconnaissances et mes remerciements à Mr Hocine ALLALI, qui a fait preuve de patience, et grâce à son expérience qui ma transmis des connaissances précieuses, et à ces précieux conseils qui ma fourni pour la réalisation de ce mémoire.*

*Que messieurs les membres de jury trouvent ici l'expression de mon profond respect et de mes remerciement sincères pour l'intérêt qu'ils mon accorder a ce modeste travail, en l'occurrence :*

*Monsieur le professeur S. GHALEM, qui a accepter d'assurer la présidence du jury de ma thèse de magister.*

*Monsieur le Docteur Z. ARRAR, Docteur M. MERAD, qu'ils ont bien voulu examiner mon travail.*

*Je remercie très chaleureusement Monsieur le Docteur M. A. DIB qui a accepter de juger ce modeste travail, pour son aide précieuse, et son encouragement tout le long de mon parcours.*

*Je remercie Mr N. DJABOU pour sa contribution et son aide concernant la réalisation des analyses CPG/SM des huiles essentielles.*

*Nos remerciements vont également à Monsieur J. KAJIMA MULENGI, Directeur de notre laboratoire.*

*Je ne saurais oublier d'exprimer mon entière gratitude à Mr R. CHADLI qui a participé à la réalisation de ce travail.*

*Enfin mes vifs remerciements à toutes personne qui a participé de près ou de loin, et a tous les chercheurs de post-graduation du laboratoire COSNA.*



# Dédicace

*Je dédie ce travail à mes chers parents, pour leur amour et leurs encouragements, que Dieu les garde.*

*Au soutien de ma mère que j'ai perdue et qui n'a pas pu partager ma réussite. Qu'elle puisse reposer en paix dans sa tombe.*

*A mon cher mari qui a fait preuve de dévouement, de patience et de compréhension, et je ne saurais le remercier pour son soutien aussi bien moral que matériel qui m'a sans cesse apporté.*

*A mon fils ABDELMALEK que Dieu le garde.*

*A ma belle famille.*


*A mes chers frères Ismaïl, Mortada et son épouse.*

*A mes sœurs et leurs époux*

*A mes neveux et mes nièces*

*A toutes mes amies surtout Nadia et Karima qui m'ont apporté leur soutien.*

*A monsieur ABDELGHANI qui malgré son handicap moteur, a pu me procurer la plante sujet de ma thèse.*



Projet sous le N° :  
 Date le 29/10/2009  
 Code 3790

## Table des matières

Introduction générale.....	01
Bibliographie.....	03
<b>Chapitre I : La thérapie par les plantes.....</b>	<b>04</b>
I. Introduction.....	04
II. Historique.....	04
III. Phytothérapie & aromathérapie.....	05
III-1. La phytothérapie .....	05
III-2. Aromathérapie .....	06
IV. Conclusion.....	06
Bibliographie.....	07
<b>Chapitre II : Botanique de la <i>Rhaponticum acaule</i> L. (Astéracées).....</b>	<b>09</b>
I. Introduction.....	09
II- Famille des Astéracées.....	10
II-1 Introduction.....	10
II-2 Caractères généraux .....	10
III- Présentation générale de la plante étudiée.....	11
III-1 Systématique .....	11
III-2 Description botanique .....	11
III-3 Usages thérapeutiques.....	11
Bibliographie.....	13
<b>Chapitre III : Les substances actives dans les plantes.....</b>	<b>14</b>
I- Introduction.....	14
II- Les métabolites secondaires.....	14
II-1 Introduction.....	14
II-2 Les polyphénols.....	14
II-3 Les huiles essentielles .....	23



Bibliographie.....	30
<b>Chapitre IV : Résultats &amp; Interprétations.....</b>	<b>33</b>
I- Introduction.....	33
II- Examen phytochimique.....	33
II-1 Matériel végétal.....	33
II-1 Matériel végétal.....	33
II-2 Criblage phytochimique .....	34
III- Dosage des polyphénols.....	35
III-1 Dosage des phénols totaux.....	36
III-2 Dosage des tanins hydrolysables .....	36
III-3 Dosage des flavonoïdes .....	36
VI- Extractions sélectives.....	36
IV-1 Introduction.....	36
IV-2 Acides gras et insaponifiables.....	37
IV-3 Extraction des polyphénols .....	38
IV-4 Extraction des H.E .....	45
V- Conclusion.....	49
Bibliographie.....	50
<b>Chapitre V : Partie Expérimentale - Généralités -.....</b>	<b>51</b>
Généralités .....	51
I- Tests phytochimiques.....	52
II- Dosage des composés phénoliques.....	53
II-1Extraction avec Eau/Acétone .....	53
II-2 Dosage des phénols totaux.....	53
II-3 Dosage des tanins hydrolysables.....	53
II-4 Dosage des flavonoïdes .....	54
III- Extractions sélectives.....	54
III-1 Dégraissage du matériel végétal.....	54
III-2 Séparation des acides gras et des insaponifiables.....	54
III-3 Estérification des acides gras .....	54
III-4 Extraction des polyphénols .....	54
III-5 Extraction des H.E .....	55

# ***Introduction Générale***

## Introduction Générale

Depuis la nuit des temps, les hommes ont utilisés les plantes pour se soigner. Leur utilisation a longtemps été guidée par la tradition [1-6].

A l'heure actuelle, l'origine de nos médicaments se confond avec l'origine de la connaissance des plantes, c'est-à-dire avec l'origine de la phytothérapie. La thérapie par les plantes est basée sur la connaissance empirique, ancestrale et sur l'usage traditionnel transmis oralement au cours des siècles et des millénaires. Peu à peu, le nombre des plantes utilisées s'est accru et leur mode d'emploi a été, constamment, perfectionné grâce aux progrès réalisés par l'expérience et l'intelligence humaine [7].

Après les progrès de la chimie d'extraction puis la chimie de synthèse, la phytothérapie renaît aujourd'hui avec une approche plus scientifique permettant d'obtenir les principes actifs de la plante, d'où certaines perdent leur prétendu pouvoir alors que d'autres acquièrent une importance en thérapeutique du fait de leur efficacité [1].

Par ailleurs, la science moderne n'a pas pour but de diminuer notre confiance dans les plantes, mais elle veut préciser, comparer et classer leurs diverses propriétés pour grouper celles dotées des effets similaires, choisir les plus efficaces et les faire connaître [8,9].

Cependant, les plantes médicinales contiennent une grande diversité de composés différents parmi lesquels certains peuvent exercer une activité biologique, de sorte qu'un risque réel existe d'assister à des effets secondaires, parfois même toxiques [7-10]. En outre, étant donné que dans les plantes le principe actif n'est présent qu'à de faibles concentrations, nous devons nous attendre à ce que ces remèdes naturels soient moins actifs que le composé pur [11].

Le continent africain est un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde, avec beaucoup de plantes utilisées comme herbes, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques [12]. Par ailleurs, selon l'O.M.S, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui constituent 90% de la médecine traditionnelle [13]. Malgré la nature hétérogène du continent, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents chimio-thérapeutiques et prophylactiques de ces plantes.

Cependant et dans le but d'une valorisation socio-économique de la flore de l'ouest algérien, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante de la région de Tlemcen, spontanée, abondante, peu populaire et non encore exploitée appelée la *Rhaponticum acaule* L. Cette dernière possède plusieurs propriétés parmi lesquelles : apéritive, cholagogue, dépurative, digestive, stomachique, tonique, etc. Aussi, elle est considérée comme bénéfique pour les cellules hépatiques.

Les objectifs fixés dans cette recherche consistent à :

- Une étude phytochimique visant la mise en évidence des différentes familles de composés chimiques existant dans la partie aérienne de la *Rhaponticum acaule* L. (fleurs et feuilles).

- Dosage des composés phénoliques (tanins et flavonoïdes).

- Extraction des tanins à partir des fleurs.

- Extraction des huiles essentielles des fleurs et feuilles et leur caractérisation par les méthodes chromatographiques (CPG, CPG/SM etc.).

Pour atteindre ces objectifs, les laboratoires, cités ci-dessous, ont apportés leur contribution :

- Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyse (COSNA), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

- Laboratoire de Spectrochimie et Pharmacologie Structurale (SCPS), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

- Laboratoire de Chimie des Produits Naturels (CPN), Université de Corse, France.

## Bibliographie

- [1] M. Cazaubon, Programme jambes légères, Ed. S.M.A., 2005, p.54.
- [2] S. M. Colegate, R. J. Molyneux, Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination, 2<sup>ème</sup> Ed. CRC press, cop., 2008, p. 1-605.
- [3] Y.-Z. Zhu, Natural products : essential resources for human survival, Ed. World Scientific, cop., 2007, p. 1-454.
- [4] S. D. Sarker, Z. Latif, A. I. Gray, Natural products isolation, 2<sup>ème</sup> Ed. Humana Press, cop., 2006, p. 515.
- [5] M. Paris, M. Hurabielle, Abrégé de matière médicale, Pharmacognosie, Tome 1 (Généralités-Monographies), Ed. Masson, 1980, p. 1-356.
- [6] H. Leclerc, Précis de phytothérapie, Essais de thérapeutique par les plantes françaises, 5<sup>ème</sup> Ed. Masson, 1983, p. 1-380.
- [7] L. Girre, Les plantes et les médicaments - L'origine végétale de nos médicaments, Ed. Paris, 2006, p.1.
- [8] I. Lamnaour, Plantes médicinales et toxicité, Ed. Paris, 2000, p.1.
- [9] D.G. Barceloux, Medical toxicology of natural substances, Ed. John Wiley & Sons, cop., 2008, p. 1-1157.
- [10] M. Paris, M. Hurabielle, Abrégé de matière médicale, Pharmacognosie, Tome 2 (Monographies), Ed. Masson, 1986, p. 1-173.
- [11] L. G. Patrick, Chimie pharmaceutique, Ed. Boeck Université, 2002, p.190.
- [12] E.O. Farombi, African plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents, *J. Biotech.*, 2003, 2(12), 662-671.
- [13] A. Diallo, Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (*Myrtaceae*), mémoire de Doctorat en pharmacie, Université de Bamako, 2005.



# ***Chapitre I***

## ***La thérapie par les plantes***

## La thérapie par les plantes

### I-Introduction

Les plantes sont à l'origine de nombreux médicaments et certains de leurs principes actifs entrent dans la composition de 70% des produits pharmaceutiques commercialisés dans les pays industrialisés, le tiers restant étant constitué de produits de synthèse [1,2].

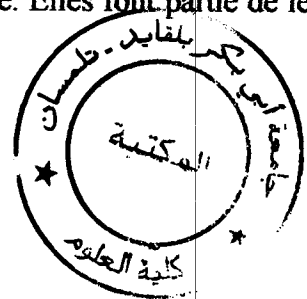
Les produits actuellement utilisés en phytothérapie sont testés et sélectionnés pour leur valeur thérapeutique et se présentent, pour la plupart, sous une forme galénique moderne, d'utilisation pratique, qui garantit l'intégrité de la plante et la bonne absorption de ses constituants par l'organisme [1-3].

Une plante médicinale contient un ensemble de principes actifs qui ont chacun un effet thérapeutique spécifique. L'action thérapeutique globale d'une plante ne se résume donc pas à un constituant isolé. Elle est la résultante de l'action de tous ses constituants. Nous parlons d'actions synergiques [4].

### II-Historique [5,6]

Lorsqu'il s'agit de l'histoire des plantes, il est fait souvent référence à la médecine grecque, habituellement à Hippocrate (300 ans av. J.C.), à Dioscorides (1<sup>er</sup> siècle de notre ère) ou à Galien (2<sup>e</sup> siècle de notre ère). A vrai dire, elle est beaucoup plus ancienne, et est liée à celle de l'Homme. En effet, dès que l'Homme est apparu comme espèce, il a dû chercher à subvenir à ses besoins nutritionnels, en sélectionnant des fruits sauvages, des feuilles à saveur agréable et des tubercules comestibles. Puis, sa vie sociale et son aptitude à communiquer, l'amènèrent à échanger avec ses semblables de nombreuses informations sur la qualité des végétaux qu'il a rencontrés ou expérimentés. Ceci lui a permis d'enrichir ses connaissances des plantes (les bonnes, les désagréables, les toxiques, etc.), et même de se spécialiser dans le traitement par les herbes, au sein des groupes structurés.

En Afrique, l'usage des plantes date de la nuit des temps. D'anciens textes égyptiens font état de l'emploi de plantes médicinales, en Afrique du Nord. Le papyrus égyptien Ebers (env. 1500 av. J.C.) mentionne environ 700 herbes et de nombreuses formules et indications. Les herbes font partie intégrante de la vie des habitants de l'Afrique. Elles font partie de leur culture.



Effet, les habitants se soignent, font des offrandes, exorcisent avec les plantes, et les utilisent, aussi, pour se protéger contre les mauvais esprits en les conservant dans les demeures et en faisant des fumigations. Et, bien que leur pouvoir thérapeutique soit coloré de magie et de mysticisme, plusieurs propriétés sont effectives. Il est à noter que des centaines de plantes sauvages et cultivées se vendent sur tous les marchés d'Afrique.

Autrefois, le commerce des plantes et de leurs substances (épices, arômes, etc.) était florissant, et les arabes eurent un rôle capital dans leur expansion. Dans l'Antiquité, ils commençaient déjà avec l'Inde, le Proche-Orient, et l'Afrique, si bien que les grecs crurent que de nombreuses substances végétales provenaient d'Arabie.

### **III-Phytothérapie & aromathérapie**

#### **III-1 La phytothérapie**

##### **a-Définition**

Etymologiquement, le terme phytothérapie vient de deux mots grecs : *phyton* (plante) et *therapeuein* (soigner). Il pourrait donc être traduit par : l'art de soigner à l'aide des plantes, ou encore la thérapeutique par les plantes [7,8].

Au sens large, le mot phytothérapie désignerait une médecine millénaire et universelle qui considère le règne végétal comme principale source de médicaments [9-12].

Nous pouvons distinguer deux types de phytothérapie [13] :

- *Une pratique traditionnelle* : parfois très ancienne basée sur l'utilisation de la plante sur la base de ces vertus découvertes empiriquement. Selon l'O.M.S, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle, et est encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est une médecine parallèle du fait de l'absence d'étude clinique.
- *Une pratique basée sur les avancées scientifiques et la recherche des principes actifs des plantes* : Cette phytothérapie est assimilée aux médicaments et selon les pays suit les mêmes réglementations (AMM, vente en pharmacie, etc.). Nous parlons alors de la pharmacognosie ou de la biologie pharmaceutique.

##### **b-Méthodes d'utilisation et de fabrication**

En phytothérapie traditionnelle, les plantes sont utilisées fraîches ou séchées, entrant ensuite éventuellement dans des préparations diverses afin de conserver leurs principes actifs et éviter toute décomposition. Elles sont administrées sous formes de teintures alcooliques, macérats, tisanes, poudres, etc. [1, 12,14].

Un procédé plus récent permet d'obtenir l'ensemble des principes actifs par broyage fin de la plante après séchage (cryobroyage). La poudre est macérée dans un mélange d'eau et d'alcool. Après purification, la solution est séchée jusqu'à obtention d'une nouvelle poudre. Cette poudre peut être présentée sous forme de comprimés, de gélules, de sachets, etc. [1].

### **c-Précautions d'emplois de la phytothérapie**

Avant l'utilisation des plantes, il est primordial de prendre conseil chez un phytothérapeute car certaines d'entre elles sont toxiques [15]. Nous devons donc observer les précautions suivantes lors de leurs usages :

- S'assurer qu'il n'y ait pas d'interaction avec le traitement médicamenteux en cours.
- Ne pas interrompre un traitement médical en cours.
- Avoir à l'esprit que des effets secondaires peuvent survenir.
- Prendre en compte les éventuelles sensibilités allergiques du patient.
- Etre attentif aux doses utilisées chez l'enfant ou la personne âgée.

### **III-2 Aromathérapie**

Elle désigne une branche particulière de la médecine par les plantes. Ce terme est composé de deux racines grecques : *arôma* signifiant parfum et thérapie [16-20]. Elle met en œuvre des huiles essentielles pures extraites de différentes plantes aromatiques appréciées pour leurs propriétés thérapeutiques [21,22].

D'une manière générale l'aromathérapie peut se définir comme une thérapeutique naturelle utilisant les extraits de plantes aromatiques. Elle s'intègre dans le cadre de la phytothérapie qui elle fait appel à toutes les plantes dotées de vertus médicinales [23].

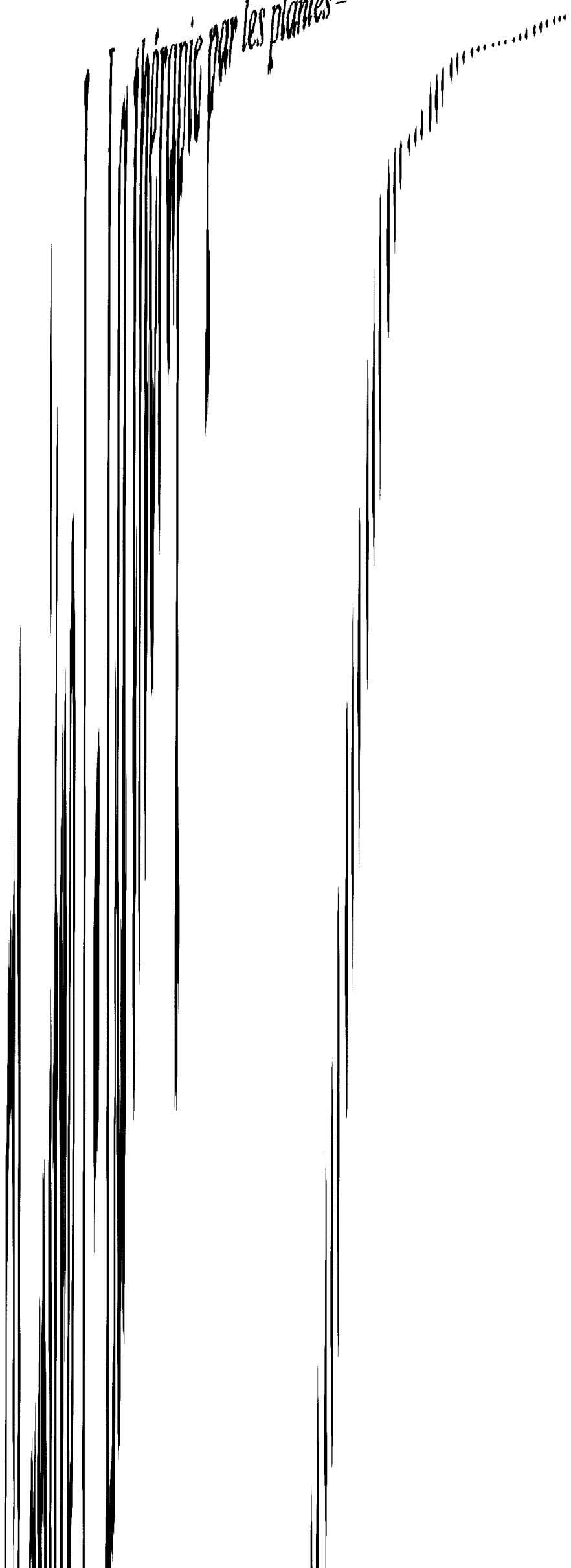
### **IV-Conclusion**

Les plantes constituent la source prioritaire et le réservoir inépuisable de la recherche des substances biologiquement actives. Ce patrimoine riche a servi et continu à servir les industries pharmaceutiques modernes à la mise en évidence des principes actifs et la production de médicaments universellement utilisés [24].

## Bibliographie

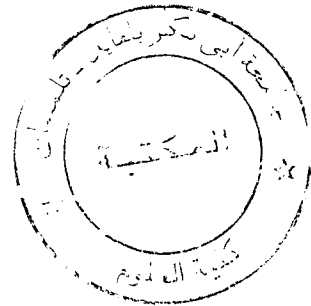
- [1] S. Lamassiaude-Peyramaure, *Actualités pharmaceutiques*, N° 476, 2008, p. 41.
- [2] S. M. Colegate, R. J. Molyneux, *Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination*, 2<sup>ème</sup> Ed. CRC press, cop., 2008, p. 1-605.
- [3] Y.-Z. Zhu, *Natural products : essential resources for human survival*, Ed. World Scientific, cop., 2007, p. 1-454.
- [4] D. Kassel, *Des hommes et des plantes*, Juillet 1996, p.1.
- [5] F. Baba Aissa, *Encyclopédie des plantes utilisée. Flore d'Algérie et du Maghreb substance végétale*, Ed. Librairie moderne, Rouïba, 1999, p. 145.
- [6] J. Quetin-Leclercq, *Le voyage insolite de la plante au médicament*, *J. Pharm. Belg.*, 2002, 57 :11
- [7] P. C. Rwangabo, R. Anton, *La médecine traditionnelle au Rwanda*, Ed. Karthala, 1993, p.52.
- [8] D. Scimeca, M. Tétou, *Votre santé par les plantes: Le guide phyto utile pour toute la famille*, Ed. S.M.A., 2005.
- [9] S. Gellé-Jonquois, *Secrets de beauté*, Ed. Borée, 2008, p.219.
- [10] E. Breitmaier, *Terpenes : flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*, Ed. Wiley-VCH, cop., 2006, p. 1-214.
- [11] S. D. Sarker, Z. Latif, A. I. Gray, *Natural products isolation*, 2<sup>ème</sup> Ed. Humana Press, cop., 2006, p. 515.
- [12] M. Paris, M. Hurabielle, *Abrégé de matière médicale – Pharmacognosie, Tome 2 (Monographies)*, Ed. Masson, 1986, p. 1-173.
- [13] D. Lamnaouer, *Plantes médicinales du Maroc : Usage et toxicité*, 2000.
- [14] B. Boufflers, *Soins naturels des dents*, Ed. Cheops, 2005, p. 7.
- [15] D.G. Barceloux, *Medical toxicology of natural substances*, Ed. John Wiley & Sons, cop., 2008, p. 1-1157.
- [16] L. M. Brian, *Essential oils*, Ed. Allured, cop., 2008, p. 1-201.
- [17] E. Teuscher, R. Anton, A. Lobstein-Guth, *Plantes aromatiques*, Ed. Médicales internationales, impr., 2005, p.1-522.

l'humidité par les plantes -



# **Chapitre II**

## **Botanique de la *Rhaponticum acaule* L.(Astéracées )**



## Botanique de la *Rhaponticum acaule* L. (Astéracées)

### I-Introduction

*Rhaponticum acaule* DC., aussi connu sous le nom de *Leuzea acaulis* ou *Centerea chamerrhaponticum* Ball., est une plante, parmi les plantes aromatiques, qui fleurit au printemps, de mars à mai. Elle pousse à l'état spontané en rosace sur les pentes des collines, des champs et dans les pâturages de sable. Il s'agit d'un genre mono spécifique appartenant à la famille des Astéracées [1].

C'est une espèce nord africaine, commune dans toute l'Algérie septentrionale, notamment dans les lieux sablonneux du littoral.

Les appellations locales sont : *تافغا tafgha*, *تافغيت tafghait*.

Ces termes sont indiqués par Ibn El-Baytar qui précise que la plante est acaule et qu'elle pousse en Afrique du Nord. Abderrezaq El-Djazairi mentionne *et-tafgha* sans aucun commentaire.

Le réceptacle du capitule de la rhapontique est comestible. Elle est souvent confondue avec d'autres Carduacées (Cynarées) acaules, notamment la carline (sans inconvénients), le chardon à glu (*Atractylis gummifera* L.) (Figure 1). Ce dernier a causé des empoisonnements accidentels bien des fois mortels, surtout chez les enfants. Il ressemble lui aussi d'une certaine manière à la rhapontique (Figure 2) [2].

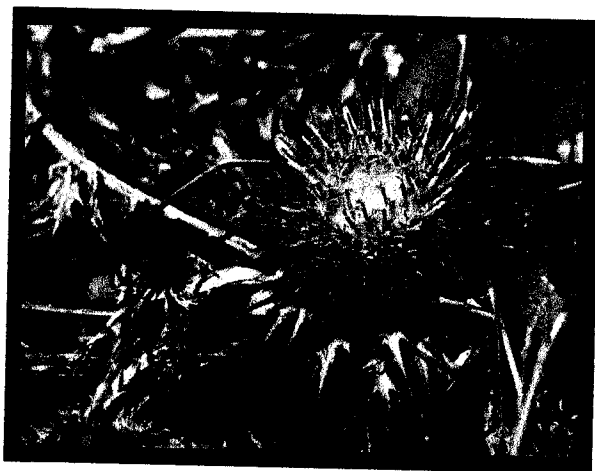


Figure 1 : Chardon à glu (*Atractylis gummifera* L.).



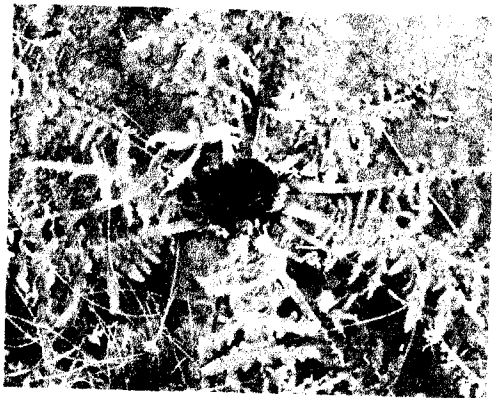


Figure 2 : Rhapontique (*Rhaponticum acaule* L.) en pleine floraison.

## II- Famille des Astéracées

### II-1 Introduction

La famille des Composées est devenue famille des Astéracées en raison du type d'organisation de son inflorescence et selon la nouvelle nomenclature [3]. La famille des Astéracées est une importante famille de plantes dicotylédones qui regroupent 20.000 espèces [4]. Ce sont essentiellement des plantes herbacées, des arbustes, quelque fois petits arbres. Ils sont, en proportions négligeables et groupés dans le genre Vernonia [5]. Elle comprend des espèces utilisées soit pour l'alimentation soit comme plantes ornementales, aromatiques ou médicinales [6].

### II-2 Caractères généraux [7]

Ce sont des herbes à feuilles simples, leurs inflorescences sont des capitules. Chaque fleur est en général assez ténue, mais le rapprochement sur un plateau commun (le réceptacle) de nombre d'entre elles rend l'ensemble massif. Chacune des fleurs possède un calice (parfois original), une corolle et des pièces sexuées. Parfois, les deux sexes coexistent, la fleur est hermaphrodite, parfois le gynécée est seul présent, la fleur est femelle. L'androcée se singularise par la soudure de ses cinq anthères en un tube (ce sont des Synanthérées).

L'ovaire est infère et devient, après fécondation, un akène souvent surmonté d'un Pappus. Selon le groupement des fleurs tubulées ou ligulées au niveau des inflorescences de chaque espèce, nous distinguons, communément, quatre sous familles :

- Le liguliflores : les capitules sont constitués de fleurs toutes ligulées bisexuées à valeur de demi-fleurons (comme le Pissenlit).
- Les tubuliflores : les capitules sont constitués de fleurs toutes tubulées, bisexuées à valeur de fleurons (comme les Chardons).

- Les radiées : les capitules regroupent, à la fois, des fleurs périphériques ligulées (ou demi-fleurons blancs ou jaunes) et des fleurs centrales tubulées (ou fleurons) comme la Marguerite.
- Les labiatiflores : regroupent surtout les espèces sud-américaines avec des capitules à fleurs toutes, ou pour une partie d'entre elles seulement, bilabiées.

### III- Présentation générale de la plante étudiée

#### III-1 Systématique

- Règne : Plantae
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous embranchement : Angiospermes
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Dicotyledoneae, Dicotylédones, Magnoliopsida
- Sous-classe : Asteridae
- Ordre : Astérales
- Famille : Astéracées
- Genre : *Rhaponticum*
- Espèce : *Rhaponticum acaule* L.

#### III-2 Description botanique [8]

C'est une plante vivace, acaule. Les feuilles sont grandes disposées sur le sol en rosettes, vertes en dessus et blanches-tomenteuses en dessous, coriaces, les toutes externes parfois entières, obovées ou oblongues, les autres pinnatiséquées. Il existe un très gros capitule solitaire et sessile au centre de la rosette, à fleurs jaunes, à odeur d'œillet. Les capitules homogames, multiflores, à fleurs toutes tubuleuses et égales, hermaphrodites et fertiles. L'involucre à bractées multisériées et apprimées, marges scarieuses et à sommet se termine en appendice scarieux et lacéré, argentées sur la face interne. Le réceptacle est charnu, fimbrié. Les akènes sont anguleux. L'aigrette est formée, de poils multisériés, scabres, roux, rigides et cassants, particulièrement longs.

#### III-3 Usages thérapeutiques

La *Rhaponticum acaule* L. possède des vertus médicinales. Elle est considérée comme bénéfique pour les cellules hépatiques, et possède plusieurs autres propriétés parmi lesquelles : apéritive, cholagogue, dépurative, digestive, stomachique, tonique, etc. [2].

Plusieurs espèces du genre rhapontique sont utilisées en médecine traditionnelle :

- *Rhaponticum uniflorum* : la racine est utilisée contre l'intoxication et pour le traitement de la fièvre. Elle inhibe la peroxydation des lipides membranaires et possède une activité anti-athérosclérotique [9].
- *Rhaponticum caroténoïde* : Elle est utilisée dans les diverses formules de boissons, médicaments hygiéniques, les préparations des lubrifiants, les crèmes, les shampooings. Par ailleurs, certains extraits de la plante possèdent des propriétés pharmacologiques [10-12].

## Bibliographie

- [1] G. Pottier-Alapetit, Flore de la Tunisie. Angiospermes-Dicotylédones Gamopétales. Publications Scientifiques Tunisiennes, 1981, p. 1070.
- [2] F. Baba Aissa, Encyclopédie des plantes utilisées. Flore d'Algérie et du Maghreb substance végétale, Ed. Librairie moderne, Rouïba, 1999, p. 145.
- [3] J. Fleurentin, J. Pelt, Guérisseurs et plantes médicinales du Yémen, Ed. Kartala, 2004, p. 203.
- [4] J. Tardif, Société des amis de jardin Vaan Den Hende, Université Laval, Une visite de jardin Roger-Van Den - un parcours de l'évolution des végétaux, Ed. Illustrated, 2003, p.137.
- [5] D. Normard, J. Paquis, Manuel d'identification des bois commerciaux, Tome 2, Ed. Quae, 1976, p. 208.
- [6] M. Hullé, Association technique agricole, Evelyne Turpeau-Ait, les pucerons des plantes maraichers: cycles biologiques et activité de vol, Ed. Quae, 1999, p. 13.
- [7] B. Borullard, Dictionnaire : Plantes et champignons, 1997, p. 73.
- [8] P. Quezel, S. Santa, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2, Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 1963, p. 1170.
- [9] Y.H. Zhang, J.K. Cheng, L. Yang, D.L. Cheng, Triterpenoids from *Rhaponticum uniflorum*, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2002, 49, 117–24.
- [10] M.B. Plotnikov, O.I. Aliev, A.S. Vasilje, M.Y. Mason, G.A. Chernyshova, E.A. Krasnov, Haemorheological activity of extracts of the above-ground parts of *Lychnis chalconica* L. and *Rhaponticum carthamoides* (Willd.), Iljin under experimental myocardial infraction. *Rastitelnye Resursy*, 1999, 35:103–7.
- [11] V. Petkov, K. Roussinov, S. Todorov, M. Lazarova, D. Yonkov, S. Draganova, Pharmacological investigations on *Rhaponticum carthamoides*, *Planta Med.*, 1984, 50, 205–9.
- [12] G. Pintore, M. Usai, P. Bradesi, C. Juliano, G. Boatto, F. Tomi, Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica, *Flavour Fragr. J.*, 2002, 17, 15–9.

## ***Chapitre III***

# ***Les substances actives dans les plantes***

## Les substances actives dans les plantes

### I- Introduction

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques, etc.), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agro-alimentaire [1].

### II- Les métabolites secondaires

#### II-1 Introduction

Les métabolites secondaires sont des substances cytoplasmiques qui ne sont pas propre à chaque cellule, mais qui sont caractéristiques de certaines espèces, genres ou familles [2]. Ils se rencontrent, généralement, en faible quantité et leur production peut être soit largement répandue soit limitée [3]. La plus part, de ces derniers fonctionnent comme signaux chimiques qui permettent à la plante de répondre aux contraintes de l'environnement, d'autres, interviennent dans la défense contre les herbivores, les pathogènes etc. Ainsi, certains assurent une protection contre les radiations solaires [4,5].

Parmi les métabolites secondaires, nous citons les alcaloïdes, les polyphénols, les coumarines, les quinones, les anthocyanosides, les anthracénosides etc. [4].

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à l'étude des polyphénols et à l'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de la *Rhaponticum acaule* L.

#### II-2 Les polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal [6]. Ils sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autre constituants [7].

Ces composés résultent biogénétiquement de deux voies synthétiques principales [8] :

- *La voie de shikimate* : c'est la voie la plus courante, elle conduit des oses aux acides aminés aromatiques (tyrosine et phénylalanine). La désamination de ces derniers fournit les acides cinnamiques et leurs dérivés : lignanes, coumarines, acides benzoïques etc.
- *La voie par l'acétate* : conduit à des polyacétates, des quinones, isocoumarines, etc.

### **II-2-1 Distribution et variations des polyphénols**

Une des caractéristiques des polyphénols, qu'ils partagent généralement avec l'ensemble des métabolites secondaires, est de montrer une répartition très inégale chez les différentes espèces végétales et, pour une même espèce, selon la variété et le stade d'évolution physiologique. Les variations sont, généralement, considérables selon la nature des tissus et des cellules composant le végétal [1].

### **II-2-2 Propriétés physico-chimiques**

Ce sont des molécules hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000. Ils sont nucléophiles, réducteurs et complexants. Ces caractères sont en relation avec leurs propriétés biologiques : expression de la couleur, effet antioxydant, interaction avec les métaux, les protéines, et les polysaccharides.

Les perspectives de recherche sur les polyphénols sont associées aux espèces oxygénées réactives, formes radicalaires activées de l'oxygène à l'origine de nombreuses pathologies. Les polyphénols en réponse, piègent des radicaux libres accompagnants d'autres mécanismes de défense (enzymes, antioxydants) [9].

### **II-2-3 Rôles des polyphénols**

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme. Ils peuvent, en effet, intervenir :

- Dans certains aspects de la physiologie de la plante (régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites, etc.).
- Dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, résistantes à l'UV, etc.).
- Dans les critères de qualité (couleurs, qualités nutritionnelles, etc.) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux.
- Dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies [1]. En effet, leur rôle d'antioxydant naturel suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer [10], des maladies inflammatoires [11], cardiovasculaires [12] et neurodégénératives [13].

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes, est, souvent, corrélée avec la teneur en composés phénoliques [14].

## II-2-4 Classification des polyphénols [8,15]

En se basant sur la structure carbonée de base, nous pouvons dégager les principales classes des composés phénoliques suivantes :

**Tableau 1 : Classification des polyphénols.**

<b>Squelette carboné</b>	<b>Classe</b>	<b>Exemple</b>	<b>Origine</b>
C6	Phénols simples	Hydroquinone	Busserole
C6-C1	Ac. Hydroxybenzoïques	Ac. <i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraises
C6-C3	Ac. Hydroxycinnamiques	Ac. <i>p</i> -coumarique	Tomates, ail
	Coumarines	Ombelliférone	Carottes, Coriandre
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C6-C2-C6	Stilbénoides	Trans-resvératrol	Raisin
C6-C3-C6	Flavonoïdes	Kaempférol	Fraises
	Isoflavonoïdes	Daidzéine	Graines de Soja
	Anthocyanes	Delphinidol	Raisin cabernet-savignon
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanes	Entérodiol	Bactéries intestinales
(C6-C3) <sub>n</sub>	Lignines	/	Bois, fruits à noyaux
(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Tanins condensés	Procyanidol	Raisin, Kaki

Dans cette panoplie de composés, nous nous sommes intéressés, de près, aux tanins et aux flavonoïdes. Cet intérêt est motivé par la richesse de notre plante en ces composés.

## II-2-5 Les tanins

### II-2-5-1 Généralités

Les tanins sont des polyphénols hydrosolubles de masse molaire comprise entre 500 et 3000g/mole. Ils présentent des cycles aromatiques greffés d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles [16]. Leur structure chimique, leur confère une capacité très développée à se fixer sur toute sorte de molécules, essentiellement, les protéines.

Les tanins sont localisés dans les différents organes : tiges, feuilles, fruit ou grains. Les plantes les plus riches en tanins sont les Ericacées, les Légumineuses, les Rosacées et les Salicacées [17].



### II-2-5-2 Classification

En 1920, Frenenberg [16] répartit les tanins selon un critère de structure en deux classes : les tanins condensés et les tanins hydrolysables (Figure 3).

- *Les tanins condensés* ou les proanthocyanidines : Se sont des polymères à noyau flavone. Leur poids moléculaire est élevé (1000 à 3000). Ils possèdent une forte affinité pour les protéines, auxquelles sont liés en C4-C8 [6]. Leurs précurseurs sont des flavan-3-ols (catéchine et épicatechine) et flavan-3,4-diols [1]. Ils sont présents dans nombreuses plantes, notamment, les pommes, l'écorce de pin, la cannelle, les pépins et la peau de raisin, les vins rouges et le cacao. Nous en trouvons aussi dans les myrtilles, airelles cassis, thé vert et thé noir [18-20]. Ce sont des antioxydants dotés d'un fort pouvoir protecteur sur la santé humaine [21].

- *Les tanins hydrolysables* : Se sont des esters de sucres simples (glucose ou xylose, principalement) et d'acides phénoliques. Par hydrolyse acide, alcaline ou enzymatique, les acides phénoliques libérés sont l'acide gallique ou l'acide ellagique. Ceci divise les tanins hydrolysables en deux sous classes : les tanins galliques (gallotanins) et les tanins ellagiques (ellagitanins). Contrairement aux tanins condensés, ils ne sont présents que chez les dicotylédones. Le plus connu est l'acide tannique extrait de la galle de chêne (*Quercus infectoria*). D'autres tanins hydrolysables sont extraits industriellement tels ceux de diverses galles ou cœur de bois de variétés de chêne et de châtaignier (*Castanea sativa* et *dentata*) [16]. Ils ont un poids moléculaire plus faible (300-500) et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés. Ils peuvent, aussi, diminuer la dégradation des parois dans le rumen et être hydrolysé dans l'intestin en libérant des produits toxiques pour le foie et le rein [6,16].

La différence structurale des deux classes de tanins est responsable de leur comportement chimique spécifique. En effet, en milieu acide, alors que les tanins hydrolysables sont hydrolysés, les tanins condensés donnent des composés colorés (les anthocyanidines). Les produits résultants de l'hydrolyse tendent à se polymériser. Il y a également apparition d'un précipité de polymères insolubles (les phlobaphènes) [16].

### II-2-5-3 Propriétés physico-chimiques

Les tanins se dissolvent dans l'eau en formant des solutions colloïdales. Leur solubilité varie selon le degré de polymérisation ; elle diminue lorsque celui-ci augmente. Ils sont solubles dans les alcools et l'acétone. Comme tous les phénols, les tanins réagissent avec le chlorure ferrique. Ils sont précipités de leurs solutions aqueuses par les sels de métaux lourds et par la gélatine [8].

#### **II-2-5-4 Caractérisation**

La caractérisation des polyphénols est résumée comme suit :

- Les tanins galliques et ellagiques donnent des colorations et des précipités bleu-noir en présence des sels ferriques.
- Les tanins condensés fournissent des précipités bruns verdâtres.
- Les tanins galliques donnent une coloration rose avec l'iodure de potassium. Ce dernier colore l'acide gallique libre en orange.
- Les tanins ellagiques sont colorés par l'acide nitreux en milieu acétique en rose. Cette coloration vire, ensuite, au pourpre puis au bleu.
- Les tanins condensés sont colorés en rouge par la vanilline chlorhydrique.

L'analyse des extraits fait appel aux techniques chromatographiques habituelles: CCM (sur cellulose ou silice, révélation par examen des fluorescences en UV et par les réactifs cités ci-dessus) et CLHP (phases inverses, solvants alcooliques légèrement acides) [8].

#### **II-2-5-5 Actions des tanins**

La présence des tanins dans une plante est à l'origine de plusieurs activités, notamment : astringente, anti-diarrhéique, antibactérienne, anti-virale (ellagitanin), et hémostatique [22]. Ils tannent la peau et les muqueuses de façon à les rendre insensibles aux processus inflammatoires et peuvent, dans le cas d'une présence trop concentrée, être sclérosant ou bloquant [23]. Aussi, les tanins tendent à réduire l'efficacité de l'utilisation alimentaire des plantes qui en contiennent, et à réduire la vitesse de croissance ainsi que la survie des animaux qui s'en nourrissent [3].

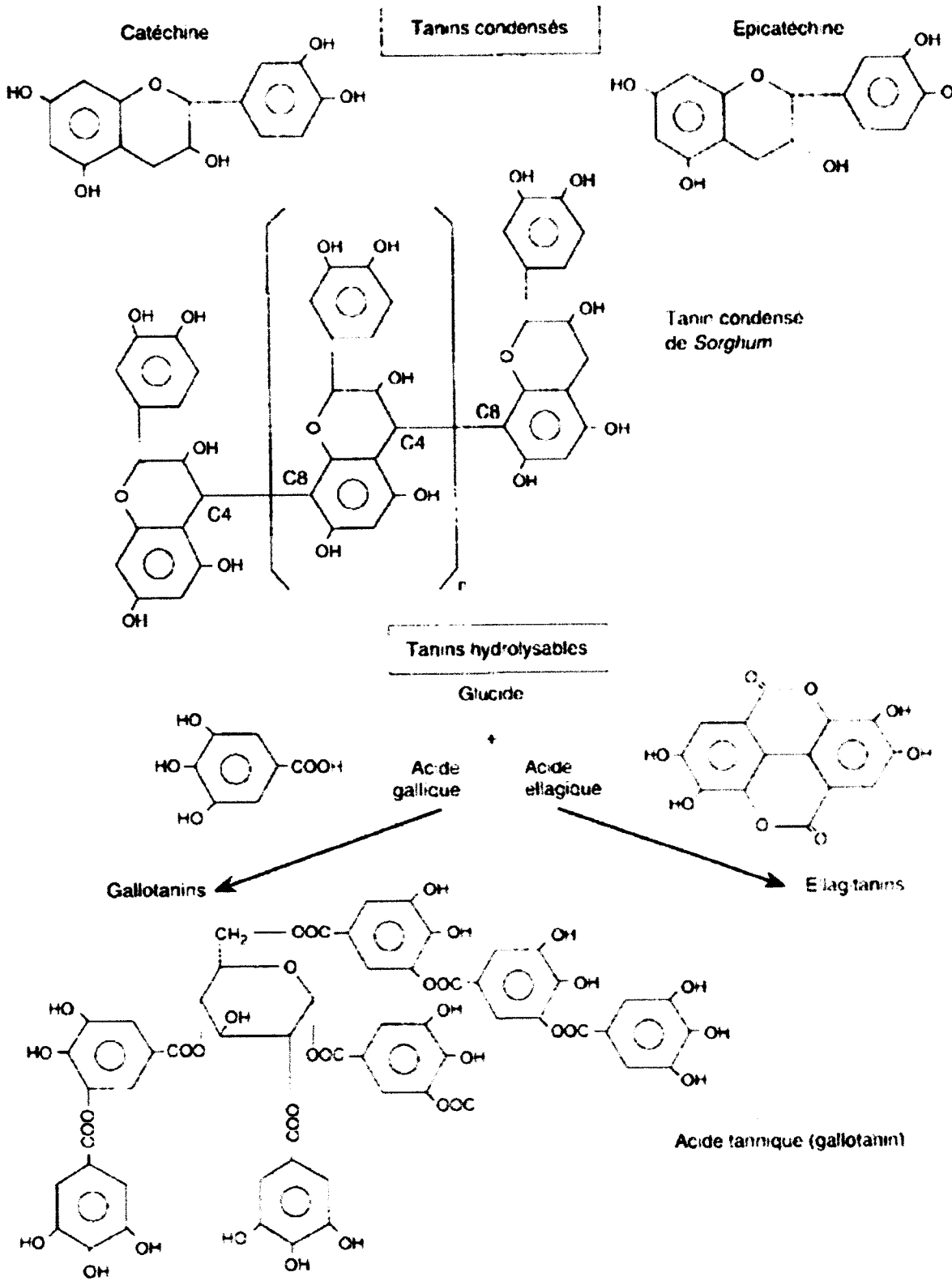


Figure 3 : Exemple de tanins végétaux.

## II-2-6 Les flavonoïdes

### II-2-6-1 Généralités

Les flavonoïdes sont des constituants caractéristiques des végétaux. Ils sont, entre autres, responsables de la pigmentation des fleurs et des fruits et sont distribués dans toute la plante. Nous en recensons, aujourd'hui, 45100 répartis en différentes classes (anthocyanines, flavonols, flavones et iso-flavone) [24].

La structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation permettent de distinguer les différentes classes des flavonoïdes (Figure 4) [1].

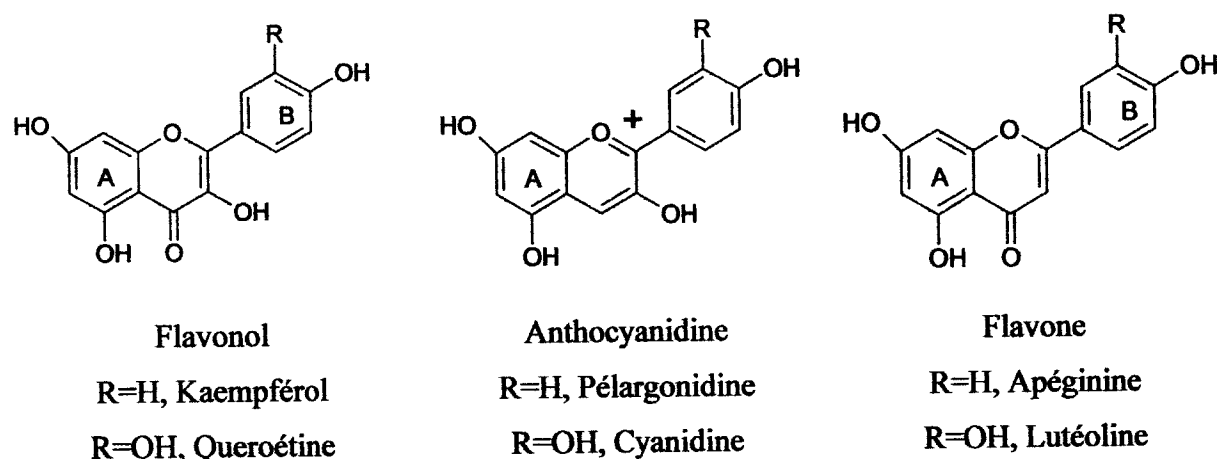


Figure 4 : Quelques exemples de flavonoïdes.

La plus part, des flavones et flavonoles sont des pigments jaunâtres ou ivoire. Certaines sont incolores. Ces dernières peuvent modifier la couleur d'une plante en formant des complexes avec des anthocyanes et des ions métalliques. Ce phénomène appelé co-pigmentation est responsable de la couleur bleu intense des fleurs [4]. Les anthocyanes sont des pigments rouges, violet ou bleu. Ils sont présents dans le cassis, la myrtille, la fraise, le radis, le chou rouge etc. [25].

### II-2-6-2 Propriétés biologiques

Les pigments floraux agissent comme signaux visuels pour attirer les pollinisateurs (oiseaux, abeilles). Ils interviennent dans les interactions entre les plantes et d'autres organismes [4] et pourraient avoir un rôle dans certains processus d'oxydo-réduction de croissance de respiration et dans la morphogénèse des plantes. En outre, il a été démontré que leur forte absorption dans l'UV protège les plantes contre les rayonnements nocifs. Leur intervention dans les mécanismes de la pollinisation,

liée à leur couleur est essentielle. Certains flavonoïdes situés au cœur du bois ont aussi des propriétés fongicides et insecticides qui préservent l'arbre des attaques des champignons et des insectes.

Enfin, dans les feuilles, ils peuvent avoir un rôle répulsif ou attractif sur les insectes herbivores permettant ou non leur consommation [26].

### II-2-6-3 Propriétés thérapeutiques

Les flavonoïdes sont utilisés comme diurétiques pour leur activité vitaminique P, c'est-à-dire leur pouvoir d'augmenter la résistance et de diminuer la perméabilité capillaire sanguine [27].

- *Les mono et bi flavonoïdes* : Se sont des activateurs hépatocellulaires, des inhibiteurs de la peroxydation des lipides. En effet, ils empêchent les graisses de l'organisme de trop s'abimer et ont une action retardatrice du catabolisme des protéoglycones, substances situées au niveau articulaire.
- *Les isoflavonoïdes* : une action anti-tumorale des dérivés flavonoliques comme les rutosides qui sont d'excellents protecteurs vasculaires et les pécapitosides qui ont une action diurétique et azotémique.
- *Les anthocyanes* : Elles ont une action anti-inflammatoire et selon les familles des plantes, elles possèdent des propriétés anti-diarrhéiques, cholagogue astringente. A forte dose les anthocyanes peuvent être toxiques, poissons apparentés aux cyanures [22].

### II-2-7 Extraction, caractérisation et dosages des polyphénols [1]

Les méthodes de séparation, de dosage et d'identification des composés phénoliques ont fait des progrès spectaculaires au cours des trente dernières années, grâce, en particulier, à l'utilisation quasi systématique de la RMN, CPG/SM, CLHP/SM, etc.

La présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques hydroxylés dans les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir du matériel végétal, les caractériser chimiquement et les doser. Cependant, il faut noter que ces propriétés peuvent s'exprimer différemment selon la complexité de la molécule concernée et le nombre de groupements hydroxyles portés par chacun des cycles benzéniques.

Le schéma général des différentes étapes d'extraction, de caractérisation et de dosage des polyphénols est représenté sur la figure 5. Il est à noter que ce procédé doit être modifié pour être mieux adapter à la nature chimique des polyphénols étudiés, leur solubilité et leur degré de liaison avec d'autres constituants végétaux.

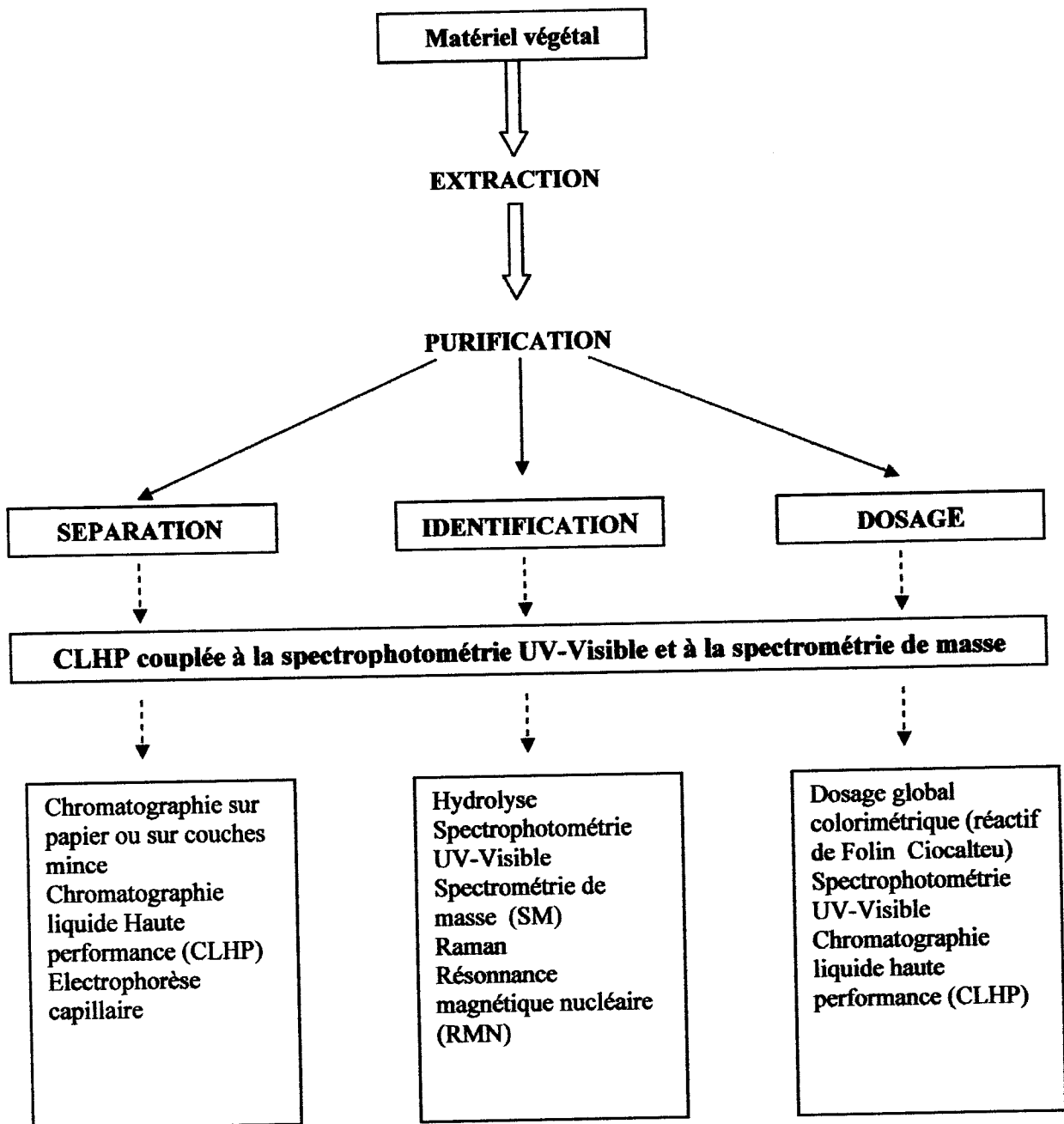


Figure 5 : Schéma récapitulatif des extractions et analyses des polyphénols.

- Caractérisation et dosage des polyphénols par leur spectre d'absorption en UV-Visible [1]

Le dosage des composés phénoliques utilise, très fréquemment, leur spectre d'absorption, soit dans le visible (anthocyanes, flavonols, etc.), soit dans l'UV pour la plupart des autres composés, en choisissant pour chacun d'eux la longueur d'onde d'absorption maximale. Le spectre d'absorption résulte de la présence combinée du (ou, des) cycle(s) benzénique(s), des fonctions OH portées par ce(s) cycle(s) benzénique(s) et des différentes doubles liaisons présentes dans la molécule.

La concentration du composé phénolique en solution est déduite en utilisant la loi classique de Beer Lambert qui lie cette concentration C en mole/l à la densité optique DO mesurée sur le spectre d'absorption :

$$DO = \epsilon \times C \times l$$

$\epsilon$  : Le coefficient d'extinction du composé considéré à la longueur d'onde utilisée pour la mesure.

l : largeur de la cuve de mesure exprimée en cm.

### II-3 Les Huiles Essentielles (H.E)

#### II-3-1 Historique

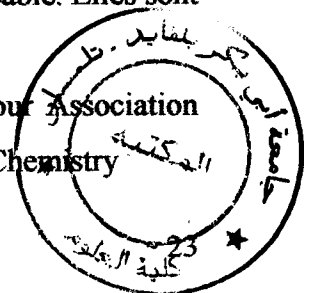
L'utilisation des arômes pour soigner n'est pas une technique récente. Dans toutes les civilisations de l'antiquité, la mention des arômes est présente, pour des usages religieux, cosmétiques, mais aussi thérapeutiques. D'abord, l'homme se servit des plantes entières pour apporter soulagement et bien-être sous forme d'infusions, de macérations et de décoctions [28], ensuite, il s'est intéressé à en retirer leur principe aromatique [29]. En cela l'Inde, la Chine et l'Égypte semblent avoir été à l'origine de la recherche.

#### II-3-2 Définition

Les H.E appelées encore 'essences' ou 'essences aromatiques végétales' sont les substances odorantes, volatiles et de consistance huileuse, contenues dans les plantes. Elles sont fabriquées à partir des sucres issus de la photosynthèse, par des cellules sécrétrices situées, le plus souvent, dans les fleurs et les feuilles. Mais il est aussi possible d'utiliser le fruit, le bois ou encore la racine du végétal considéré [28, 30, 31].

Elles sont le parfum des plantes. Lorsque nous humons une rose, que nous épluchons une orange ou que nous fripons une feuille de menthe ou de romarin entre les doigts c'est l'H.E qui se volatilise et qui nous fait éprouver cette sensation olfactive si agréable. Elles sont à la fois des parfums et des remèdes naturels [32].

Pour l'internationale Standard Organisation (I.S.O, 1997) comme pour l'Association Française de Normalisation (A.F.N.O.R, 1998) ou l'Américain Essential Oils Chemistry



(A.E.O.C), le terme H.E désigne les produits, généralement, odorants obtenus, soit par des procédés mécaniques soit par distillation sèche.

Elles sont très utilisées en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie et en cosmétique. Leur utilisation est liée à leurs différentes activités biologiques reconnues [33].

La plupart des végétaux renferment des H.E, mais habituellement en quantité infime. Seules les plantes dites 'aromatiques' en produisent en quantité suffisante comme les Labiées (lavande, thym, menthe, etc.), les Ombellifères (cumin, carvi, anis, fenouil, etc.), des Rutacées (citron, orange, etc.), et des Lauracées (cannelle, camphrier, sassafras, etc.) [32].

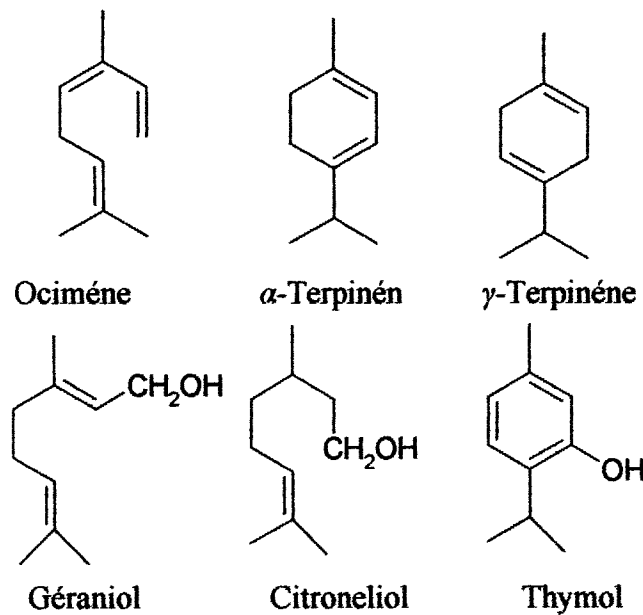


Figure 6 : Quelques structures rencontrées dans les H.E.

### II-3-3 Propriétés physiques

En général, les H.E sont liquides, insolubles dans l'eau, solubles dans les alcools, les huiles et la vaseline. Elles sont volatiles, incolores, jaune pale ou quelque fois bleue. Leur densité est inférieure à 1 sauf celles du giroflier, cannelle, et sassafras. Les H.E sont très altérables et s'oxydent avec la lumière et au contact de l'air [34].

### II-3-4 Classification des H.E

Les H.E sont classées sur la base d'un certain nombre de critères comme leur couleur, leur composition élémentaire, la fonction de leur constituant principal, [35,34].



**a- Selon leur couleur**

Les H.E incolores : dépourvues de résine et d'azulène (noix de muscade, etc.).

Les H.E jaunes : renferment des résines (anis, fenouil, etc.).

Les H.E bleues : contiennent l'azulène.

Les H.E vertes-brunes ou jaunes-vertes : contiennent principalement l'azulène et les colorants (patchouli).

**b- Selon leur composition élémentaire**

Les essences hydrocarbonées : riches en terpènes et sont les plus répandues.

Les essences oxygénées : généralement solides.

Les essences sulfurées.

**c- Selon la fonction de leur constituant principal [35,34]**

**Tableau 2 : Exemples des H.E.**

<b>Fonction</b>	<b>Exemple</b>
Carbures terpéniques et sesquiterpéniques	H.E de térébenthine : pinène, camphène H.E de genévrier : pinène, camphène, cadinène H.E de citron : limonène
Alcools	H.E de coriandre : linalol H.E de bois de rose : linalol H.E de rose : géranol
Mélange d'esters et d'alcools	H.E de lavande : linalol, acétate de linalyle H.E de menthe : menthol, acétate de menthyle
Aldéhydes	H.E de cannelle : aldéhyde cinnamique H.E de citronnelle : citral et citrannal H.E d'eucalyptus citriodora : citronellal
Cétones	H.E de carvi : carvone H.E de sauge : thuyone H.E de thuya : thuyone
Phénols	H.E de thym : thymol H.E de sarriette : carvacrol H.E d'origan : thymol et carvacrol Huile essentielle de girofle : eugénol

Éthers	H.E d'anis vert, de badiane : anéthol
	H.E de fenouil : anéthol
	H.E d'eucalyptus globulus : eucalyptol
	H.E de cajepout : eucalyptol
	H.E de niaouli
Peroxydes	H.E de chénopode : ascaridol
	H.E d'ail : allicine

### II-3-5 Les méthodes d'extraction des H.E

#### a- Entraînement à la vapeur [8]

L'hydrodistillation simple consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic remplis d'eau puis porter l'ensemble à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et H.E se sépare par différence de densité.

Dans la distillation à vapeur saturée, le végétal n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. Pour raccourcir le temps de traitement, limiter l'altération des constituants d'H.E et économiser l'énergie, il est possible de travailler en surpression modérée (1 à 3 bars). La conséquence de la surpression étant une augmentation de la température.

#### b- Expression à froid

Elle est appelée aussi expression mécanique. Elle se fait par :

- *Écoulement naturel* : l'incision du tronc de certains arbres permet de recueillir un baume ou une gomme, par exemple pour le *commiphora* (myrrhe), le laurier de Guyane, ou le camphrier de Bornéo.
- *Écrasement de plantes* (surtout les agrumes) : en pressant les zestes, nous obtenons une émulsion d'eau et d'H.E qui doit ensuite être centrifugée et filtrée [32].

#### c- Extraction par solvants

Cette méthode est utilisée pour les plantes fragiles. Ces dernières sont plongées dans un solvant organique provoquant la dissolution des substances aromatiques. Après séparation du solvant par distillation, nous obtenons un produit cireux solubilisé dans l'alcool. L'élimination de l'alcool par évaporation conduit à l'H.E dite absolue [32]. Comme il est difficile d'éliminer complètement les traces de solvants, nous utilisons que très exceptionnellement ces H.E en médecine [30].

#### **d- Percolation**

La percolation est appelée aussi l'hydrodiffusion. Elle diffère de la distillation à la vapeur seulement par le fait que la vapeur entre dans l'alambic par le haut, donc au-dessus des plantes, et non par dessous. La percolation convient parfaitement aux bois ou aux matériaux fibreux, car la vapeur peut s'y infiltrer [36].

#### **e- Enflourage**

Cette méthode utilise des graisses, comme solvant, pour leur forte affinité avec les composés odorants. Elle est très peu utilisée de nos jours [31,37].

### **II-3-6 Modes d'utilisation des H.E**

Les H.E peuvent s'utiliser par différentes voies. Leur emploi nécessite le respect de certaines règles afin de bénéficier de leur efficacité et éviter les désagréments dus à un mauvais usage. Les H.E s'utilisent en usage interne ou externe.

#### **a- En usage interne**

- *Par voie orale* (ou buccale) : Il ne faut pas les utiliser pures, mais diluées de 5 à 15 % car elles peuvent provoquer des brûlures digestives.

- *Par voie rectale ou vaginale* : Elles sont administrées sous forme de suppositoires (rectal) et sous forme d'ovules (vaginale).

Ces deux voies permettent d'éviter le système digestif, donc la diffusion dans l'organisme se fait par circulation générale.

- *Par voies respiratoires* : les particules inhalées vont pénétrer profondément dans l'arbre respiratoire et recouvrir la muqueuse. La surface considérable de celle-ci, et sa très riche vascularisation vont faciliter la pénétration des H.E et leurs constituants dans la circulation.

#### **b- En usage externe**

- *Par voie transcutanée* : Elle permet une pénétration facile et rapide de l'H.E qui va se diffuser dans la microcirculation périphérique puis dans la circulation générale où elle va exercer son activité. En effet, les végétaux synthétisent des molécules naturelles dont le poids moléculaire est adapté au passage transcutané.

Voici quelques techniques en usages externes :

- *Bains* : Appelés aussi 'Bains aromatiques'. Dans ce cas, les H.E ne doivent jamais être versés directement dans l'eau. En effet, les huiles, par définition, ne sont pas hydrosolubles. Il faut donc les mélanger (3 à 10 gouttes) avec, par exemple, du jaune d'œuf, du lait en poudre, ou encore du

miel, avant de les placer dans l'eau du bain. Nous pouvons aussi les additionner à des produits comme : bains moussants ou gels douche, à la dose de 3 à 5%. Il est conseillé de prendre dans ces conditions, des bains chauds (37°C) pendant une durée variant de 5 à 15 mn.

- *Massage* : Les H.E sont, souvent, conseillées en massage. 5 à 10 gouttes d'H.E sont utilisées par massage ou diluées (15 à 30 ml pour 100 ml d'huile neutre).

- *Embaumement aromatique* : Cette opération consiste à utiliser une grande quantité d'H.E pure (10 à 15 ml/jour) par massage, puis par enveloppement (bandes Velpeau) de la région considérée.

- *Masques* : 1 à 5 gouttes d'H.E sont déposées dans 3 cuillères à soupe de miel ou d'argile. Après mélange, nous étalons le produit obtenu sur la peau pendant 5 à 10 minutes avant de rincer la peau à l'eau tiède.

### II-3-7 Action thérapeutique [38-46]

La composition chimique des H.E est à l'origine de plusieurs activités :

- *Activité antibactérienne*: Capacité des H.E à s'opposer à la reproduction des bactéries en les détruisant. Les molécules aromatiques possédant le coefficient antibactérien le plus élevé sont les phénols, ensuite viennent les aldéhydes, les cétones.
- *Activité antiviral*: Les virus responsables de certaines pathologies comme le zona, l'herpès, la grippe, le sida sont traités avec succès par certaines huiles essentielles alors qu'à ce jour la médecine chimique se trouve désarmée. Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques et certaines pathologies virales graves se trouvent très nettement améliorées grâce à elles.
- *Activité antifongique*: Ce sont des H.E pour s'opposer au développement des champignons, des moisissures en les détruisant.
- *Activité antiseptique*: S'opposent au développement des germes microbiens et les détruisent.

Aussi, elles peuvent avoir une action dans des domaines plus larges : antalgiques, analgésiques, cicatrisantes, digestives (basilic exotique). Elles régulent l'immunité (ravensare aromatique), et sont très efficaces dans les troubles nerveux (*Lavandula vera*).

### II-3-8 Facteurs influençant la composition d'une H.E

Les facteurs influençant la composition d'une H.E sont résumés comme suit :

- L'espèce, la variété: préciser le nom de la plante en utilisant la nomenclature binomiale (genre, espèce).
- La drogue : organe utilisé.

- L'origine géographique.
- La période de récolte.
- Le chimiotype: exemple thym à thymol, à carvacrol, à géraniol, à linalol, etc.
- Le mode de préparation: au cours de l'hydrodistillation, l'eau et l'acidité peuvent provoquer des hydrolyses. Le chauffage peut également modifier la composition chimique.
- La durée et le mode de conservation: la durée de conservation varie entre 12 et 18 mois à l'abri de la lumière dans des flacons teintés ou en acier inoxydable. Au-delà de cette durée, une modification de la composition chimique est possible,

### **II-3-9 Précautions d'emplois [38,47]**

Les H.E sont très actives car elles sont constituées d'un concentré de molécules terpéniques lipophiles passant très bien toutes les barrières intestinales, cutanées, pulmonaires, etc. Mal employées, utilisées à mauvais escient ou à des doses inadaptées, elles peuvent être responsables d'effets secondaires importants. C'est pourquoi, il est impératif de :

- ne pas remplacer une huile par une autre,
- respecter la posologie à la goutte près,
- ne pas utiliser les H.E de façon prolongée, même à faible dose, et donc de respecter des durées thérapeutiques de trois semaines lors d'un traitement chronique.
- Chez un patient allergique, il est préférable de faire un test de l'huile dans le pli du coude (deux ou trois gouttes) pour constater la survenue éventuelle d'une réaction qui déterminera l'emploi ou non de l'huile.
- Il convient aussi de ne jamais mettre d'H.E, même diluées, dans l'œil. L'administration d'H.E est à éviter pendant la grossesse et chez l'enfant de moins de trois ans.

## Références bibliographiques

- [1] J.J. Marcheix, A. Fleuriet, C. Jay-Allemand, Les composés phénoliques des végétaux: Un Exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Ed. PPUR presse Polytechniques, 2005, p.1-33.
- [2] W. Nultsch, R. Miesch, Botanique Générale, Ed. Boeck Université, 1998, p.316.
- [3] G.W. Hopkins, C.M. Evrard, Physiologie végétale, Ed. Boeck Université, 2003, p.267-281.
- [4] H.P. Raven, R.F. Evert, E. S. Eichhorn, J. Bouharmont, Biologie végétale, Ed. Boeck Université, 2003, p.32-35.
- [5] S.W. Judd, S.C. Campbell, J. Bouharmont, A. Elizabeth, Kellogg, P. Stevens, E. Charles-Marie, Botanique systématique, Ed. Boeck Université, 2001, p.84-87.
- [6] R. Jarrige, Y. Ruckebusch, Nutrition des ruminants domestiques: Ingestion et digestion, Ed. Quae, 1999, p.56-58.
- [7] C.W. Bamforth, Beer haze, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 1999, 57(3), 81-90.
- [8] J. Bruneton, Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes médicinales, Ed. Lavoisier, 1999, p.228.
- [9] A. Bendiabdellah, Mémoire de magister en Chimie Organique Appliquée, Faculté des Sciences, Université Abou Bakr Belkaïd, 2006, p.15.
- [10] D. Chen, Green tea and tea polyphenols in cancer prevention, *J. Front. Biosci.*, 2004, 9(26), 18-31.
- [11] M. Laughton, P.Evens, M. Moroney, J. Hoult, B. Halliwell, Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability, *J. Biochem. Pharmacol.*, 1991, 42(9), 81.
- [12] Frankel, Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *J. Lancet.*, 1993, 341.
- [13] Orgogozo, Wine consumption and dementia in the elderly: A prospective community study in the Bordeaux area, *Rev. Neuro.*, 1997, 153.
- [14] S.B. Rees, J.B. Harborne, The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defense of the chicory plant, *Phytochem.*, 1985, 24, 2225-2231.
- [15] P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Ed. Tec & Doc, 2006.

- [16] N. Zimmer, R. Cordesse, Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments, *INRA Prod. Anim.*, **1996**, 9(3), 167-179.
- [17] P. Schauenburg, Guides des plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> édition, Description et utilisation de 400 plantes, **1977**, p.142.
- [18] X. Wu, L. Prior, R. L. McKay, Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia and Sambucus and their antioxidant capacity, *J. Agric. Food. Chem.*, **2004**, 52(26), 7846-7856.
- [19] L. Gu, Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption, *J. Nut.*, **2004**, 134, 613-617.
- [20] L. Gu, Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products, *Agric. Food Chem.*, **2006**, 54(11), 4057-61.
- [21] B. Santos, C. Scalbert, Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health, *J. Sci. Food. Agric.*, **2000**, 80, 1094-1117.
- [22] S. Verbois, Plantes et herbes aromatiques. Saveurs et vertus, Ed. Fernand Lanore, **2003**, p. 33-35.
- [23] F. Guy, Plantes de vie - du corps et de l'esprit, Ed. Fernand Lanore, **2003**, p.19.
- [24] A. Serge, B. Pierre, Groupe France agricole, A. Laurent, Le chanvre industriel: Production et utilisations, Ed. France, **2006**, p.65.
- [25] J. Médart, Manuel de pratique de nutrition, Ed. Boeck Université, **2005**, p.51.
- [26] F. Chau, Bases fondamentales de la chimie hétérocyclique, Ed. EDP Sciences, **2003**, p. 489.
- [27] G. Berge, D. Diallo, B. Hveem, Les plantes sauvages du sahel malien : les stratégies d'adaptation à la sécheresse des Sahéliens, Ed. Karthala, **2006**, p.162.
- [28] J.M. Lardry, V. Haberkorn, Les formes galéniques destinées à l'usage externe. Kinésithérapie, *Les Annales*, n° 16, **2003**, p.21-5.
- [29] S. Deschamp, 60 Huiles essentielles de plantes, Ed. Arys. La Vie Naturelle, HS 17 nationales, **1990**.
- [30] G. Roulier, Les huiles essentielles pour votre santé : traité pratique d'aromathérapie. Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes, Ed. Dangles, **1990**.
- [31] R. Balz, Les huiles essentielles, Ed. Crest, **1986**.
- [32] M. Werner, Les huiles essentielles : réveil du corps et de l'esprit, Ed. vioget, Collection Santé bien-être, **2002**.

- [33] C. Kanko, B.H. Sawaliho, S. Kone, G. Koukoua, Y. T. N'Guessan, Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*, C. R. Chimie, **2004**, 7, 1040.
- [34] B. Charpentier, F. Hamon-Lorleac'h, A. Harlay, L. Ridoux, Guide du préparateur en pharmacie, Ed. Elsevier Masson, **2008**, p.1098.
- [35] G. Sens-Olive, Les huiles essentielles - généralités et définitions. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, Ed. Maloine, **1979**, p.141-144.
- [36] V.A. Worwood, Aromathérapie pour l'esthéticienne. Ed Vigot, **2002**, p.1-182.
- [37] T. Telphon, ABC des huiles essentielles, Ed. Grancher, **2003**, p.1-358.
- [38] S. Lamassiaude-Peyramaure, Actualités pharmaceutiques, n° 475, **2008**, p.27-28.
- [39] L.M. Brian, Essential oils, Ed. Allures, cop., **2008**, p.1-201.
- [40] E. Breitmaier, Terpenes : flavors, fragrances, pharma, pheromones, Ed. Wiley-VCH, cop., **2006**, p.1-214.
- [41] F. Padrini, M. T. Lucheroni, Le grand livre des huiles essentielles, Ed. De Vecchi, **2003**, p. 1-206.
- [42] H. Surburg, J. Panten, Common fragrance and flavor materials: preparation, properties, and uses, 5<sup>ème</sup> Ed. Wiley, cop., **2006**, p. 1-318.
- [43] Association française de normalisation, Recueil des normes françaises des huiles essentielles, Ed. AFNOR, **1982**, p.1-330.
- [44] R. P. Adams, Identification of essential oil components by gas chromatography-masse spectrometry, Ed. Allured publ. Corporation, cop., **2004**, p.1-456.
- [45] R. P. Adams, Identification of essential oil components by gas chromatography-masse spectrometry, Ed. Allured publ. Corporation, cop., **2007**, p.1-804.
- [46] P. Goetz, C. Busser, La pyhtocosmétologie thérapeutique, Ed. Springer, **2007**, p.58.
- [47] D. Scimeca, M. Teteau, votre santé par les huiles essentielles, Ed. S.M.A, **2005**, p.20.



# ***-Chapitre IV***

## ***Résultats et Interprétations***

## Résultats & Interprétations

### I- Introduction

La rhapsodique est une plante de la famille des Astéracées. Elle est connue dans la région de Tlemcen pour ces vertus thérapeutiques, notamment comme apéritive, cholagogue, dépurative, digestive, stomachique, tonique, etc. Aussi, elle est considérée comme bénéfique pour les cellules hépatiques. Une recherche bibliographique minutieuse révèle peu de travaux sur cette plante. C'est, d'ailleurs, ce qui nous a motivé pour l'étudier chimiquement et aussi confirmer ou infirmer les vertus thérapeutiques citées plus haut. Cette plante constitue pour nous un champ d'investigation vierge qui peut être à l'origine de nouvelles molécules dotées d'activité thérapeutiques nouvelles. Dans ce but, nous avons adopté une stratégie de recherche basée sur les points suivants :

- Une caractérisation phytochimique des métabolites secondaires présents dans la partie aérienne de la *Rhaponticum acaule* L.
- Application des méthodes de dosages des polyphénols (phénols totaux, les tanins hydrolysables et les flavonoïdes).
- Extractions sélectives des acides gras, des insaponifiables, des polyphénols et des H.E.

### II- Examen phytochimique

#### II-1 Matériel végétal

L'espèce *Rhaponticum acaule* L. est récoltée à coté d'Ain Fezza (Tlemcen), au mois de mars 2007 (Tableau 3). Son identification botanique est faite par Pr Benabadji Nouri du Département de biologie, Université Aboubekr Belkaïd -Tlemcen.

Après séchage à l'air libre et à l'ombre, le matériel végétal (feuilles et fleurs) est broyé puis conservé dans des flacons pour une utilisation ultérieure.

Tableau 3 : Etude bioclimatique de la zone d'étude.

Ain Fezza	
Longitude	1° 17'
Altitude	1000m
Latitude	34° 50'
Climat	Semi-aride à hivers tempéré

## II-2 Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique constitue la première étape dans l'étude de la *Rhaponticum acaule* L. Il permet de nous renseigner sur la nature des substances contenues dans la partie étudiée de la plante, en l'occurrence, la partie aérienne (feuilles et fleurs).

Ce screening est basé sur des réactions chimiques simples, aisément réalisables dans des tubes à essais. Ces dernières peuvent être de précipitation et/ou de coloration et se traduisent par l'apparition d'une turbidité, floculation, ou un changement de couleur.

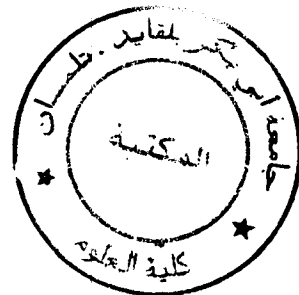
Les résultats du criblage réalisé sur les feuilles et les fleurs épuisées par des solvants de polarité croissante (éther diéthylique, méthanol et l'eau) sont représentés dans les tableaux 4, 5 et 6 suivants :

**Tableau 4 : Epuisement à l'éther diéthylique.**

Famille de composés	Fleurs	Feuilles
Alcaloïdes bases	-	-
Stérols et Stéroïdes	+++	+++
Emodols	-	-
Huile volatile	+++	+++
Acides gras	+++	+++

**Tableau 5 : Epuisement au Méthanol.**

Famille de composés	Fleurs	Feuilles
Alcaloïdes sels	-	+
Flavonoïdes	+++	-
Tanins hydrolysables	+++	+++
Composés Réducteurs	+++	-
Stérols	+++	+++
Anthracénosides	-	-
Anthocyanosides	-	-
Coumarines	-	-



**Tableau 6 : Epuisement à H<sub>2</sub>O.**

<b>Famille de composés</b>	<b>Fleurs</b>	<b>Feuilles</b>
Amidon	-	-
Saponosides	-	+++
Tanins	++	+++
Alcaloïdes sels	-	-
Polyuronides	-	-

+++ : Test très positif ; ++ Test moyennement positif ; + : test faiblement positif ; - : test négatif

En faisant la synthèse des résultats expérimentaux illustrés dans les tableaux 4, 5 et 6, nous pouvons faire les constatations suivantes :

- Les acides gras, les tanins, les stérols, les stéroïdes et l'H.E sont présents en quantité importante dans les deux organes étudiés.
- Les saponosides et les flavonoïdes sont très fortement caractérisés respectivement dans les feuilles et les fleurs.
- Les alcaloïdes sels existent faiblement dans les feuilles et sont totalement absents dans les fleurs.
- Les composés réducteurs sont fortement présents dans les fleurs.

De plus, les coumarines, les anthracénosides, les anthocyanosides, l'amidon, les émодols, les polyuronides et les alcaloïdes bases sont absents dans la partie aérienne de la rhapontique.

D'après ces résultats, nous pouvons avancer, sans aucune confirmation, que les effets thérapeutiques de cette plante sont dus soit à l'une des substances (tanins, saponosides, insaponifiables etc.), soit l'action synergique de l'ensemble.

Ce pendant, il est clair que la couleur jaune des fleurs constitue une indication supplémentaire de la richesse de cette plante en flavonoïdes.

### **III- Dosages des polyphénols**

L'étude phytochimique sur la rhapontique a prouvé, qualitativement, la présence des composés phénoliques. Pour estimer quantitativement leur teneur, nous les avons dosés, en employant des méthodes spécifiques, dans les fleurs et les feuilles. Ces méthodes sont largement détaillées dans le chapitre III.

Pour notre part, nous avons dosé les phénols totaux, les tanins hydrolysables et les flavonoïdes dans des extraits de la matière végétale, préalablement, obtenus respectivement par un mélange acétone/eau (2/1) à chaud et une extraction avec le méthanol en utilisant le soxhlet.

### III-1 Dosage des phénols totaux

Cette méthode est basée sur la réduction de l'ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en ion ferreux ( $Fe^{2+}$ ) par les composés phénoliques. Il en résulte un complexe de couleur bleu de Prusse. L'analyse spectrophotométrique UV-Visible à la longueur d'onde  $\lambda_{max} = 725$  nm permet de faire une évaluation de la teneur en phénols totaux. Les résultats, regroupés dans le tableau 7 ci-dessous, montrent que les fleurs (45.52 mg/g) sont plus riches en phénols totaux que les feuilles (14.52 mg/g).

### III-2 Dosage des tanins hydrolysables

Le principe de cette technique repose sur l'affinité des tanins hydrolysables avec une solution de  $FeCl_3$  acidifiée. Cette réaction conduit à la formation d'un complexe de couleur rouge violette dont l'absorbance à  $\lambda_{max} = 660$  nm donne le pourcentage des tanins hydrolysables. Dans ce cas aussi, les fleurs (0.34%) contiennent plus de tanins hydrolysables que les feuilles (0.16%) (Tableau 7).

### III-3 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est déterminée à partir d'une équation de la régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage. Elle est exprimée en milligrammes équivalents de pyrocathécol par 100 g de matière sèche. D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les fleurs et les feuilles contiennent approximativement les mêmes teneurs en flavonoïdes (~ 10 mg/100 g) (Tableau 7).

Tableau 7 : Résultats des dosages.

	Phénols totaux (mg/g)	Tanins hydrolysables (%)	Flavonoïdes (mg/100 g)
Fleurs	45.52	0.34	11.0
Feuilles	14.52	0.16	10.0

## IV- Extractions sélectives

### IV-1 Introduction

Plusieurs approches sont couramment utilisées pour extraire les métabolites secondaires d'une matrice végétale. L'extraction à l'aide de solvants est l'une des plus utilisées et elle permet plusieurs variantes telles que l'extraction par macération, par sonication, à reflux, par Soxhlet, etc. L'extraction par Soxhlet est très employée. En effet, elle permet de récupérer le maximum de produits dans des conditions optimales (temps d'extraction, nature du solvant, etc.) [1].

#### IV-2 Acides gras et insaponifiables

Le matériel végétal renferme, souvent, des quantités appréciables de graisse, de cires, de terpènes, de pigments et d'autres substances lipophiles qui peuvent perturber le processus extractif (formation d'émulsion). Pour surmonter ces difficultés, il est nécessaire de procéder à un dégraissage [2].

Pour notre part, nous avons extrait les feuilles de la *Rhaponticum acaule* L. avec la méthode d'extraction solide-liquide continue en utilisant un appareil soxhlet, et en employant divers solvants apolaires comme l'hexane et l'éther de pétrole. Le rendement global de l'extraction est estimé à 2.65% (m=1.06 g, pate verdâtre).

La saponification de la fraction grasse obtenue, en milieu alcoolique et en présence d'une base telle que KOH, conduit après extraction avec l'hexane à la fraction des insaponifiables (m=0.62 g, solide jaunâtre). Cette dernière regroupe l'ensemble des constituants non glycéridiques des huiles naturelles et dont la composition varie d'une plante à une autre [3].

Afin de pouvoir mettre en évidence la composition des acides gras, nous avons réalisé la préparation de leurs esters méthyliques correspondants [4]. Cette réaction d'estérification est faite dans une solution méthanolique en présence d'acide comme catalyseur.

Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous :

**Tableau 8 : Résultats des esters méthyliques et insaponifiables.**

Extraits	Masse (g)	Rendement (%)	Aspect physique
Insaponifiables	0.62	58.50	Solide jaune
Esters méthyliques	0.38	36.90	Pate noire

La confirmation de l'obtention des esters méthyliques est réalisée par spectroscopie infra rouge. Le spectre est représenté sur la figure 7.

Le spectre IRTF montre en plus des bandes correspondantes aux vibrations d'élongation et de déformation angulaire des liaisons C-H ( $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) : 2924.70, 2853.07, 1460.88, 1363.87, 721.42), une bande d'absorption C=O intense située vers  $1741.23 \text{ cm}^{-1}$  et trois bandes d'élongation du groupe C-O vers  $1171.66$ ,  $1197.84$  et  $1258.66 \text{ cm}^{-1}$ .

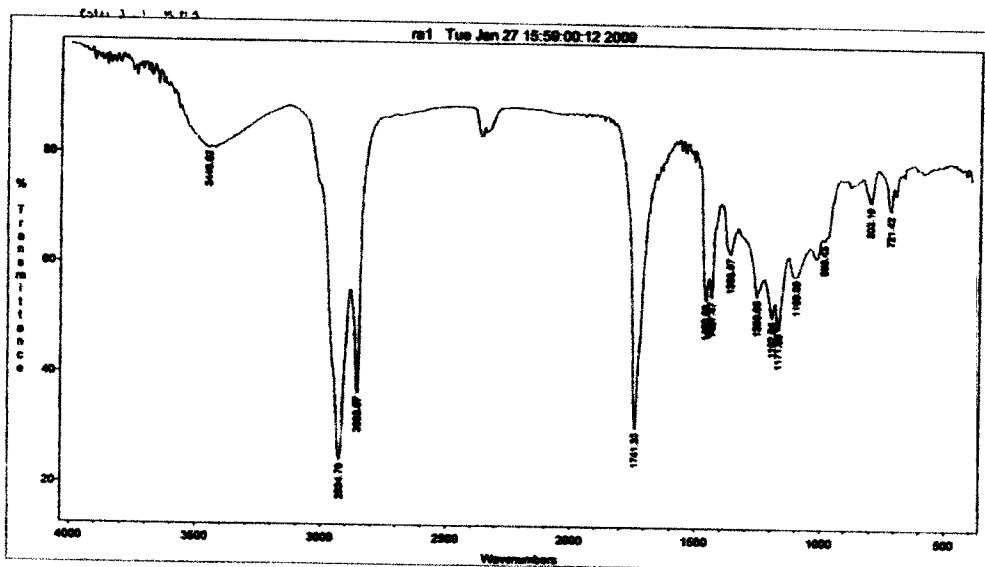


Figure 7 : Spectre IR des esters méthyliques.

Les analyses par CPG/SM des acides gras, des insaponifiables et des esters méthyliques sont en cours en réalisations.

#### IV-3 Extraction des polyphénols

Les polyphénols représentent une famille de composés très répandus dans le règne végétal. En se basant sur la structure carbonée de base, nous pouvons énumérer les principales classes de composés phénoliques suivantes : les flavonoïdes, les anthocyanes, les tanins condensés, les coumarines, les lignanes, les lignines, les acides hydroxybenzoïques etc.

Actuellement, leur rôle essentiel est connu. Ils interviennent dans la physiologie de la plante et aussi dans sa relation avec l'environnement. Ces dernières années, beaucoup de vertus leur sont attribuées, notamment, le pouvoir de piégeage des radicaux libres.

Nous avons déjà prouvé la présence des polyphénols, en quantité appréciable, dans les fleurs de la *Rhaponticum acaule* L. grâce au screening phytochimique. Ce résultat nous a incité à entreprendre des extractions afin d'isoler des molécules nouvelles et tester leurs activités.

Pour ce faire, nous avons choisi la méthode d'extraction solide-liquide discontinue. La matière végétale est mise en solution dans un mélange de solvants (acétone/eau : (2/1)). L'ensemble est porté à reflux pendant 12 heures. Après refroidissement, le mélange réactionnel est concentré au rotavapor. La phase aqueuse résultante est, ensuite, extraite avec une série de solvants non miscibles à l'eau pour débarrasser l'extrait des polyphénols de toutes traces de

pigments, des lipides etc. Plusieurs solvants comme l'éther de pétrole, l'Et<sub>2</sub>O et l'AcOEt sont utilisés. L'examen de la fraction extraite avec l'AcOEt montre la présence des polyphénols.

**Tableau 9 : Polyphénols des fleurs.**

Résultats	Polyphénols
Masse (g)	0.62
Rendement (%)	1.03
Aspect	Solide jaune

Nous avons tenté de connaître la composition de la fraction d'acétate d'éthyle. Pour ce faire, nous avons soumis l'extrait ainsi obtenu aux tests phytochimiques. Ces derniers révèlent la présence des tanins et des flavonoïdes respectivement par des tests positifs avec une solution de FeCl<sub>3</sub> et de la tournure de magnésium en milieu acide. La séparation de ces composés est réalisée sur la base de leur différence de solubilité dans un mélange de solvants comme H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH : (0.1/10.5/2). Il en résulte une fraction soluble des tanins (RAF<sub>T</sub>, m = 500 mg) et une autre insoluble représentant les flavonoïdes séparés par filtration (RAF<sub>F</sub>, m = 20 mg) avec RAF<sub>X</sub> désignant la fraction de Rhaponticum (R) acaule (A) fleurs (F) et X représentant les initiales des composés séparés.

Ces résultats sont confirmés par les tests correspondants et sont regroupés dans le tableau 10 ci-dessous :

**Tableau 10 : Résultats du fractionnement de l'extrait de polyphénols.**

Fractions	RAF <sub>T</sub>	RAF <sub>F</sub>
Masse (g)	0.50	0.02
Rendement (%)	80.64	3.22
Aspect	Solide jaune	Solide marron clair

A ce stade de l'extraction, nous avons choisi, pour des raisons qui se rapportent aux quantités de chaque fraction, d'étudier plus minutieusement la fraction RAF<sub>T</sub>. Toute fois, l'extrait des flavonoïdes (RAF<sub>F</sub>) ne sera pas négligé et fera, certainement l'objet d'une étude ultérieure sur les plans chimique et biologique.

Dans le but de connaître la composition de la fraction RAF<sub>T</sub>, nous avons employé les méthodes chromatographiques (CCM, CC, CLHP etc.) [5-7].



Plusieurs mélanges éluants sont testés, notamment : acétone/Et<sub>2</sub>O (1/1), acétone/C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> (1/1), acétone/H<sub>2</sub>O (1/1), CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (10/2/0.15/0.01), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (8/1), CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (9/1/0.5), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH/H<sub>2</sub>O (10.5/2/0.1). Seul le dernier mélange a donné une bonne séparation.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau 11.

**Tableau 11 : Résultats des CCM de la fraction RAF<sub>T</sub>.**

Aspect physique	Éluant	Taches	R <sub>f</sub>
Solide jaune	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /EtOH/H <sub>2</sub> O (10.5/2/0.1)	1	0.90
		2	0.60
		3	0.09

Après le choix du mélange éluant, un fractionnement est engagé sur l'extrait brut des tanins des fleurs de la *Rhaponticum acaule* L. Il est réalisé sur une colonne de gel de silice. Après optimisation des conditions opératoires, cinq fractions désignées par RAF1, RAF2, RAF3, RAF4 et RAF5 sont obtenues. Les résultats du fractionnement sont regroupés ci-dessous :

**Tableau 12 : CC de l'extrait RAF<sub>T</sub>.**

Aspect	Masse	Chromatographie sur colonne				
		Éluant	Fractions	Masse (mg)	R <sub>f</sub>	Rdt (%)
Solide jaune	500 mg	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /EtOH/H <sub>2</sub> O (10.5/2/0.1)	RAF1	10	0.82	2
			RAF2	50	0.80	10
			RAF3	20	0.20	4
			RAF4	120	0.11	24
			RAF5	20	/	4

Le rendement global de cette opération est estimé à 44%. En effet, à partir d'une masse brute de 500 mg d'extrait tannique brut, 220 mg sont récupérés sous forme de cinq fractions de masses respectives 10, 50, 20, 120 et 20 mg. Notons que la fraction RAF5 est récupérée avec du méthanol en fin d'opération.

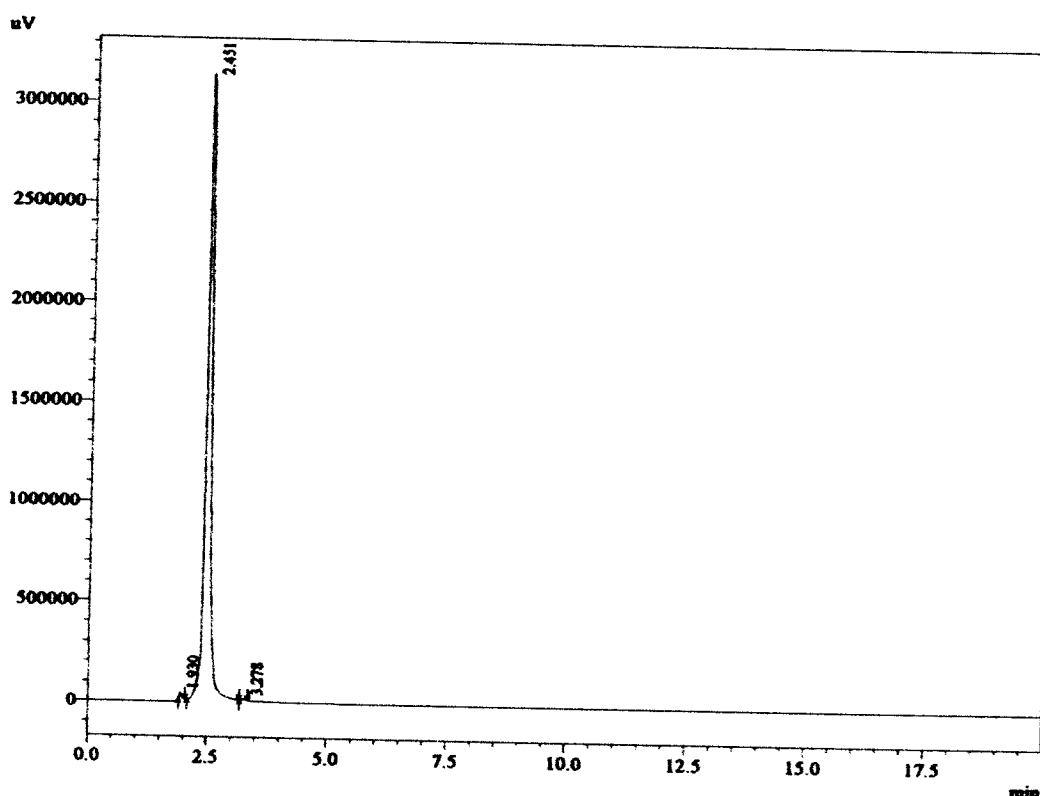
Pour vérifier leur pureté, nous avons procédé à des analyses CLHP. Les échantillons des fractions RAF2, RAF3 et RAF4 sont analysés dans les conditions, modifiées par nos soins, citées dans la référence 8.

Les conditions de la CLHP employées sont :

- Colonne : ZORBAX SB-C18 (4.6 x 250 mm, 5 μm).
- Détecteur : UV-visible
- Phase mobile : 80% CH<sub>3</sub>OH ; 20% CH<sub>3</sub>CN
- Débit : 1ml/min

- $\lambda$  max : 280 nm
- Pression : 56 bars
- T : 20°C
- Volume injecté : 20  $\mu$ l

Dans ces conditions, les chromatogrammes CLHP de toutes les fractions étudiées sont représentés ci-dessous :



**Figure 8 : CLHP de la fraction RAF2.**

**Tableau 13 : Analyse CLHP de la fraction RAF2.**

N° pic	Temps de rétention	Surface	Hauteur	% Aire	% Hauteur
1	1.930	98282	32236	0.411	1.016
2	2.451	23806456	3133310	99.474	98.788
3	3.278	27632	6203	0.115	0.196
Total		23932370	31717550	100.000	100.000

Le chromatogramme CLHP de la fraction RAF2 révèle la présence de trois composés dont l'un est majoritaire (99.47%) avec un temps de rétention de 2.451 min.

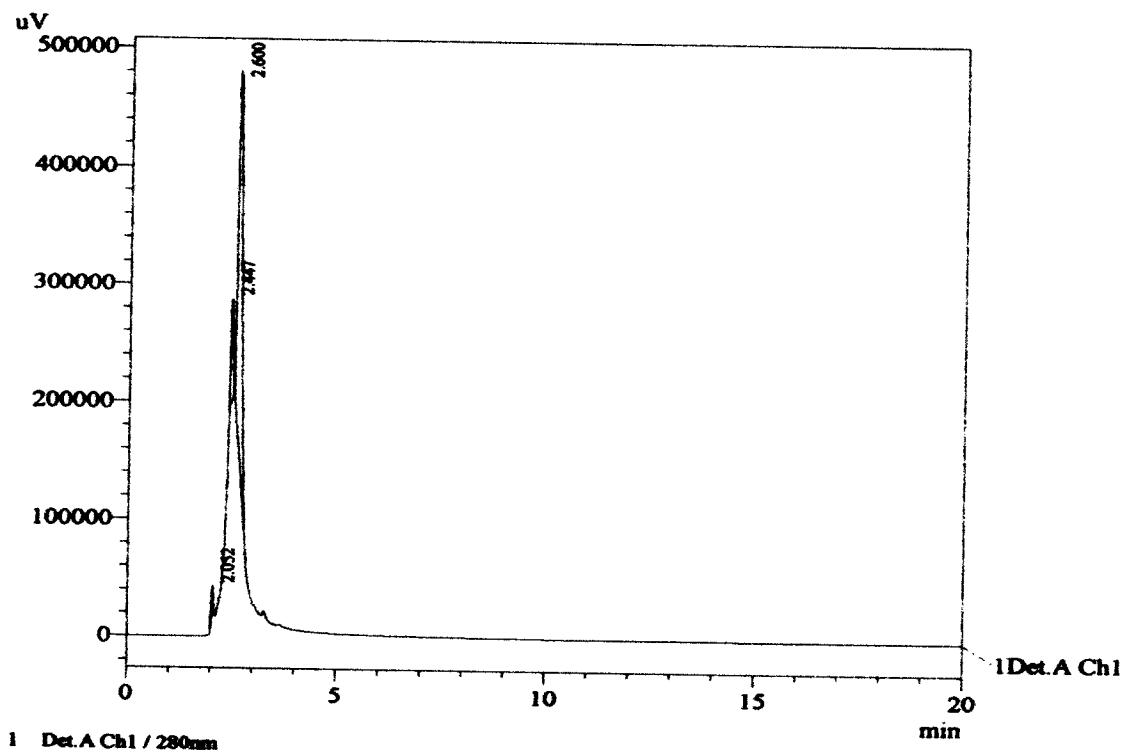
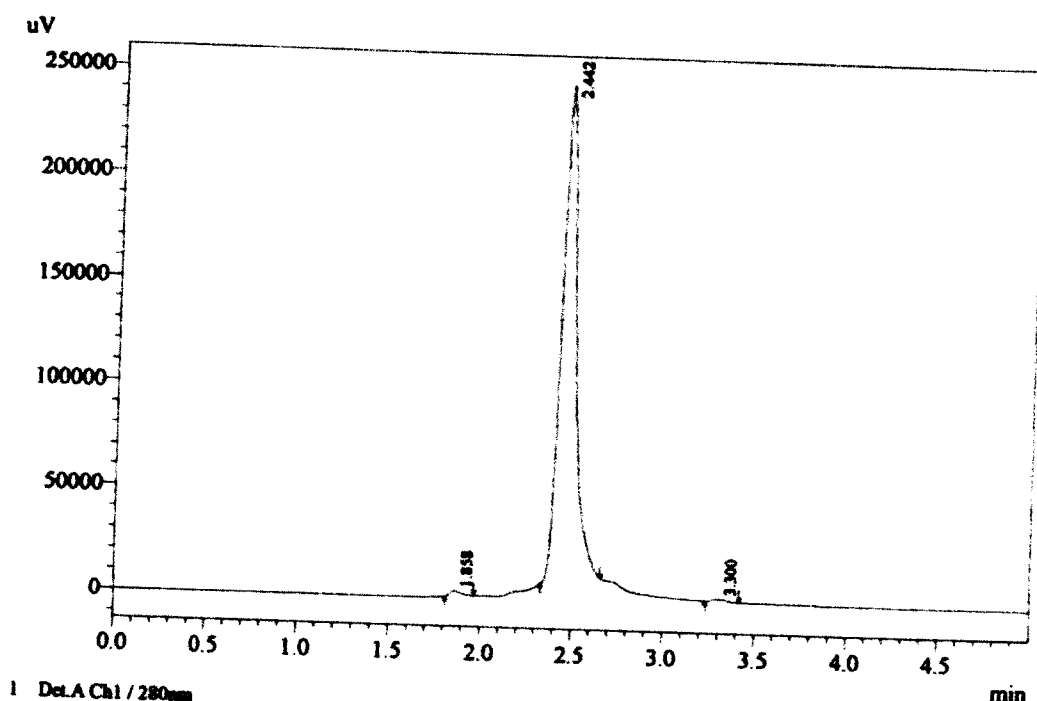


Figure 9 : CLHP de la fraction RAF3.

Tableau 14 : Analyse CLHP de la fraction RAF3.

N° pic	Temps de rétention	Surface	Hauteur	% Aire	% Hauteur
1	2.052	65473	26343	2.330	6.204
2	2.447	337459	88901	12.010	20.973
3	2.600	2406876	309373	85.660	72.859
Total		2809808	424617	100.000	100.000

L'analyse de la fraction RAF3 montre aussi la présence de trois composés parmi lesquels le composé majoritaire de la fraction RAF2 avec un temps de rétention proche de celui obtenu sur le chromatogramme précédent (2.447 min). Dans ce cas, un second produit est majoritaire (85.66%). Sa purification peut être améliorée en optimisant les conditions de la CC (dimensions de la colonne, la nature de la phase stationnaire, polarité de l'éluant etc.).



**Figure 10 : CLHP de la fraction RAF4.**

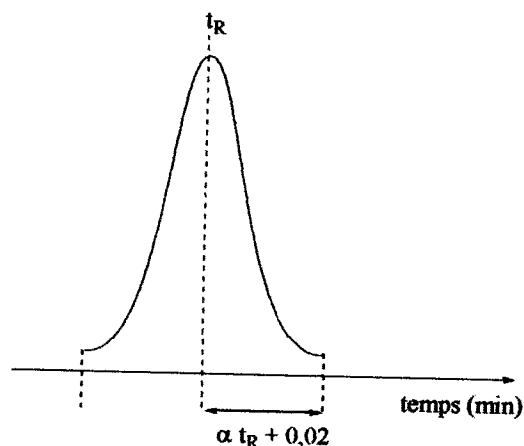
**Tableau 15 : Analyse CLHP de la fraction RAF4.**

N° pic	Temps de rétention	Surface	Hauteur	% Aire	% Hauteur
1	1.855	9259	2390	0.673	0.995
2	2.442	1361113	236777	98.958	98.577
3	3.300	5071	1027	0.396	0.428
Total		1375443	240194	100.000	100.000

Le chromatogramme de la fraction RAF4, obtenue majoritairement lors du fractionnement de la fraction RAF<sub>T</sub>, indique la présence de trois pics. Parmi ces signaux, nous retrouvons celui de notre composé prépondérant dans la fraction RAF2. Cette déduction est faite sur la base de la comparaison des temps de rétention. En effet, ce composé apparaît à 2.442 min, et est majoritaire (98.96%).

Ces résultats montrent que la fraction RAF<sub>T</sub> renferme six produits avec les temps de rétention respectifs suivants : 1.855 ; 1.930 ; 2.052 ; (2.442 ; 2.447 ; 2.451) ; 2.600 ; (3.278 ; 3.300). Cette identification est réalisée automatiquement par le logiciel, grâce à l'option « Identification », qui offre selon le mode d'éluion deux sortes de méthodes suggérées. La méthode " Time window " est conseillée dans le cas du mode isocratique. Elle désigne la

fenêtre de temps permise pour l'identification du pic du composé, en comparant son temps de rétention avec celui de l'étalon pur.



**Figure 11** : Marge de temps tolérée pour l'identification des composés selon la méthode « Time Window » du logiciel.

Le calcul de la marge de temps tolérée est effectué d'après l'équation suivante :

$$\text{Marge de temps tolérée (min)} = t_R (\text{étalon}) \times \frac{W}{100} + 0,02 (\text{min})$$

W: fenêtre du temps ;

$t_R$  (étalon) : Temps de rétention de l'étalon.

Si,  $W = 0,5\%$ , alors cette valeur est généralement de 5% par défaut.

Pour le temps de rétention du tanin de la fraction RAF2 considéré comme étalon :

$$t_R (\text{étalon}) = 2.451 \text{ min}$$

La marge de temps tolérée est donc :

$$\text{Marge de Temps tolérée (min)} = [(2.451 \times 0.5)/100] + 0.020 = 0.0322$$

Ceci donne un intervalle de temps :  $2.451 \pm 0.0322$

$$2.418 \leq t_R \leq 2.483$$

Deux composés parmi les six sont isolés avec des rendements élevés (99.47% et 85.66%). Ce résultat mérite une attention particulière à cause du manque d'études sur la chimie de la *Rhaponticum acaule* L. Des analyses spectroscopiques poussées permettront, sans aucun doute, d'établir leurs structures. Ces fractions sont conservées pour des tests biologiques futurs.

#### IV-4 Extraction des H.E

D'après les résultats du screening phytochimique de la *Rhaponticum acaule* L., nous avons prouvé que les fleurs et les feuilles contiennent de l'H.E. La quantité et la qualité de cette dernière, dans les deux organes de cette plante, dépendent de plusieurs facteurs parmi lesquels : la période de la cueillette, mode de conservation, la méthode d'extraction etc.

Le manque d'études sur l'H.E de cette plante réponde dans la région de Tlemcen et connue par ces applications variées en médecine traditionnelle locale, nous a poussés à l'extraire et la caractériser par CPG et CPG/SM. L'étude de cette H.E est aussi motivée par le manque de travaux relatifs à la mise en évidence de ses activités biologiques et l'intérêt économique que nous pouvons en tirer afin de la valoriser.

Pour ce faire, nous avons procédé à l'extraction des fleurs par hydrodistillation (Figure 12). Un rendement faible est obtenu par cette méthode. Cela est du peut être à la période de cueillette (mars) pendant laquelle les cellules sécrétrices n'étaient pas à leur maximum de production de l'H.E ou encore l'emploi d'un montage d'hydrodistillation obsolète. Pour contourner ces deux difficultés, nous préconisons dans un travail futur une cueillette de la plante en période de floraison (avril-mai) et l'utilisation d'un Clevenger.

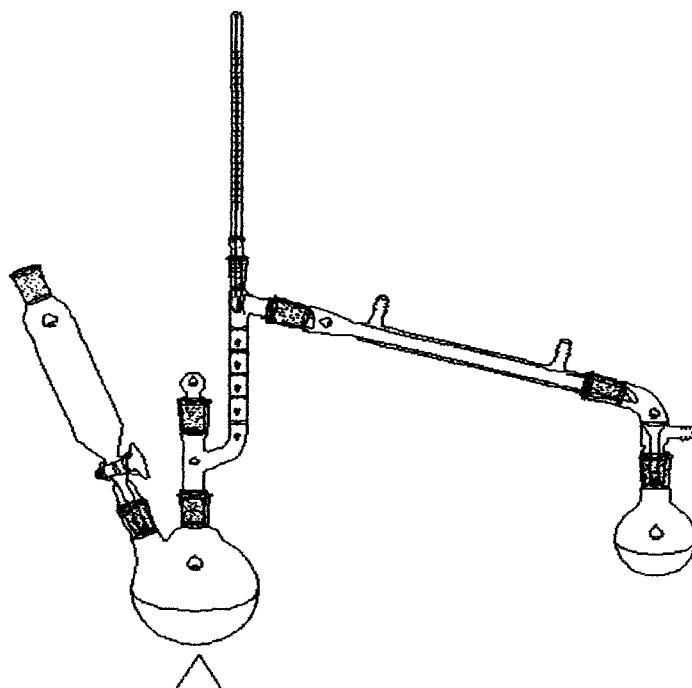


Figure 12 : Montage d'hydrodistillation.

L'H.E des fleurs de la rhapsodique est récupérée par extraction à l'éther diéthylique. Elle est, ensuite, analysée qualitativement et quantitativement par les méthodes CPG et CPG/SM dans les conditions suivantes :

- Les chromatogrammes CPG sont enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) Autosystem XL équipé d'un système de détection FID, d'un injecteur diviseur et deux colonnes capillaires (60m x 0.22 mm d.i. ; épaisseur du film 0.25  $\mu\text{m}$ ) respectivement apolaire (Rtx-1, Polydiméthyl siloxane) et polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol). Les échantillons ont été injectés en mode de fente (1:50), employant l'hélium comme gaz vecteur (1ml/min) ; volume d'injection, 0.2  $\mu\text{l}$ .

- Les chromatogrammes CPG/SM (Voire Annexe) sont réalisés avec un détecteur de masse Perkin-Elmer Turbo (Quadripôle), couplé à un Perkin-Elmer Auto système XL, équipé d'une colonne capillaire Rtx-wax ; la température de la source d'ions, 150°C ; énergie d'ionisation, 70eV. L'ionisation électronique (EI) est obtenue sur l'intervalle des masses 35-350 Da.

Le chromatogramme obtenu est représenté sur la figure 13 :

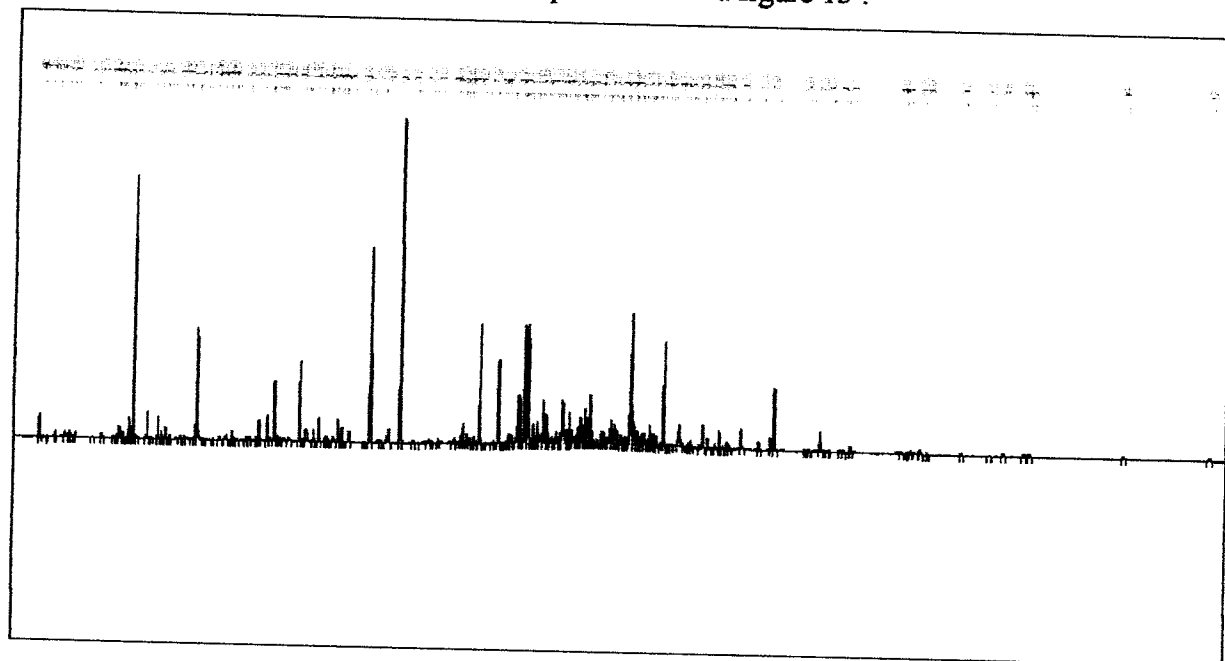


Figure 13 : CPG des H.E des fleurs de la *Rhaponticum acaule* L.

Une analyse minutieuse des CPG et CPG/SM, nous a permis de dresser le tableau 16 regroupant les composés constitutifs de l'H.E.

**Tableau 16 : Composition chimique de l'H.E des fleurs de la *Rhaponticum acaule* L.**

Pic	Tr (mn)	% Aire	%	IR	Composés
1	7.45	34916	0.28	775.19	Hexanal
2	8.14	2204.36	0.02	805.20	<i>n</i> -Buthyl méthyl éther
3	9.72	33174.26	0.27	850.37	1-Hexanol
4	10.55	5428.74	0.04	874.41	Heptanal
5	13	17188.90	0.14	931.36	Benzaldéhyde
6	14.57	41126.86	0.33	963.13	Oct-1,3-ol
7	15.46	45079.35	0.36	981.11	Octanal
8	15.58	27628.98	0.22	989.58	4-Formyl cyclohexane
9	16.06	10199.99	0.08	993.16	Heptadiénal
10	17.06	70284.91	0.57	1011.40	Phényl acétaldéhyde
11	18.73	31518.38	0.25	1039.15	3,5-Octadièn-2-one
12	21.36	38526.28	0.31	1083.38	Nonanal
13	21.50	336306.82	2.71	1085.69	Linalol
14	24.55	28742.99	0.23	1136.08	Isobornéol
15	27.05	52784.86	0.43	1173.68	$\alpha$ -Terpinéol
16	27.80	64821.37	0.52	1185.39	Décanal
17	27.95	21346.89	0.17	487.71	Trans-trans-2,4-nonadiénal
18	28.43	173093.17	1.39	1195.32	2,3-Dihydrobenzofurane
19	29.66	25239.86	0.20	1214.45	Nérol
20	30.69	217322.37	1.75	1230.61	Géranol
21	31.22	83122.05	0.67	1238.99	Chavicol
22	33.02	20638.39	0.17	1267.13	Indole
23	34.38	17371.38	0.14	1288.37	2-Métoxy-4-vinyl phénol
24	34.50	43443.77	0.35	1290.25	(E,E)-2,2-Décadiénal
25	37.03	652156.32	5.26	1330.83	Eugénol
26	37.91	5679.14	0.05	1345.00	$\delta$ -Elmène
27	38.66	92745.46	0.75	1357.06	Méthyl cinnamate
28	39.72	1258249.21	10.14	1374.15	Méthyl eugénol
29	42.20	16024.88	0.13	1414.78	$\alpha$ -Cédrène
30	44.45	19052.37	0.15	1452.8	Aromadendrène
31	45.14	23676.00	0.19	1464.39	Allo-aromadendrène
32	45.28	4577.74	0.041	1466.73	$\beta$ -Lénone
33	46.80	343208.72	2.77	1492.39	2,6-bis-(1,1-diméthyl éthyl)-4-méthyl phénol
35	48.46	248668.84	2.0	1521.41	Elemicine
36	50.26	327082.84	2.64	1553.34	Acide décanoïque
37	50.80	386542.14	3.12	1562.83	Spathulénol
38	50.92	40206.79	0.32	1565.08	Hydrate cis-sesquisabinène
39	51.10	428289.25	3.45	1568.27	Oxyde de Caryophyllène
40	52.71	111685.56	0.9	1596.72	Epoxyde d'humulène II
41	53.63	626320.1	0.5	1613.78	$\alpha$ -Cédrol
42	54.30	246510.47	1.99	1626.29	T-Cadinol
43	54.90	131002.75	1.06	1637.37	$\beta$ -Vulgarone
44	55.60	24233.92	0.20	1650.54	Apiol
45	55.72	68081.06	0.55	1652.74	$\beta$ -Bisabolol
46	55.90	163162.84	1.31	1656.08	Cadalène



47	56.76	180299.67	1.54	1672.19	$\alpha$ -Bisabolol
48	58.63	126517.21	1.02	1707.34	Chamazulène
49	59.84	34557.01	0.28	1731.01	Acide tétradécanoïque
50	61.46	60346.06	0.49	1762.90	Acétate cédryle
51	62.73	41472.79	0.33	1787.88	Nootkatone
52	63.42	381042.94	3.07	1801.47	Acétate de farnésyle
53	65.77	35998.92	0.29	1849.81	Salicylate de benzyle
54	66.89	91666.05	0.74	1872.85	Hexadécanol
55	70.32	88449.09	0.71	1945.68	Isophytol
56	71.88	33214.24	0.27	1979.36	Acide hexadécanoïque
57	73.27	193541.69	1.56	2010	Géranyl linalol
58	77.38	77732.81	0.63	2102.89	(E)-phytol
Composés identifiés			60.04%		

Ces identifications sont faites suite à une étude comparative des temps de rétention, du dépouillement des spectres de masse et aussi le recours aux sites bibliographiques contenant des banques de données informatisées comme <http://webbook.nist.gov/chemistry>. D'autres références peuvent être employées notamment 11, 12 et 13.

L'analyse CPG et CPG/SM de l'H.E des fleurs de la *Rhaponticum acaule* L. a révélé la présence de 182 composés différents, dont 58 sont identifiés. Ils représentent 60.04% de caractérisation.

Cette H.E est caractérisée par la prédominance de terpènes (43.38%) et des composés aromatiques (14.10%). Dans la fraction volatile, le pourcentage des hydrocarbures et de leurs dérivés est estimé à 4.85%. En outre, divers acides gras et leurs esters correspondants sont présents (7.79%). Ces derniers sont les constituants typiques de cires, plutôt que des H.E [11]. De plus, l'analyse montre la présence d'époxydes et d'éthers (5.76%), d'aldéhydes (2.82%) et de cétones (1.90%).

L'H.E de la rhapontique montre aussi que les constituants majoritaires sont : le méthyle eugénol (10.14 %), l'eugénol (5.26%), l'oxyde de caryophyllène (3.45 %), le spathulénol (3.12%), l'acétate de farnésyle (3.07 %) et le linanol (2.71%). D'autres composés sont identifiés comme elemicine (2.0 %), T-cadinol (1.99 %), Géranol (1.75%),  $\alpha$ -bisabolol (1.54 %),  $\beta$ -Vulgarone (1.06%), chamazulène (1.02 %), chavicol (0.67%), allo-aromadendrène (0.19%).

Pour compléter l'identification des constituants de l'H.E des fleurs de la rhapontique, il est prévu, dans un avenir proche, d'exploiter les avantages d'une méthode récente appelée la Micro Extraction en Phase Solide (MEPS). Cette technique présente de nombreux avantages par rapport à l'hydrodistillation. Les plus importants sont le coût peu élevé, la rapidité d'analyse, la reproductibilité et la fiabilité.

## V- Conclusion

Cette étude permet d'initier un certain nombre d'axes de recherche sur une plante peu connue chimiquement : la *Rhaponticum acaule* L. Ces axes peuvent se résumer comme suit :

- Etude des acides gras,
- Séparation des insaponifiables,
- Extraction des polyphénols contenus dans la partie aérienne.
- Obtention et caractérisation de l'H.E des fleurs.

Des résultats prometteurs sont obtenus permettant la valorisation de la plante étudiée.

## Bibliographie

- [1] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2<sup>ème</sup> Ed. John Wiley & Sons, 1997, p.1-765.
- [2] A. Bendiabdellah, Mémoire de magister en chimie organique, Faculté des Sciences, Université Abou Bakr Belkaïd, 2006.
- [3] P. Goetz, C. Busser, *La phytocosmétologie thérapeutique*, Ed. Springer, 2007, p.54.
- [4] M. C. Martini, *BTS esthétique-cosmétique: Volume 2 : Cosmétologie*, Ed. Elsevier Masson, 2008, p.29-35.
- [5] R. Salghi, *Cours d'analyses physico-chimiques des denrées alimentaires II*, GPÉE, 1ère année, ENSA Agadir, p.20-45.
- [6] E. Antonot, R. Marchal, *Chromatographie*, Stage MAFFEN, Lycée Louis Vincent – Metz, 1998, p.1-48.
- [7] R. Poortmans, N. Boisseau, *Biochimie des activités physiques*, Ed. Boeck Université, 2003.
- [8] M.A. Harish Nayaka, U.V. Sathisha, M.P. Manohar, KB Chandrashekar, S.M. Dharmesh, *Cytoprotective and antioxidant activity studies of jiggery Sugar*, *Food Chem.*, 2009, 115, 113-118.
- [9] *Help du logiciel L CSolution Analytical et measuring instruments Division*, Shimadzu.corporation 2004.
- [10] R. Laouer, *Développement de la méthode RP-HPLC pour le dosage de la vitamine E plasmatique des enfants d'âges préscolaires de la Wilaya de Tlemcen*, mémoire de Magister, Laboratoire de Spectrochimie pharmacologique Structurale (LSPS), Université de Abou bekr Belkaïd-Tlemcen, 2009.
- [11] R.P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*, Ed. Carol Sream, IL, Allured Publishing Corporation, 2001.
- [12] F.W. Lafferty, D.B. Stauffer, *The Wiley NBS registry of Mass Spectral Data 2nd Edition*. New York: J. Wiley & Son 1989.
- [13] W. Jennings, T. Shibamoto, *Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by class-capillary gas chromatography*, Ed. Jovanovitch HB, Academic press, New York, 1980.
- [14] M.L. Diamanto, D.S. Helen, C. Theophanis, *Volatile constituents of Centaurea pelia DC., C. Thessala Hausskn. Subsp. Drakiensis (Freyn & Sint.) Georg. And C. zuccariniana DC. from Greece*, *Flavour Fragr. J.*, 2000, 15:7-11.

# **Chapitre V**

## **Partie expérimentale et généralités**



## - Généralités -

*Les solvants organiques ont été employés sans purification supplémentaire.*

*Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur plaque Merck 60F 254, 0,25 mm d'épaisseur, prête à l'emploi. La révélation a été effectuée selon les cas à la lumière ultraviolette (UV) à 254 nm et 365 nm ou à la vapeur d'iode.*

*Les purifications par chromatographie sur colonne (CC) ont été effectuées sur gel de silice Merck 60F 254 de granulométrie 0.063-0.2 mm. Les dimensions des colonnes utilisées ainsi que le choix des éluants ont été choisis sur la base des caractéristiques des composés à séparer.*

*Les dosages ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre HELIOS Gamma de marque Thermo Spectronic UV-Visible. L'absorbance est à valeur singulière de longueur d'onde. La cuve utilisée est en verre.*

*Les spectres infrarouges (IR) ont été enregistrés sur un appareil Genesis FTIR, mono faisceau (Matteson) au niveau du centre de mesure du Laboratoire COSNA de l'Université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen. Les valeurs des bandes d'absorption les plus caractéristiques sont données en  $\text{cm}^{-1}$ .*

*Les analyses CLHP ont été enregistrés sur un appareil de marque Shimadzu au niveau du Laboratoire SCPS de l'Université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen.*

*Les chromatogrammes CPG ont été enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) Autosystem XL équipé d'un système de détection FID, d'un injecteur diviseur et deux colonnes capillaires (60m x 0.22 mm d.i. ; épaisseur du film 0.25  $\mu\text{m}$ ) respectivement apolaire (Rtx-1, Polydiméthyl siloxane) et polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol). La température est programmée de 60 à 230°C (2°C/min) suivie d'une isotherme à 230°C pendant 35 min. Les échantillons ont été injectés dans le mode de fente (1:50), employant l'hélium comme gaz vecteur (1ml/min) ; volume d'injection, 0.2  $\mu\text{l}$ .*

*Les chromatogrammes CPG/SM ont été réalisés avec un détecteur de masse Perkin-Elmer Turbo (Quadripôle), couplé à un Perkin-Elmer Auto système XL, équipé d'une colonne capillaire Rtx-wax ; la température de la source d'ions, 150°C ; énergie d'ionisation, 70 eV. L'ionisation électronique (EI) a été obtenue sur l'intervalle des masses 35-350 Da. Ces analyses ont été effectuées au niveau du Laboratoire CPN de l'Université de Corse - France.*

## Partie expérimentale

### I-Tests phytochimiques

Une étude phytochimique consiste à rechercher des catégories de molécules dans la plante qui peuvent servir, non seulement, à la découverte d'agents thérapeutiques, mais aussi, être à l'origine de la révélation de nouvelles sources de matériaux économiques.

Pour cela, nous avons réalisé un screening phytochimique sur la *Rhaponticum acaule* L. Ce dernier est réalisé *via* des réactions de précipitation et/ou de coloration par des réactifs spécifiques.

Au cours de ces tests, trois solvants de polarité croissante (Et<sub>2</sub>O, MeOH et H<sub>2</sub>O) sont employés. Les modes opératoires d'extractions, préparation des réactifs, caractérisation sont déjà décrits dans des mémoires de magisters et de doctorats (COSNA):

- 1) BENMEHDI Houcine, Valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la Coloquinte, mémoire de Magister, Université Abou bekr belkaïd - Tlemcen, Juin 2000.
- 2) BABA AHMED Abderrezak, Séparations et caractérisations de principes actifs d'*Aristida pungens* L., mémoire de Magister, Université Aboubekr Belkaïd – Tlemcen, Juin 2005.
- 3) DJABOU Nassim, *Sambucus nigra* L., une plante de la pharmacopée traditionnelle Nord africaine, mémoire de Magister, Université Aboubekr Belkaïd – Tlemcen, Octobre 2006.
- 4) BENDIABDELLAH Amel, Les polyphénols dans les racines d'*Arbutus unedo* L., mémoire de Magistère, Université Aboubekr Belkaïd – Tlemcen, Mai 2007.
- 5) BOUHADJERA Kaltoum, Etudes chimiques et biologique de deux plantes médicinales : *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L., thèse de Doctorat d'Etat, Université Aboubekr Belkaïd – Tlemcen, Septembre 2005.
- 6) DIB Mohamed El Amine, Etude de l'activité antimicrobienne de quelques polyphénols extraits des racines d'*Arbutus unedo* L., thèse de Doctorat, Université Aboubekr Belkaïd – Tlemcen, Juin 2008.

## II-Dosage des composés phénoliques

### II-1Extraction avec Eau/Acétone

Dans un ballon de 150 ml surmonté d'un réfrigérant à reflux, introduire la matière végétale (0.5 g) dans un mélange constitué d'acétone (70 ml) et d'eau (30 ml). Porter l'ensemble à reflux pendant 40 min. Après refroidissement, noter A la solution résultante.

### II-2 Dosage des phénols totaux

Dans un bécher de 50 ml, mélanger la solution A (7 ml), l'eau distillée (10 ml), le chlorure ferrique (1 ml) ( $\text{FeCl}_3$  0.1 M + HCl 0.1 N) et l'hexacyanoferrate de potassium (1 ml). Laisser le mélange réagir pendant 10 min à température ambiante, ensuite, lire l'absorbance à  $\lambda = 725$  nm.

*Expression des résultats*

La formule suivante permet le calcul de la teneur en phénols totaux exprimée en mg/g.

T : teneur en phénols totaux.

A : absorbance à  $\lambda$  max.

V : volume de l'extrait total.

D : facteur de dilution égal à 2.

Ps : poids de la matière sèche.

$$T = A \times (V \times D / Ps)$$

### II-3 Dosage des tanins hydrolysables

Dans un bécher de 10 ml, mélanger la solution A (1 ml) et une solution de  $\text{FeCl}_3$  acidifiée (3.5 ml) préparée à partir d'une solution de  $\text{FeCl}_3$  0.01M et une solution d'HCl 0.001M. Laisser le mélange réagir pendant 15 secondes puis lire l'absorbance à  $\lambda = 660$  nm.

*Expression des résultats*

T% : pourcentage des tanins hydrolysables.

D.O : densité optique.

$E_{\text{mole}}$  : Const=2169 de l'acide gallique

M : 300 g/mole.

Ps : poids de l'échantillon.

$$T\% = D.O \times (M \times V / E_{\text{mole}} \times P)$$

#### **II-4 Dosage des flavonoïdes**

Extraire la matière végétale (10 g) avec du MeOH (200 ml) en utilisant un appareil soxhlet pendant 24 h. Procéder à une filtration puis une élimination du MeOH au rotavapor. Dans un bécher, mélanger l'extrait méthanolique (0.25 ml), l'eau distillée (1.25 ml) et  $\text{KNO}_2$  5% (75  $\mu\text{l}$ ) puis laisser réagir à température ambiante pendant 6 min. Ajouter, ensuite,  $\text{AlCl}_3$  10% (150  $\mu\text{l}$ ). De même, laisser réagir pendant 5 min toujours à température ambiante. Enfin, ajouter NaOH 1M (0.5 ml) puis ajuster le volume avec l'eau distillée jusqu'à 3 ml. Lire l'absorbance contre un blanc à  $\lambda = 510$  nm, et comparer avec une solution standard de pyrocatéchol de concentration connue. Le résultat est exprimé en équivalent de pyrocatéchol.

#### **III-Extractions sélectives**

##### **III-1 Dégraissage du matériel végétal**

Extraire les feuilles (40 g) avec de l'hexane, pendant 12 h, en utilisant un appareil soxhlet. Après évaporation du solvant, le résidu obtenu constitue la fraction de la matière grasse.

##### **III-2 Séparation des acides gras et des insaponifiables**

Dans un ballon de 250 ml surmonté d'un réfrigérant à reflux, introduire le résidu gras obtenu après dégraissage du matériel végétal (1.06 g) et une solution méthanolique de KOH 2N (160 ml). Porter l'ensemble à reflux pendant 1h 30min. Après évaporation du MeOH, extraire la solution résultante avec l'hexane (fraction insaponifiables). Décantier puis acidifier la phase aqueuse avec du HCl concentré. Extraire, ensuite, avec l' $\text{Et}_2\text{O}$  (2x20 ml) puis sécher sur  $\text{CaSO}_4$ . Un résidu d'acide gras est obtenu après concentration de la phase organique.

##### **III-3 Estérification des acides gras**

Dans un ballon de 250 ml surmonté d'un réfrigérant à reflux, dissoudre le mélange d'acide gras (1.03 g) dans du MeOH anhydre (15 ml). Ajouter du  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré (1 ml) gouttes à gouttes. Porter l'ensemble à reflux pendant 3 h. Couler le mélange réactionnel sur de l'eau glacée (50 ml) contenue dans une ampoule à décantier. Extraire la phase aqueuse, ensuite, avec du  $\text{CHCl}_3$  (3x50 ml). Sécher sur  $\text{CaSO}_4$ , puis évaporer le solvant. Un résidu d'esters méthyliques est obtenu.

##### **III-4 Extraction des polyphénols**

Dans un ballon de 500 ml surmonté d'un réfrigérant à reflux, mettre 60 g de matière végétale non dégraissée dans un mélange d'acétone (120 ml) et d'eau (180ml). Porter l'ensemble à reflux pendant 12 heures. Filtrer et concentrer la solution jusqu'à ce que le



milieu ne contienne plus que l'eau. Mettre en œuvre une série d'extraction liquide-liquide en utilisant des solvants non miscibles à l'eau, l'éther de pétrole (2×50 ml) pour éliminer les pigments, l'Et<sub>2</sub>O (3×50 ml), et enfin l'AcOEt (3×50 ml).

### **III-5 Extraction des H.E**

Nous avons utilisé la méthode d'hydrodistillation pour extraire l'H.E des fleurs et feuilles. La méthode d'extraction est décrite ci-dessous :

Dans un ballon de 2 l, mettre la matière végétale broyée (fleurs, feuilles) (200 g) dans l'eau distillée. Adapter, ensuite, un montage d'hydrodistillation complet puis chauffer l'ensemble pendant 6 heures. Récupérer les vapeurs refroidies dans une ampoule à décanter. Séparer l'huile essentielle surnageant à la surface de la phase aqueuse. Compléter l'extraction en saturant la phase aqueuse avec du sel puis extraire avec Et<sub>2</sub>O. Soumettre le résultat de l'hydrodistillation à l'analyse CPG et CPG/SM.

## Conclusion Générale

L'objet de notre étude a porté sur une plante nord africaine, commune dans toute l'Algérie septentrionale. Il s'agit de la *Rhaponticum acaule* L. C'est une plante médicinale utilisée dans la pharmacopée traditionnelle dans la région de Tlemcen comme apéritive, cholagogue, dépurative, digestive, stomachique, tonique, etc. Elle est reconnue pour son action bénéfique pour les cellules hépatiques.

Avant d'engager notre étude sur cette plante, une identification botanique a été réalisée par Pr. N. Benabadji du Département de Biologie-Université Abou bekr Belkaïd - Tlemcen. Nos investigations débutent par un criblage phytochimique sur la partie aérienne de la rhapsontique (fleurs et feuilles) qui nous a renseignés sur :

- la présence, en quantité importante, des acides gras, des tanins, des stérols, des stéroïdes et de l'H.E, des saponosides et des flavonoïdes.

- l'absence totale des coumarines, des anthracénosides, des anthocyanosides, de l'amidon, des émouls et des polyuronides.

Cette identification qualitative est suivie d'une évaluation des teneurs en phénols totaux, tanins hydrolysables et flavonoïdes. Les résultats montrent que les fleurs sont plus riches en phénols totaux et en tanins hydrolysables que les feuilles. De plus, leur contenance en flavonoïdes est approximativement la même (~ 10 mg/100 g).

Après la mise en évidence de la nature des composés présents dans notre plante, une série d'extractions est engagée. Cette dernière se résume comme suit :

- Extraction des acides gras et séparation des insaponifiables.

- Isolement des polyphénols contenus dans la partie aérienne suivi d'un fractionnement conduisant à la séparation des tanins et des flavonoïdes.

- A partir de la fraction tannique, deux composés sont isolés par CC. L'analyse CLHP révèle leurs puretés respectives à environ 99.50% et 86.0%.

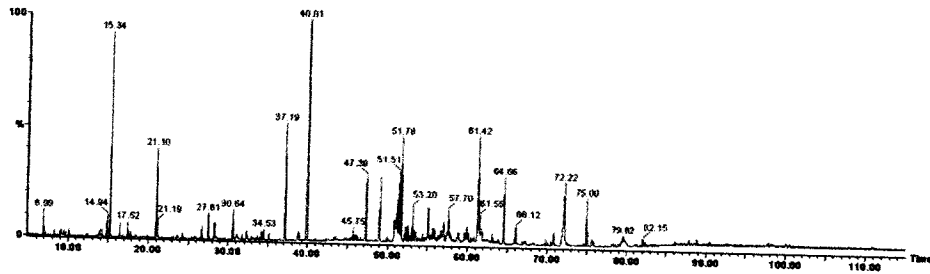
- Obtention et caractérisation de l'H.E des fleurs. En effet, une caractérisation par CPG et CPG/SM montre que cette H.E est riche en terpènes (43.38%) et en composés aromatiques (14.10%). Ces méthodes analytiques révèlent aussi la présence des hydrocarbures et de leurs dérivés (4.85%), des acides gras et leurs esters correspondants (7.79%), des époxydes et d'éthers (5.76%), d'aldéhydes (2.82%) et de cétones (1.90%). Elles montrent aussi que les constituants majoritaires

sont : le méthyle eugénol (10.14 %), l'eugénol (5.26%), l'oxyde de caryophyllène (3.45 %), le spathulénol (3.12%), l'acétate de farnesyle (3.07 %) et le linanol (2.71%).

Enfin, nous préconisons dans une étude future de caractériser tous les composés isolés de la rhapsodique et de compléter la composition de l'H.E des fleurs par la MEPS. Cette étape sera suivie d'essais d'activités biologiques et ceci dans le but de rechercher de nouvelles applications thérapeutiques de cette plante.

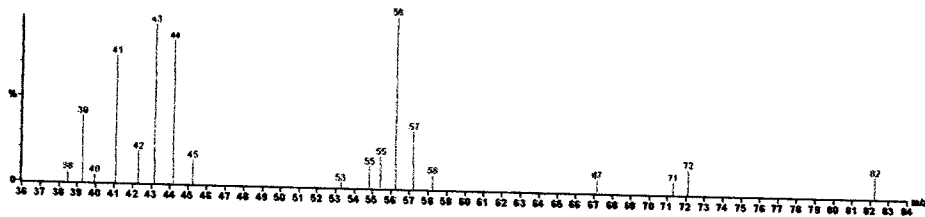
## Annexe

### A) Spectre de masse de l'H.E de la *Rhaponticum acaule* L.

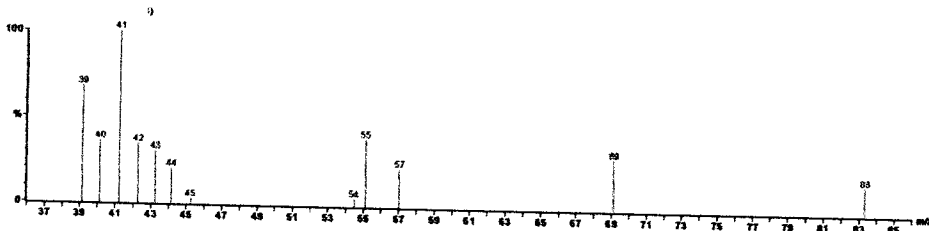


### B) Spectres de masses des constituants de l'H.E

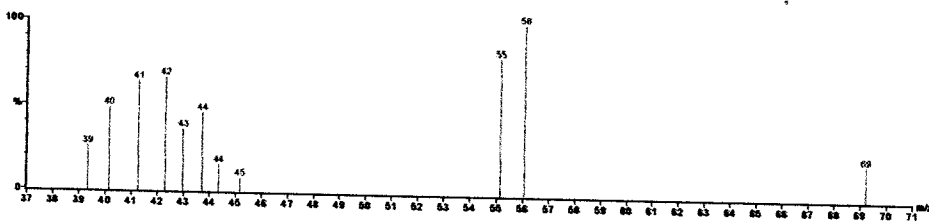
1)



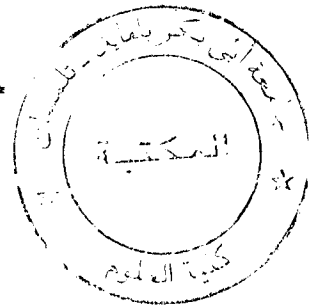
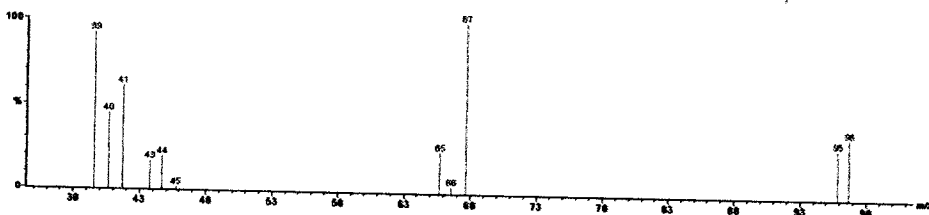
2)

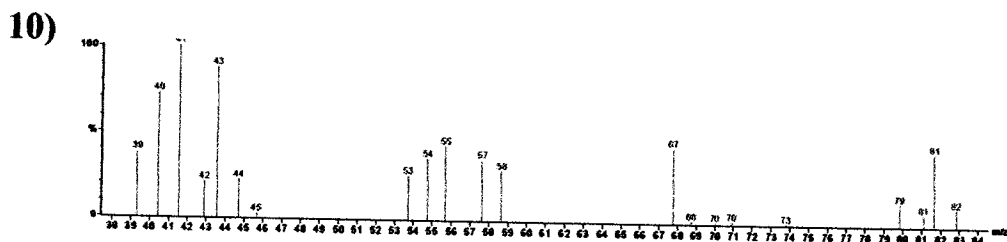
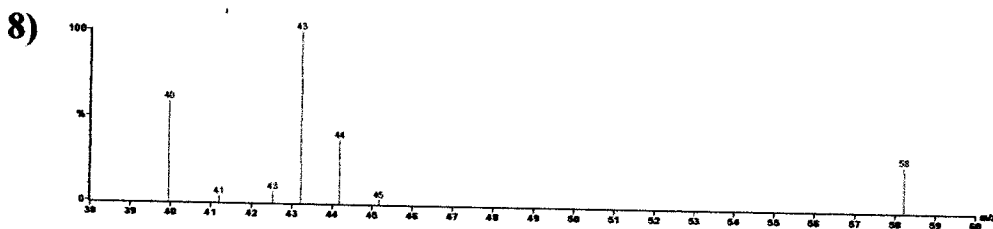
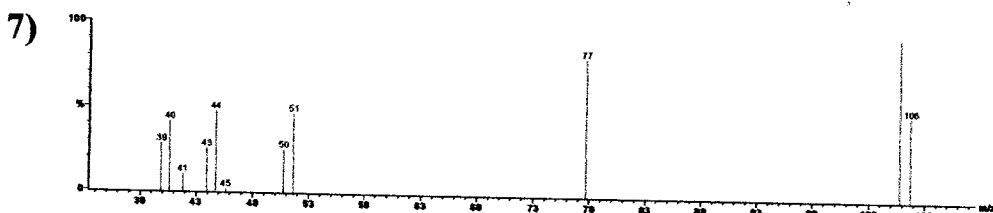
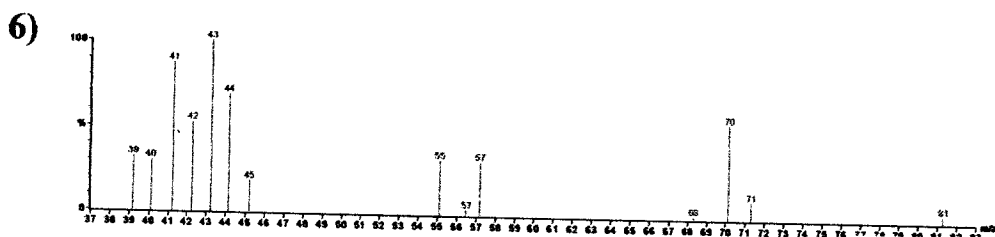
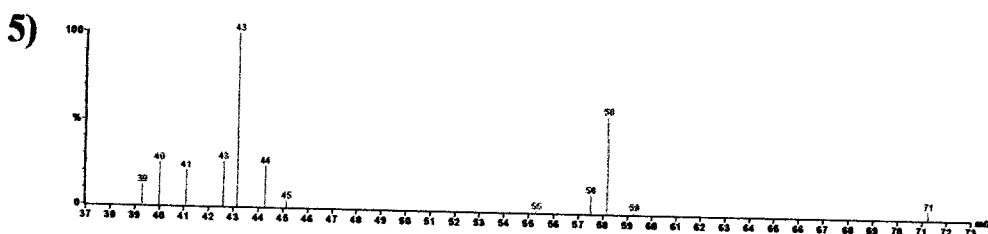


3)

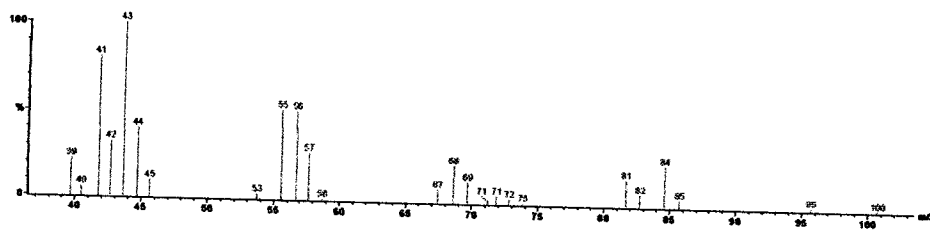


4)

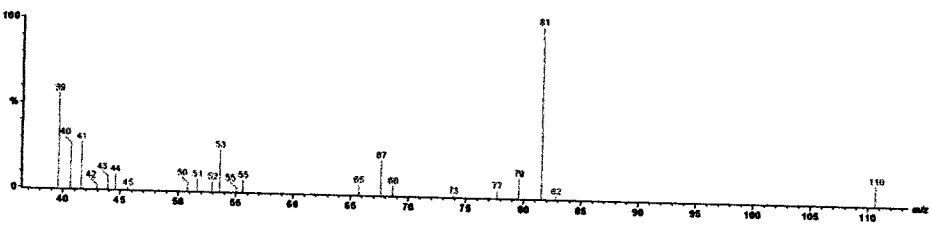




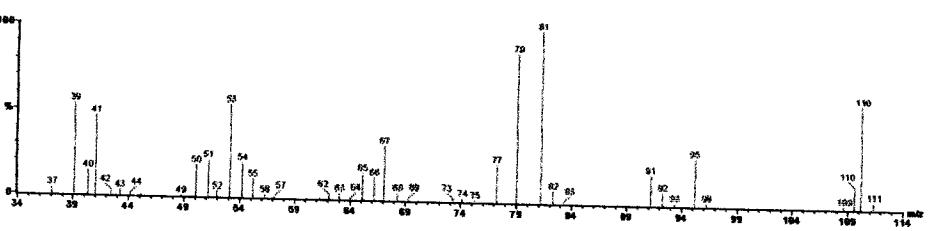
11)



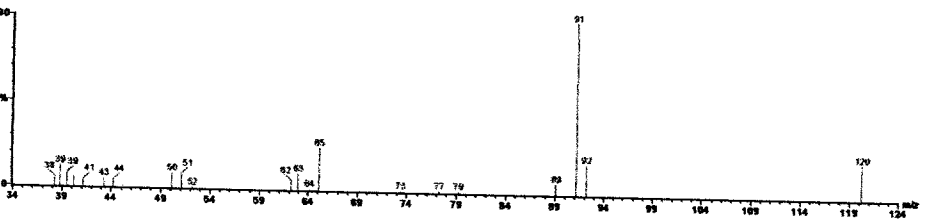
12)



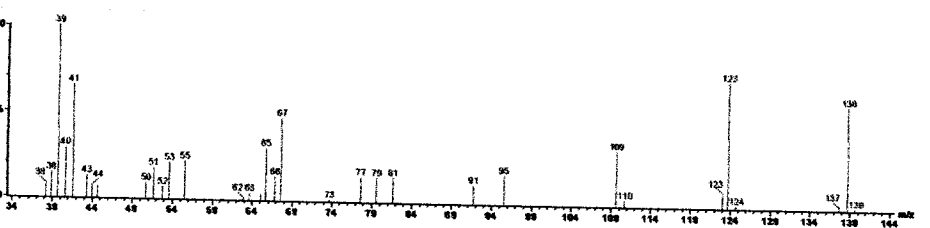
13)



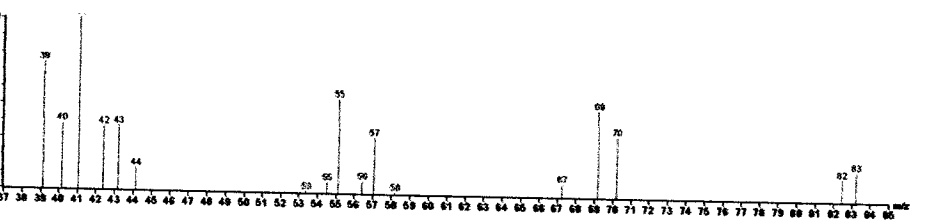
14)

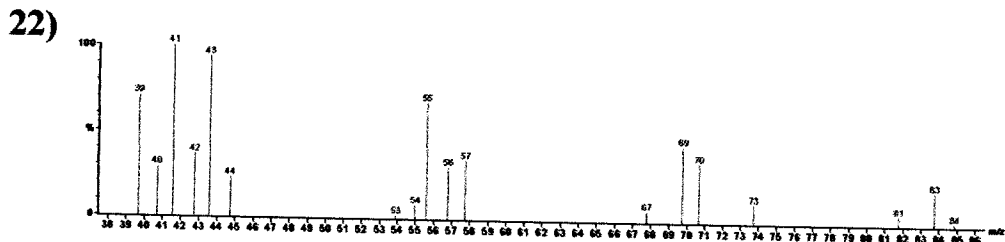
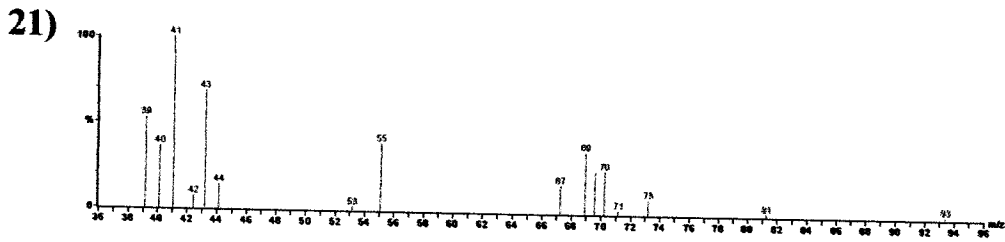
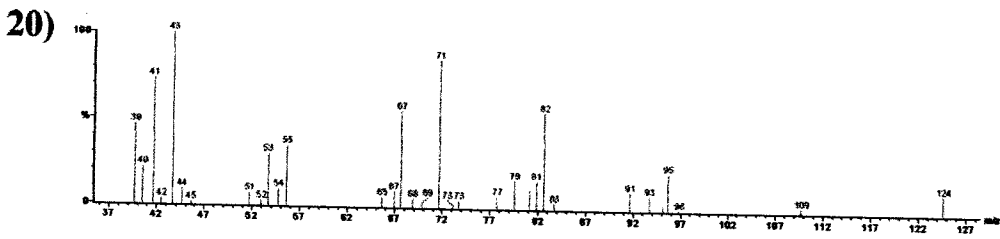
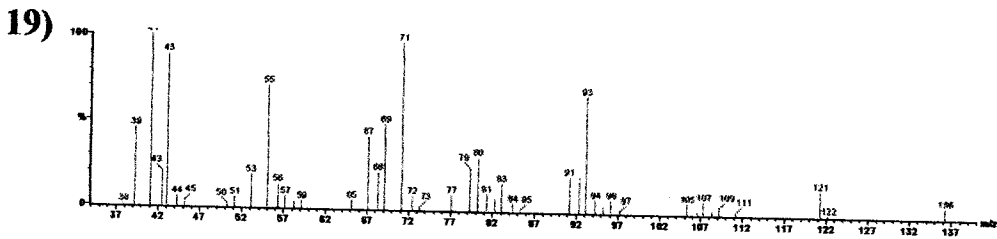
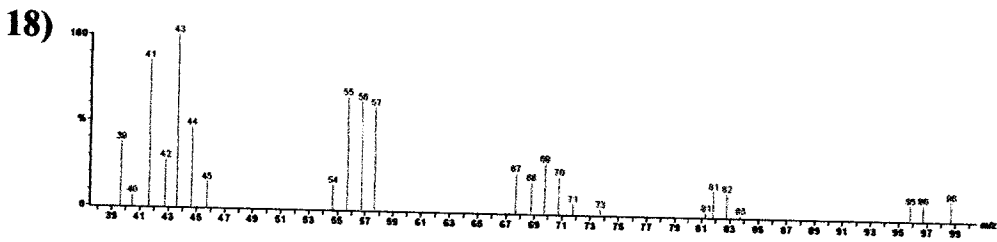
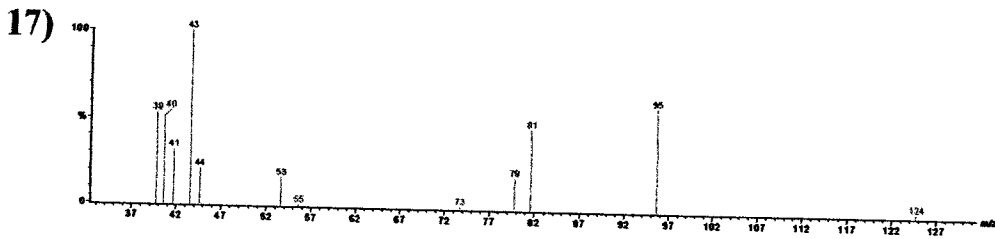


15)

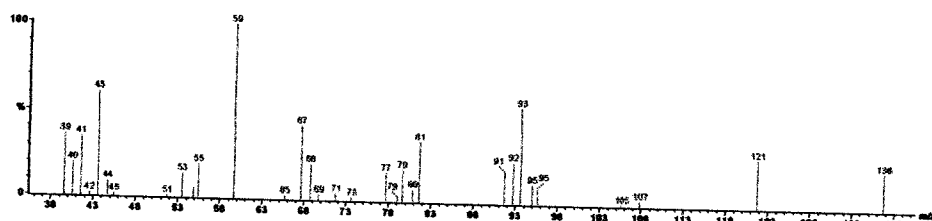


16)

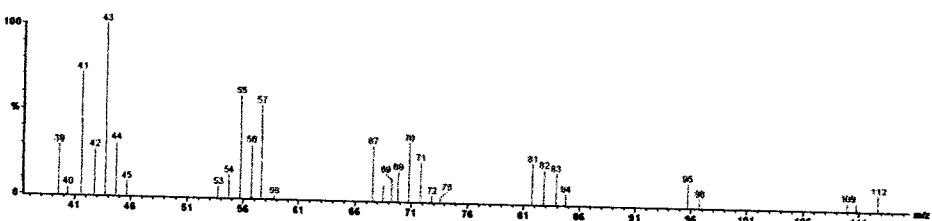




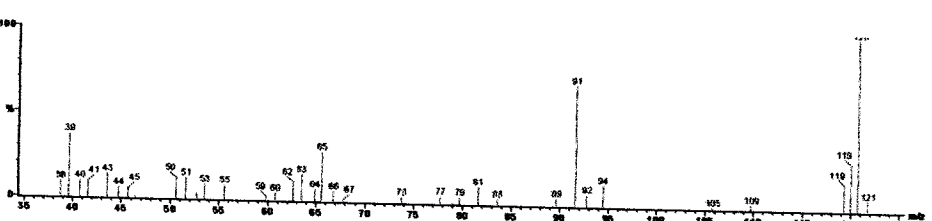
23)



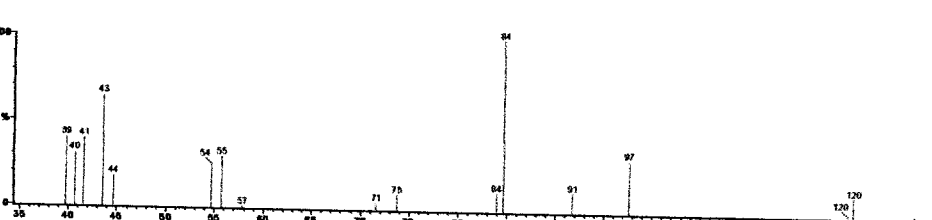
24)



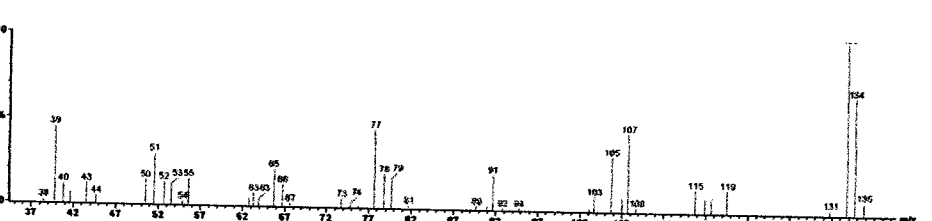
25)



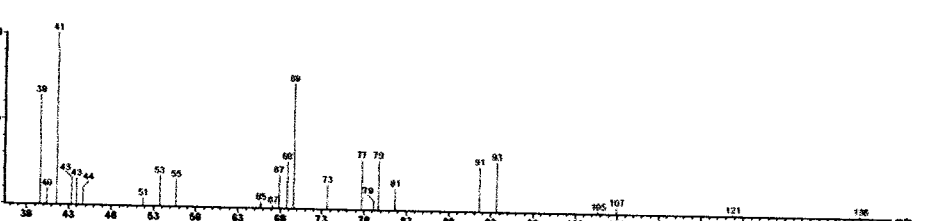
26)



27)

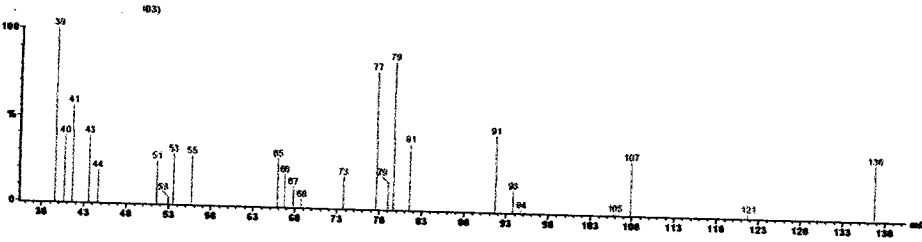


28)

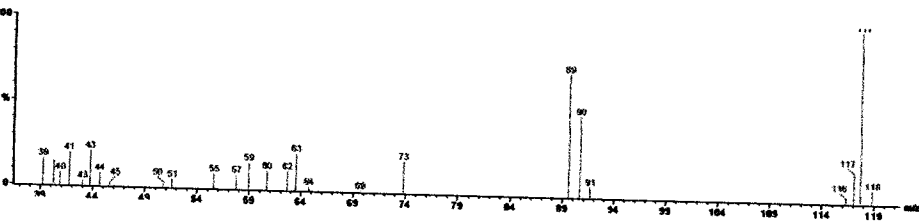




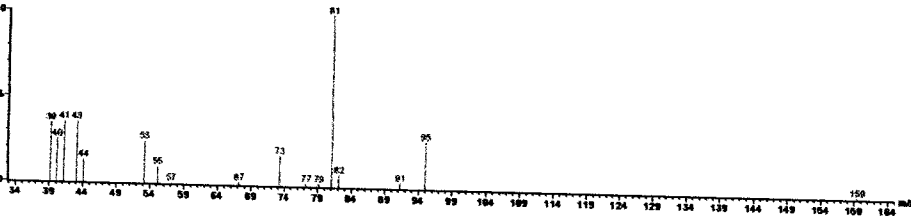
29)



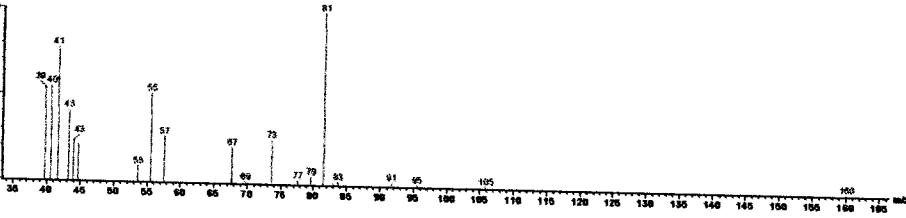
30)



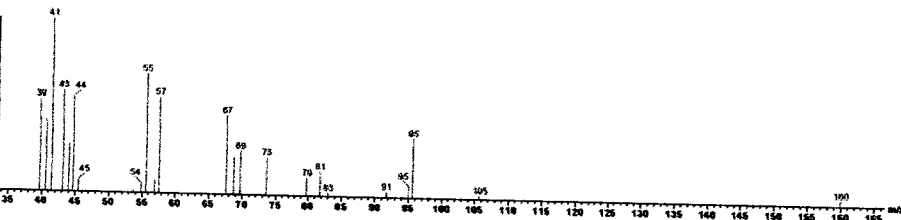
31)



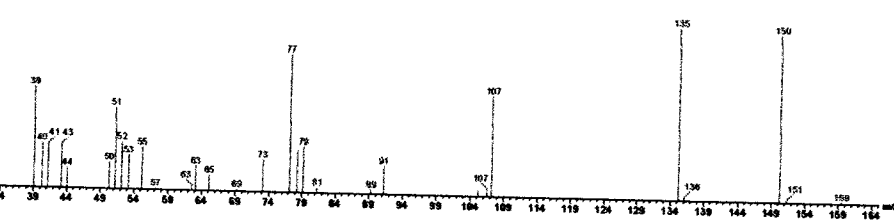
32)



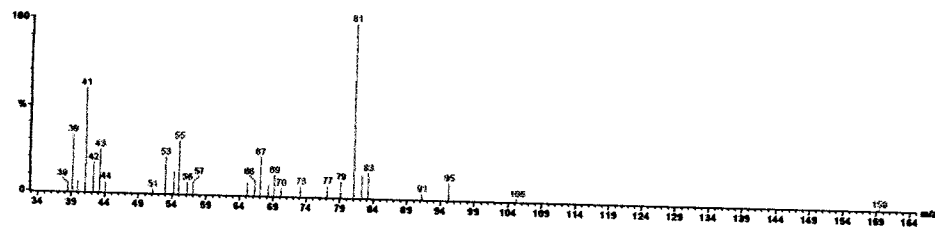
33)



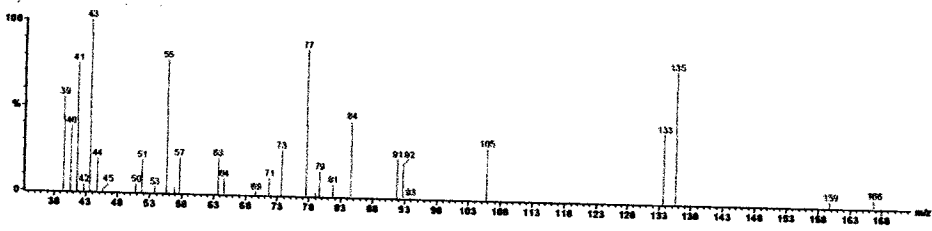
34)



35)



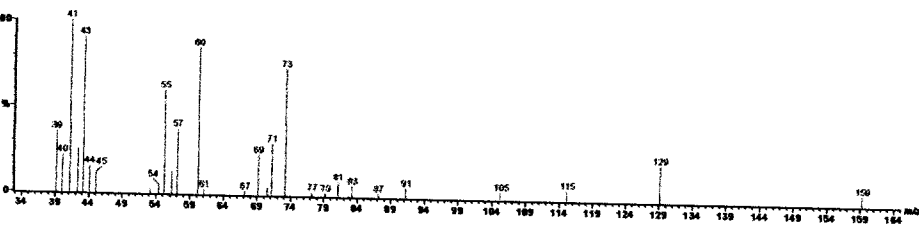
36)



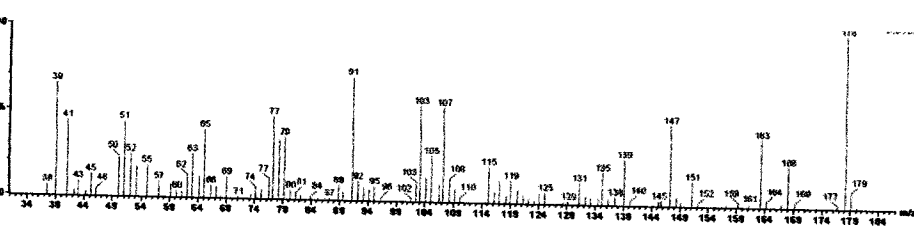
37)



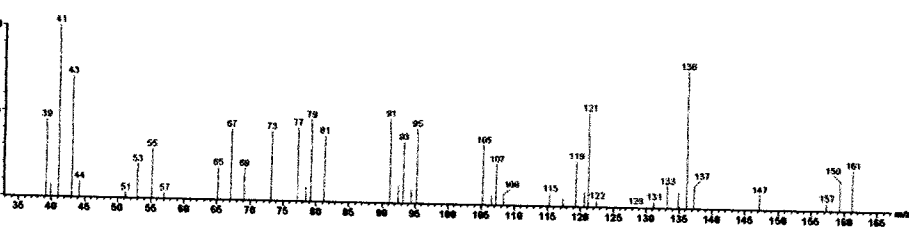
38)



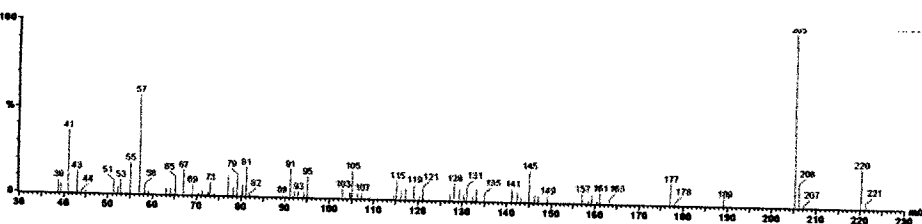
39)



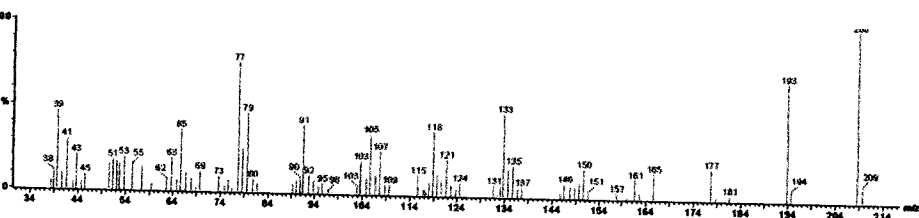
40)



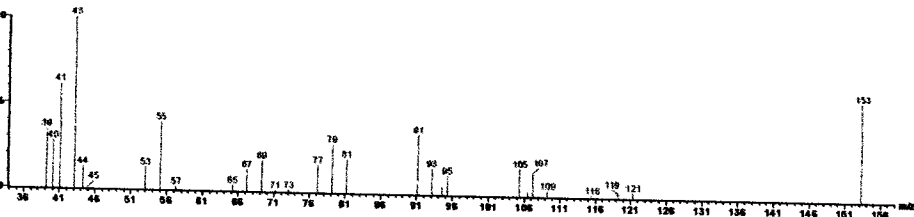
41)



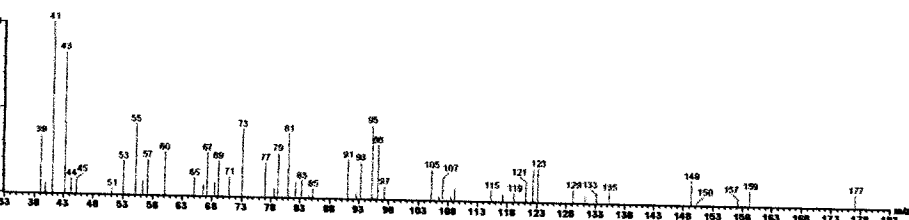
42)



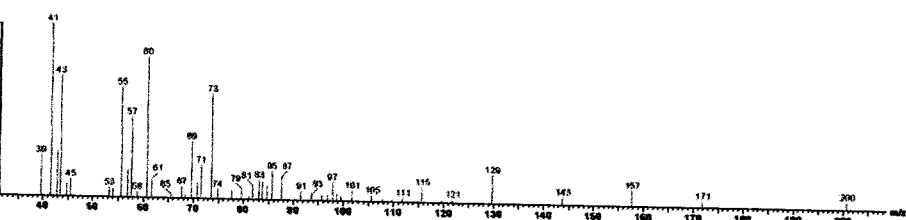
43)



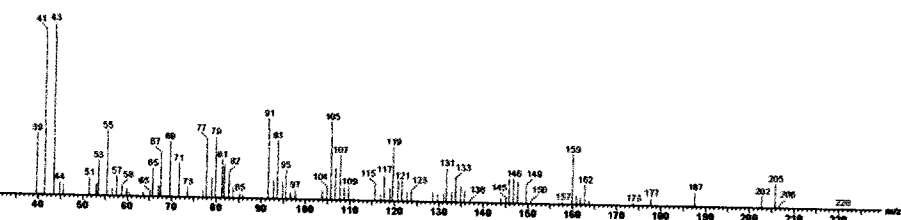
44)



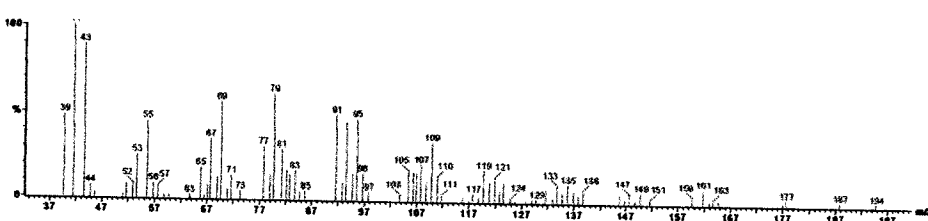
45)



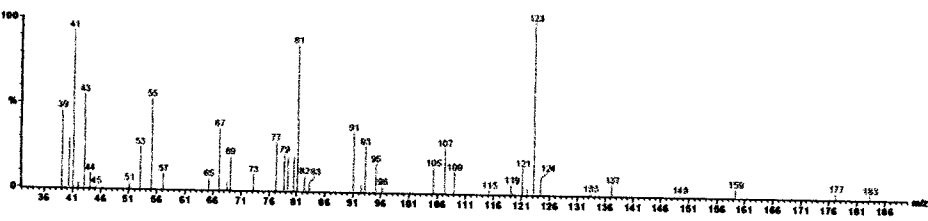
46)



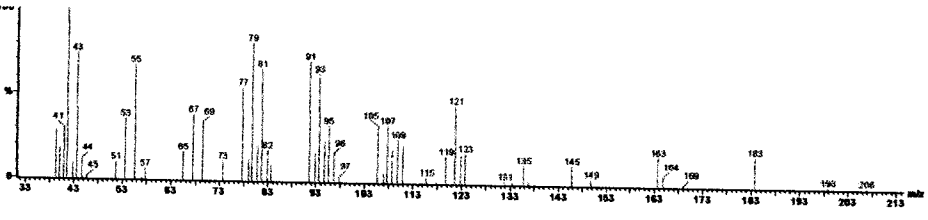
47)



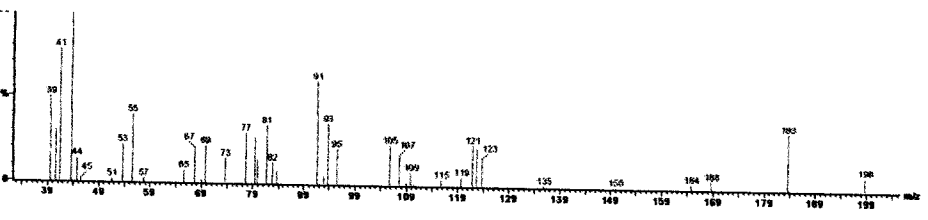
48)



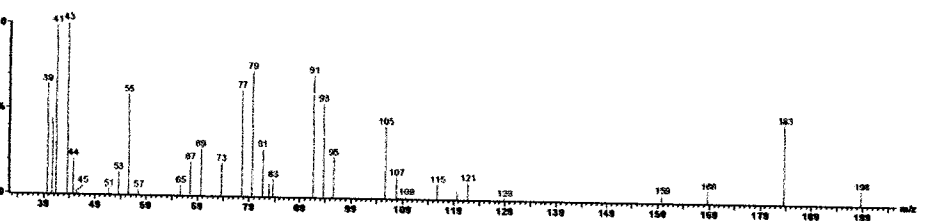
49)



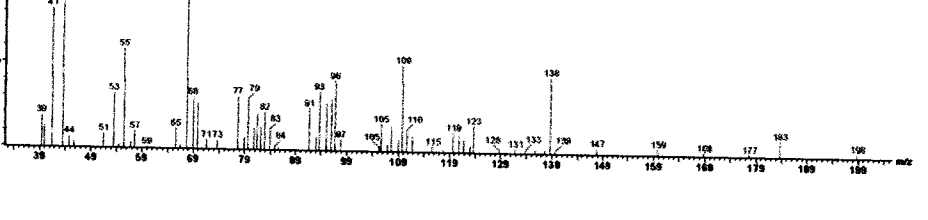
50)

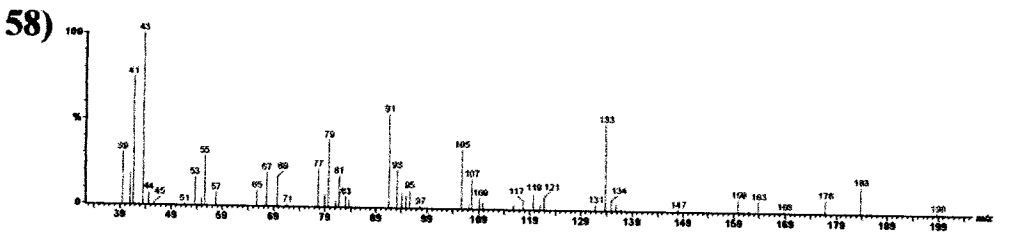
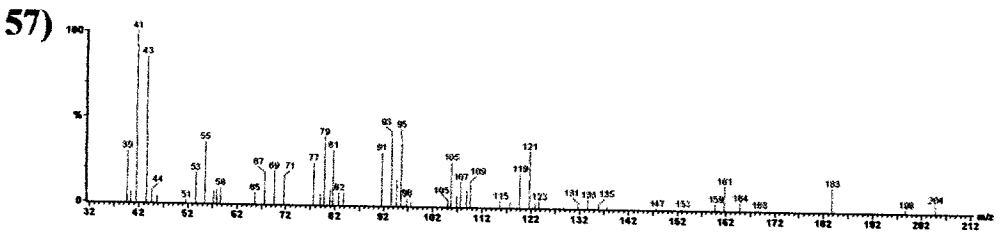
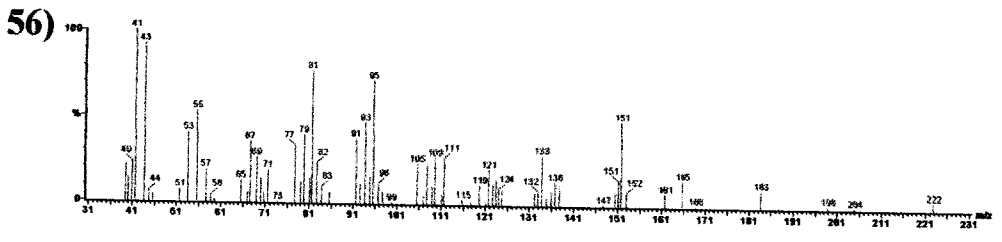
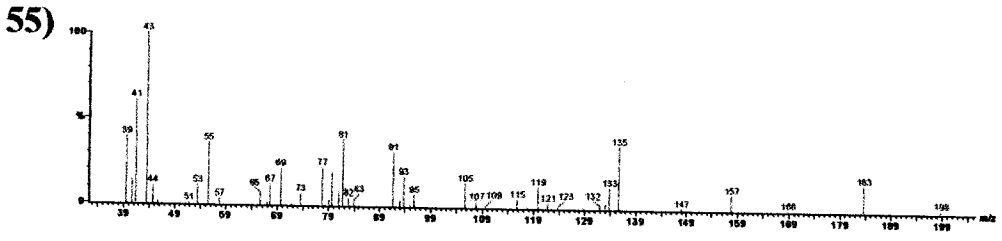
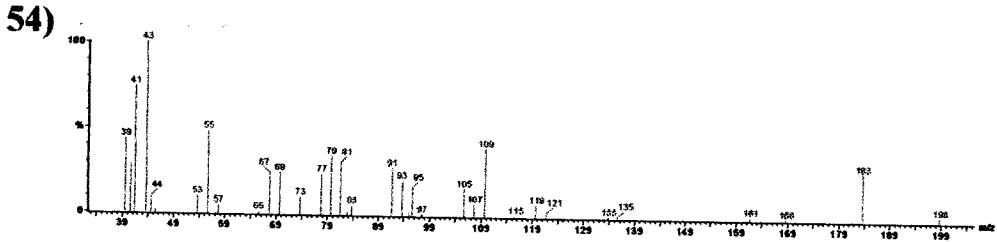
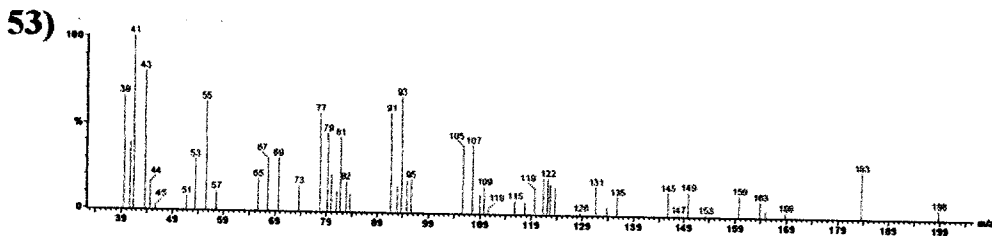


51)

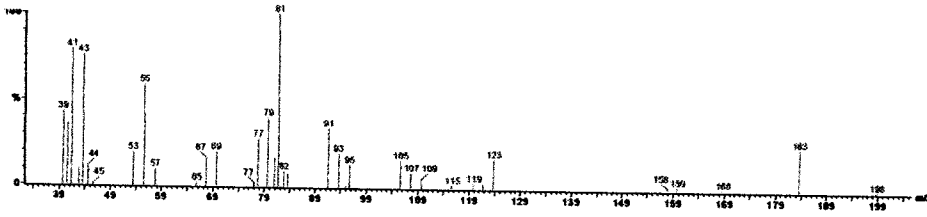


52)

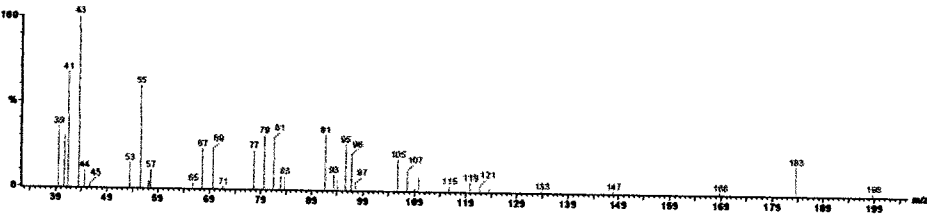




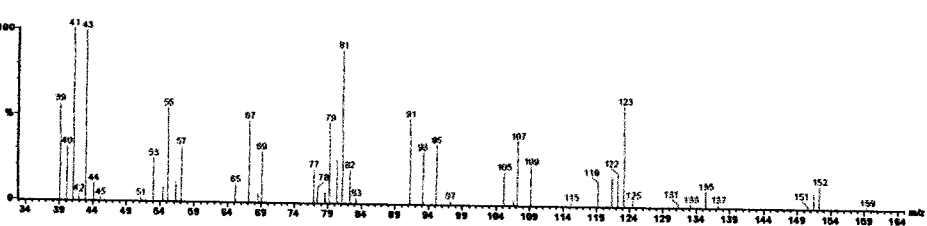
59)



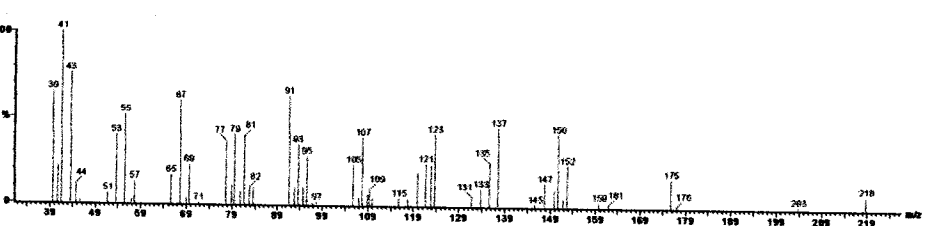
60)



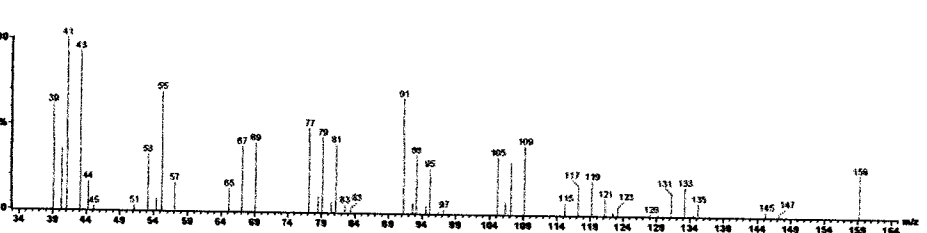
61)



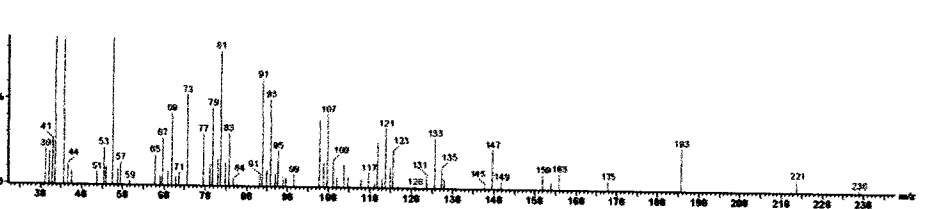
62)

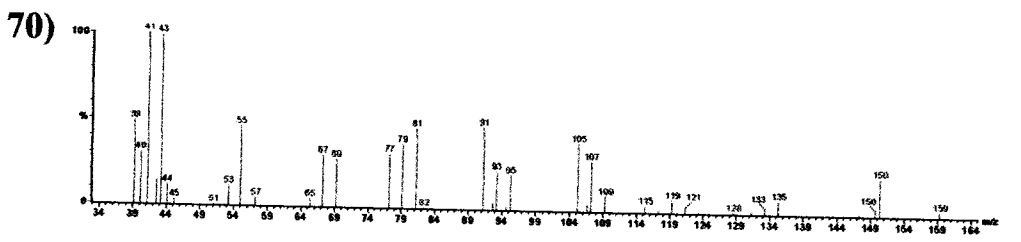
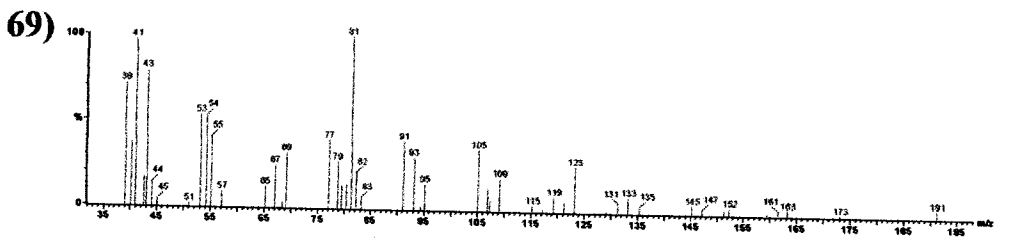
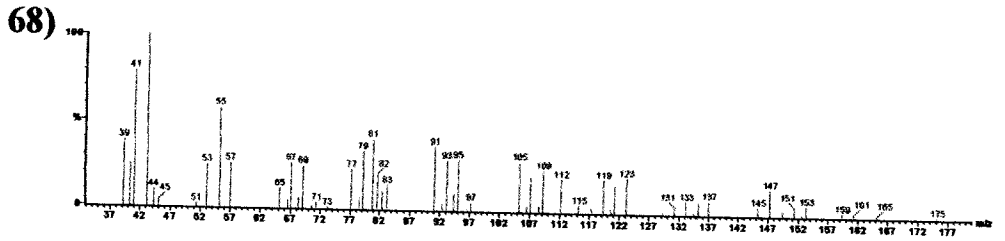
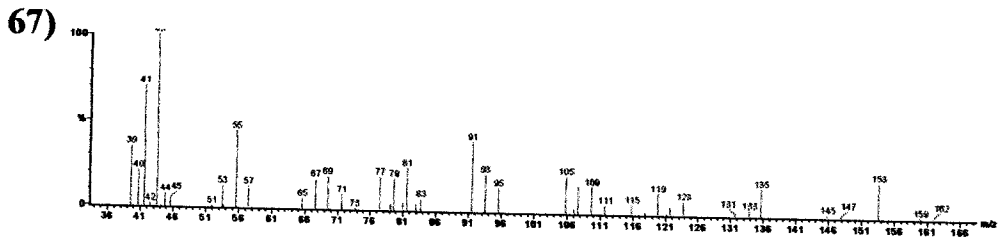
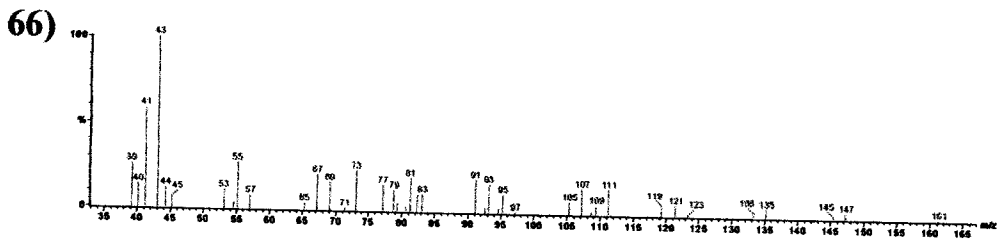
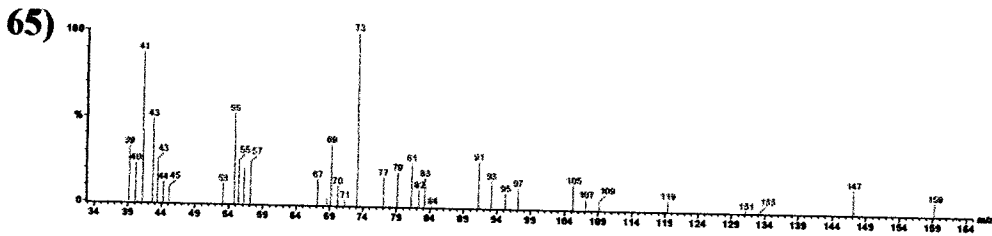


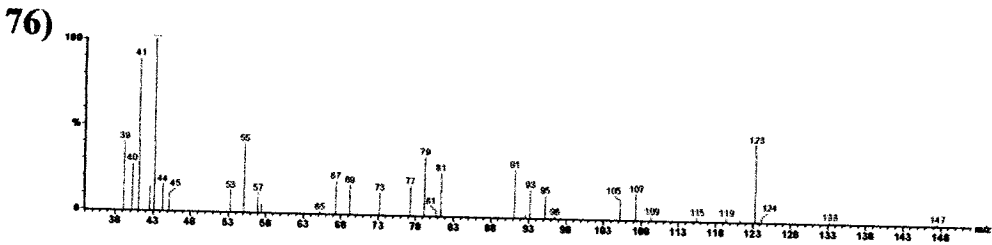
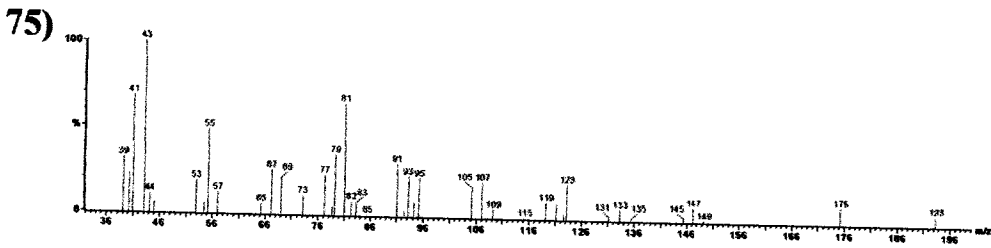
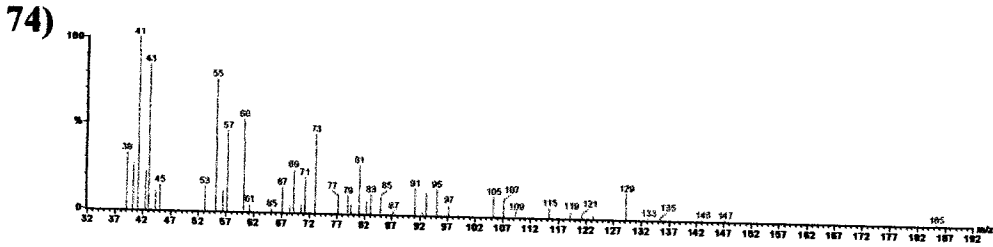
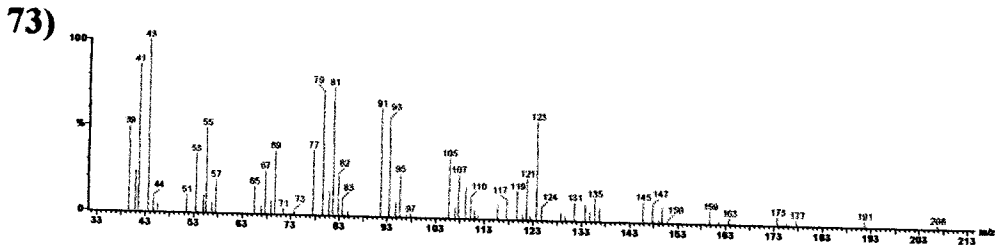
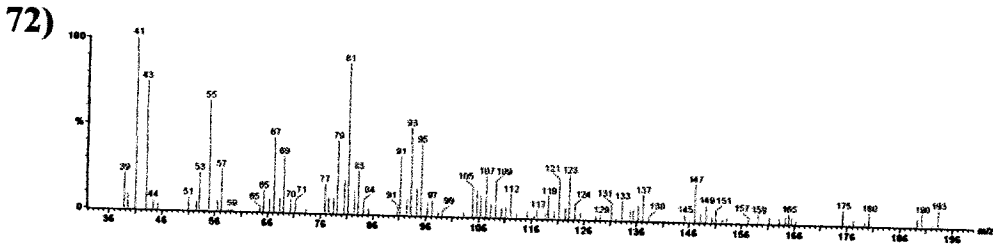
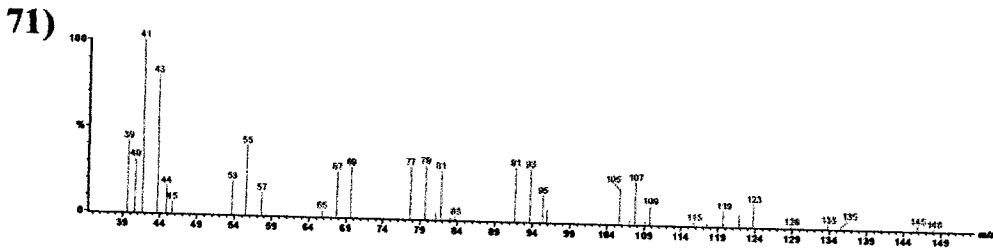
63)



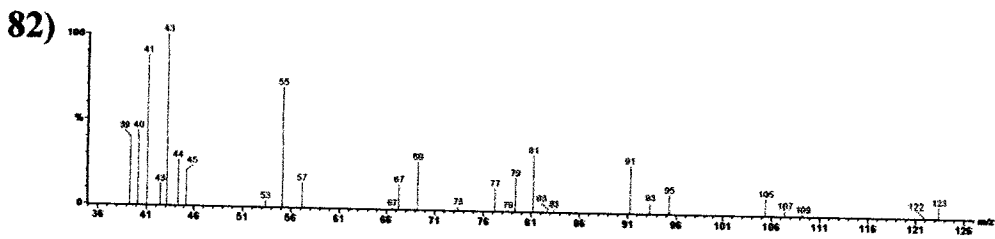
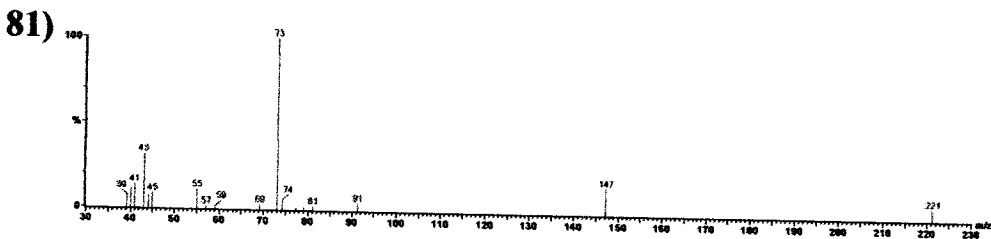
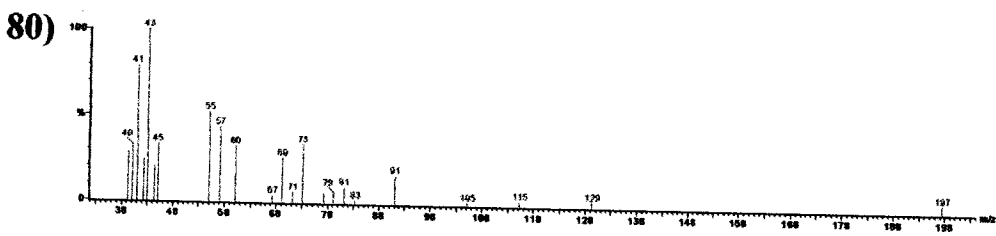
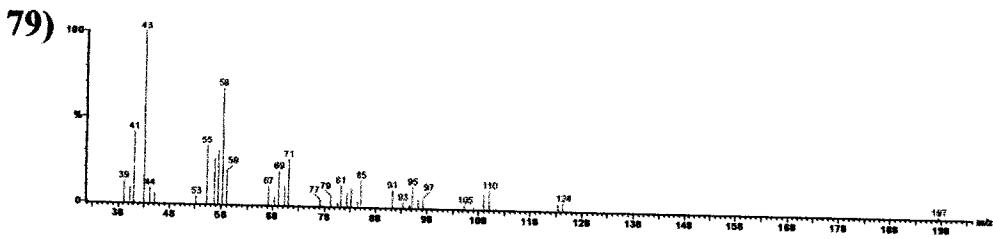
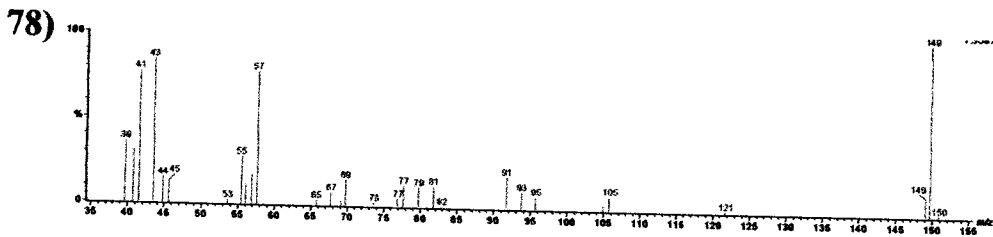
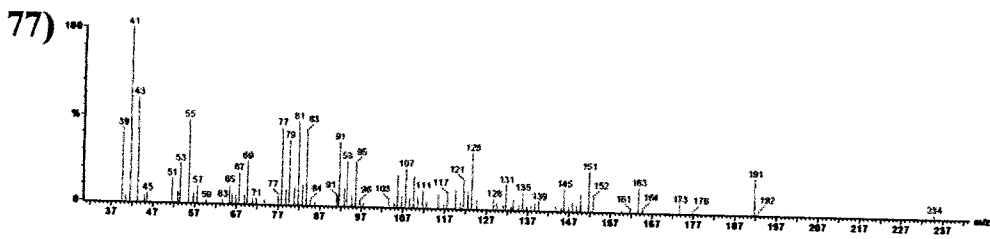
64)



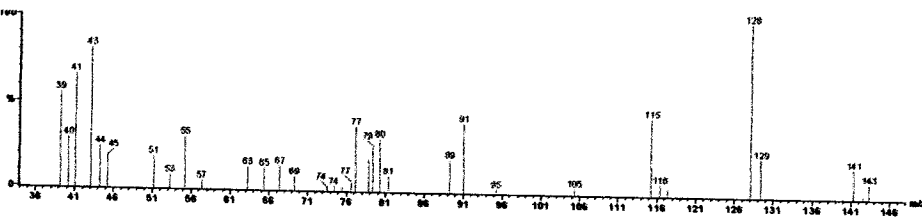




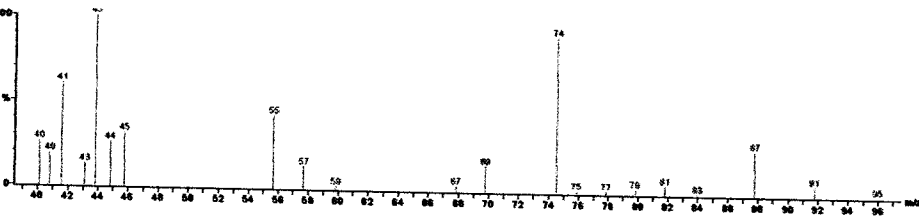




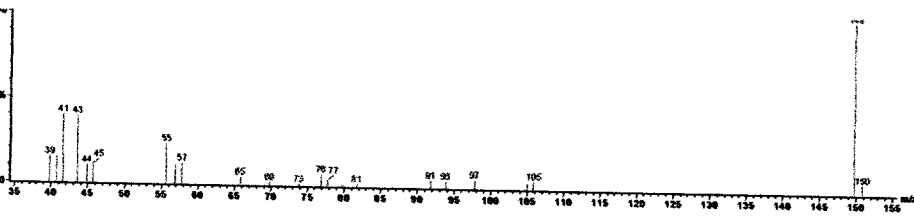
83)



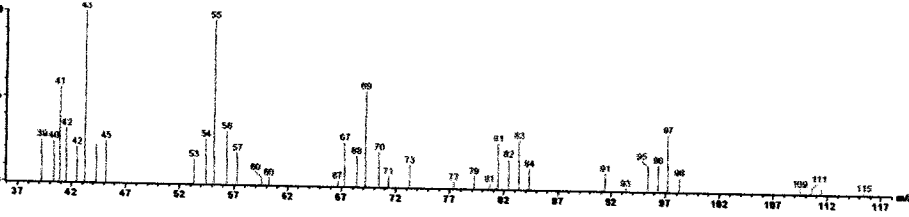
84)



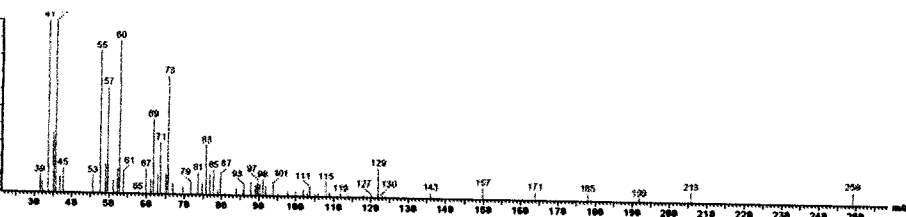
85)



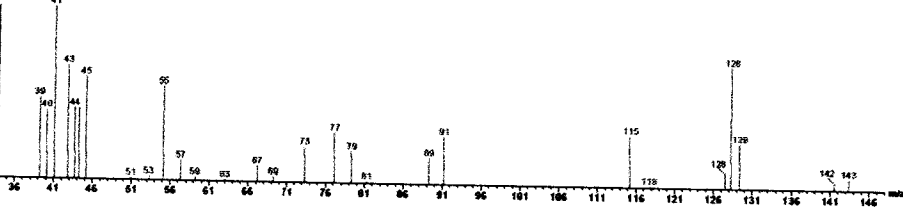
86)



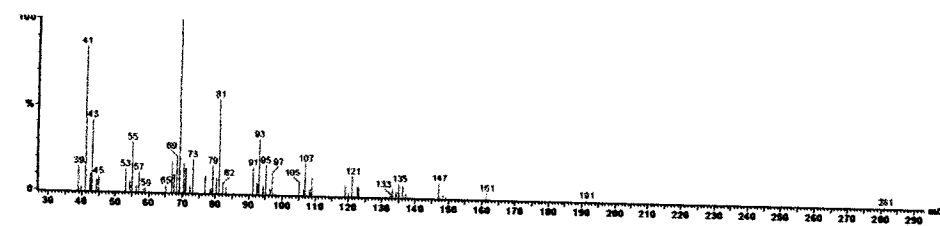
87)



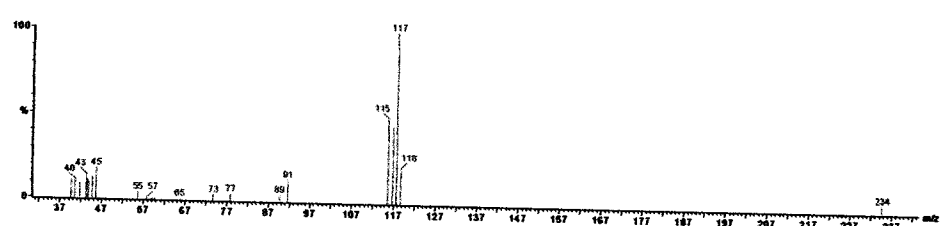
88)



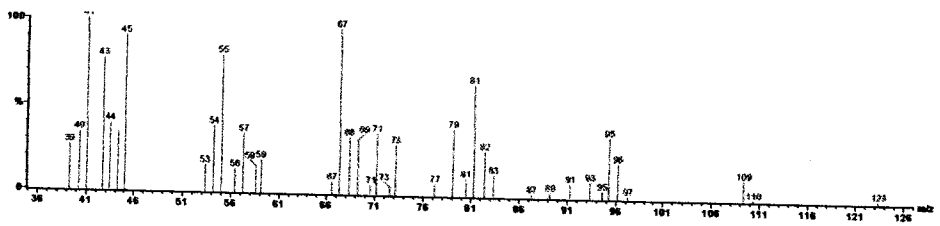
89)



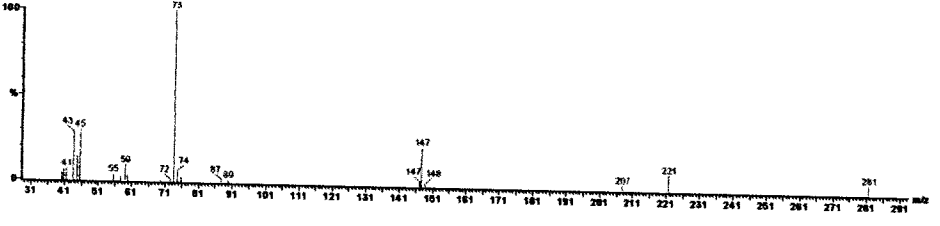
90)



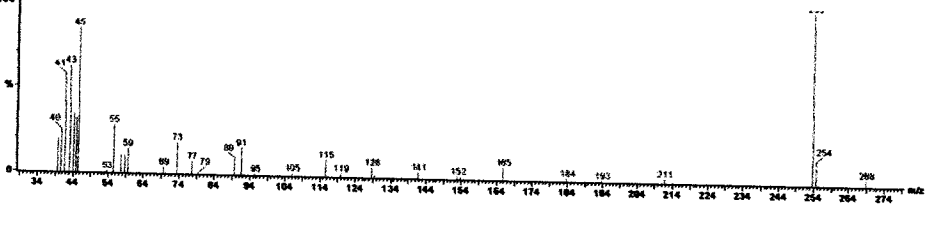
91)



92)



93)



94)

