

M/547 - 27/02

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID - TLEMCEM -
FACULTE DES SCIENCES - DEPARTEMENT DE CHIMIE
LABORATOIRE DE CHIMIE ORGANIQUE SUBSTANCES NATURELLES ET ANALYSE
(COSNA)



MEMOIRE

Pour l'obtention du

DIPLOME DE MAGISTER

Option : CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE



THEME

SCREENING PHYTOCHIMIQUE DE LA RHAPONTIQUE, UNE PLANTE COMMUNE DANS TOUTE L'ALGERIE SEPTENTRIONALE

Présenté par : M^{elle} BECHLAGHEM KARIMA

Devant la commission d'examen formée de :

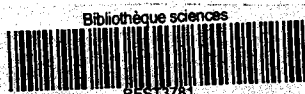
M^r JOSEPH KAJIMA MULENGI
M^r BOUFELDJA TABTI
M^r NOURI BENABADJI
M^r HOCINE ALLALI

Professeur
Professeur
Professeur
Maitre de Conférences

Président
Examinateur
Examinateur
Encadreur

UABB - Tlemc
UABB - Tlemc
UABB - Tlemc
UABB - Tlemc

Année Universitaire 2008/2009



Inscrit
Date le	29/10/2009
Code:	3781

Bien que la médecine moderne soit bien développée presque partout dans le monde, une proportion non négligeable de la population dans les pays en développement compte encore sur les tradipraticiens, les plantes médicinales et les médicaments à base de plantes pour leurs soins de base.

En outre, au cours des décennies passées, l'intérêt public pour les thérapies naturelles a considérablement augmenté dans les pays industrialisés, en même temps que l'utilisation des plantes médicinales et des médicaments à base de plantes.

Les formes nombreuses et variées des produits de la médecine traditionnelle ont évolué dans des contextes ethnologiques, culturels, climatiques, géographiques et même philosophiques largement différents.

« Réglementation des médicaments à base de plantes, La situation dans le monde »
(WHO/TRM/98.1, Organisation Mondiale de la Santé, Genève)



Remerciements

Ce mémoire est le résultat d'un travail effectué au sein du laboratoire : Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA) dirigé par Monsieur JOSEPH KAJIMA MULENGI, Professeur à l'Université de Tlemcen.

Je voudrais adresser mes remerciements :

A Monsieur JOSEPH KAJIMA MULENGI,
Professeur à l'Université de Tlemcen

A Monsieur BOUFELDJA TABTI,
Professeur à l'Université de Tlemcen, Doyen de la Faculté des Sciences

A Monsieur NOURI BENABADJI,
Professeur à l'université de Tlemcen

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce mémoire.

Je tiens à remercier plus particulièrement :

Le Professeur JOSEPH KAJIMA MULENGI, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

En témoignage de ma profonde reconnaissance

Le Docteur HOCINE ALLALI, Maître de conférences à l'Université de Tlemcen, au côté de qui j'ai eu plaisir à travailler, pour son aide, et ses conseils tout au long de ce travail.

En témoignage de ma sincère reconnaissance



Je ne saurais remercier ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour la réalisation de certaines étapes de ce travail en particulier :

Monsieur BENAMAR DAHMANI, Directeur du laboratoire de Spectrochimie et pharmacologie structurale, Département de Chimie, faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, et à ses étudiants pour la réalisation des analyses CLHP.

Monsieur NASSIM DJABOU, pour sa contribution et son aide concernant la réalisation de l'analyse par CPG et CPG/SM des huiles essentielles.

Monsieur BOUMEDIENNE KHALDI Ingénieur au laboratoire du Département de Chimie, Faculté des Sciences, pour son aide.

Monsieur DJAMEL BENDIABDALLAH pour la réalisation des analyses spectrales (IR, UV).

Je remercie également :

Monsieur MOHAMED AMINE DIB, et Madame SALIMA MERIAH pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée.

Monsieur CHADLI REDOUANE, pour son aide tout au long de ces trois années.

Je remercie aussi tous les collègues et tous les étudiants de Master, je leur exprime ma profonde sympathie et je leur souhaite beaucoup de réussite.



Sommaire

	Page
Introduction Générale	01
Chapitre I : Quelques Notions sur les Plantes Médicinales	03
I. Introduction.....	03
II. Plantes en médecine.....	03
III. Valeur économique des plantes médicinales.....	04
IV. Ethnopharmacologie, une science pluridisciplinaire.....	05
V. Tradition empirique à l'épreuve du laboratoire.....	06
VI. Exemple d'une plante nutritive et curative.....	06
VII. Remèdes naturels en toute sécurité.....	07
VIII. Hépatotoxicité des plantes.....	08
Bibliographie.....	09
Chapitre II : Etude Botanique de la <i>Rhaponticum acaule</i> L. (Astéracées)	11
I. Introduction.....	11
II. Systématique.....	11
III. Famille des Astéracées ou Composées.....	12
IV. Sous-familles.....	14
V. Genre <i>Rhaponticum</i>	15
VI. Espèce <i>Rhaponticum acaule</i> L.	15
Bibliographie.....	17
Chapitre III : Etude des Métabolites Primaires et Secondaires	18
I. Introduction.....	18
II. Métabolites primaires.....	19
III. Métabolites secondaires.....	40
IV. Conclusion.....	62
Bibliographie.....	63

Chapitre IV : Extraction et Méthodes d'Analyse.....	70
I. Introduction.....	70
II. Méthodes d'extraction.....	70
III. Purification & méthodes d'identifications des constituants d'un mélange.....	76
Bibliographie.....	82
Chapitre V : Travaux Réalisés, Résultats et Discussions.....	86
I. Introduction.....	86
II. Matière végétale.....	86
III. Examen phytochimique.....	87
IV. Réactions de dosages.....	89
V. Extraction et purification.....	90
VI. conclusion.....	107
Bibliographie.....	108
Chapitre VI : Partie Expérimentale.....	109
Généralités.....	109
I. Examen phytochimique.....	110
II. Dosages.....	110
III. Extractions et purifications.....	112
Conclusion Générale.....	115

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À la mémoire de mon père, à qui je dois tant. Que dieu le garde en son vaste paradis.

À ma chère mère, pour tous les sacrifices.

À mes frères et sœurs, que dieu les garde.

À mes neveux et à mes nièces.

À toute la famille.

À celui qui m'a tant encouragé.

« Avec toute mon affection »



Introduction Générale



Introduction Générale

Depuis fort longtemps, les plantes médicinales furent le principal recours du médecin pour la fabrication de remèdes pharmaceutiques.

Avec le développement de la chimie, la découverte des complexes processus de synthèse organique et l'explosion en matière de médecine moderne, les plantes médicinales et les remèdes maintiennent leur place. Leurs réservoirs en matières premières furent et sont toujours exploités pour isoler des matières premières irremplaçables.

Au cours de l'évolution humaine, la médecine populaire et l'herboristerie ne cessèrent jamais de faire appel aux simples moyens et s'employèrent même à maintenir vivante une tradition thérapeutique commune dès les premiers temps de cette évolution.

A l'époque moderne, l'industrie pharmaceutique, les médecins et les équipes de chercheurs tournent à nouveau leur intérêt vers les ressources naturelles et les plantes médicinales.

Les plantes médicinales et leur utilisation diverses peuvent jouer un rôle important dans l'économie surtout dans les pays en voie de développement qui peuvent à un certain degré remplacer quelques importations des pays développés, d'où la nécessité d'une meilleure prise en charge de ce patrimoine national (étude, culture, protection, etc.).

Nous pouvons dire que le monde végétal dans lequel nous vivons est très riche et très diversifié et la plupart des propriétés de beaucoup de plantes qui nous entourent restent inconnu et pourtant l'homme a, depuis des milliers d'années, utilisé à diverses fins ces végétaux (commerciale, médicinale, etc.).

Ce patrimoine inestimable subit aujourd'hui de très fortes pressions et est entrain de disparaître d'où la nécessité d'améliorer notre condition présente grâce à une meilleure compréhension et à un plus grand respect de la nature.

Le travail que nous avons entrepris s'inscrit dans le cadre de la valorisation du potentiel médicinal des plantes de la flore de la région de Tlemcen. Nous nous sommes intéressés à l'étude des racines d'une plante utilisée dans la médecine traditionnelle, il s'agit de la Rhapontique (*Rhaponticum acaule* L.). Elle est connue pour ses vertus curatives : digestive, stomachique, apéritive, cholagogue, etc. Du point de vue chimique et biologique, cette plante n'a jamais fait l'objet d'une étude auparavant.

Quelques Notions sur les Plantes Médicinales

I. Introduction

La phytothérapie fait référence à l'usage de remèdes végétaux pour la guérison et/ou le maintien de la santé.

Cette pratique est originaire d'Égypte et date de 1550 avant Jésus-Christ. Certains indices indiquent cependant que les êtres humains ont utilisé les plantes médicinales depuis 60 000 ans. L'analyse de la terre entourant les ossements d'homme de Neandertal découvert en Iraq en 1990, a révélé de grandes quantités de pollen qui n'auraient pas pu être introduites dans ce site de manière accidentelle. Des huit espèces de plantes différentes entourant les ossements, sept sont encore utilisées aujourd'hui en phytothérapie ^[1]. Celle-ci a par ailleurs connu un énorme succès aux 17^{ème} et 18^{ème} siècles, suivi d'un déclin jusqu'au 20^{ème} siècle.

Aujourd'hui, on observe à nouveau un regain d'intérêt pour la phytothérapie avec plus de cinq cents produits promus comme remèdes inoffensifs dans de multiples indications comme la constipation, la fatigue, l'obésité et des affections cutanées (acné et psoriasis).

La majorité des produits de l'industrie botanique ne sont pas enregistrés et n'ont pas fait la preuve de leur efficacité, de leur qualité ni même d'une sécurité adéquate. Leur réputation d'innocuité est basée sur l'expérience acquise au cours des siècles en l'absence d'essais thérapeutiques rigoureux. Les débats sur la nécessité de procédures de contrôle de qualité sont donc d'actualité ^[2].

II. Plantes en médecine

Les plantes constituent pour l'homme et les animaux une source des aliments tant structuraux que fonctionnels. Elles renferment aussi de nombreux principes actifs employés comme médicaments. L'idée de rechercher le pouvoir de guérison des plantes est très ancienne. En effet, depuis la préhistoire, plusieurs plantes ont été utilisées dans le monde entier sous forme de cataplasme ou d'infusion.

En ethnomédecine ^[3], plusieurs espèces de plantes sont utilisées comme médicaments. Il a été rapporté que les natifs américains ont utilisé 2564 espèces de plantes comme médicaments.

Actuellement, les plantes médicinales et aromatiques sont largement utilisées dans les pays africains, asiatiques, sud-américains ainsi que dans plusieurs pays tels que l'Albanie, Bulgarie, Croatie, France, Allemagne, Hongrie, Espagne, Turquie et Royaume Uni ^[3].

La majorité de la population mondiale (75%) représentant la tranche la plus pauvre utilise les plantes pour subvenir à ses besoins de santé primaire, malgré l'existence des médicaments synthétiques^[4].

En Afrique plus de 80% de la population utilisent les plantes médicinales dans le traitement des maladies graves. Au Ghana, Mali, Nigéria et en Zambie par exemple, les plantes médicinales constituent le traitement de première intention pour plus de 60% des enfants atteints de forte fièvre due au paludisme. En Chine les préparations traditionnelles à base de plantes représentent entre 30 et 50% de la consommation totale de médicaments. En Europe, en Amérique du nord et dans d'autres régions industrialisées plus de 50% de la population a eu recours au moins une fois à la médecine complémentaire ou parallèle. A San Francisco, à Londres et en Afrique du sud, 75% des personnes vivant avec le SIDA font appel à la médecine traditionnelle. Environ 70% des canadiens ont eu recours au moins une fois à la médecine complémentaire^[5].

Cette ruée vers la médecine par les plantes peut s'expliquer par le fait que les plantes sont disponibles partout et c'est une médecine qui est abordable surtout dans les pays en voie de développement^[5]. De plus, les effets secondaires causés par les plantes sont minimes voire absents au contraire des médicaments semi-synthétiques^[3,6].

III. Valeur économique des plantes médicinales

La plupart des habitants des zones rurales comptent d'abord sur les plantes médicinales et aromatiques pour traiter leurs problèmes de santé et les utilisent en cosmétologie, en parfumerie et dans l'industrie alimentaire entre autres. Même dans les zones urbaines les habitants se tournent vers des remèdes de plantes traditionnelles étant donné qu'elles ont peu ou même aucun effet secondaire. Au Royaume-Uni seulement, le commerce des plantes médicinales représente plus de 293 millions euros chaque année^[5].

En tant qu'élément de projet, des plantes médicinales et aromatiques ont été cultivées dans des pépinières où l'on a testé des techniques de propagation. Ce nouveau concept de culture a ensuite été transmis aux communautés locales. En Algérie, des projets pilotes ont rassemblés la culture des plantes médicinales, le développement rural et la participation spécifique des femmes. Quatre fermes, exploitées par des femmes, se sont investies dans la culture des plantes médicinales dans leur principale terre cultivable afin de les vendre aux herboristes locaux et, de cette façon, augmenter leurs revenus^[7].

IV. Ethnopharmacologie, une science pluridisciplinaire ^[8]

L'ethnopharmacologie est l'étude scientifique interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale, animale ou minérale et des savoirs ou des pratiques s'y rattachant, que les cultures vernaculaires mettent en œuvre pour modifier les états des organismes vivants à des fins thérapeutiques, curatives, préventives ou diagnostiques.

Parmi des milliers de plantes médicinales recensées à ce jour, la plupart d'entre elles n'ont pas attiré l'attention des chercheurs et leurs potentialités thérapeutiques restent à découvrir. C'est en fait la fréquente pertinence des indications thérapeutiques de remèdes traditionnels qui a frappé les scientifiques occidentaux, et ceux-ci se demandaient de quelle manière les tradipraticiens avaient pu réussir à sélectionner des plantes aussi actives parmi le foisonnement important des espèces végétales qui les entouraient. Un autre phénomène curieux est celui des convergences d'usage chez des populations qui à priori n'ont eu aucun échange culturel. C'est le cas du figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica* L.) dont les feuilles (raquettes) coupées longitudinalement sont appliquées en cataplasme au Yémen pour soigner les blessures. Le manuscrit aztèque de Manuel de la Cruz décrit l'*Opuntia* avec des indications similaires.

Une discipline récente, l'ethnopharmacologie aborde l'étude des médecines traditionnelles et de leurs pharmacopées sous un éclairage nouveau ; celui apporté par la richesse et la diversité des nombreuses disciplines qui la composent. L'ethnopharmacologie met en relation les savoirs ancestraux des médecines traditionnelles et les connaissances scientifiques actuelles. Située à l'interface des sciences de l'homme, comme l'ethnologie, l'histoire, la linguistique, et des sciences de la nature, comme la botanique, la pharmacologie, la pharmacognosie, la médecine, l'ethnopharmacologie respecte la tradition, et s'ouvre résolument à l'innovation. Très schématiquement la recherche se déroule en trois temps :

- un travail de terrain qui recensera les pratiques médicales, l'usage des plantes médicinales et les produits d'origine naturelle, partout dans le monde, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en développement.
- un travail de laboratoire qui, grâce aux outils modernes de la pharmacologie, de la chimie et de la biologie, vise à mieux comprendre et à définir l'activité thérapeutique de ces substances, l'expérimentation scientifique est en fait guidé par l'usage traditionnel.
- un travail de retour vers le terrain qui comprend des programmes de valorisation de la recherche par la promotion de médicaments à base de plantes efficaces et dépourvus de toxicité et par la publication dans des revues scientifiques des travaux de terrain et de laboratoire.

V. Tradition empirique à l'épreuve du laboratoire

C'est en quelque sorte la façon dont la partie est utilisée dans la tradition qui guide le chercheur : il réalisera une infusion, une macération ou une décoction puis obtiendra un extrait sec en éliminant le solvant, eau ou alcool par lyophilisation. Cet extrait sera administré à l'animal ou sur culture cellulaire pour rechercher une activité thérapeutique. L'étude pharmacologique quantifie les effets en fonction des doses utilisées et compare ces résultats à ceux de produits de référence. On établira aussi l'absence de toxicité de la plante étudiée. Les travaux de chimie interviendront lorsqu'il s'agira de tenter d'identifier les substances responsables de l'activité pharmacologique. C'est une démarche qui vise à découvrir de nouvelles molécules et surtout de nouveaux médicaments. Les travaux menés depuis une dizaine d'année nous montrent que lorsqu'il y a une bonne coordination entre les travaux de terrain et de laboratoire, plus des deux tiers des plantes ont des effets pharmacologiques au moins aussi importants que des produits de référence [8,9].

Aujourd'hui, de nombreux travaux obtenus dans le domaine de l'ethnopharmacologie, nous montrent que les plantes issues des médecines traditionnelles et qui ont été testées sont d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part sont quasiment dépourvues de toxicité. C'est le cas de plantes à propriétés anxiolytiques, antalgiques, diurétiques et hépatoprotectrices [10, 11-14].

VI. Exemple d'une plante nutritive et curative

L'olivier (*Olea europea* L.), arbre typiquement méditerranéen, se caractérise par un fruit, l'olive, dont l'huile est un composant essentiel du régime méditerranéen.

L'huile est utilisée comme cholérétique et cholagogue. On lui attribue des propriétés laxatives légères. En usage externe, c'est un adoucissant et un émollient utilisé contre les brûlures et les coups de soleil. Les feuilles d'olivier sont diurétiques et préconisées dans l'hypertension artérielle modérée. L'extrait de feuilles est utilisé comme adjuvant dans les formes légères de diabète (au cours de la grossesse ou en cas d'obésité) [15,16].

- **Pression artérielle** : Bien que l'on n'ait pas encore identifié avec exactitude les constituants auxquels il convient d'attribuer les effets favorables sur la pression artérielle du régime alimentaire méditerranéen, il a été démontré que l'introduction de l'huile d'olive dans le régime alimentaire entraîne une diminution de la tension artérielle. La consommation régulière d'huile d'olive permet de réduire les valeurs de pression artérielle systolique (maximale) et diastolique (minimale).

Il a été récemment vérifié que la consommation d'huile d'olive permet de diminuer la dose quotidienne de médicaments hypotenseurs nécessaire pour contrôler la pression artérielle des sujets souffrant d'hypertension, probablement grâce à une production d'oxyde nitrique entraînée par les polyphénols ^[17].

- **Prévention des cancers** : Des études épidémiologiques ont montré que la consommation d'huile d'olive est associée à une diminution du risque de survenue de certaines tumeurs malignes et de certains types de cancer (côlon, rectum, sein, prostate, pancréas, endomètre) d'environ 10 %.

L'huile d'olive pourrait diminuer le risque de cancer du sein. Cet effet a été évalué dans le cadre de différentes études. L'adoption d'une alimentation saine, dont la source principale de matière grasse est l'huile d'olive, permettrait de réduire considérablement l'incidence de ce cancer, la mutation cellulaire impliquée dans la cancérogenèse étant due en partie à des substances mutagènes (radicaux libres) qui altèrent l'ADN. Pour neutraliser les espèces réactives de l'oxygène, l'organisme a besoin d'antioxydants tels les composés phénoliques contenus dans l'huile d'olive ^[18].

VII. Remèdes naturels en toute sécurité

Les plantes sont des remèdes naturels causant des effets secondaires minimes voire absents. Cependant, il arrive que certaines espèces de plantes médicinales soient nocives, et d'autres peuvent être contre-indiquées avec l'emploi de médicaments conventionnels. Dans de très rares circonstances, des personnes sont tombées gravement malades, et ont perdu la vie après avoir absorbé des plantes médicinales. Ces cas exceptionnels s'expliquent, en général, par le fait que les règles de sécurité concernant l'usage de remèdes phytothérapeutiques n'ont pas été respectées :

- La plante a été mal identifiée.
- La plante a été mal utilisée : il est très important d'employer la bonne partie de la plante. En effet, pour certaines espèces, seule une partie de la plante possède des propriétés médicinales alors que le reste peut être nocif.
- Un mauvais remède phytothérapeutiques a été choisi.
- Le remède thérapeutique interfère avec d'autres médicaments : les remèdes préparés à base de plantes, peuvent présenter des interactions avec des produits conventionnels. Par exemple, le millepertuis accélère la vitesse de désagrégation par le foie des substances médicamenteuses comme certains antibiotiques, antiépileptiques. L'efficacité de ces médicaments s'en trouvent réduite, le risque peut être fatal ^[19].

VIII. Hépatotoxicité des plantes

Les principales hépatopathies associées à la phytothérapie sont les maladies veinoocclusives et les hépatiques aiguës.

Le chardon à glu (*Atractylis gummifera* L.) est un autre exemple ancien de toxicité de la phytothérapie. La toxicité du chardon à glu est bien connue en Algérie et survient au printemps, période de plus grande croissance de la plante. Cette plante dont on connaît 26 espèces, est utilisée comme plante médicinale dans les pays méditerranéens et également comme « chewing-gum » par les enfants. Les intoxications sont liées à la consommation de la racine et résultent également d'une confusion entre cette plante et l'artichaut sauvage. L'atteinte hépatique de type cytolytique survient en moins d'une journée et est souvent sévère et mortelle. Elle est souvent associée à une hypoglycémie sévère et parfois une insuffisance rénale. L'hépatotoxicité du chardon à glu paraît être liée à deux glucosides toxiques, l'atractylate de potassium et la gummiférine. Ces composés sont capables d'inhiber les réactions d'oxydation du cycle de Krebs mitochondrial. L'hypoglycémie est due à l'inhibition de la synthèse du glycogène ^[20].

Bibliographie

- [1] J. Bateman, R.D. Chapman, D. Simpson, Possible toxicity of herbal remedies, *Scott. Med. J.*, **1998**, 43, 7-15.
- [2] M. Pinto, D.A. Into Cunhat, A.P. Geubel, Phytothérapie et hépatotoxicité, *Louvain Med.*, **2002**, 121, 407-414.
- [3] M.M. Cowan, Plant products as antimicrobial agents, *Clinic. Microbial. Rev.*, **1999**, 12, 564-582.
- [4] J.A. Duke, Promosing phytochemicals, advances in new crops, Editions J. Janick and Simon, Timer press, Portland, **1990**, p. 491-498.
- [5] O.M.S (Organisation Mondiale de la Santé), Rapport sur la médecine traditionnelle : Besoin et potentiel, **2002**, N° 4, p. 6.
- [6] M.W. IWU, A.R. Duncan, C.O. Okunji, New antimicrobial of plant origin, perspectives on new crops and new uses, Edition J. Janick, ASHS Press, Alexandria, VA, **1999**, p. 457-462.
- [7] U.I.C.N (Union mondial pour la nature), « Usage durable des plantes médicinales en Afrique du Nord », Communiqué de presse, Malaga, **18 Avril 2005**.
- [8] J.R. Dos Santos, J. Fleurentin, Ethnopharmacologie : sources, méthodes, objectifs, Edition ORSTOM et Société Française d'Ethnopharmacologie, Paris-Metz, **1991**, p. 26-39-490.
- [9] J. Fleurentin, J.M. Pelt, Les plantes médicinales, *La Recherche*, **1990**, 21, 222, 810-818.
- [10] C. Hoefler, J. Fleurentin, F. Mortier, J.M. Pelt, J. Guillemain, Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats, *J. Ethnopharmacol.*, **1987**, 19, 133-144.
- [11] A. Lexa, J. Fleurentin, P.R. Lehr, F. Mortier, M. Pruvost, J.M. Pelt, Choleric and hepatoprotective properties of *Eupatorium cannabinum* in the rat, *Planta Med.*, **1989**, 55(2), 117-132.
- [12] M.C. Lanhers, J. Fleurentin, P. Cabalion, A. Rolland, P. Dorfman, R. Misslin, J.M. Pelt, Behavioral effects of *Euphorbia hirta* L.: sedative and anxiolytic properties, *J. Ethnopharmacol.*, **1990**, 29, 189-198.
- [13] A. Rolland, J. Fleurentin, M.C. Lanhers, C. Younos, R. Misslin, F. Mortier, J.M. Pelt, Behavioral effects of an American traditional plant: *Eschscholzia californica* Cham., (Papaveraceae): sedative and anxiolytic properties, *Planta Med.*, **1991**, 57(3), 212-217.
- [14] D. Beaux, J. Fleurentin, F. Mortier, Diuretic action of hydroalcoholic extracts of *Foeniculum vulgare var dulce* (DC) roots in rats, *Phytother. Res.*, **1997**, 156.

- [15] J. Bruneton, « Pharmacognosie - Phytochimie - Plantes médicinales », 3^{ème} Edition, Technique & Documentation, Paris, 1999, p. 129.
- [16] « Phytothérapie par les plantes, la santé par les plantes », ouvrage collectif, Sélection du Reader's Digest-Vidal, Paris, 2007.
- [17] A.H Gilani, A.U. Khan, A.J. Shah, Blood pressure lowering effect of olive is mediated through calcium channel blockade, *J. Food Sci. Nutr.*, 2005, 56(8), 613-20.
- [18] H. Hamdi, R. Castellon. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 333, 769-78.
- [19] P. Iserin, Larousse, « Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins » Edition La Rousse, 2001, p. 298.
- [20] D. Larry, Accidents hépatiques de la phytothérapie, *Press Med.*, 1994, 23, 691-693.



Chapitre II

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

I. Introduction

Cette famille comprend 25000 espèces, c'est la plus importante des plantes à ovaires. C'est une famille répandue dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées. Les premières Astéracées sont apparues à l'Oligocène, soit il y a environ 20 millions d'années (Ere Tertiaire).

Les Astéracées sont une des plus belles réussites de l'évolution. Un fait le prouve sans conteste : le grand nombre de ses espèces ^[1].

II. Systématique

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

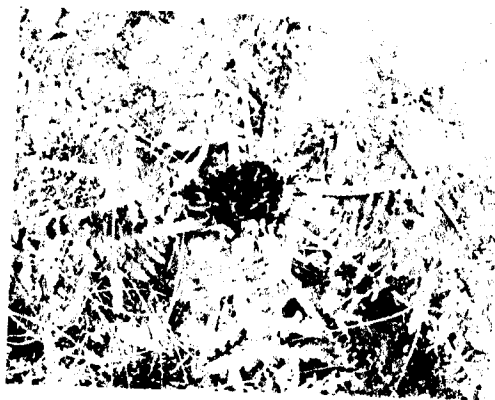


Figure 1 : *Rhaponticum acaule* L. en pleine floraison.

III. Famille des Astéracées ou Composées

III.1. Appareil végétatif

Nous y retrouvons surtout des plantes herbacées, vivaces et à feuilles alternes. Mais en fait, à peu près toutes les formes végétales y sont connues ; nous y rencontrerons des feuilles opposées, verticillés, etc.

En prenant le genre *Séneçon* (1300 espèces) comme exemple, nous trouvons :

- Des herbes annuelles : *Séneçon* des jardins.
- Des herbes vivaces : de plaine, comme le *Séneçon* Jacobée, mais aussi d'altitude.
- Des arbustes.
- Des lianes.
- Des *Séneçons* tropicaux plus ou moins cactiformes.
- Les célèbres *Séneçons* arborescents réfugiés sur les sommets de quelques hautes montagnes africaines ou andines^[1].

Les Astéracées sont pourvues d'un appareil sécréteur ordinairement bien développé :

- Cellules et canaux sécréteurs à essence, poils sécréteurs. Certaines espèces sont ainsi très aromatiques, et utilisées comme telles (*Camomille*, *Armoise*, etc.).
- Laticifères comme chez le groupe des *Chicorées* et plantes affines (*Pissenlit*, *Laiterons*, etc.), lorsque nous brisons la tige de ces plantes, il s'exsude un suc blanchâtre (pendant la dernière guerre les Russes ont extrait du caoutchouc à partir de certains *Pissenlit*).

Les Astéracées sont riches en polyacétyléniques et en lactones sesquiterpéniques. Leur organes de réserve contiennent de l'inuline (exemple : les tubercules de *Topinambour*)^[1].

III.2. Appareil reproducteur

Les Astéracées sont caractérisées par :

- L'inflorescence en capitule.
- Les fleurs, très particulières dont les anthères sont soudées entre elles (*Synanthérées*).
- Le fruit, un akène généralement surmonté d'un pappus^[1].

III.2.1. Inflorescence en capitule^[1]

III.2.1.1. Description

L'inflorescence élémentaire des Astéracées est le capitule. Un capitule comprend un réceptacle sur lequel sont insérées de la base au sommet, en ordre spiralé :

- D'abord des bractées stériles vertes (parfois écailleuses, à crochets ou épineuses) formant un involucre.
- Ensuite des bractées fertiles non vertes ou paillettes, axillant chacune une fleur.

L'ensemble forme une « fleur composée », d'où l'ancien nom de famille. Les capitules élémentaires (parfois isolés : pâquerette) sont généralement à leur tour diversement groupés en grappe, cyme, ou encore en corymbe chez le groupe des Radiées.

III.2.1.2. Evolution du capitule

Nous devons considérer un capitule comme étant une inflorescence très condensée dont toutes les fleurs sont devenues sessiles et groupées sur un axe court et aplati.

Chez les espèces les plus primitives :

- Le réceptacle est encore bombé.
- Les bractées sont toutes présentes et ont la forme d'écailles.
- Les fleurs élémentaires sont toutes semblables, hermaphrodites ou de même sexe. Elles sont soit régulières et tubuleuses, soit zygomorphes et à pétales tous déjetés vers l'extérieur (fleurs ligulées), puis :
 - Le réceptacle devient de plus en plus plat.
 - Les bractées se réduisent à des paillettes et même disparaissent.
 - Les fleurs du pourtour se modifient :
 - Soit légèrement : chez le Bleuet, les fleurs externes sont plus grandes à tube coudé et à pétales extérieurs légèrement plus grands.
 - Soit plus profondément : les fleurs deviennent différentes de celles du centre par leur forme (elles sont ligulées, alors que les fleurs centrales sont tubuleuses) par leur sexualité (fleurs mâles, femelles ou hermaphrodites) et souvent par leur couleur (blanche, bleue, rouge, etc.) qui tranche sur celle des fleurs du centre, généralement jaunes.

Ces fleurs, dont le rôle est essentiellement attractif, sont d'ailleurs souvent stériles (fleurs coudées des Bleuets, fleurs ligulées des Marguerites).

Le capitule est alors comparable, biologiquement, à une fleur unique dont il prend l'aspect chez la fleur de Marguerite, l'involucre simule le calice, les fleurs blanches du pourtour, une corolle et les fleurs du centre jaune, un androcée. Mais ici le nombre de bractées et des fleurs ligulées est indéterminé ^[1].

III.2.2. Fleur

La fleur de type floral 5-5-5-2 a des anthères soudées et un ovaire infère uniloculaire. Elle est petite, comme toutes les fleurs groupées en inflorescence contractée ^[1].

III.2.2.1. Calice

Il est très réduit, et tend à disparaître ; se développe souvent en Pappus ^[2].

III.2.2.2. Corolle

Elle est formée de 5 pétales soudés :

- Corolle tubuleuse ou fleuron (régulière ou plus ou moins tordue).
- Corolle ligulée ou demi-fleuron: le limbe forme une lame latérale aplatie, terminée par 3 ou 5 dents.
- Corolle à deux lèvres chez les espèces exotiques.

Les capitules sont homogames s'ils sont formés de fleurs identiques ; ils sont hétérogames s'ils comportent des fleurons et des demi-fleurons [2].

III.2.2.3. Androcée

Les cinq étamines sont soudées :

- d'une part, à la corolle, par la base de leur filet.
- d'autre part, entre elles par leur anthères. Les anthères réunis forment ainsi un manchon autour du style. Leurs fentes de déhiscence sont tournées vers l'intérieur [1].

III.2.2.4. Gynécée

L'ovaire est infère, uniloculaire, et, bien que formé par la soudure de deux carpelles ouverts uniovulé. Le style se termine par deux stigmates qui portent une brosse de poils généralement sur leur sommet, parfois à leur base [1].

III.2.3. Fruit

L'akène est muni de poils (pappus) ou de crochets (dissémination animale) [2].

III.2.4. Graine

L'Exalbuminée est souvent oléagineuse [2].

IV. Sous-familles [3]

Selon le groupement des fleurs tubulées ou ligulées au niveau des inflorescences de chaque espèce, nous distinguons communément quatre sous-familles :

- Liguliflores : dont les capitules sont constitués de fleurs toutes ligulées bisexuées, à valeur de demi-fleurons (comme le Pissenlit).
- Tubuliglores : dont les capitules sont constitués de fleurs toutes tubulées, bisexuées, à valeur de fleurons (comme les Chardons).
- Radiées : dont 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).
- Labiatiflores : regroupe surtout des espèces sud-américaines que caractérisent des capitules à fleurs toutes, ou pour une partie d'entre elles seulement bilabiées.

V. Genre *Rhaponticum* ^[4]

Les plantes de ce genre sont remarquables par leur capitules de 55 à 90 millimètres de largeur dont l'involucre a de nombreuses bractées membraneuses sur les bords ou terminées par un large appendice membraneux.

Les fleurs sont toutes stamino-pistillées et sensiblement égales entre elles. Les fruits sont comprimés et marqués d'une petite côte longitudinale sur chacune de leurs deux faces : la partie supérieure du fruit porte une bordure entière, irrégulièrement plissée vers l'intérieur. L'aigrette est formée de poils fragiles, denticulés et non plumeux, disposés sur plusieurs rangs, ceux du rang interne étant plus longs que les autres et étalés. Ce sont des plantes vivaces à fleurs purpurines.

En Europe, en Asie et dans le Nord de l'Afrique, 9 espèces de ce genre sont décrites.

VI. Espèce *Rhaponticum acaule* L.

Nom scientifique : *Rhaponticum acaule* L. ^[5]

Synonyme : *Centaurea chamaerhaponticum* Ball. ^[5]

Nom vernaculaire : Tfraït, Khiria, Tafgha ^[5,6].

VI.1. Origine et répartition géographique

C'est une espèce nord-africaine, commune dans toute l'Algérie septentrionale, notamment dans les lieux sablonneux du littoral. Ibn-el-Baytar précise que la plante est acaule et qu'elle pousse en Afrique du nord. D'autre part, Abderrezaq El-Djazaïri la mentionne sans aucun commentaire ^[7].

VI.2. Description botanique

C'est une plante vivace sans tige apparente, acaule. Ces feuilles grandes sont disposées sur le sol en rosette, vertes en dessus et blanches et tomenteuses en dessous. Elles sont coriaces, les toutes externes parfois entières et oblongues, les autres pinnatiséquées. Très gros capitule solitaire et sessile au centre de la rosette, à fleurs jaunes (parfois pourpres à odeur d'œillet). Le Réceptacle est comestible ^[5].

VI.3. Principes chimiques

L'espèce en question contient les substances suivantes : tanin, principes amers, résine, sels minéraux, etc. ^[7]

VI.4. Propriétés médicinales

La plante possède des vertus médicinales. Elle est considérée comme bénéfique pour les cellules hépatiques. Elle est apéritive, cholagogue, dépurative, digestive, stomachique, tonique, etc. ^[7]

VI.5 Préparation

Après la récolte, les racines sont débarrassées des débris, lavées puis séchées à l'air libre ensuite broyées finement en poudre. Cette dernière est mélangée avec du miel jusqu'à obtention d'une pâte. Chaque prise consiste à prendre une cuillère à café le matin à jeun, ou bien encore une cuillère à café de la poudre avec un peu de lait.

Bibliographie

- [1] J.L. Guignard, F. Dupont, « Botanique : Système moléculaire », 14^{ème} Edition, Elsevier Masson, Paris, 2007, p. 248-249-250-252-253.
- [2] V. Hammiche, « Systématique et morphologie botaniques », O.P.U., Alger, 1990, p. 171.
- [3] B. Boullard, Plantes & champignons: Dictionnaire, 2^{ème} Edition, Estem, 1997, p. 73.
- [4] G. Bonnier, « La grande flore », Tome 3, Edition Belin, 1990, p. 596.
- [5] P. Quezel, S. Santa, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, Edition CNRS, Paris, 1963, p. 1037.
- [6] L. Trabut, Flore du nord de l'Afrique, répertoire des noms indigènes des plantes, Collection du Centenaire de l'Algérie, 1830-1930, p. 221.
- [7] F. Baba Aissa, Encyclopédie des plantes utiles-Flore d'Algérie et du Maghreb, Edition Librairie moderne, Rouïba, 1999, p. 238-239.

Chapitre III

Etude des Métabolites Primaires et Secondaires

I. Introduction

L'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent dans un organisme est appelé métabolisme : (du grec : *metabolê*, changement). Il est un processus très dynamique. Les molécules sont en continuel renouvellement ; la composition d'une cellule à un instant donné est en équilibre entre synthèse et dégradation.

La partie du métabolisme biosynthétique ou basal, comme la photosynthèse, la synthèse de protéines ou de lipides, etc., comprend des réactions dites anaboliques (du grec, *ana* : en haut et *bolos* : jet) constituant l'anabolisme. La partie du métabolisme qui englobe la dégradation de molécules complexes en composés plus simple, comprend des réactions cataboliques (du grec *kata* : en bas et *bolos* : jet) constituant le catabolisme ^[1].

Chez les végétaux, les processus qui permettent de synthétiser les composés organiques sont traditionnellement regroupés en métabolisme primaire et secondaire :

Nous parlons de métabolisme primaire pour les molécules qui ont des rôles spécifiques et indispensables, et que nous retrouvons de la même façon dans la quasi-totalité des cellules vivantes ^[2].

Une des singularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle, au niveau de la plante, est mal connu. Le fait que ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces indique qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général et qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal : ce sont des métabolites secondaires ^[3].

En raison de leur valeur au plan économique ou médical, les chercheurs en chimie organique ou ceux qui s'intéressent aux substances naturelles, ont étudié les métabolites secondaires depuis des siècles. Cependant jusqu'à une époque récente, ces métabolites ont été considérés comme produits de déchet du métabolisme chez les plantes. Durant ces trois dernières décennies, il a été montré que de nombreux métabolites secondaires jouaient un rôle écologique important. Contrairement aux animaux qui sont mobiles pour rechercher leur nourriture, pour échapper aux prédateurs et pour se reproduire, les plantes sont immobiles ou presque, et elles ont dû développer des stratégies pour survivre et se reproduire. Les métabolites secondaires sont impliqués étroitement dans ces stratégies :

Dissuader les prédateurs : les odeurs repoussent les herbivores, par exemple chez les Pélargoniums, Les plantes toxiques "éduquent" les herbivores à les éviter pour ne pas être broutées.

Attirer les pollinisateurs : les couleurs, mais aussi les odeurs attirent les insectes. Par exemple, certaines Orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles.

Décourager la compétition vis-à-vis d'autres espèces : certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes : c'est le cas du Noyer qui produit de la *juglone* qui inhibe la croissance des autres plantes dans un rayon de 8 m autour du tronc.

L'Homme a inventorié près de 270 000 espèces végétales et nous estimons entre 300 000 et 500 000 espèces de plantes vivant sur la planète. Le plus grand nombre d'entre elles vit dans les forêts tropicales et équatoriales: donc 7% de la surface du globe abrite 75% des espèces végétales. Ces forêts recèleraient près de 400 nouveaux médicaments potentiels [1,4].

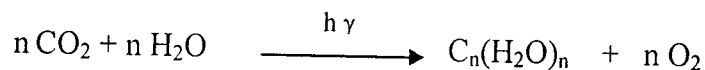
II. Métabolites primaires

II.1. Glucides

II.1.1. Définition

Les glucides, anciennement appelés hydrates de carbone, sont des molécules organiques caractérisés par la présence de chaînes carbonées ramifiées ou non, porteuses de groupement hydroxyle (fonction alcool) et d'un groupement carbonyle : aldéhyde ou cétone. Le terme hydrate de carbone s'explique par leur formule brute générale $C_n(H_2O)_n$ [5].

Dans les plantes vertes, les glucides se forment lors du processus de la photosynthèse :



II.1.2. Répartition dans la nature

Les glucides ou saccharides (du grec sakcharon, sucre) sont des composés essentiels pour tous les organismes vivants et sont, en fait, les molécules biologiques les plus abondantes. Ils sont soit des éléments de structure (la cellulose des végétaux), soit des éléments énergétiques, (le glucose). Charpentier B. et coll. [6] mentionnent, que chez les animaux, la majeure partie des glucides est apportée par l'alimentation et est d'origine végétale.

II.1.3. Sources alimentaires des glucides

D'un grand intérêt économique, car moins coûteux que les aliments riches en protéines et lipides, les glucides sont à la base de l'alimentation humaine. Au point de vue alimentaire, nous pouvons distinguer : les sucres rapides et les sucres lents.

a) Sucres rapides

Ils ont un goût sucré et sont représentés par les oses et les diosides. Ils sont assimilés rapidement et fournissent de l'énergie à court terme, immédiatement utilisable.

Sources alimentaires : le sucre de table (saccharose), les confitures, le miel, le chocolat, la pâtisserie, la biscuiterie, la confiserie, les fruits ^[7].

b) Sucres lents

Ils ne sont pas sucrés au goût. Ce sont les glucides complexes, les polysides, dont l'amidon est le chef de file. Ils ne se dégradent que lentement au cours de la digestion (pour donner du glucose pur) ; si bien qu'ils passent dans la circulation en plusieurs heures apportant ainsi de l'énergie progressivement dans la journée.

Sources alimentaires : les céréales (blé, maïs, riz, etc.), les légumes secs et les pommes de terre ^[7].

II.1.4. Apports conseillés

Le pourcentage d'apport conseillé en glucides est de 50 à 55% de la ration énergétique totale ^[7].

II.1.5. Importance biologique ^[8,9,10]

Leurs rôles sont multiples :

Au niveau extracellulaire

- **Structural** : sous forme de fibres ou de gels, les glucides soutiennent et protègent les structures biologiques (la cellulose de la paroi des cellules végétales, la chitine des exosquelettes des insectes et crustacés, la muréine de la paroi bactérienne, les glycosaminoglycanes du cartilage et des tendons) : ce sont la cellulose et la chitine qui placent les glucides au rang des biopolymères les plus abondants sur la terre.

Au niveau intracellulaire

- **Energétique** : L'oxydation des glucides est l'une des voies essentielles de production d'énergie dans les cellules non photosynthétiques. Des polymères (amidon chez les végétaux et glycogène chez les animaux) mettent en réserve cette énergie.
- **Métabolique** : Les glucides ne sont pas seulement la principale source d'énergie des cellules, ils entrent aussi dans la constitution d'un grand nombre de molécules importantes. Les acides nucléiques, l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN), contiennent des pentoses, le 2-désoxyribose et le ribose, respectivement. Le ribose est aussi un des constituants des nucléotides puriques qui jouent un rôle central dans le métabolisme cellulaire.

Au niveau intercellulaire

- Fonctionnel : liées à des protéines ou à des lipides membranaires, des glucides sont impliqués dans les processus de communication cellulaire, les glucides membranaires sont souvent de petits polysaccharides ramifiés comptant moins de 15 monomères.

Usages industriels

Dans la vie pratique, la cellulose est liée à l'industrie du papier, des textiles naturels (coton) ou artificiels (viscose, rayonne), de la cellophane, de matières plastiques (celluloïd, rhodoïd), d'explosifs, d'adhésifs, etc.

II.1.6 Quelques plantes riches en glucides

L'examen de la composition d'un large assortiment de fruits et légumes montre que leurs glucides contiennent en moyenne environ 30% de glucose et de saccharose et 40% de fructose (Tableau 1). Dans les légumes, dont la teneur en sucres totaux est beaucoup plus faible que celle des fruits. La pomme, la poire sont particulièrement riches en fructose [11].

Tableau 1 : Composition des fruits, des légumes et du miel en sucres simples.

	Sucres totaux (g/100g)	% Glucose	% Saccharose	% Fructose
Fruits	10.4	30	30	40
Légumes	2.5	38	28	34
Miel	75	30	30	40

Les travaux de Veberic R. et coll. [12] montrent que les fruits du sureau noir (*Sambucus nigra* L.) sont riches en glucides. Le fructose et le glucose se trouvent en abondance dans la matière végétale fraîche avec respectivement 52.25g et 50.23g/Kg, et le sucrose est présent en petite quantité : 0.47g/Kg.

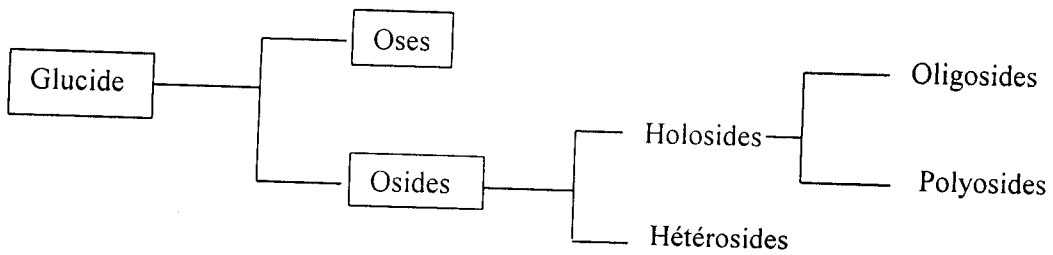
La papaye (*Carica papaya*), donne un apport énergétique de 33 Kcalories pour 100g. Les glucides de la papaye sont constitués par du saccharose (36% du total glucidique), du fructose (32%) et du glucose (32%) [13].

La datte, fruit du palmier (*Phoenix dactylifera* L.) est considérée comme extrêmement nutritive et indispensable à l'équilibre de l'organisme, les glucides en constituent 73% [14].

II.1.7. Classification

Les glucides sont classés en oses et osides :

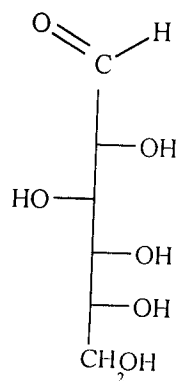
- Les oses (monosaccharides) sont des sucres simples non hydrolysables.
- Les osides (saccharides) sont des glucides complexes résultant de l'association par une liaison glycosidique de plusieurs oses. Ils sont hydrolysables en un ou plusieurs oses. Les osides qui ne sont composés que d'oses sont des holosides. Ceux composés d'oses et d'une partie non glucidique sont les hétérosides.



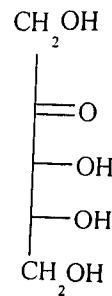
Organigramme 1 : Classification des glucides.

II.1.7.1. Oses

Les monosaccharides ou sucres simples sont des dérivés aldéhyde ou cétone de chaînes linéaires polyalcools qui contiennent au moins trois atomes de carbone. De telles substances, le D-glucose et le D-ribulose par exemple, ne peuvent être hydrolysées pour donner des sucres plus simples [1].



D-Glucose



D-Ribulose

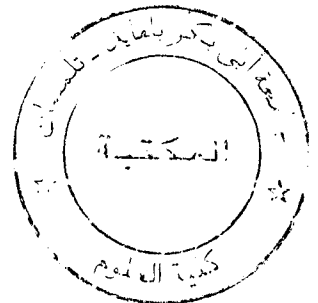


Figure 2 : Exemples d'oses naturels de la série D.

Les monosaccharides sont classés selon la nature chimique de leur groupement carbonyle et leur nombre d'atomes de carbone. Si le groupement carbonyle est un aldéhyde, comme dans le glucose, le sucre est un aldose. Si le groupement carbonyle est une cétone comme dans le ribulose, le sucre est un cétose. De plus, les monosaccharides les plus petits, ceux qui ont trois atomes de carbone, sont des trioses. Ceux avec quatre, cinq, six, sept, etc., atomes de carbone sont respectivement, des tétroses, des pentoses, des hexoses, des heptoses, etc. [1]

Les monosaccharides naturels (glucose, fructose, ribose, etc.) font partie de la série D des sucres. La série L étant la série non naturelle.

II.1.7.1.1. Représentations cycliques des oses [6, 10, 15]

La formule linéaire des oses n'explique pas leurs propriétés particulières. Les chimistes ont été obligés d'envisager des formules cycliques. La représentation linéaire ne rend pas compte de

toutes les propriétés du glucose. En effet, le glucose possède une fonction aldéhyde et pourtant il ne possède pas toutes les propriétés chimiques liées à cette fonction ; en particulier :

- Il ne recolore pas la fuchsine, décolorée par le réactif de Schiff, réaction pourtant caractéristique des aldéhydes et des cétones.

- Quand nous dissolvons du glucose dans l'eau et que nous mesurons le pouvoir rotatoire de la solution, nous remarquons que celui-ci se modifie pendant quelques minutes avant d'atteindre sa valeur. Ceci ne s'explique que par l'existence de deux structures isomères du glucose s'équilibrant progressivement.

Ces différentes anomalies sont dues à la présence dans la molécule de glucose d'une liaison hémiacétal entre la fonction aldéhyde et la fonction alcool en C₅. Ainsi le glucose et les autres hexoses et pentoses existent sous forme d'un mélange de formes cycliques à cinq ou six chaînons, les formes ouvertes sont généralement très minoritaires.

La cyclisation du glucose en forme hémiacétalique a pour effet de créer un centre d'asymétrie supplémentaire. Il ya donc deux stéréoisomères de cette forme cyclique. Nous les désignons par α et β (formes anomères).

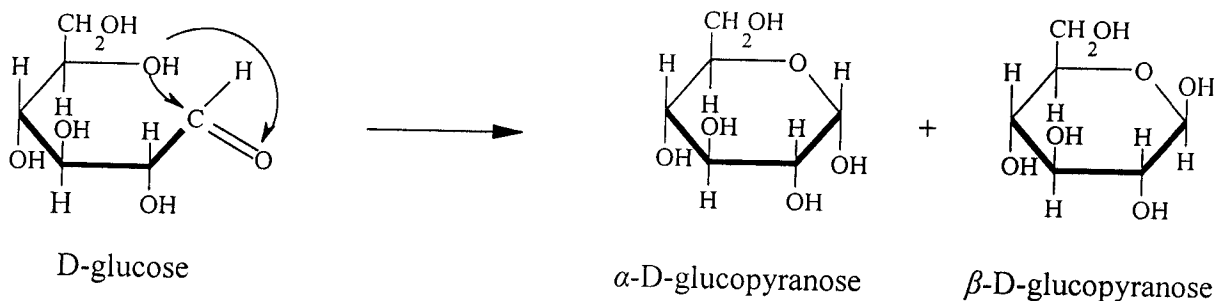


Figure 3 : Représentation cyclique du D-glucose.

II.1.7.1.2. Propriétés physiques du glucose

Le glucose est une poudre blanche microcristalline, soluble dans l'eau, mais peu soluble dans l'alcool. Il cristallise mal en solution aqueuse, mais cette cristallisation est favorisée en présence d'alcool.

Le pouvoir rotatoire d'une solution fraîchement préparée de glucose change lorsque nous l'observons au polarimètre. Ce changement doit traduire une modification de structure. D'ailleurs, les deux stéréoisomères du glucose sont isolés : l' α -D-glucose ayant un pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D = + 112.2^\circ$ et le β -D-glucose ayant un pouvoir rotatoire = $+ 18.7^\circ$, mais une fois en solution, chacune de ces deux formes subit une conversion, et nous obtenons finalement à l'équilibre un mélange des anomères α et β dont le pouvoir rotatoire est $+ 52.7^\circ$ à 20°C .

Le glucose possède également un spectre infrarouge spécifique. Le pouvoir rotatoire et le spectre infrarouge sont utilisés pour l'identification du glucose dans un mélange [6].



11.1.7.1.3. Propriétés chimiques du glucose et des oses simples [16]

a) Réduction

Les oses sont hydrogénés en polyols, le glucose conduit ainsi au sorbitol.

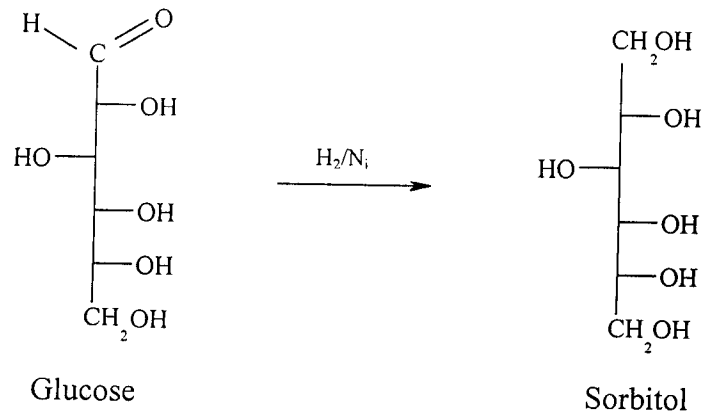


Figure 4 : Réduction d'un aldose en polyol.

b) Oxydation

- Oxydation des aldoses par des réactifs donnant des réactions colorées

Ces réactions peuvent présenter un intérêt en analyse qualitative. Les aldoses sont dits sucres réducteurs. Ils réduisent la liqueur de Fehling et le nitrate d'argent ammoniacal :

- La réaction du miroir d'argent : une pellicule d'argent se forme sur la paroi du tube.
- La liqueur de Fehling : la solution bleue d'ions cuivriques conduit à un précipité rouge brique d'oxyde cuivreux.

- Oxydation par l'acide nitrique de la fonction alcool primaire et du carbonyle

Les deux extrémités des aldoses sont ainsi transformées en fonction acide carboxylique.

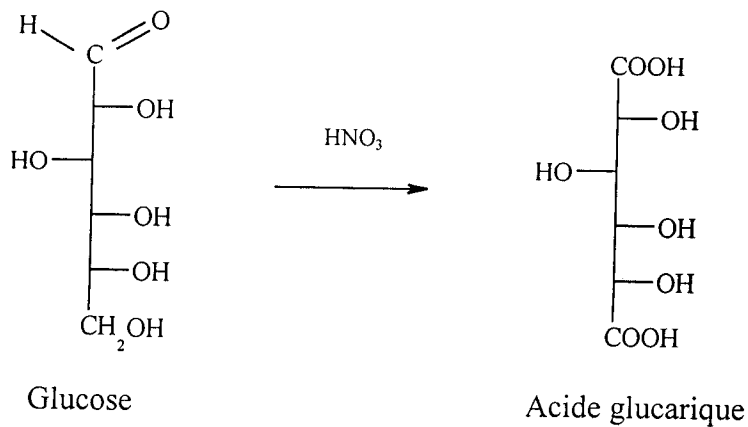


Figure 5 : Oxydation nitrique du glucose.

c) Dégradation de Wohl

Cette réaction permet le passage d'un sucre au sucre inférieur, à partir d'un ose à nC nous obtenons un ose à (n-1) C.

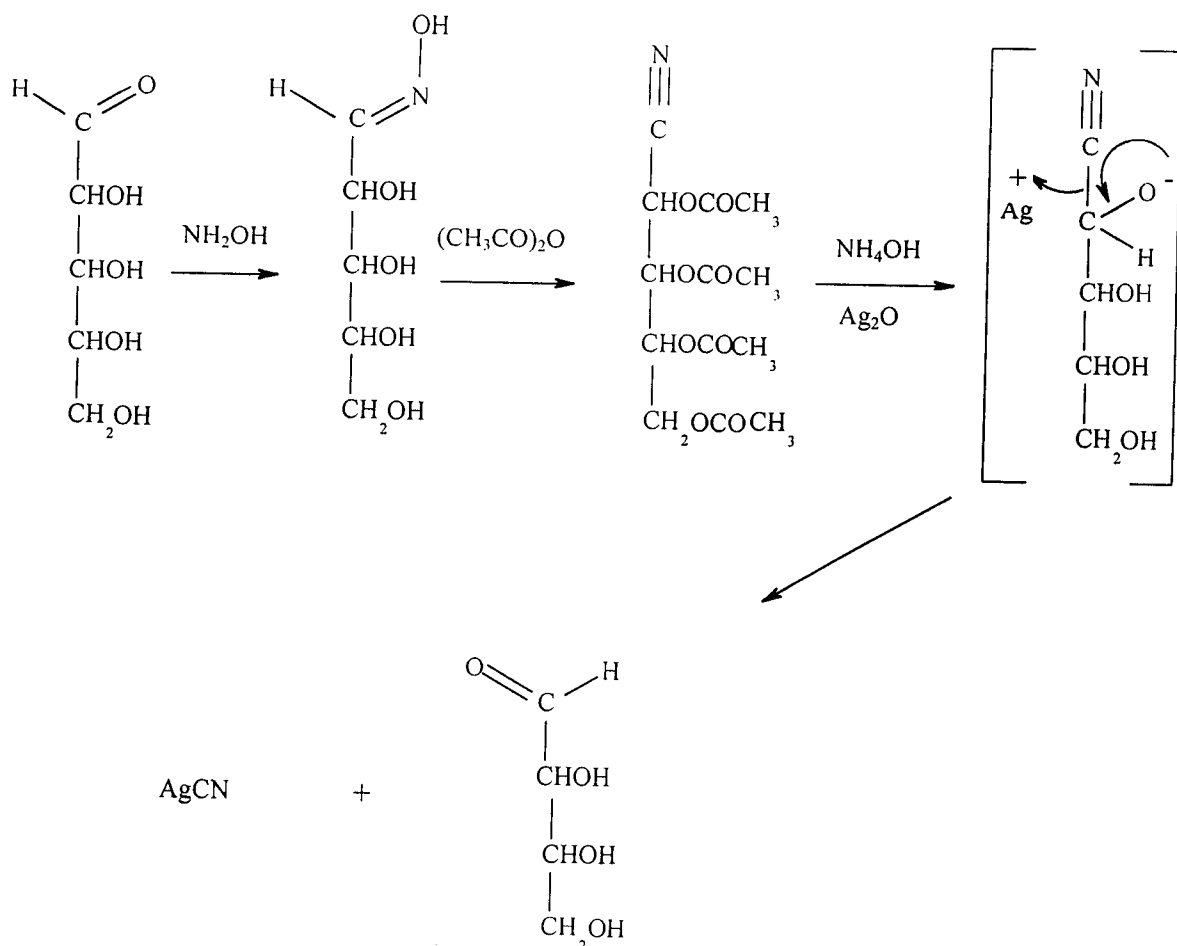
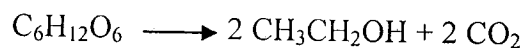


Figure 6 : Enchaînement réactionnel de la dégradation de Wohl.

d) Fermentation

Une solution de glucose abandonnée à l'air subit une réaction de fermentation, provoquée par le développement de microorganismes (levures) produisant un enzyme (catalyseur biologique), la zymase. Ce processus de fermentation est très complexe et il aboutit à la formation d'alcool éthylique et de dioxyde de carbone ^[10].



II.1.7.1.4. Analyse des glucides ^[5]

La caractérisation d'un oligosaccharide consiste à déterminer la nature, la configuration anomérique, les liaisons et l'ordre des constituants monosaccharidiques. Les liaisons entre monosaccharides peuvent être déterminées par analyse par méthylation, technique mise au point par Norman Haworth dans les années 1930 : les esters méthyliques, sauf ceux qui se forment sur le carbone anomérique, résistent à une hydrolyse acide tandis que les liaisons glycosidiques sont hydrolysées. Par conséquent, si un oligosaccharide est entièrement méthylé puis hydrolysé, les groupements OH libres des monosaccharides méthylés résultants indiquent les positions initiales des liaisons glycosidiques.

Les séquences et les configurations anomériques des monosaccharides d'un oligosaccharide peuvent être déterminées en utilisant des exoglycosidases spécifiques. Ces enzymes hydrolysent spécifiquement leurs monosaccharides correspondants depuis les extrémités non réductrices des oligosaccharides (les extrémités où il n'y a pas d'atome de carbone anomérique), la β -galactosidase détache les anomères β du galactose en position terminale, alors que les α -mannosidases font de même avec les anomères α du mannose.

L'étude des oligosaccharides par RMN ^1H et ^{13}C est également utile à leur séquençage. Les techniques de RMN à deux dimensions peuvent fournir des renseignements sur les conformations des oligosaccharides. Les techniques d'CLHP sont également utilisées.

II.1.7.2. Osides

II.1.7.2.1. Diholosides (saccharides) [8]

Les disaccharides sont formés de deux unités monosaccharidiques unies par une liaison *O*-glycosidique entre le groupement hydroxyle anomérique (en configuration α ou β) de l'une et un groupement hydroxyle de l'autre, anomérique ou non.

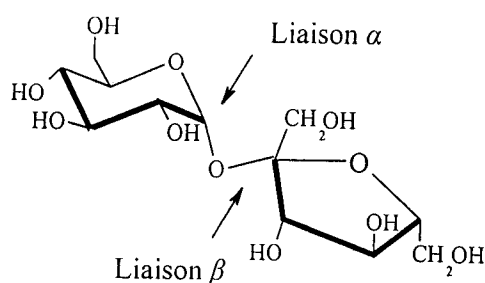
Comme les disaccharides sont trop gros pour traverser les membranes cellulaires, ils doivent être dégradés en sucres simples au cours de la digestion afin de pouvoir passer du tube digestif au sang. La liaison entre les sucres simples est rompue par addition d'une molécule d'eau.

Les trois disaccharides importants sont : le saccharose, le lactose, le maltose.

a) Saccharose [5, 17-19]

Le saccharose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), le disaccharide le plus abondant, se trouve dans le règne végétal et nous le connaissons comme sucre de table. Sa structure a été établie par la technique de méthylation et a été confirmée plus tard par rayon X.

Il est formé de deux monosaccharides différents, une molécule de α -D-glucose et une molécule de β -D-fructose. α 1G- β 2F est une notation abrégée habituelle pour le saccharose.



Saccharose [α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranoside]

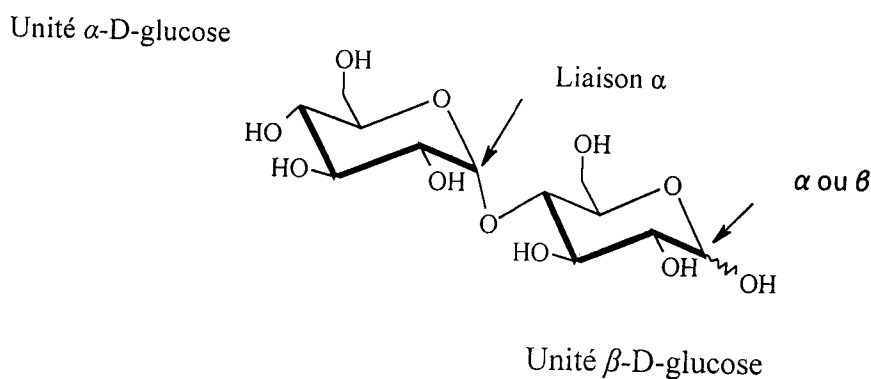
Figure 7 : Structure chimique du saccharose.

Dans le système métabolique de l'être humain, les enzymes sont capables d'hydrolyser le saccharose en ses monosaccharides constitutifs, le glucose et le fructose grâce à une enzyme, la sucrase-isomaltase. Les monosaccharides poursuivent alors leur métabolisme dans les cellules

jusqu'à la formation, accompagnée d'énergie, de CO_2 et de H_2O . Alternativement, le glucose peut aboutir (par le biais de la circulation sanguine) dans le foie ou les muscles où il est transformé puis stocké sous la forme de glycogène, un polysaccharide ne contenant que des unités glucose liées entre elles par des liaisons alpha.

b) Maltose

Le maltose est formé de deux molécules de glucose reliées par l'atome de carbone 1 de l'une à l'atome de carbone 4 de l'autre. La liaison entre les deux monosaccharides est indiquée par la notation $\alpha 1\text{G}-\beta 4\text{G}$. Le maltose est un produit intermédiaire de l'hydrolyse de l'amidon. Il se forme sous l'action d'une enzyme (la maltase) au cours d'une étape appelée maltage dans le processus de fabrication de la bière ^[18].



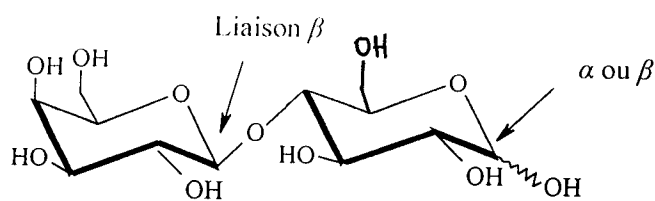
Maltose [α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranose]

Figure 8 : Structure chimique du maltose.

c) Lactose ^[18, 19]

Le lactose, disaccharide principal du lait, est formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de galactose. Il peut être représenté par le symbolisme $\beta 1\text{GA}-\alpha 4\text{G}$.

Il est apporté à l'organisme par le lait et par les produits laitiers. Le lait de femme en contient 7g/100 ml et le lait de vache 4.7 g/100 ml. Certains individus sont incapable de digérer le lactose parce qu'il leur manque une enzyme essentielle (la lactase). Ils souffrent d'une intolérance au lactose. Ils doivent choisir entre éviter les produits laitiers ou ajouter de la lactase à leur alimentation pour faciliter le métabolisme du lactose.



Unité β-D-galactose

Unité α-D-glucose

Lactose [β -D-galactopyranosyl-(1→4)- α -D-glucopyranose]

Figure 9 : Structure chimique du lactose.

II.1.7.2.2. Polyholosides

Les polysaccharides sont formés de nombreuses unités monosaccharidiques unies par des liaisons O-glycosidiques. Ils sont linéaires (par exemple : la cellulose) ou ramifiés (le glycogène). Nous les classons selon leur structure ; ils sont formés :

- Ou d'un seul type d'unité. Ce sont des homopolysaccharides (ou homopolyosides) : la cellulose, le glycogène et l'amidon sont des polymères de glucose, la chitine est un polymère de N-acétylglucosamine.
- Ou de deux ou plusieurs types différents d'unités. Ce sont des hétéropolysaccharides (ou hétéropolyosides) : Les glycosaminoglycanes des protéoglycanes, les gommages, hémicelluloses et mucillages des végétaux.

Nous les classons aussi selon leur rôle biologique :

- Les polysaccharides de réserve : le glycogène et l'amidon qui sont respectivement dans les cellules animales et végétales, des formes de stockage du glucose.
- Les polysaccharides de structure : par exemple, la cellulose et la chitine.

Les polysaccharides doivent être hydrolysés en monosaccharides et disaccharides pour permettre leur utilisation comme source d'énergie ou leur transport dans les systèmes vivants [20].

a) Amidon

L'amidon est la nourriture de base de tous les êtres humains. Il est intéressant de noter que le métabolisme humain hydrolyse facilement l'amidon en glucose mais est incapable d'hydrolyser la cellulose. En d'autres mots, les fibres végétales ingérées par les humains ne subissent pas de métabolisme ; elles traversent le système digestif sans subir de modifications majeures et sont excrétées dans les matières fécales [18].

L'amidon est un mélange de deux polymères du glucose, chacun pouvant contenir jusqu'à 4000 unités glucose par molécule. L'amidon consiste en environ 80% d'un composé soluble dans l'eau, appelé amylose, et 20% d'un composé insoluble dans l'eau, appelé amylopectine.

L'amylose est un polymère linéaire contenant des liaisons alpha entre les atomes de carbone 1 et 4 d'unités glucose adjacentes représenté par $\alpha 1G-\alpha 4G$.

L'amylopectine possède le même squelette de base composé d'unités $\alpha 1G-\alpha 4G$ mais contient aussi quelques liaisons $\alpha 1G-\alpha 6G$. L'amylopectine n'est donc pas un polymère linéaire, mais possède de nombreuses ramifications partant des longues chaînes d'unité glucose ^[18].

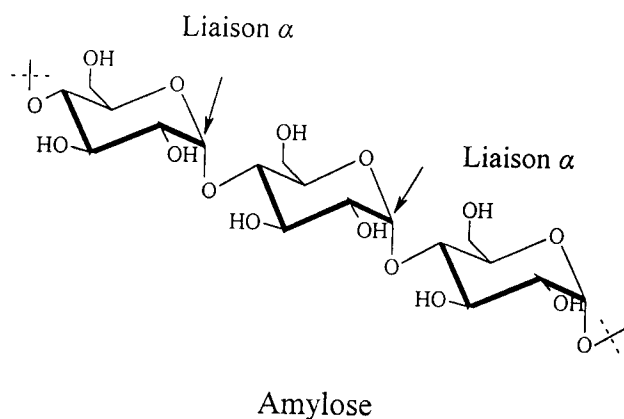


Figure 10 : Une partie de la molécule d'amylose.

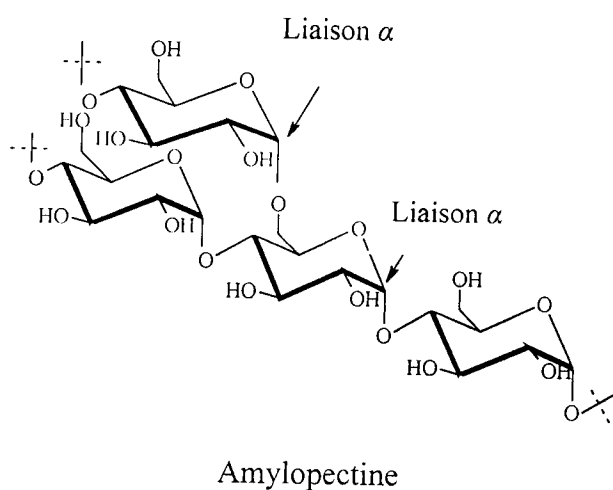


Figure 11 : Une partie de la molécule d'amylopectine.

La plante décompose ses réserves amylacées lorsque des monosaccharides et disaccharides sont nécessaires à la croissance et au développement. Nous hydrolysons ces polysaccharides lorsque notre système digestif décompose l'amidon stocké par les plantes dans des aliments tels que le maïs et les pommes de terre, le glucose devient ainsi disponible pour alimenter nos cellules ^[20].

Chez certaines plantes, particulièrement chez les céréales, comme le blé, le seigle et l'orge, les principaux polysaccharides de réserve dans les feuilles et les tiges sont des polymères de fructose appelés fructanes. Ces polymères sont solubles dans l'eau et peuvent être stockés à des concentrations beaucoup plus élevées que l'amidon ^[20].

b) Glycogène

Le glycogène, qui est le polysaccharide de réserve habituel chez les procaryotes, les champignons et les animaux, est également composé de chaînes de molécules de glucose [20]. C'est un homopolysaccharide ramifié, les unités de D-glucose ($n > 50.000$) sont unies par des liaisons *O*-glycosidiques intrachânes ($\alpha 1 \rightarrow 4$) et inter-chânes ($\alpha 1 \rightarrow 6$).

La molécule a une extrémité réductrice, celle dont le groupement hydroxyle hémiacétalique du glucose (terminal) est libre. Toutes les autres extrémités sont non réductrices : le groupement hydroxyle hémiacétalique du glucose (initial) est engagé dans la liaison *O*-glycosidique. La molécule compte une ramification toutes les 10 unités environ, chaque chaîne ($\alpha 1 \rightarrow 4$) portant en moyenne deux ramifications [8].

Le glycogène ne se trouve pas à l'état naturel. Il est synthétisé par le corps humain puis stocké essentiellement dans le foie et les tissus musculaires. Il est la source d'énergie majeure du corps humain [18]. L'apport glucidique alimentaire conditionne, directement, le niveau des stocks de glycogène musculaires et donc la capacité physique et l'aptitude à réaliser des efforts d'endurance.

Des athlètes qui s'entraînent intensément, mais qui consomment peu de sucre (40% de l'apport glucidique est augmenté à 70% de l'apport calorique total), les stocks de glycogène se reconstituent et la restauration est pratiquement complète au bout de 22 heures. Si les stocks de glycogène sont maintenus à un niveau suffisant, pendant la période d'entraînement, les athlètes se sentent mieux et se disent moins fatigués [21].

c) Cellulose

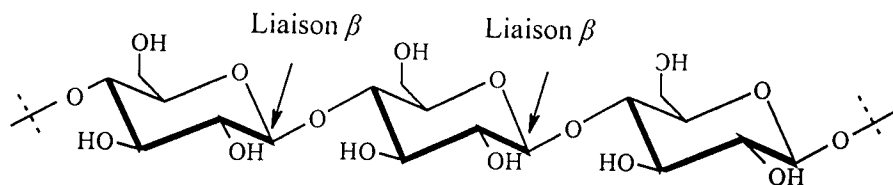


Figure 12 : Une partie de la molécule de cellulose.

La cellulose est un homopolysaccharide linéaire, Les unités de D-glucose ($n > 10.000$) sont unies par des liaisons *O*-glycosidiques ($\beta 1 \rightarrow 4$). C'est un constituant de la paroi des végétaux, elle constitue une partie des résidus fibreux nommés fibres alimentaires végétales (FAV). Les avantages des FAV sont nombreux :

- Elles accélèrent le transit intestinal.
- Elles diminuent le taux de cholestérol sanguin et donc préviennent l'athérome.
- Elles diminuent le risque de cancer de l'intestin.
- Elles ont un effet volume et diminuent ainsi la sensation de faim [7].

Les enzymes qui digèrent l'amidon en hydrolysant les liaisons glycosidiques α sont incapables d'hydrolyser les liaisons glycosidiques β de la cellulose. En fait, peu d'organismes produisent des enzymes capables de digérer la cellulose [22].

Par contre, les animaux à fourrage (par exemple les bovins) possèdent les enzymes nécessaires au métabolisme aussi bien de la cellulose que de l'amidon, et sont donc capables de survivre en se nourrissant de foin. La raison fondamentale de cette différence est que dans l'amidon, les liaisons reliant les unités glucose sont des liaisons alpha, alors que dans la cellulose, ce sont des liaisons bêta. Les enzymes humaines ne peuvent pas hydrolyser la liaison bêta de la cellulose [18].

II.1.7.2.3. Hétérosides

Les hétérosides sont constitués par l'association de glucides et de substances diverses, de nature non glucidique. La liaison entre le glucide (sous la forme pyranose ou furanose) et la partie non glucidique, appelée aglycone, met en cause le carbone anomère du glucide, de sorte qu'il existe des α -hétérosides et des β -hétérosides. Enfin, l'aglycone peut se lier au glucide soit par un atome d'oxygène (*O*-hétérosides) soit par un atome d'azote (*N*-hétérosides) [10].

a) Hétérosides d'origine végétale

Nous trouvons en abondance des hétérosides dans la nature, et notamment dans le règne végétal. Beaucoup sont des β -glucopyranosides, et souvent l'aglycone est un composé phénolique.

L'amygdaline se trouve dans les amandes amères et dans les noyaux de certains fruits, la partie glucidique est le gentiobiose et l'aglycone est la cyanhydrine du benzaldéhyde.

La coniférine est présente dans la sève des conifères. La coniférine est un β -D-glucopyranoside, dont l'aglycone est l'alcool coniférylique [10].

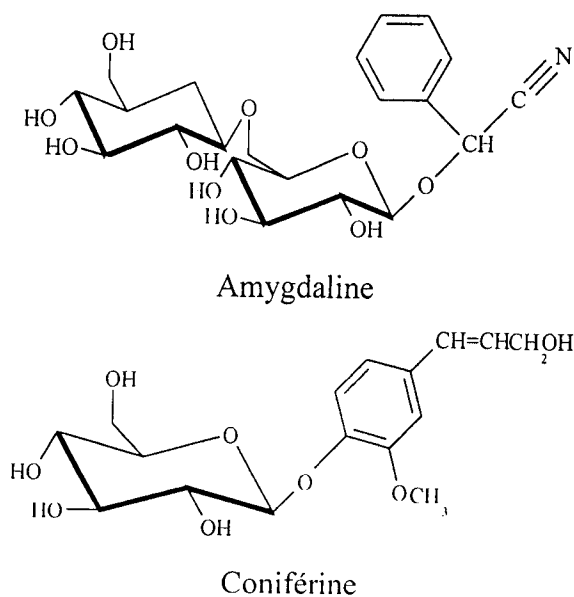


Figure 13 : Structures chimiques de quelques hétérosides végétaux.

b) Acides nucléiques

Les *N*-hétérosides dans lesquels la partie glucidique correspond au D-ribose ou au β -D-2-désoxyribose, et l'aglycone à diverses bases hétérocycliques du groupe de la pyrimidine et de la purine, sont d'une très grande importance biologique. Ils sont appelés ribonucléosides ou désoxyribonucléosides.

Les acides ribonucléique (ARN) et désoxyribonucléique (ADN) présents dans le noyau des cellules vivantes sont formés de la réunion d'un très grand nombre (3000 à 10 millions) de tels hétérosides. Par association de ces acides désoxyribonucléiques avec des protéines se forment les désoxyribonucléoprotéines dont sont constitués les chromosomes, et qui jouent un rôle essentiel dans la biosynthèse de protéines spécifiques à l'espèce et à l'individu ^[10].

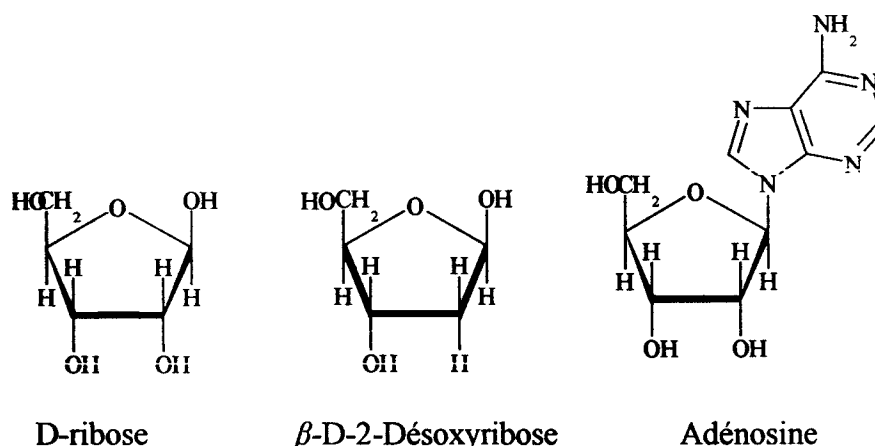


Figure 14 : Structures chimiques de quelques *N*-hétérosides.

c) Amino sucres

Ces molécules permettent aux protéines et aux sucres de se combiner et de produire des structures d'une diversité remarquables. Les aminosucres les plus courants sont la *N*-acétylglucosamine et la *N*-acétylgalactosamine. Le squelette externe dur des insectes et des coquillages contient de la chitine, un polymère qui ressemble beaucoup à la cellulose mais qui est constitué d'acétylglucosamine à la place du glucose. Il s'enroule de la même façon et donne leur dureté aux carapaces des crabes et aux corps des scarabées ^[23].

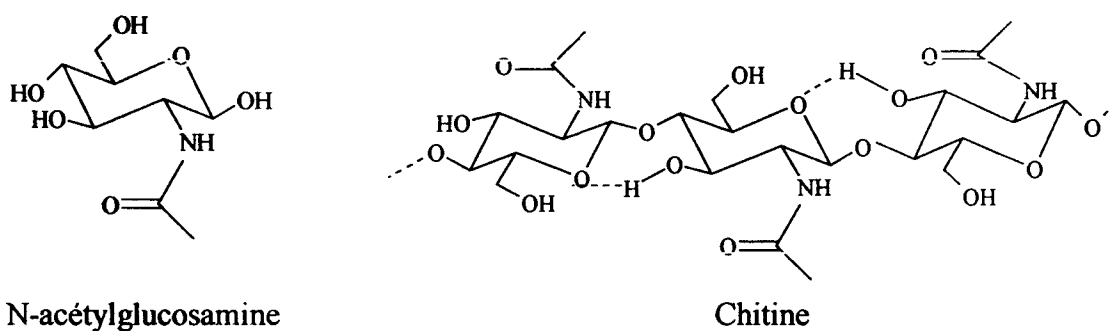


Figure 15 : Structures chimiques de la *N*-acétylgalactosamine et de la Chitine.

L'acide *N*-acétylmuramique, dérivé de sucre aminé qui résulte d'une liaison éther entre la *N*-acétyl-*D*-glucosamine et l'acide *D*-lactique, est un constituant essentiel des parois des cellules bactériennes [5].

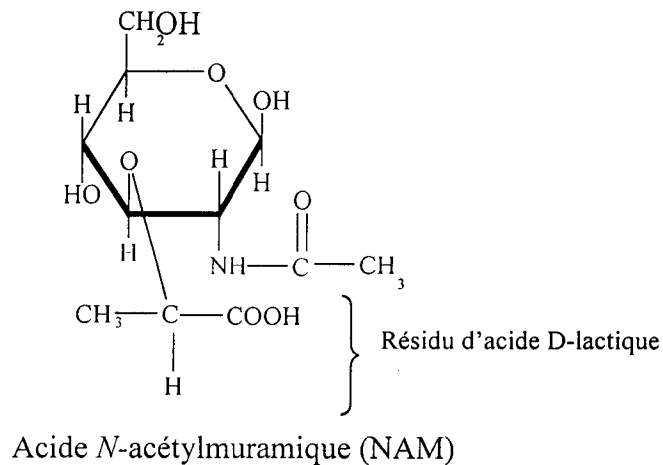


Figure 16 : Structure chimique de l'acide *N*-acétylmuramique.

II.1.7.3. Composés dérivés des sucres

Dans la nature, nous trouvons quelques composés importants fabriqués à partir des sucres. La vitamine C est l'un d'entre eux.

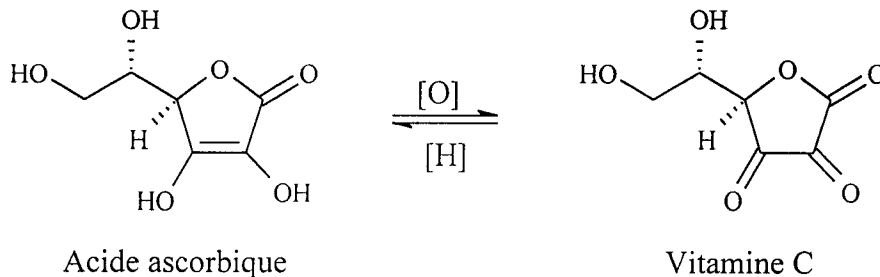


Figure 17 : Structure chimique de la vitamine C.

Comme le glutathion, elle nous protège des oxydants errants, et elle intervient dans les chemins réactionnels rédox primaires [23].

II.2. Lipides

II.2.1. Introduction

Contrairement aux glucides qui constituent une famille de composés relativement homogène, les lipides forment un groupe très hétérogène de composés, qui se différencient par leurs structures et leurs rôles biologiques.

Les lipides (du grec *lipos*, graisse) sont des substances naturelles, esters d'acides gras et d'un alcool ou d'un polyol. Ils constituent les structures cellulaires comme les phospholipides et les glycolipides membranaires. Ce sont aussi des substances de réserve et des sources d'énergie cellulaire [24].

II.2.2. Rôles des lipides ^[5]

Les lipides ont plusieurs rôles :

Rôle structural : les lipides entrent dans la constitution des membranes (membranes cellulaires, membranes mitochondriales, etc.). Ils interviennent ainsi dans la formation de nombreuses cellules.

Rôle métabolique : les lipides sont des molécules très efficaces pour mettre en réserve l'énergie métabolique, ceci parce qu'ils sont beaucoup moins oxydés que les glucides ou les protéines. Ils libèrent beaucoup plus d'énergie lorsqu'ils sont dégradés.

L'apport énergétique fourni par les lipides est important : 1g de lipide = 9Kcal. Les lipides apportés par l'alimentation sont stockés pour être utilisés en dehors des repas.

II.2.3. Apports alimentaires

Les lipides alimentaires peuvent être d'origine végétale ou animale. Les graisses végétales sont retrouvées dans les différentes huiles et la margarine. Elles peuvent être saturées (arachide), mono-insaturées (olive, colza) ou polyinsaturées (tournesol, maïs, pépins de raisins, soja, noix) ^[25]. Chez les plantes dites oléagineuses, comme le Ricin, l'Arachide, le Palmier à huile, les teneurs en lipides de certains organes peuvent devenir impressionnantes (50% par exemple, dans la Cacahuète ou la Fève du Cacaoyer) ^[26].

II.2.4. Classification

Nous distinguons habituellement :

- Les lipides simples, esters d'acides gras et d'un alcool qui peut être : le glycérol, constitutif des triglycérides, ou un alcool aliphatique de masse moléculaire élevée, constitutif des cérides.
- Les lipides complexes, dénommés aussi hétérolipides : leur molécule renferme non seulement du carbone, de l'oxygène et de l'hydrogène, mais aussi de l'azote et du phosphore. Ils comprennent essentiellement deux familles : les glycérophospholipides et les sphingolipides qui jouent un rôle fondamental dans les organismes vivants, en particulier comme constituants membranaires.

II.2.4.1. Acides gras ^[8, 27]

Ce sont les unités de base des lipides. Un acide gras est constitué d'une chaîne hydrocarbonée de longueur variable terminée par un groupement carboxyle (COOH). Ils sont rarement à l'état libre, le plus souvent estérifiés à des alcools (glycérol, sphingosine, cholestérol, etc.) pour former d'autres lipides ^[8].

Nous distinguons les acides gras saturés qui ne présentent aucune double liaison, les mono-insaturés, porteurs d'une seule double liaison et les polyinsaturés qui en comportent au moins deux ^[27]. Chez les plantes et les animaux supérieurs, les acides gras les plus abondants sont ceux de la série C₁₆ et C₁₈.

La classification des acides gras se fonde sur :

- Le nombre de carbone (n compris entre 4 et 36).
- Le nombre de doubles liaisons : la plupart des acides gras polyinsaturés ont leurs doubles liaisons en configuration cis.

- Une nomenclature simplifiée indique : $C_n : x \Delta^{m, n, o}$ (C : carbone ; n : nombre de carbone ; x : nombre de doubles liaisons ; Δ : double liaison ; m, n, o, position des doubles liaisons à partir du carbone 1). [8]

Tableau 2 : Exemples de quelques acides gras.

Nomenclature	Symbole
Acide palmitique	$C_{16} : 0$
Acide stéarique	$C_{18} : 0$
Acide oléique	$C_{18} : 1 \Delta^9$
Acide linoléique	$C_{18} : 2 \Delta^{9, 12}$
Acide α -linoléique	$C_{18} : 3 \Delta^{9, 12, 15}$

a) Principaux acides gras saturés

Les acides palmitique et stéarique sont les acides gras naturels les plus répandus.

b) Principaux acides gras insaturés [28]

Mono insaturés :

- Acide oléique : universellement répandu dans les lipides végétaux et animaux.

Polyinsaturés :

- Acide linoléique : synthétisé uniquement par les végétaux, présents en abondance dans certaines huiles végétales (soja, tournesol, maïs, noix, pépins de raisin, etc.). L'organisme humain est déficient en l'enzyme (désaturase) nécessaire pour créer une deuxième double liaison dans l'acide oléique, pour le transformer en acide linoléique. L'acide linoléique est donc un acide gras indispensable et doit être obligatoirement fourni par l'alimentation.
- Acide linoléique : synthétisé aussi uniquement par les végétaux, semble aussi indispensable pour le corps humain. Il est abondant dans certaines huiles végétales (soja, coton, noix, etc.)
- Acide arachidonique : isolé à l'origine de l'huile d'arachide, il peut en fait être synthétisé par l'homme. Néanmoins il est essentiel quand à son rôle biologique, notamment en tant que précurseur des prostaglandines et d'autres médiateurs lipidiques cellulaires.
- Acide éicosapentaénoïque : acide gras présent surtout dans les lipides d'animaux marins, dont les poissons gras.

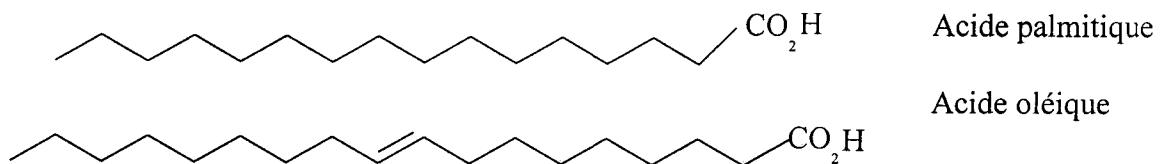


Figure 18 : Structures chimiques de quelques acides gras.

II.2.4.1.1. Acides gras dans l'alimentation

La composition en acides gras des lipides dans l'alimentation de l'homme varie considérablement. Le tableau ci-dessous en présente un bref aperçu. La corrélation entre les troubles cardiovasculaires et une alimentation riche en acides gras saturés est bien établie. Garrett H. R. et coll. [29] mentionnent qu'une alimentation contenant une plus grande proportion d'acides gras insaturés (en particulier les acides gras polyinsaturés) pourrait réduire le risque d'infarctus ou de congestion cérébrale.

Tableau 3: Teneur en acides gras de quelques lipides alimentaires*.

Origine	Laurique et Myristique	Palmitique	Stéarique	Oléique	Linoléique
Bœuf	5	24-32	20-25	37-43	2-3
Lait		25	12	33	3
Noix de coco	74	10	2	7	-
Maïs		8-12	3-4	19-49	34-62
Olive		9	2	84	4
Palmier		39	4	40	8
Soja		9	6	20	52
Tournesol		6	1	21	66

* valeurs exprimées en pourcentage des acides gras totaux.

L'usage de l'huile de maïs qui est riche en acide linoléique (polyinsaturé), révèle d'un bon choix pour l'alimentation.

L'huile de palme contient peu d'acides gras polyinsaturés et beaucoup d'acide palmitique (un acide saturé extrait à l'origine d'huile de palme). L'huile de noix de coco contient une grande proportion d'acides laurique et myristique (acides gras saturés), avec très peu d'acides gras insaturés. Une alimentation destinée à réduire les risques de troubles de circulation cardiaque doit être pauvre en acides gras saturés [29].

II.2.4.1.2. Propriétés physiques des acides gras [28, 30]

Une propriété physique importante des acides gras est leur point de fusion. Celui-ci est d'autant plus bas que le nombre de doubles liaisons est élevé. Le point de fusion de l'acide stéarique est de 70°C, alors que celui de l'acide oléique est de 13°C.

Les acides gras insaturés sont liquides à la température ordinaire, leur point de fusion est plus bas que celui des acides saturés. Ainsi, ce sont surtout les huiles qui sont riches en acides gras mono- et polyinsaturés.

II.2.4.2. Triglycérides

Une très grande fraction des acides gras des plantes et des animaux sont présents sous forme de triglycérides (ou triacylglycérols). Les triglycérides, ou encore graisses neutres, sont les principaux dérivés neutres du glycérol et la plus importante réserve d'énergie chez l'animal.

Ces molécules résultent de l'estérification d'une molécule de glycérol par trois molécules d'acides gras ^[29].

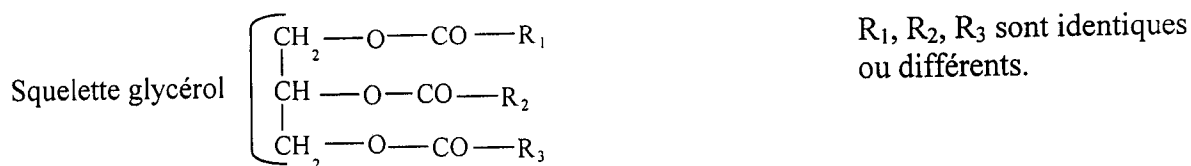


Figure 19 : Structure chimique du triglycéride.

Les triglycérides simples contiennent le même acide gras, tandis que les triglycérides mixtes contiennent deux ou trois acides gras différents. Les corps gras naturels sont non seulement des triesters mixtes du glycérol, mais des mélanges de glycérides divers : ainsi dans le beurre interviennent une quinzaine d'acides différents ^[10].

Les glycérides qui correspondent à des acides gras non saturés sont liquides à la température ordinaire (huiles), alors que ceux qui correspondent à des acides gras saturés sont solides (graisse). Il en résulte que l'hydrogénation catalytique d'une huile, faisant disparaître son caractère insaturé, la transforme en une graisse. Cette opération (durcissement des huiles) est couramment pratiquée sur des huiles végétales non directement consommables (coton, soya) pour obtenir des margarines, substitut du beurre ^[10].

II. 2.4.2.1. Propriétés chimiques ^[6, 31, 32]

Les glycérides sont des graisses neutres hydrophobes, insoluble dans l'eau, et dont le point de fusion est d'autant plus élevé que le taux d'acides gras insaturés entrant dans leur composition est plus faible. Leurs principales propriétés chimiques sont dues aux fonctions esters, à la chaîne aliphatique de l'acide gras et, surtout, aux doubles liaisons.

a) Hydrolyse

Catalysée par les ions H^+ , l'hydrolyse d'une glycéride libère le glycérol et les acides gras.

b) Saponification

L'hydrolyse alcaline libère les sels d'acides gras, appelés savons, et le glycérol. Il existe certaines fractions lipidiques qui ne sont pas solubles au cours des réactions de saponification. Elles sont appelées insaponifiables, extractibles par l'éther.

c) Hydrogénation des huiles

L'hydrogénation réduit les acides gras insaturés sans les détacher du glycérol. Ainsi, elle transforme les huiles en produits solides ressemblant aux graisses. Le produit d'hydrogénation des huiles végétales est la margarine.

d) Oxydation spontanée

Elle se produit sur les acides gras insaturés, donc elle s'exerce sur les huiles et non pas les graisses. Elle dépend de mécanismes d'oxydation par des radicaux libres oxygénés et aboutissent à la coupure des acides gras insaturés en diacides à courte chaîne.

e) Indice d'iode

Cet indice permet d'établir le nombre de doubles liaisons présents dans le triglycéride. Nous faisons agir sur une quantité connue de préparation de triglycéride une solution titrée d'iode et nous

Les glycérophospholipides sont donc des molécules amphiphiles avec des queues non polaires aliphatiques et une tête phosphoryle-X polaire. Les plus simples, pour lesquels X=H, sont des acides phosphatidiques. Ils se trouvent en faibles quantités dans les membranes biologiques.

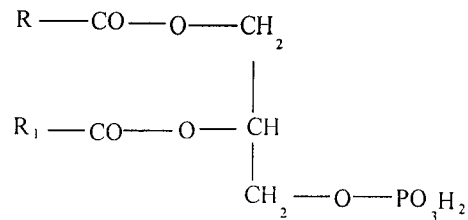


Figure 21 : Structure chimique de l'acide phosphatidique.

Certains phospholipides portent en plus une fonction amine, comme la lécithine, dont la structure chimique est la suivante :

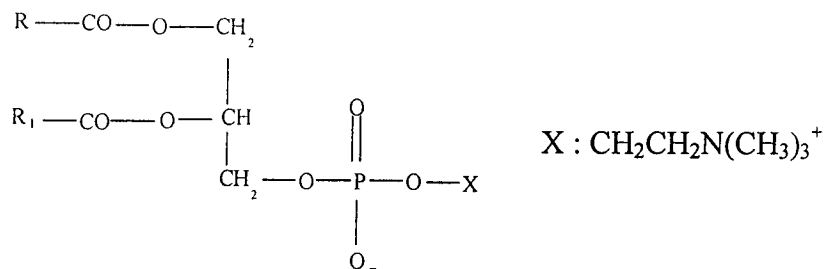


Figure 22 : Structure chimique de la lécithine.

II.2.4.6. Sphingolipides ^[29, 30]

Les sphingolipides sont une autre classe des lipides fréquemment présents dans les membranes biologiques. Le squelette carboné de ces lipides n'est plus le glycérol mais un amino alcool à 18 atomes de carbone, la sphingosine. La liaison de la sphingosine à un acide gras par une liaison amide donne une céramide. Les céramides ont été trouvées en petites quantités à l'état libre dans de nombreuses cellules eucaryotes et procaryotes. Tout les sphingolipides sont amphiphiles.

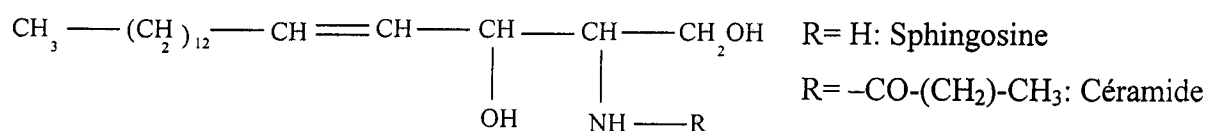


Figure 23: Structures chimiques de quelque sphingolipides.

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 ^[39].

Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocyanes, des aurones et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que des flavonols et flavanones interagissent avec des anthocyanes pour altérer, par co-pigmentation, la couleur des fleurs et fruits ^[40].

III.1.3. Principales sources et utilisations actuelles des polyphénols

Les flavonoïdes les plus utilisés sont, d'une part ceux provenant du ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), qui participent à la lutte contre la sénescence cérébrale et ses conséquences (altération de la mémoire, confusion, etc.) et, d'autre part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers *Citrus*) et le rutoside (extrait de *Sophora japonica* L.), qui sont utilisés dans le traitement des troubles liés à la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire). De plus, Hennebelle T. et coll. ^[41] attribuent également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives (passiflore, *Passiflora incarnata* L.), antispasmodiques (thym, *Thymus vulgaris* L., *Thymus zygis* L.), anti-inflammatoires (camomille romaine, *Chamaemelum nobile* (L.) ; achillée millefeuille, *Achillea millefolium* L.) et diurétiques (bouleau, *Betula* spp. ; genêt à balai, *Cytisus scoparius* (L.)).

Les flavonoïdes sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes. L'hypolaétine-8-glucose, flavonoïde présent dans diverses espèces du genre *Sideritis*, présente une activité anti-ulcérogène significative ^[42].

Des propriétés antibactériennes et antivirales des flavonoïdes vis-à-vis de différentes souches bactériennes ont également été mises en évidence ^[43, 44-47]. Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire d'autres virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus. ^[48, 49]

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase ^[50, 51-54], de la phospholipase A2 ^[55], et des enzymes de l'inflammation : la cyclooxygénase ^[56], et la lipo-oxygénase ^[57, 58].

Les anthocyanes sont également utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire (vigne rouge, *Vitis vinifera* L.), mais aussi comme diurétiques (sureau, *Sambucus nigra* L.), voire même antiseptiques urinaires (canneberge à gros fruits, *Vaccinium macrocarpon* Aiton.). Leur plus grande spécificité reste cependant leur propriété d'améliorer la vision nocturne en facilitant la régénération du pourpre rétinien (myrtille, *Vaccinium myrtillus* L. ; cassis, *Ribes nigrum* L.) ^[41].

Les tanins (proanthocyanidines et tanins hydrolysables) sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel Hennebelle T. ^[41] expliquent leurs propriétés vasculoprotectrice (ratanhia du Pérou, *Krameria lappacea* (Dombey)), cicatrisantes (hamamélis, *Hamamelis virginiana* L.) et

antidiarrhéiques (chêne, *Quercus* sp.). Les proanthocyanidines dimères de l'aubépine (*Crataegus* sp.) seraient de bons sédatifs cardiaques.

Les catéchols, unités structurales de bases des tanins catéchiques du thé, exercent une activité cardioprotectrice, grâce à leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-thrombotiques^[59-60]. Ils sont également efficaces en prophylaxie de certains cancers comme le cancer de la peau et des poumons^[61]. Le thé vert consommé au long cours à raison de 2 à 4 tasses (une tasse apporte de 300 à 400 mg de polyphénols) peut reproduire les effets du gallate d'épicatéchol sur la thermogénèse, contribuant ainsi à une incidence moindre de l'obésité^[62].

Les acides-phénols sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut, (*Cynara scolymus* L.). Nous connaissons bien sûr les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés (spirée ulmaire, *Filipendula ulmaria* (L.) ; saule, *Salix* sp.)^[41].

Les coumarines sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices (mélilot, *Melilotus officinalis* (L.) ; marronnier d'Inde, *Aesculus hippocastanum* L.), neurosédatives (aspérule odorante, *Galium odoratum* (L.) Scop.), diurétiques (piloselle, *Hieracium pilosella* L.), stomachiques et carminatives (angélique, *Angelica archangelica* L.)^[41].

Les coumarines possèdent un tropisme nerveux et sanguin (anticoagulant). Leur action sur le cerveau est sédatif et calmant. Elles diminuent l'excitabilité réflexe au niveau central. A un degré de plus, leur propriété devient hypnotique. L'action anticoagulante des coumarines s'exerce, entre autres, par interférence dans la synthèse de la prothrombine au niveau hépatique. Les anticoagulants à base de coumarine (warfarine, Coumadin®) sont prescrits après une crise cardiaque ou pour la prévenir en cas de risque accru. Ils peuvent aussi réduire les risques de thrombose, soit la formation de caillots dans les veines et les artères entravant la circulation sanguine^[63].

Les coumarines sont aussi un remède de choix pour traiter la fibrillation cardiaque (contractions anormalement rapides et irrégulières du muscle cardiaque). Ce problème touche plus de 5 % des personnes âgées de 65 ans et plus. Certaines coumarines ont des propriétés anti-infectieuses (*E. coli*, *Staph. aureus*, bacille de Koch responsable de la tuberculose)^[63].

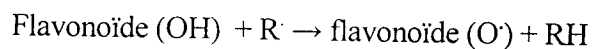
Certaines quinones, dérivant de l'anthraquinone, sont des laxatifs stimulants. Elles sont rencontrées dans la bourdaine (*Rhamnus frangula* L.), le cascara (*Rhamnus purshianus* DC.), les sénéés (*Cassia* sp.), les aloès (*Aloe* sp.), la rhubarbe de Chine (*Rheum* sp.). Ces dérivés seraient irritants et leur utilisation prolongée pourrait être dangereuse à long terme^[41].

III.1.4. La lutte contre l'oxydation

En particulier, l'attention des chercheurs a été attirée par le fait que, par leur nature même, les composés à fonction phénolique présentent une activité antioxydante. De nombreuses molécules possédant des propriétés anti-oxydantes ont été isolées du monde végétal, toutes de nature plus ou

moins phénolique. Leurs représentants les plus défendus sont le resvératrol (un stilbénoloïde rencontré dans la peau de raisin) [64], les polyphénols du ginkgo [65], du thé vert [66], et de l'huile d'olive [67], les diterpènes et l'acide rosmarinique du romarin [68].

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles (OH), anions superoxydes (O_2^-) et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante :



Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle ($C_3\text{-OH}$) fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques (largués à partir de leurs protéines de fixation ou de transport) qui peuvent renforcer ces effets nuisibles par la production des radicaux hydroxyles (OH^\cdot) [69, 70].

L'effet antioxydant des anthocyanes est expliqué en partie par le piégeage des radicaux libres et la chélation des métaux. Par ailleurs, le cyanidol forme un complexe de pigmentation avec l'ADN, protégeant ainsi cette molécule critique des altérations oxydatives [71].

III.1.5. Flavonoïdes

III.1.5.1. Définition

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires [72]. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [73]. Les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits (notamment du genre *Citrus* où ils représentent jusqu'à 1 % des fruits frais) et les légumes. Des boissons telles que le vin rouge, le thé, le café et la bière en contiennent également des quantités importantes.

III.1.5.2. Structures chimiques

Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone [74].

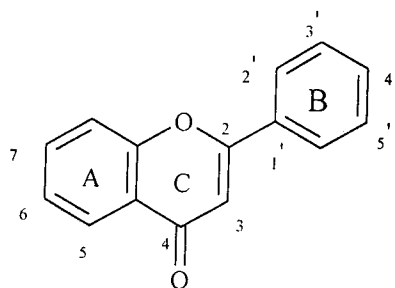


Figure 24 : Structure de l'enchaînement benzo- γ -pyrone.

Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes [24, 72].

Selon la nature de l'hétérocycle (γ -pyrone ou son dihydro dérivé), nous distinguons :

- les flavones et les flavonols,
- les flavanones, les flavanols et les dihydroflavanols.

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques).

Les flavones et flavonols sont les composés flavonoïdiques les plus répandus dont notamment : la quercétine, le kaempférol, la myricétine et l'apigénine. Les flavanones (naringénine) et les flavanols (catéchine) ainsi que les dihydroflavonols (dihydrokaempférol, dihydroquercétine) et les dihydroflavan-3,4-diols (leucopélargonidol, leucocyanidol) sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte [73, 75].

a) Flavones

Tableau 4 : Exemples de quelques flavones.

	5	6	7	4'
Apigénine	OH	-	OH	OH
Lutéoline	OH	-	OH	-

b) Flavanones

Tableau 5 : Exemple d'un flavanone.

	5	7	4'
Naringénine	OH	OH	OH

c) Flavonols

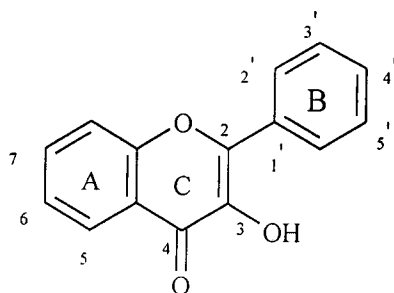


Figure 25 : Structure chimique de base des flavonols.

Tableau 6 : Exemples de quelques falvonols.

	5	7	3'	4'	5'
Quercétine	OH	OH	OH	OH	-
Kaempférol	OH	OH	-	OH	-
Myricétine	OH	OH	OH	OH	OH

d) Flavanols

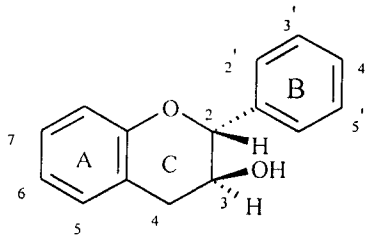


Figure 26 : Structure chimique de base des flavanols.

Tableau 7 : Exemple d'un flavanol.

	5	7	3'	4'
Catéchine	OH	OH	OH	OH

e) Flavan-3,4-diols

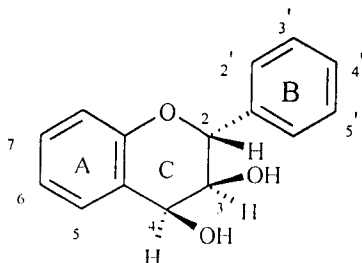


Figure 27 : Structure chimique de base des flavan-3,4-diols.

Tableau 8 : Exemples de quelques flavandiols.

	5	7	3'	4'
Leucopélargonidol	OH	OH	H	OH
Leucocyanidol	OH	OH	OH	OH

f) Dihydroflavonols

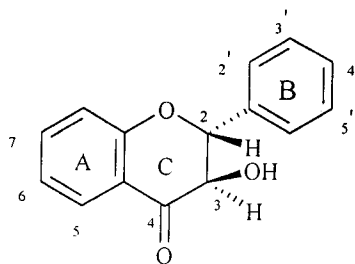


Figure 28 : Structure chimique de base des dihydroflavonols.

Tableau 9 : Exemples de quelques dihydroflavonols.

	5	7	3'	4'
Dihydrokaempférol	OH	OH	H	OH
Dihydroquercétine	OH	OH	OH	OH

g) Isoflavone

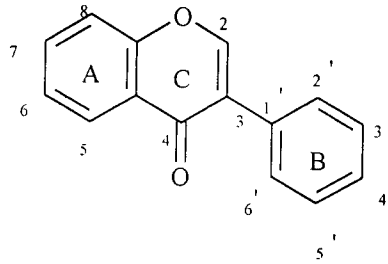


Figure 29 : Structure chimique de base de l'isoflavone.

III.1.5.3. Propriétés physico-chimiques

Les hétérosides sont hydrosolubles et solubles dans les alcools et les solutions d'hydroxyde alcalin [24].

III.1.6. Anthocyanes

III.1.6.1. Définition

Ces composés phénoliques se caractérisent par une génine comportant un noyau flavylium ou cation 2-phényl benzopyrilium. Il s'agit de pigments existant sous forme d'hétérosides stables et hydrosolubles responsables de la coloration rouge, rose, mauve, pourpre, bleue ou violette de la plupart des fleurs et fruits [24]. Les anthocyanes sont répandus dans plusieurs fruits comme les cerises, les myrtilles, les canneberges, le cassis, le sureau noir et le raisin. Ils sont rencontrés dans des légumes comme les racines de betterave et de radis, les bulbes d'oignon rouge et dans des boissons comme les jus de fruits, le thé etc. [24, 69]

III.1.6.2. Structures chimiques

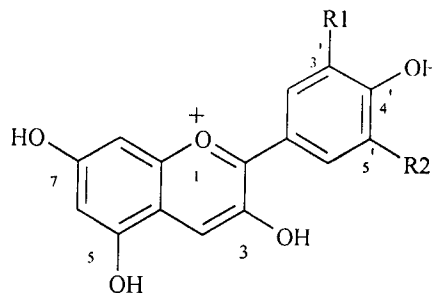


Figure 30 : Structure chimique du cation 2-phényl benzopyrilium (flavylium).

Tableau 10 : Exemples de quelques anthocyanidines.

Anthocyanidines	3'	4'	5'
Pélagonnidol	H	OH	H
Cyanidol	OH	OH	H
Delphinidol	OH	OH	H
Malvidol	OCH ₃	OH	OCH ₃
Pétunidol	OH	OH	OCH ₃

En général, les anthocyanes sont glycosylées en position 3 et 5. Les sucres les plus fréquents sont des mono-(glucose, galactose, etc.), des di- et tri- saccharides.

III.1.6.3. Propriétés physico-chimiques

Les anthocyanidines présentent une absorption caractéristique dans le domaine UV. ^[76] La forme cationique de l'anthocyanidine est caractérisée par deux bandes d'absorption, dont une bande intense dans le domaine du visible, caractéristique pour chacune d'entre elles ^[77].

Les anthocyanosides sont soluble dans l'eau et les alcools, insolubles dans les solvants organiques apolaires, instables en milieu neutre ou alcalin, caractérisés par une coloration rouge à pH < 3 et une coloration bleue à pH compris entre 4 et 6 ^[24].

III.1.7. Coumarines

III.1.7.1. Définition

Les coumarines, composés phénoliques non volatils, sont très répandues chez les végétaux, notamment dans les racines et les écorces ; d'odeurs agréables, certaines servent en parfumerie ou pour aromatiser le tabac ; d'autres sont très toxiques telles que les aflatoxines des champignons inférieurs. Ce sont des dérivés du phénylpropane dont les précurseurs sont des acides hydroxycinnamiques. La coumarine simple est un inhibiteur de germination des graines et de la croissance racinaire. Dans certaines références, il a été noté que les coumarines pouvaient avoir un rôle régulateur de croissance ^[78, 79]. Les coumarines sont des composés hétérocycliques oxygénés dérivant des cétones (de l' α -pyrone). Il s'agit d'une lactone de l'acide *o*-hydroxycinnamique qui sert de soutien à une infinité de parfums employés dans la fabrication des savons, des pommades et des crèmes ^[80].

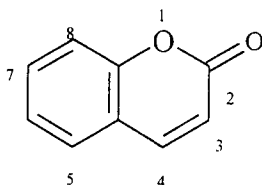


Figure 31 : Structure chimique de la coumarine benzo α -pyrone.

Nous distinguons deux types :

- Les coumarines simples substituées, en C₆-C₇-C₈ soit, par les hydroxydes forme méthoxyles.
- Les coumarines complexes telles que les furocoumarines et les pyranocoumarines.

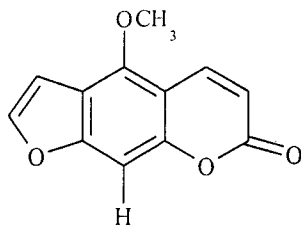


Figure 32 : Structure des coumarines complexes : Bergaptène.

III.1.7.2. Propriétés physico-chimiques

Les coumarines sont solubles dans les solvants organiques tels que l'éther, les solvants chlorés et les alcools. Leurs formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Elles ont une absorption caractéristique en UV [24].

III.1.8. Tanins

III.1.8.1. Définition

Le procédé du tannage est utilisé pour la production de cuir depuis la préhistoire, alors que la nature des extraits végétaux et les réactions chimiques qui se produisent avec la peau ne sont connues que depuis un peu plus d'un siècle. Le terme tanin fut introduit à la fin du dix-huitième siècle pour définir les substances organiques présentes dans les extraits aqueux des feuilles, écorce, bois, fruit [81]. Ces substances ont la capacité de transformer des peaux d'animaux en cuir bien plus résistant face aux bactéries, à la chaleur et à l'abrasion.

En 1962, Bate-Smith et Swain en donnent la définition suivante : composés phénoliques solubles dans l'eau, de poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Daltons, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité à précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines.

En 1980, Gupta et Haslam [2] ajoutèrent à la définition de 1962 que les tanins végétaux sont des produits métaboliques normaux et ne sont pas des produits issus de transformations *in vitro*, chimiques ou autres.

III.1.8.2. Structure chimique et classification

En 1920, Frendenberg établit la classification des tanins la plus largement acceptée. Il les divise en deux groupes basés sur des différences structurales : les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables, ou tanins condensés [2].

a) Tanins hydrolysables

Ce sont des esters de glucose, c'est-à-dire un noyau central de glucose sur lequel se fixent, au moyen d'une liaison ester, des acides : l'acide gallique pour le groupe des tanins galliques ou l'acide hexahydroxy diphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation dans le cas des tanins ellagiques.

Leur hydrolyse, par des acides, des bases ou certaines enzymes, libère le glucose ainsi que les acides galliques ou phénoliques liés [2, 24, 82, 83]. Ils n'existent que chez les dicotylédones [84].

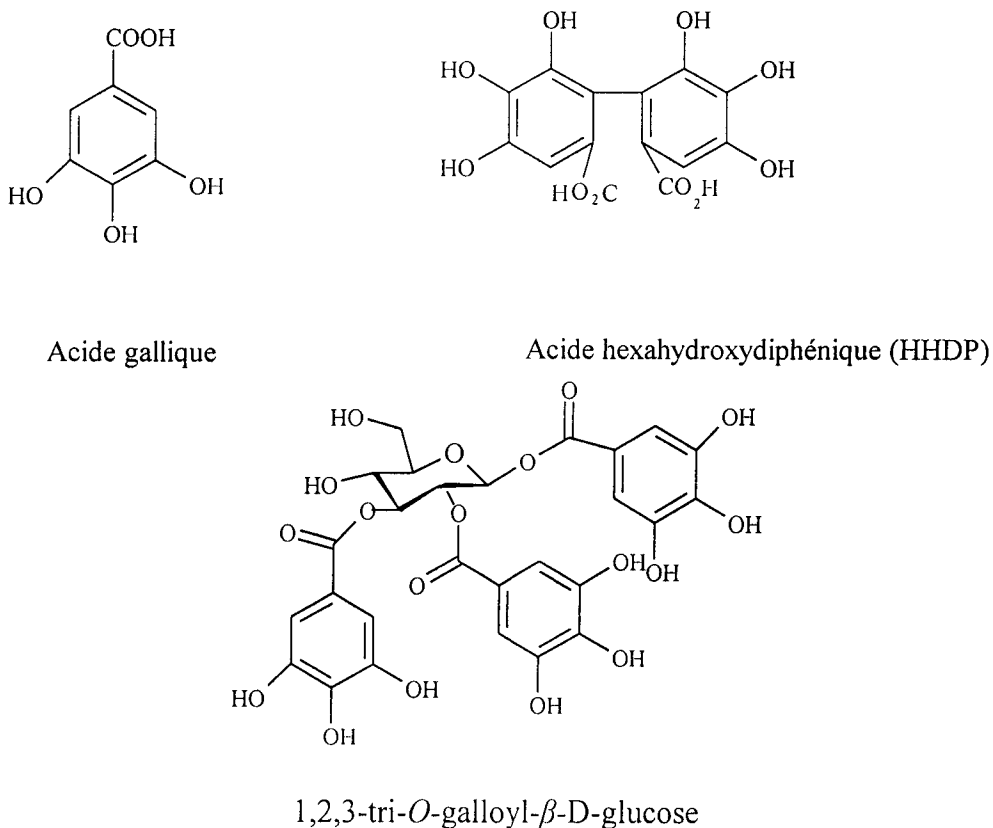


Figure 33: Structures de quelques tanins hydrolysables.

b) Tanins condensés

Nous les appelons également proanthocyanidines, car les tanins condensés produisent des anthocyanidines quand nous les chauffons dans l'acide [85]. Ce sont des polymères de flavan-3-ols (appelés aussi catéchines) et de flavan-3,4-diols (appelés leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux [2, 82].

Les tanins condensés sont des polymères de fort poids moléculaire, les plus couramment décrits faisant 5000 Daltons, mais d'autres sont découverts de plus de 30.000 Daltons [86]. Le degré moyen de polymérisation des proanthocyanidines peut varier considérablement. Il peut être 20-30, comme dans la feuille du *Trifolium affine*, [87] 83 dans des peaux de raisin [88] et 190 unités dans la pomme à cidre. [89], et il existe de nombreuses hydroxylations possibles en différents endroits de chaque monomère. Cette diversité structurale explique les variations d'activité biologique [85].

L'élément structural de base de ces polymères est un flavan-3-ol. La configuration habituelle des flavan-3-ols est 2R, 3S. Des énantiomères comme l'entcatéchol (2S, 3S) semblent exceptionnels^[24].

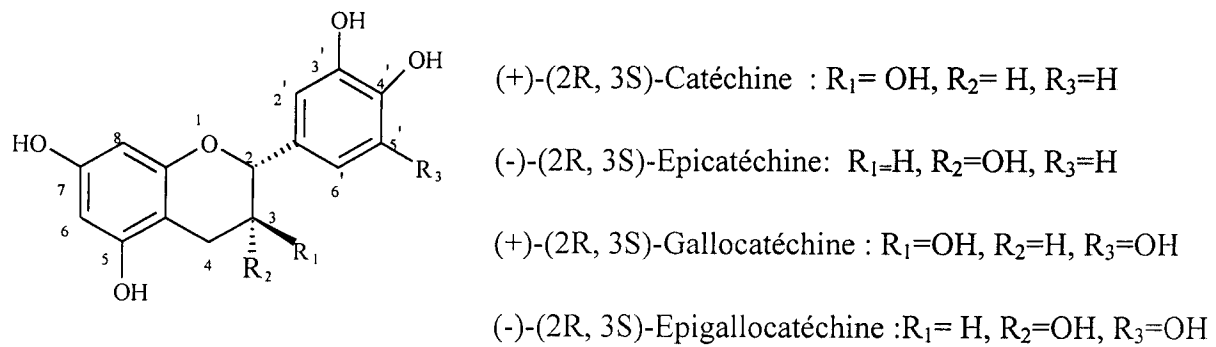


Figure 34: Structures des unités monomériques constitutives des tanins condensés.

Les dimères les plus simples sont les procyanidols B-1, B-2, B-3 et B-4 :

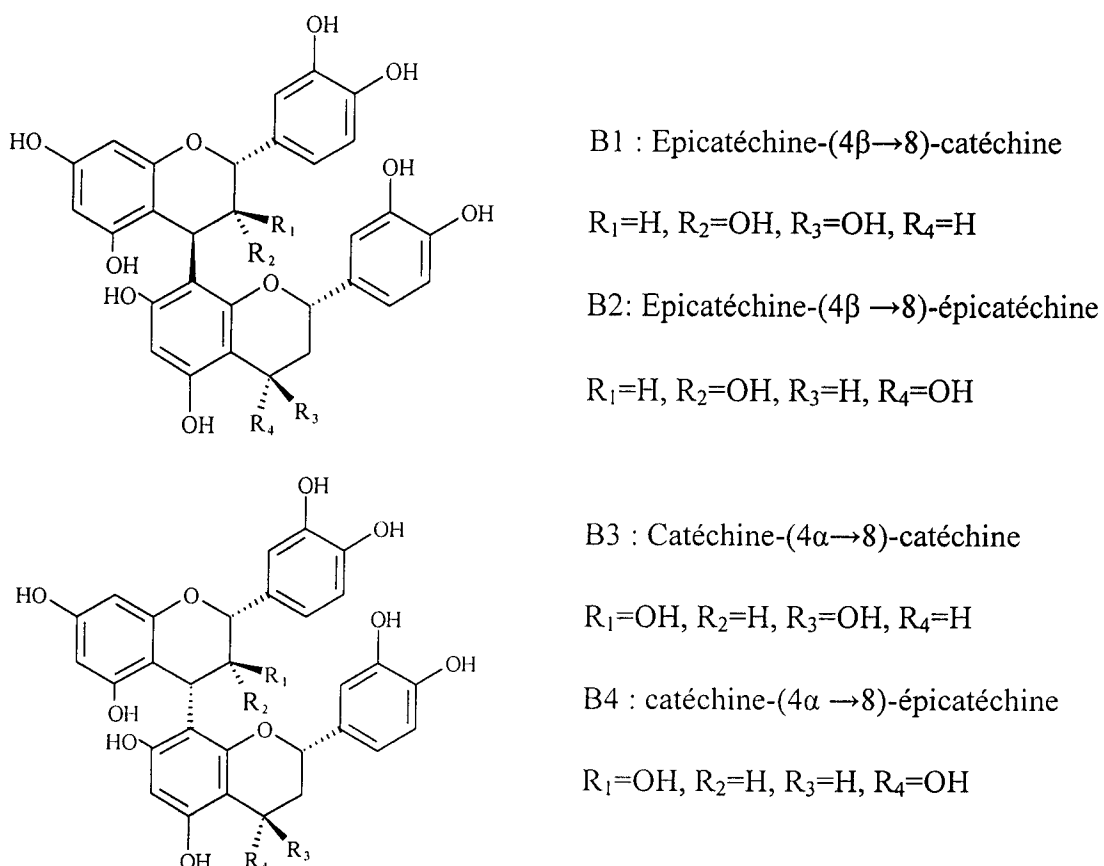


Figure 35 : Structures chimiques des proanthocyanidines dimériques de type B.

III.1.8.3. Propriétés physico-chimiques des tanins

Ce sont des corps généralement amorphe, solubles dans l'eau, dans l'alcool, et l'acétone. Ils sont insolubles dans les solvants organiques apolaires, et sont extraits par des mélanges hydroalcooliques additionnés ou non d'acétone^[90].

Ils forment des précipités avec les sels des métaux lourds tels que : Fe, P, Cu, Mo et aussi avec les protéines. Cette action est responsable de l'effet de tannage sur le cuir, des effets antidiarrhéiques et astringents.

III.1.8.4. Usages industriels

Ils sont utilisés dans l'industrie du cuir, et se combinent sous forme de complexes aux protéines et rendent imputrescibles les peaux.

A cause de leur nature, les tanins sont des antifongiques et antibactériens. Ils sont utilisés pour la protection des filets de pêches contre la prolifération des germes producteurs de cellulases qui sont des enzymes responsables de la destruction de la cellulose des filets [91].

III.1.9. Stilbènes

III.1.9.1. Définition

Les stilbènes sont des composés phénoliques possédant deux noyaux benzéniques reliés par un pont éthène. Le plus abondant est le resvératrol (3,4,5-trihydroxy stilbène), raison pour laquelle la majorité des travaux publiés pendant plusieurs années ont mis le point sur ce composé. Cependant, d'autres dérivés du resvératrol ont été identifiés [92-96].

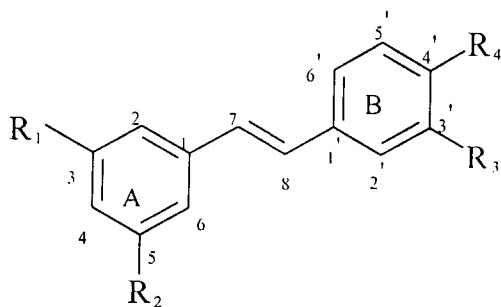


Figure 36: Structure chimique de base des stilbènes.

Tableau 11 : Exemples de stilbènes.

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Trans-resveratrol	OH	OH	H	OH
Trans-astringine	OGlc	OH	OH	OH
Trans-resveratrolside	OH	OH	H	OGlc

III.1.9.2. Effets bénéfiques sur la santé

En tenant compte des effets biologiques du trans-resvératrol, Orallo F. et coll. [97] concluent que ce composé joue un rôle crucial dans la prévention des pathologies cardio-vasculaires et des cancers [98]. Il protège les cellules contre la mort neuronale et s'avère intéressant dans la prévention des maladies neuro-dégénératives [99].

III.2. Huiles essentielles

III.2.1. Introduction

L'odeur de la plupart des plantes est due à des essences. Ces dernières sont d'abord isolées par léger chauffage de la matière végétale. Ultérieurement, elles ont pu être extraites plus facilement par entraînement à la vapeur. Des huiles parfumées concentrées sont ainsi obtenues, et sont appelées huiles essentielles, très utilisées en parfumerie. Le faible rendement de cette source en fait des produits à forte valeur ajoutée (pour avoir 1 kg d'essence de rose il faut 4000 à 5000 kg de pétales) ^[100].

III.2.2. Définition ^[24]

Selon la définition de la norme française AFNOR NF T 75-006 (Octobre 1987), l'huile essentielle est un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation à sec.

III.2.3. Répartition et localisation

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, fruits, rhizomes et graines. La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à l'huile essentielles des Lauracées ou des Zingiberacées, poils sécréteurs des Lamiacées, poches sécrétrices des Myrtacées ou des Rutacées, canaux sécréteurs des Apiacées ou des Asteracées ^[24].

III.2.4. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

A la température ambiante, elles sont généralement liquides, très rarement colorées, volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Leur densité, le plus souvent est inférieure à celle de l'eau. Elles sont peu solubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques (éther, alcools, hexane, pentane, etc.) ^[24].

III.2.5. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique de ces essences est complexe et peut varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, le mode d'extraction ^[101].

III.2.5.1. Terpènes

L'analyse chimique a permis de mettre en évidence la présence dans ces huiles de composés volatils en C₁₀ ou C₁₅ qu'on a appelés terpènes à cause de leur origine historique qui est l'essence de térébenthine ^[101]. Le point commun à la majorité des terpènes est la présence dans leur squelette de l'unité de base isoprène, qui peut se retrouver plusieurs fois, conduisant à une formule brute multiple de C₅H₈ pour les hydrocarbures.

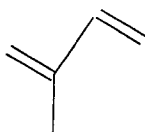


Figure 37 : Structure chimique de l'isoprène.

Cette constatation a fait croire au début que ces composés provenaient de la condensation de molécules d'isoprène sur elles mêmes, mais en pratique on n'a jamais mis en évidence la présence d'isoprène dans les plantes. L'arrangement des motifs isoprène le plus couramment rencontré dans les terpènes est de type tête-queue, la tête de l'un des motifs isoprène étant reliée à la queue du motif suivant.

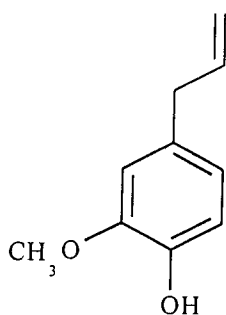
Rahal S. ^[100] classe les terpènes d'après le nombre d'unités en C_{10} qu'ils comportent. Ainsi, pour les hydrocarbures terpéniques, la classification est la suivante : $C_{10}H_{16}$: monoterpènes ; $C_{15}H_{24}$: sesquiterpènes ; $C_{20}H_{32}$: diterpènes ; $C_{30}H_{48}$: triterpènes, etc.

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : mono et sesquiterpènes ^[24].

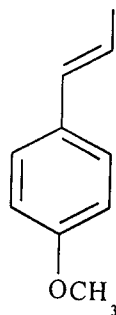
III.2.5.2. Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Ils se distinguent entre eux par :

- Le nombre et la position des groupements hydroxyle et méthoxy.
- La position de la double liaison de la chaîne latérale, allylique ou propénylique.
- Le degré d'oxydation de la chaîne aliphatique (alcool, aldéhyde ou cétone, acide, etc.) ^[102].



Eugénol (girofle)



Anéthol (anis, fenouil)

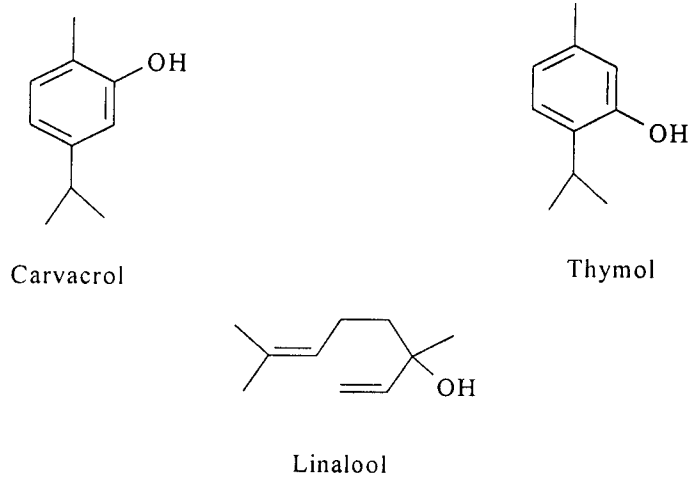


Figure 38 : Structures de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles.

III.2.5.3. Composés d'origines variées

Les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faibles masse moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation : carbures, acides (C_3 à C_{10}), alcools (1-octèn-3-ol de l'huile essentielle de lavande, etc.), aldéhydes, esters acycliques principalement présents dans les fruits : Acétate de butyle (pomme), Acétate d'isoamyle (banane), lactones, produits azotés ou soufrés ^[24].

III.2.6. Méthodes d'extraction ^[103, 104, 105]

Enfleurage et macération

Cette technique, la plus ancienne, très coûteuse et peu employée aujourd'hui. Elle est employée pour des fleurs sensibles, ne supportant pas un chauffage trop élevé, comme par exemple le jasmin, la violette et la rose. Les fleurs sont mises à macérer dans des graisses ou des huiles et chauffées (bain-marie ou soleil) et étalées sur des châssis en bois pendant plusieurs jours. Une fois gorgés de parfum, les corps gras sont filtrés au travers de tissus de lin ou de coton. Les huiles sont ensuite lavées à l'alcool pur, filtrées et évaporées.

Expression

C'est une technique simple où les écorces des agrumes sont pressées à froid pour extraire leurs huiles essentielles.

Par entraînement à la vapeur d'eau

- Hydrodistillation

Les extraits végétaux sont immergés dans de l'eau distillée, puis chauffés jusqu'à ébullition. L'huile essentielle s'évapore et se condense, ensuite elle est séparée par décantation. Cependant l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques.

Entrainement à la vapeur sèche

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats, le procédé de l'entraînement à la vapeur sèche a été mis au point.

La masse végétale repose sur une grille vers laquelle la vapeur sèche est pulsée. Les cellules se distendent et les particules d'huile se libèrent. Ces dernières sont alors vaporisées et condensées dans un serpentin réfrigéré. La récupération de l'huile essentielle est la même que dans le cas de l'hydrodistillation.

Extraction au CO₂ supercritique

Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique : le CO₂, sous pression et à température supérieures à 31°C, se trouve dans un état supercritique, la matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO₂ est introduit sous pression et réfrigéré. Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion. La pression y étant réduite, le CO₂ reprend sa forme gazeuse et est complètement éliminé. L'extrait végétal est isolé, les matières premières sont ainsi obtenues.

III.2.7. Influences des différents facteurs sur la production des huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles varie suivant diverses conditions : L'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites et les mauvaises herbes.

Ajouter à la complexité d'huiles volatiles^[106], les proportions des différents constituants d'une huile essentielle peuvent varier de façon importante tout au long du développement, aussi les chimiotypes ou races chimiques sont très fréquents chez les plantes aromatiques, exemple on compte pour le thym (*Thymus vulgaris* L.); sept chimiotypes différents^[106].

III.2.8. Utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont employées pour leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums^[107].

Elles ont des propriétés antiseptiques pour les poumons (Eucalyptus), dépuratives ou cicatrisantes (Lavande)^[108], activité analgésique (Origan, Thym)^[109].

Elles ont une activité antimicrobienne : les terpènes ont des effets contre les bactéries, les mycètes et virus : le Carvacrol possède une activité antibactérienne, activité antifongique contre les mycètes phytopathogène^[109], également l'huile essentielle de la Menthe pouliot dont le composé majoritaire est la R(+)-Pulégone (82%) est dotée d'un fort pouvoir antifongique contre *Penicillium* et *Mucor*^[110]

La capacité antioxydante de l'huile volatile est étroitement liée à tout le contenu phénol^[111]. Une étude réalisée par M. Jukić et coll.^[112] portant sur l'huile essentielle de (*Thymus vulgaris* L.) montrent que les chimiotypes phénoliques (Thymol et Carvacrol) et non phénoliques (Linalool) sont capables de réduire le radical 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl, avec un effet plus élevé enregistré pour les chimiotypes phénoliques. Ces observations sont expliquées par la concentration élevée de Thymol et Carvacrol dans ces derniers

III.3. Stéroïdes et stérols

III.3.1. Définition

Le terme stéroïde tire son origine du mot grec *Stéréos* signifiant solide et désignant toutes les molécules qui se caractérisent par la présence d'un cycle perhydro cyclo pentano phénanthrène^[113].

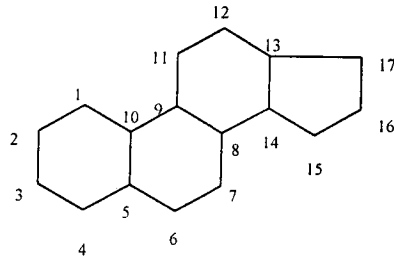
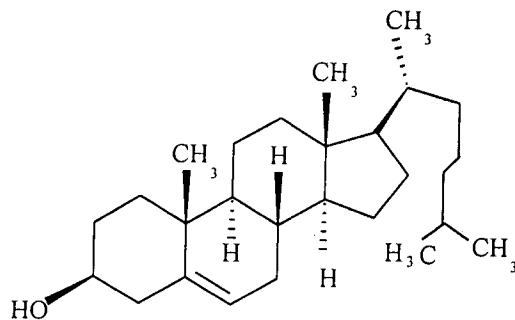


Figure 39 : Structure du squelette des stérols et des stéroïdes.

Les stéroïdes comportent, généralement, des méthyles en C₁₀ et C₁₃ et souvent une chaîne alkyle en C₁₇. Les stérols comportent un hydroxyle en position C₃^[113].

Les stérols sont les constituants des membranes de divers métabolites cellulaires, dont le plus caractéristique est le cholestérol isolé dans les calculs biliaires^[114].



Cholestérol

Figure 40 : Structure chimique du Cholestérol.

III.3.2. Propriétés générales

Les stéroïdes les plus importants se retrouvent dans les hormones, les acides biliaires et certaines vitamines.

Les hormones sont biosynthétisées à partir du cholestérol, leur structure n'a été élucidée que depuis une cinquantaine d'années en raison de leurs très faibles proportions dans l'organisme et elles sont de trois types :

- Les hormones sexuelles comme la testostérone, responsable du caractère secondaire mâle. Elles se retrouvent dans les urines sous forme d'androstérone.

- Les hormones sexuelles femelles comme l'œstradiol qui peut donner l'œstrone dont la présence dans les urines dénote la grossesse [100].
- Les hormones corticoïdes dont la plus connue est la cortisone, utilisée comme anti-inflammatoire. Des analogues artificiels fluorés en position 9 comme la dexaméthasone sont utilisés comme médicaments et se sont avérés plus actifs que la cortisone [100].

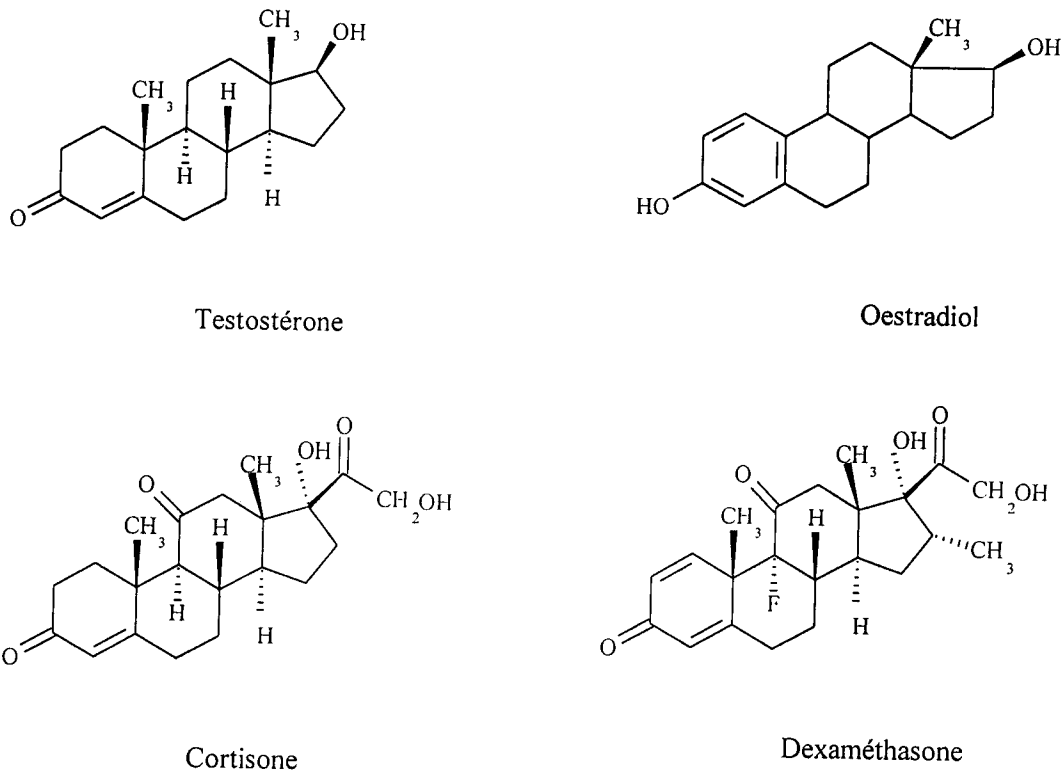


Figure 41 : Structures des hormones.

III.4. Saponosides

III.4.1. Définition

Les saponosides [24, 115] sont des métabolites secondaires hétérosidiques présents dans de nombreuses plantes et quelques organismes marins où ils auraient un rôle de défense contre des agents pathogènes extérieurs (champignons, bactéries, insectes). Ils sont composés d'une partie lipophile, la génine ou (aglycone) et d'une partie hydrophile osidique. Ces molécules sont connues depuis longtemps pour leur propriété tensio-active, leur pouvoir hémolytique ou encore leur toxicité vis-à-vis des animaux à sang froid (ichthyotoxicité).

Les plantes riches en saponosides tel que la Saponaire (*saponaria officinalis*) ou le Bois de Panama (*Quillaja saponaria*), ont été utilisées pendant de nombreuses années comme savon d'où le nom donné à cette classe de métabolites secondaires (saponosides du latin *sapo* (savon)).

III.4.2. Structure chimique des saponosides

Les saponosides sont classés en deux groupes chimiques suivant la nature de leur génines.

III.4.2.1. Génines stéroïdiques ^[116]

Les saponosides stéroïdiques sont pour la plupart présents chez les Angiospermes Monocotylédones (Liliaceae, Dioscoraceae) et rarement chez les Dicotylédones (Fabaceae, Ranunculaceae, etc.). Leur génine, dont plus d'une centaine est connue, est constituée d'un squelette à 27 atomes de carbones. Deux principaux types existent, hexacyclique (spirostane) ou pentacyclique (furostane).

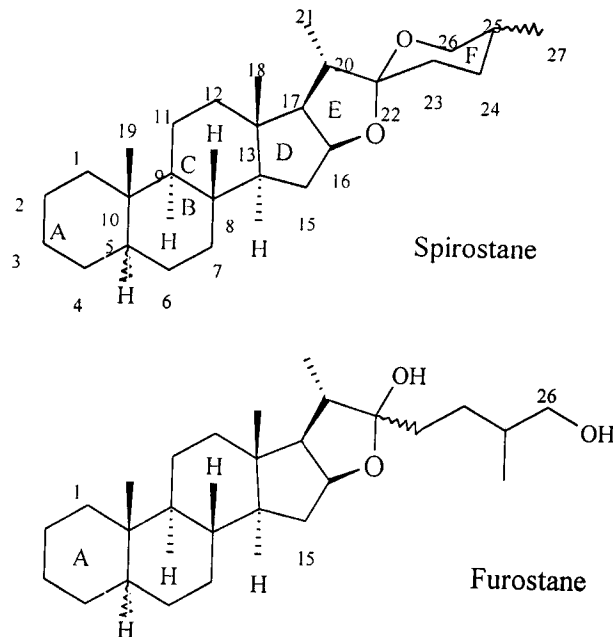


Figure 42 : Principaux squelettes stéroïdiques.

III.4.2.2. Génines triterpéniques ^[116]

Les saponosides triterpéniques, rencontrés principalement chez les Angiospermes Dicotylédones (saponaire, Marronnier d'Inde, Luzerne, Ginseng, etc.) et quelques organismes marins tels que les étoiles de mer, sont de loin les plus nombreux. Leurs génines à 30 atomes de carbone sont soit tétracycliques (dammarane, cucurbitane, lanostane), soit pentacyclique (oléanane, ursane, lupane, hopane).

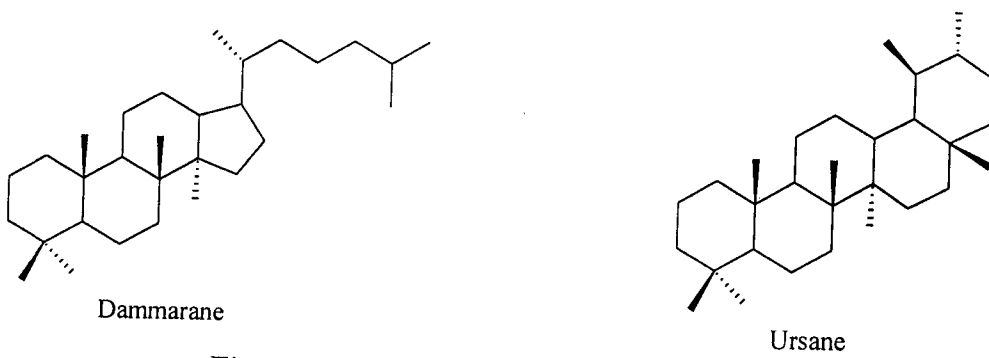


Figure 43 : Principaux squelettes triterpéniques.

Plus de la moitié des saponosides isolés appartiennent au type oléanane (β -amyrine) dont le squelette oléane-12-ène (acide oléanolique, hédéragénine) est le plus représenté.

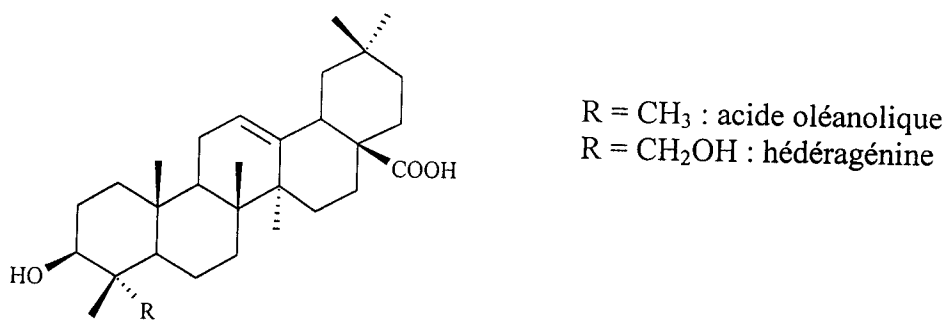


Figure 44 : Exemples de quelques saponosides du type oléanane.

III.4.3. Propriétés physico-chimiques

Ils possèdent un ensemble de propriétés physico-chimiques parmi lesquelles :

- Pouvoir aphrogène.
- Ils se présentent, le plus souvent, sous forme amorphe.
- Ils sont solubles dans l'eau, les alcools dilués. Ils agissent sur la lumière polarisée et leurs points de fusion sont toujours élevés, compris entre 200 et 300 °C [117].

III.4.4. Propriétés biologiques

De nombreuses plantes, utilisées en médecine traditionnelle se sont révélées riches en ces molécules : un extrait d'Hydrocotyle (*Centella asiatica*) par exemple est aujourd'hui commercialisé sous le nom de Madécassol® pour les propriétés cicatrisantes des saponosides qu'il renferme ; le Marron d'Inde est utilisé pour ses propriétés veinotoniques sous le nom de Veinotonyl® ; l'aescine est commercialisée sous les noms commerciaux de Reparil® ou Escinogel® pour ses propriétés anti-inflammatoire, anti-oedémateux et veinotonique et les ruscogénines du Petit Houx (Proctolog®) sont utilisées comme anti-hémorroïdaire [116].

Des saponosides produits par l'écorce du bois de Panama (*Quillaja saponaria*) ont été commercialisés et utilisés comme agents tensioactifs dans la fabrication des films photographiques, des shampoings, des détergents liquides, des dentifrices et des boissons (agents émulsifiants). Un saponoside, la glycyrrhizine, extrait de la réglisse (*Glycyrrhiza glabra* L.) a été utilisé dans des médicaments mais aussi comme édulcorant et arôme dans des aliments et des cigarettes [1].

Les effets des saponosides sur les animaux sont très variables. Bien qu'ils ne soient pas particulièrement toxiques pour les mammifères, les saponosides ont un goût amer et acre et provoquent, une fois ingérés, d'importantes irritations gastriques. S'ils sont injectés dans le circuit sanguin, ils provoquent l'hémolyse des globules rouges. C'est là sans doute une conséquence de leurs propriétés de détergents et de leur capacité générale à rompre les membranes [116].

III.5. Alcaloïdes

III.5.1. Définition

Les alcaloïdes sont des composés hétérocycliques comportant un ou plusieurs atomes d'azote et présents dans les plantes. Le mot alcaloïde vient d'alcali, car ce sont des bases organiques que nous rencontrons sous forme de sels d'acides naturels (acétique, oxalique, citrique, lactique...).

Malgré leur structure très souvent complexe, ils sont facilement disponibles et jouent un rôle important à cause de leur action physiologique marquée, toxique ou curative^[100].

Les alcaloïdes qui ne possèdent pas d'azote intracyclique, ont une structure simple, proche des amines, et sont appelés protoalcaloïdes. La majorité présente un azote inclus dans un hétérocycle : se sont les alcaloïdes vrais. Ils se localisent dans toutes les parties de la plante : les fleurs (coquelicot), les fruits (pavots ; morphine), les racines de la belladone, les grains du café (trigonelline), les écorces du quinquina (quinine), les feuilles de coca (tropacocaïne) et du tabac (nicotine) etc.

Les alcaloïdes sont biosynthésés à partir d'acides aminés (histidine, tryptophane, tyrosine, etc.) sauf le cas des pseudo-alcaloïdes ou les alcaloïdes terpéniques ont une origine strictement terpénique^[101].

III.5.2. Propriétés physico-chimiques :

Les alcaloïdes ont des masses moléculaires variant de 100 à 900 g/mol, rarement colorés. Ils sont insolubles ou très peu solubles dans l'eau, soluble dans les solvants organiques apolaires ou peu polaires et solubles dans les alcools de titre élevé. La basicité des alcaloïdes permet de former des sels avec des acides minéraux (chlorhydrates, sulfates, nitrates etc.) ou organiques (tartrates, maléates, etc.). Les sels d'alcaloïdes sont, généralement, solubles dans l'eau et les alcools dilués^[24]. Comme ils sont presque toujours optiquement actifs, ils servent aussi en chimie pour la résolution des acides racémiques, surtout la brucine et la quinine^[101].

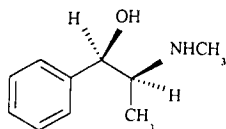
III.5.3. Classification^[24]

Plusieurs milliers d'alcaloïdes existent, et leur classification est difficile. Nous les regroupons selon l'hétérocycle principal qu'ils contiennent.

III.5.3.1. Proto-alcaloïdes

Les alcaloïdes qui ne possèdent pas d'azote intracyclique, ont une structure simple, proche des amines, et sont appelés proto-alcaloïdes.

Exemple :



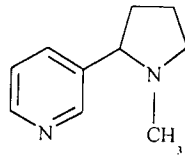
(-)- Ephédrine

Figure 45 : Structure chimique de l'éphédrine.

III.5.3.2. Alcaloïdes vrais

Ils existent à l'état de sels et sont biosynthétiquement formés à partir des acides aminés.

Exemple :



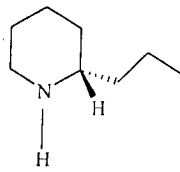
Nicotine

Figure 46 : Structure chimique de la nicotine.

III.5.3.3. Pseudo-alcaloïdes

Il s'agit de la majorité des alcaloïdes terpéniques. Ils présentent, le plus souvent, toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés.

Exemple :



(+)-Coniine

Figure 47 : Structure de la coniine.

III.5.4. Action pharmacologique et emplois ^[24, 100]

Les alcaloïdes sont des substances organiques complexes ayant une forte activité pharmaceutique qui se manifeste dans plusieurs domaines, nous pouvons citer :

- la sérotonine qui est présente dans le cerveau et joue un rôle considérable pour l'équilibre mental de l'homme.
- L'acide lysergique dont le diéthylamide est une drogue connue sous le nom de LSD. Sa consommation produit un état schizophrénique, qui serait du à la diminution du taux de sérotonine dans le cerveau.
- La réserpine qui est connu comme tranquillisant puissant utilisée dans le traitement de l'hypertension et dont la synthèse totale a été effectuée en 1956 par R. B. Woodward.

Nous notons aussi l'existence d'antitumoraux (vinblastine, ellipticine, etc.), d'antipaludiques (quinines, etc.). Au niveau du système nerveux central, ils peuvent être soit dépresseurs (morphine, scopolamine, etc.) ou stimulants (strychnine, caféine, etc.).

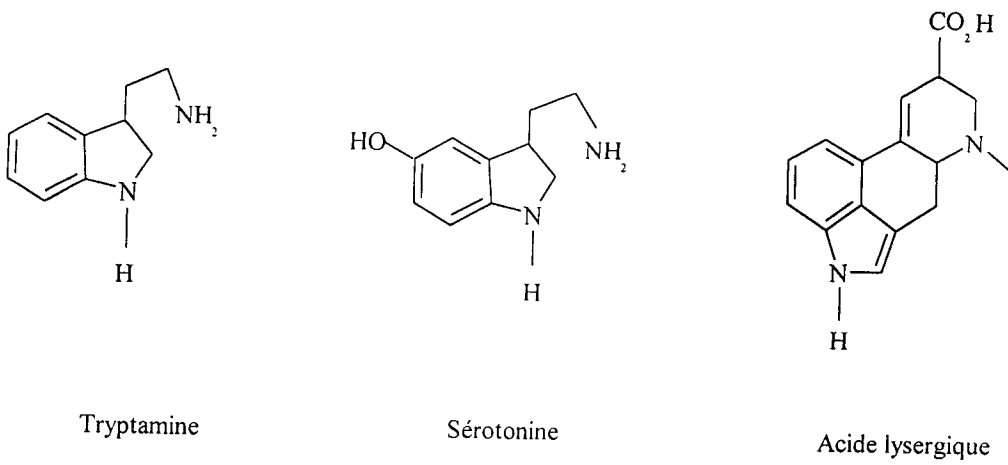


Figure 48 : Structures chimiques de quelques alcaloïdes.

IV. Conclusion

Nous avons tenté par cette recherche bibliographique de classer et souligner l'importance des constituants métaboliques des plantes médicinales. Ces derniers sont divisés en deux catégories :

- Les métabolites primaires, constituants indispensables à la croissance et à la reproduction des plantes (glucides, lipides, etc.).
- Les métabolites secondaires sécrétés par les plantes (alcaloïdes, huiles essentielles, polyphénols, etc.), qui ne se rencontrent pas chez toutes les plantes et leurs proportions sont variables selon la famille, l'espèce et le genre.

Ces phytoconstituants ont une grande importance non seulement pour la plante, mais aussi pour l'environnement. Leurs applications dans divers domaines sont riches et variées.

Bibliographie

- [1] W.G. Hopkins, C.M. Evrard, Physiologie végétale, Edition De Boeck Université, **2003**, p. 267-268-273-274.
- [2] D.K. Salunkhe, Dietary tannins: consequences and remedies, Boca Raton, Florida: CRC Press, **1990**.
- [3] P. Ozenda, Les végétaux, organisation et diversité biologique, Edition Dunod, Paris, **2005**, p. 156.
- [4] J.G. Fouché, A. Marquet, A. Hambuckers, Les plantes médicinales de la plante au médicament, Observatoire du Monde des Plantes, Exposition temporaire du **19.09.2000** au **30.06.2000**.
- [5] D. Voet, G. Rousseau, Biochimie, 2^{ème} Edition, De Boeck Université, **2005**, p. 280-356-362-363-364-383.
- [6] B. Charpentier, F.H. Lorleach, A. Harlay, L. Ridoux, Guide du préparateur en pharmacie, Collectif, Edition Elsevier Masson, **2008**, p 169-171-172-205-207.
- [7] G. Peyrefitte, Esthétique Cosmétique CAP, BP/Bac Pro, Edition Elsevier Masson, **2008**, p.14-15.
- [8] C. Moussard, Biochimie structurale et métabolique, 3^{ème} édition, De Boeck Université, **2006**, p. 74-76-78-147-148-280.
- [9] G. Pocock, C.D. Rhichards, J.F. Brun, Physiologie humaine, les fondements de la médecine, Edition Elsevier Masson, **2004**, p.11.
- [10] P. Arnaud, Chimie organique, 17^{ème} Edition, Dunod, Paris, **2004**, p. 542-551-555-562-564-601.
- [11] C. Rémésy, Sucres simples purifiés versus sucres des fruits, ont-ils les mêmes effets métaboliques?, *Phytothérapie*, **2008**, 6, 91-95.
- [12] R. Veberic, J. jakopic, F. Stampar, V. Schmitzer, European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols, *Food chem.*, **2009**, 114, 511-515.
- [13] P. Goetz, C. Busser, La phytocosmétologie thérapeutique, Edition Springer, **2007**, p. 241.
- [14] A.C. Benchelah, M. Maka, les dattes, de la préhistoire à nos jours, *Phytothérapie*, **2006**, 1, 43-47.
- [15] J. Hénin, Chimie organique: PCEM - Pharmacie - DEUG B, Edition Estem, **1996**, p22.
- [16] H. Galons, Chimie organique, Edition Elsevier Masson, **2007**, p. 226.
- [17] E.N. Marieb, R. Lachaîne, Biologie humaine: Anatomie et physiologie, Edition De Boeck Université, **2000**, p. 40.
- [18] A.W. Johnson, Invitation à la chimie organique, Edition De Boeck Université, **2002**, p. 150-151-153.
- [19] G. Debry, Glucides à saveur sucrée, édulcorants et santé, Edition John Libbey Eurotext, **1996**, p. 183-184.
- [20] P.H. Raven, R. F. Evert, S. E. Eichhom, J. Bouharmont, Biologie végétale, Edition De Boeck Université, **2003**, p. 20.
- [21] D.L. Costill, J. H. Wilmore, Physiologie du sport et de l'exercice: Adaptations physiologiques à l'exercice physique, 4^{ème} Edition, De Boeck Université, **2006**, p. 343.
- [22] N.A. Campbell, J. B. Reece, R. Mathieu, Biologie, 2^{ème} Edition, De Boeck Université, **2006**, p. 70.

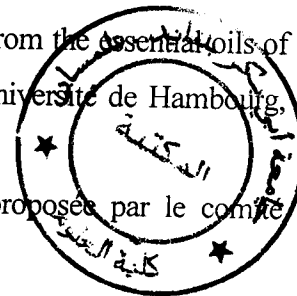
- [23] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, Chimie organique, Edition De Boeck Université, **2003**, p. 1368-1372.
- [24] J. Bruneton, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 2ème Edition, Tec & Doc., Lavoisier, Paris, 1993, p.111-232-295-274-301-304-315-319-406-409-410-413-538-626-641.
- [25] P. Delamarche, M. Dufour, F. Multon, L. Perlemuter, F. Dufour, C. Bilweis, Anatomie, physiologie, biomécanique en STAPS, Edition Elsevier Masson, **2002**, p 112.
- [26] B. Boullard, Plantes & champignons: dictionnaire, 2^{ème} Edition, Estem, **1997**, p. 473.
- [27] J. Médart, « Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative », Edition De Boeck université, **2005**, p. 55.
- [28] H. Dupin, Alimentation et nutrition humaines, Esf Editeur, **1992**, p. 147.
- [29] H. R. Garrett, C. M. Grisham, B. Lubochinsky, Biochimie, Edition De Boeck Université, **2000**, p.241-242-249.
- [30] J.H. Weil, Biochimie générale, 9^{ème} Edition, Dunod, **2001**, p.265-272-274.
- [31] J.P. Borel, Biochimie dynamique, 2^{ème} Edition, De Boeck Université, **1997**, p.138.
- [32] A. Le Hir, Y. Cohen, Pharmacie galénique : bonnes pratiques de fabrication des médicaments, 8^{ème} Edition, Elsevier Masson, **2001**, p. 56.
- [33] P. M. Kris-Etherton, K.D. Hecker, A. Bonamone, Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *Am. J. Med.*, **2002**, 113, 71S-88S.
- [34] P. Ribéreau-Gayon, Les composés phénoliques des végétaux, Edition Dunod, Paris, **1968**.
- [35] G. Alibert, R. Ranjeva, M.A. Boudet, Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques, *Phys. Veg.*, **1977**, 15, 279-301.
- [36] J.P. Nitsch, Synergistes naturels des auxines et des giberellines, *Bull. Soc. Fr.*, **1961**, 26, 2237-2240.
- [37] G.E. Dubois, G.A Grosby, P. Saffron, Non nutritive Sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones, *Science*, **1977**, 195, 397-399.
- [38] A.Fleuriet, J.J. Macheix, Effet des blessures sur les composés phénoliques des fruits de tomates « cerises » (*Lycopersicon esculentum var cerasiforme*), *Phys. Veg.*, **1977**, 15, 239-250.
- [39] S.B. Rees, J.B. Harborne, The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant, *Phytochem.*, **1985**, 24, 2225-2231.
- [40] R. Brouillard, P. Figueiredo, M. Elhabiri, O. Dangles, Molecular interactions of phenolic compounds in relation to the colour of fruits and vegetables, In: Phytochemistry of fruit and vegetables Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Oxford, UK: Clarendon Press, **1997**, p. 30-49.
- [41] T. Hennebelle, S. Sahnaz, F. Bailleul, Polyphénols végétaux : Sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif, *Phytothérapie*, **2004**, Numéro 1: 3-6.

- [42] A. Villar, M.A Gasco, M. J. Alcaraz, Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1987**, 39 (7), 502-507.
- [43] S.A. Jassim, M.A. Naji, Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective, *Appl. Microbiol.*, **2003**, 95 (3), 412-427.
- [44] D. U. Jiang, He. Zhen-Dane, Ren-Wang Jiang, Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L., *Phytochem.*, **2003**, 62 (8), 1235-1238.
- [45] M. Sokmen, M. Angelova, E. Krumova, In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L., *Life Sci.*, **2005**, 76 (25), 2981-2993.
- [46] T. Taguri, T. Tanaka, I. Kouno, Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease., *Biol. Pharm. Bull.*, **2004**, 27 (12), 1965-1969.
- [47] T. Takahashi, R. Kokubo, M. Sakaino, Antimicrobial activities of *Eucalyptus* leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*, *Lett. Appl. Microbiol.*, **2004**, 39 (1), 60-64.
- [48] J.L.S. Gonçalves, S. G. Leitão, F. Delle Monache, In vitro antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1, *Phytomedicine*, **2001**, 8 (6), 477-480.
- [49] J. Serkedjieva, S. Ivancheva, Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L., *J. Ethnopharmacol.*, **1998**, 64 (1), 59-68.
- [50] P.S. Chaudhry, J. Cabrera, H.R. Juliani, Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin, *Biochem. Pharmacol.*, **1983**, 32 (13), 1995-1998.
- [51] M. Fernández, J. Caballero, A. Morales Helguera, Quantitative structure-activity relationship to predict differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds, *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13 (9), 3269-3277.
- [52] N. Nakai, Y. Fujii, K. Kobashi, et al., Aldose reductase inhibitors: flavonoids, alkaloids, acetophenones, benzophenones, and spirohydantoin of chroman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1985**, 239(2), 491-496.
- [53] M. Shimizu, T. Ito, S. Terashima, et al., Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids, *Phytochem.*, **1984**, 23 (9), 1885-1888.
- [54] D. Varma, J.H. Kinoshita, Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids: their possible role in the prevention of diabetic cataracts, *Biochem. Pharmacol.*, **1976**, 25 (22), 2505-2513.
- [55] B. Gil, M.J. Sanz, M.C. Ferrándiz, et al., Accelerated communication: Effects of flavonoids on *Naja Naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice, *Life Sci.*, **1994**, 54 (20), PL333-PL338.

- [56] M. J. Laughton, P. J. Evans, M. A. Moroney, Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability, *Biochem. Pharmacol.*, **1991**, 42 (9), 1673-1681.
- [57] M.R. Rodriguez, A.T. Cano, M.C. Pinto, Lipoxygenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure-activity relation, *J. Mol. Struct., THEOCHEM*, **2004**, 674 (1-3), 121-124.
- [58] S.C. Yeon, G.J. Hyon, H.S. Kun, Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases, *Biochem. Pharmacol.*, **2001**, 62 (9), 1185-1191.
- [59] I.C.W. Arts, P.C.H. Hollman, E.J.M. Feskens, Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2001**, 74 (2), 227-232.
- [60] R.H. Liu, Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2003**, 78 (3), 517S-20S.
- [61] S.Y. Chung, J. M. Landau, Effects of tea consumption on nutrition and health, *J. Nutr.*, **2000**, 130, 2409-2412.
- [62] Y. Kao, R. A. Hiipakka, S. Liao, Modulation of obesity by a green tea catechin, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2000**, 72 (5), 1232-1233.
- [63] F. Garabeth, D. Bouaoun, G. Elyafi-Elzahri, Etude quantitative des coumarines d'une plante sauvage : *Prangos asperula* Boissier, *Phytothérapie*, **2007**, 5, 259-263.
- [64] M. Jang, C. Ling, G. Udeani, et al., Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derivative from grape, *Science*, **1997**, 275, 218-220.
- [65] F.V. DeFeudis, V. Papadopoulos, K. Drieu, *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **2003**, 17, 405-417.
- [66] J.D. Lambert, C. S. Yang, Cancer chemoprevention activity and bioavailability of tea and tea polyphénols, *Mutation Res.*, **2003**, 523-524, 201-208.
- [67] K.L. Tuck, P. J. Hayball, Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects, *J. Nutr. Biochem.*, **2002**, 13, 636-644.
- [68] M.J. Del Bano, J. Lorente, J. Castillo, et al., Phenolic diterpenes, flavones and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems and roots of *Rosmarinus officinalis*, Antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 4247-4253.
- [69] R.J. Nijveldt, E. van Nood, D. E. C. van Hoorn, Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2001**, 74 (4), 418-25.
- [70] C.A. Rice-Evans, N. J. Miller, Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food, *Biochem. Soc. Trans.*, **1996**, 24, 790-795.

- [71] J.M. Kong, L.S. Chia, N.K. Goh, et al., Analysis and biological activities of anthocyanidins, *Phytochem.*, **2003**, 64, 923-933.
- [72] I. Erlund, Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringénine, Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology, *Nutr. Res.*, **2004**, 24, 851-874.
- [73] B.H. Havsteen, The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol. Therap.*, **2002**, 96, 67-202.
- [74] G. Di Carlo, N. Mascolo, A.A. Izzo, et al., Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sci.*, **1999**, 65 (4), 337-353.
- [75] D.F. Birt, S. Hendrich, W. Weiqun, Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoïdes, *Pharmacol. Therap.*, **2001**, 90, 157-177.
- [76] K.R. Markham, Techniques of Flavonoid Identification, Academic Press, London, **1982**, p. 36-51.
- [77] J.B. Harborne, Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, New York, **1967**, p. 1-30.
- [78] P. Delaveau, Histoire et renouveau des plantes médicinales, Ed. Albin Michel, Paris, **1982**, p. 618.
- [79] P. Duquénois, Coumarines et dérivés : répartition dans le règne végétal et biosynthèse, *Pharm. weekblad*, **1967**, p. 102-443-454.
- [80] P. Baud, Traité de chimie industrielle (industrie organique), Tome 3, Ed. Masson et Cie, **1951**.
- [81] T. Swain, Tannins and lignins herbivores: their interaction with secondary plant metabolites, Ed. G.A Rosenthal, D. H. Janzen, New York: academic Press, **1979**, p. 637-682.
- [82] P.P. Feeny, Seasonal change in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars, *Ecology*, **1974**, 51(4), 565-581.
- [83] S.A. Brown, Lignin and tannin biosynthesis: Biochemistry of phenolic compounds, Ed. J. B. Harborne, London and New York: Academic Press, **1964**, p. 361-398.
- [84] E.A. Bernays, G. Cooper-Driver, M. Bilgener, Herbivores and plant tannins, *Adv. Ecol. Res.*, **1989**, 19, 263-302.
- [85] G.C. Waghorn, W.C. Mc Nabb, consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants, *Proc. Nutr. Soc.*, **2003**, 62, 383-392
- [86] L. Bravo, Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutr. Rev.*, **1998**, 56(11), 317-333.
- [87] W.T. Jones, R. B. Broadhurst, J. W. Lyttleton, The condensed tannins of Pasture legume species. *Phytochem.*, **1976**, 15, 1407-1409.
- [88] J. Souquet, V. Cheynier, F. Brossaud, M. Moutounet, Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochem.*, **1996**, 43, 509 -512.
- [89] S. Guyot, N. Marnet, J. F. Drilleu, Thiolytic-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 14-20.

- [90] S. Ndiaye, E. Bassene, D. Olschwang, J. L. Pousset, Fruit d'*Acacia nilotica* comme source de tannin et d'acide gallique, *Al Biruniya Rev. Mar. Pharm.*, **1994**, tome 10, n° 2, p. 117.
- [91] N.M. Ngom, Essai clinique randomisé d'*Acacia niloticaversus* fluconazole dans le traitement de la candidose bucco œsophagienne chez les personnes vivantes avec le VIH/SIDA à Dakar, *Thèse de Pharmacologie*, **2000**, n° 19.
- [92] P. Jeandet, R. Bessis, B. F. Maume, P. Meunier, D. Peyron, P. Trollat., Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine, *J. Agric. Food Chem.*, **1995a**, 43, 316-319.
- [93] P. Jeandet, M. Sbaghi, R. Bessis, P. Meunier, The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to anthocyanin content in grape berry skins, *Vitis*, **1995b**, 34 (2), 91- 94.
- [94] M. Adrian, P. Jeandet, R. Bessis, J.M. Joubert, Induction of Phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl₃), *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, 1979-1981.
- [95] L. Bavaresco, S. Pezzutto, A. Ragga, F. Ferrari, M. Trevisan, Effect of nitrogen supply on trans-resveratrol concentration in berries of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon, *Vitis*, **2001**, 40, 229-230.
- [96] R. Bessis, P. Jeandet, M. Adrian, A. C. Breuil, S. Debord, resvératrol, défenses naturelles de la vigne et image santé du vin, *Revue des Oenologues*, **1997**, 85, 5-8.
- [97] F. Orallo, E. Álvarez, M. Camiña, et al., The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption, *Mol. Pharmacol.*, **2002**, 61 (2), 294-302.
- [98] J. Gusman, H. Malonne, G. Atassi, A reappraisal of the potential chemoprotective and chemotherapeutic properties of resvératrol, *Carcinogenesis*, **2001**, 22 (8), 1111-7.
- [99] A.Y. Sun, A. Simony, Y. Sun Grace, The French paradox and beyond: Neuroprotective effects of polyphénols, *Free Radic. Biol. Med.*, **2002**, 32 (4), 314-8.
- [100] S. Rahal, Chimie des produits naturels et des êtres vivants, O. P. U., **2004**, p. 13-42-43-63-66.
- [101] J.L. Guignard, Biochimie végétale, Ed. Masson, Paris, **2000**, p.166-201-215-230.
- [102] P. Belaïche, Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, Tome I, Edition Maloine S.A. Paris, **1979**, p.137-147.
- [103] A.M. Adio, Isolation and structure elucidation of sesquiterpenoides from the essential oils of some liverworts (Hepaticae), Thèse à l'institut de la chimie organique, Université de Hambourg, **2005**, p. 280.
- [104] Parfum-L'expo, Le monde magique du parfum, Une exposition proposée par le comité Français du Parfum, Fondation Claude Verdan, **2002**.



- [105] E.M.B.D. Sousa, O. Chiavone-Filho, M.T. Moreno, D.N. Silva, M.O.M. Marques, M.A.A. Meireles, Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides* Cham., Using pressurized carbon dioxide, *Brazil. J. Chem. Engineering*, **2002**, 19(02), 229-241.
- [106] K.P. Svoboda, J.B. Hampson, Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities, Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK, KA6 5HW, **1999**.
- [107] B. Smallfield, Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes, *Crop Food Res.*, **2001**, 45, 4.
- [108] J. Caillard, Les plantes, des usines chimiques en miniature, Dossier de ressources documentaires, CRDP., Midi-Pyrénées, **2003**, p.6.
- [109] B. Schwämmle, E. Winkelhausen, S. Kuzmanova, W. Steiner, Isolation of Carvacrol assimilating microorganisms, *Biotechno.*, **2001**, 39(4), 341-345.
- [110] L. Belghazi, N. Lahlou, M. Alaoui Ismaili, T. Abousaouiria, N. Habti, A. Tantaoui Iraki, M. Talbi, M. Blaghen, K. Fellat- Zarrouck, Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la Menthe pouliot, Test antifongique, Congrès de Biochimie, Casablanca, Biochimie et santé, **2002**, 38-40.
- [111] E. Stefanouits-Bányai, M.H. Tulok, A. Hegedü, C. Renner, I.S. Varga, Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones, *Acta Biologica. Szegediensis*, **2003**, 47 (1-4), 111-113.
- [112] M. Jukić, M. Miloš, Catalytic oxidation and antioxydant properties of Thyme essential oils (*Thymus Vulgarae* L.), *Croatica Chemica. Acta*, **2005**, 78(1), 105-110.
- [113] A. Lehinger, Principes de Biochimie, Ed. Flammarion, **1989**, p. 315.
- [114] J. Mann, R.S. Davidson, J.B. Hobbs, D.V. Banthrope, J.B. Harborne, Natural products: Their chemistry and biological significance, 1^{er} edition, Longman, England, **1994**, p.331-343.
- [115] K. Hostettmann, A. Marston, Saponins: Chemistry and pharmacology of natural products, Cambridge: University Press, **1995**.
- [116] M. Chwalek, Hémisynthèse de saponosides à hédéragénine, étude de l'influence de la chaîne osidique sur l'activité hémolytique, Thèse de Doctorat, spécialité: Chimie Organique des Substances Naturelles, Université de Reims, France, **2004**, p. 10.
- [117] S.B. Mahato, A.K. Nandy, G. Roy, Triterpenoids, *Phytochem.*, **1992**, 32, 2199.

Chapitre IV



Extraction & Méthodes d'Analyse

I. Introduction

Les diversités structurales et fonctionnelles des métabolites primaires et secondaires soulignées dans le chapitre précédent, montrent que pour les isoler à l'état pur nous devons faire un choix judicieux du protocole d'extraction.

Leur isolation est suivie d'une opération de purification. Pour ce faire, nous employons différentes méthodes chromatographiques. La caractérisation spectrale des fractions purifiées est ensuite réalisée par RMN ^1H et ^{13}C , IRTF, CLHP, CPG/SM etc.

Avant d'aborder nos travaux sur la racine de la *Rhaponticum acaule* L., il nous a paru nécessaire de donner brièvement un aperçu sur les méthodes d'extraction des principes actifs, leur purification ainsi que les méthodes d'analyse utilisées pour leur caractérisation.

II. Méthodes d'extraction

II.1. Extraction liquide-liquide

Le principe de cette extraction est fondé sur la distribution d'un soluté donné entre deux solvants en fonction de sa solubilité dans chacun d'entre eux ^[1]. Elle consiste à faire passer une substance d'un solvant, dont elle est difficile à séparer, à un autre, dont elle sera facilement isolable. Cette opération, réalisée habituellement par agitation, est possible à condition que les deux solvants soient très peu ou pas miscibles entre eux ^[2].

Coefficient de partage : K

A l'équilibre, le rapport des concentrations de la substance S dans les deux phases est donné par l'équation suivante :

$$K = C_B / C_A$$

C_B : concentration de S dans la phase organique

C_A : concentration de S dans la phase aqueuse

K est une constante ^[1] à une température donnée, dans le cas d'absence des interactions solvant-soluté et quant les solvants sont parfaitement non miscibles.

II.2. Extraction d'une phase solide par un liquide

Lorsqu'une phase solide initiale, contenant plusieurs espèces chimiques, est mise en présence d'un solvant judicieusement choisi, il est possible de réaliser une dissolution sélective d'un certain nombre de principes. En utilisant successivement des liquides dont le pouvoir solvant *vis-à-vis* des constituants de la phase solide est différent, nous réalisons une dissolution fractionnée ^[1].

II.2.1. Méthode continue

Au cours de cette méthode, il est avant tout nécessaire de réduire le prélèvement en fines particules, afin de favoriser l'action du solvant qui est logiquement fonction de la surface de contact. Nous pouvons réaliser des opérations successives d'extractions suivies de filtration ou de centrifugation. Mais le plus souvent nous opérons en continu. La phase solide est placée dans une cartouche en matière poreuse et traitée d'une manière continue. L'extracteur de Soxhlet et celui de Kumagawa sont des appareils spécialement conçus pour ce type d'extraction. ^[1]

Extracteur de soxhlet

L'appareillage comporte un ballon dans lequel le solvant est chauffé et vaporisé, un réfrigérant qui condense les vapeurs, et un extracteur à l'intérieur duquel est introduit une cartouche poreuse de produit à extraire et où retombe le liquide condensé dans le réfrigérant. Un siphon permet de vider périodiquement l'extracteur de la solution obtenue. La solution retombe alors dans le ballon où se concentrent les extraits ^[1].

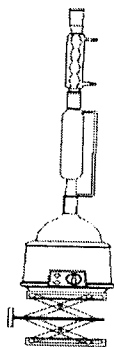


Figure 49 : Extracteur de soxhlet.

II.2.2. Méthode discontinue :

La macération est un procédé discontinu qui consiste à laisser tremper le solide dans un solvant à température ambiante, chaud ou à l'ébullition, pour en extraire les constituants solubles. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide, surtout avec les solvants à l'ébullition, mais le processus d'extraction n'est pas toujours très efficace. La quantité de solvant nécessaire est environ dix à vingt fois la masse d'échantillon traité ^[2].

II.3. Micro Extraction en Phase Solide

II.3.1. Introduction

Actuellement, l'extraction des composés organiques volatils d'un échantillon emploie des méthodes performantes. Toute fois, ces dernières présentent un certain nombre d'inconvénients parmi lesquels nous citons les coûts élevés et les durées longues de préparation.

Pour surmonter ces inconvénients, la micro extraction en phase solide (MEPS) constitue une méthode de choix. C'est une technique d'extraction et de préconcentration des composés volatils. Elle ne nécessite pas de solvant et où la préparation de l'échantillon est très souvent limitée à son prélèvement.

La MEPS, technique datant du début des années 1990, et développée par Janusz Pawliszyn, de l'Université de Waterloo, en Ontario, repose sur la partition des composés d'intérêt entre la matrice de l'échantillon et une phase polymérique spécifique supportée par une fibre en silice.

Cette technique est de plus en plus populaire dans les laboratoires, et trouve application dans tous les champs et domaines de la chimie analytique. Ses principales caractéristiques et ses nombreux avantages résident en son coût peu élevé, sa rapidité d'analyse (un échantillon prend généralement entre une demi-heure et une heure et demi), sa reproductibilité et sa fiabilité. En effet l'échantillon à analyser n'est pas détruit et il ne nécessite que de très faibles volumes d'échantillonnage, comparativement à d'autres techniques d'extraction plus anciennes. Namiesnik J. et coll. ^[3] considère la MEPS comme une combinaison de méthodes d'extractions passive et dynamique ^[3]. En outre c'est une méthode qui ne nécessite pas de solvant, donc très intéressante d'un point de vue environnemental.

II.3.2. Principe

Les composés sont extraits par adsorption sur une fibre de silice fondue revêtue d'un polymère. La fibre est, soit introduite directement dans l'échantillon, nous parlons de MEPS par immersion directe (DI-SPME : Direct Immersion- Solid Phase Micro Extraction), soit exposée dans l'espace de tête (HS-SPME : Headspace-Solid Phase Micro Extraction) ; qui correspond à la partie supérieure gazeuse au-dessus d'un échantillon solide ou liquide dans une fiole ou *vial* d'analyse.

Les travaux Pawliszyn J. et coll. ^[4] montrent que la méthode DI-MEPS est plus sensible que la HS-MEPS. Cependant, cette dernière est plus fréquemment utilisée car elle permet, d'une part, de protéger la fibre et son revêtement de l'interférence avec des molécules non volatiles et d'autres part, de modifier les conditions de pH sans endommager la fibre.

II.3.3. L'extraction des molécules dans le milieu gazeux

Le schéma simplifié du protocole opératoire est indiqué à la figure 50. Il s'agit de faire rentrer la fibre recouverte du polymère adéquat dans la fiole d'analyse et d'y réaliser l'extraction selon le temps désiré. Les types de polymères employés sont les suivants: Carboxen (CAR), Divinylbenzène (DVB), Polydiméthylsiloxane (PDMS), Carbowax (CW), Polyacrylate (PA).

La première étape d'extraction en MEPS consiste à réaliser l'équilibre de concentration des molécules entre une phase solide et une phase gazeuse ou liquide. La phase solide est un film polymère d'une épaisseur variant entre 7 et 100 μm enrobant une fibre de silice fondue totalement

neutre par rapport aux analytes et au polymère associé. L'ensemble est protégé dans une aiguille creuse amovible, qui a comme fonction de percer le septum en caoutchouc du flacon contenant l'échantillon à analyser. La fibre est alors déployée manuellement ou de façon automatique hors de l'aiguille et est plongée soit directement dans l'échantillon s'il est à l'état liquide ou gazeux, soit au-dessus de l'échantillon (headspace, ou espace de tête) à l'état liquide ou solide. Les molécules volatiles se concentrent alors dans la phase solide polymère.

La seconde étape consiste en une désorption thermique des solutés adsorbés dans l'injecteur chauffé à plus de 250 °C de l'appareil à chromatographie gazeuse (CPG), impliquant une volatilisation instantanée de toutes les molécules du fait des hautes températures. Une fois dans l'injecteur, la fibre est à nouveau déployée hors de l'aiguille creuse protectrice et les solutés sont alors rapidement désorbés et transférés vers la colonne capillaire de chromatographie gazeuse pour y être analysés [5]. Les spectres obtenus pour chaque molécule en spectrométrie de masse et comparés à des banques de données (Adams, NIST, etc.) ou avec des étalons externes permettent ensuite d'identifier avec certitude les composés extraits. L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse (couplée ou non à la spectrométrie de masse) est particulièrement appropriée pour ce type d'analyses [6-7]. Dans la plupart des cas, après la désorption dans l'injecteur de la CPG qui a duré de quelques secondes à plusieurs minutes, la fibre de la MEPS est libre et débarrassée de tout analyte, et elle peut être réemployée quasiment immédiatement pour d'autres analyses [8]. Cette propriété de réutilisation constitue un avantage indéniable du point de vue matériel et économique.

La théorie liée à l'extraction de molécules sur les fibres de MEPS est en fait extrêmement complexe et fait intervenir de nombreux paramètres. La connaissance de ces différents facteurs est importante pour qui souhaite comprendre les interactions entre les analytes, le milieu d'échantillonnage et la fibre de MEPS. Différentes publications discutent des propriétés physico-chimiques du revêtement des fibres et détaillent la technique de la MEPS [5-9-10].

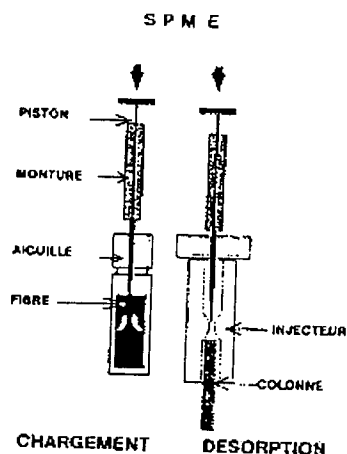


Figure 50 : Processus d'extraction MEPS.

II.3.4. Différents types de fibres employées pour différents analytes

La littérature fait état de bon nombre d'études relatives à l'extraction et l'identification de molécules par la MEPS en chimie analytique, études environnementales [11-14] et agroalimentaire [5, 15]. Chaque fibre, par la nature polaire ou non polaire et la taille du polymère, est spécifique à l'extraction de certaines familles de composés. Ainsi la fibre PDMS présente un revêtement de type phase liquide qui fonctionne bien comme absorbant. La diffusion rapide des composés volatils se fait bien dans un revêtement liquide mais les petits analytes ne sont pas correctement retenus. Par contre, la fibre CAR/PDMS agit à la fois comme adsorbant (CAR) et comme absorbant (PDMS). Les pores dans les billes de polymères du carboxen créent une surface où les composés volatils sont physiquement retenus, résultant en une meilleure rétention des plus petites molécules [16], comme indiqué sur la figure 51 (schéma de droite). Le carboxen qui est un adsorbant carboné joue ici le rôle de tamis moléculaire pour capter les composés organiques de petite taille [17].

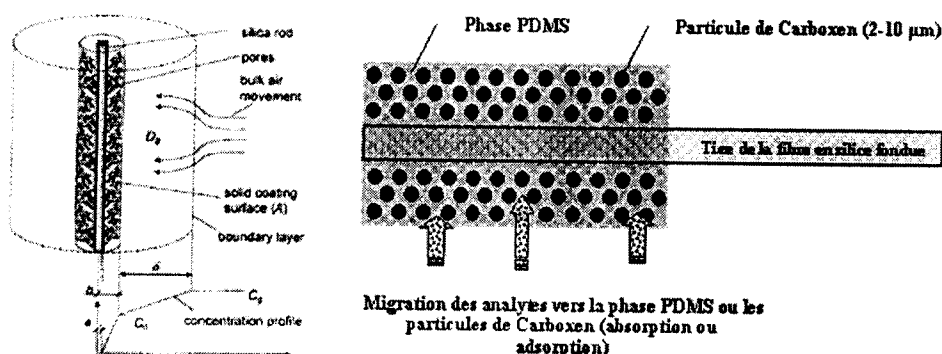


Figure 51 : Principe de l'adsorption des analytes avec une fibre solide (et poreuse) de MEPS (gauche [18]), et coupe transversale d'une fibre CAR/PDMS 75 µm (droite).

La figure 52 présente deux types de captage des composés sur des fibres de MEPS: la PDMS pour l'absorption, la CAR/PDMS et la DVB/CAR pour l'adsorption. Dans cette figure, chaque boîte représente une coupe de fibre de MEPS. Les deux boîtes du haut représentent une fibre d'absorption; en haut à gauche les molécules se déplacent vers la fibre, et en haut à droite elles sont en équilibre avec la fibre. Les deux boîtes du bas représentent une fibre d'adsorption. En bas à gauche les molécules se déplacent vers la fibre, et en bas à droite elles sont en équilibre. D'après Penton Z. [19], nous s'attendrons à ce que l'intervalle linéaire d'extraction soit limité pour les fibres d'adsorption.

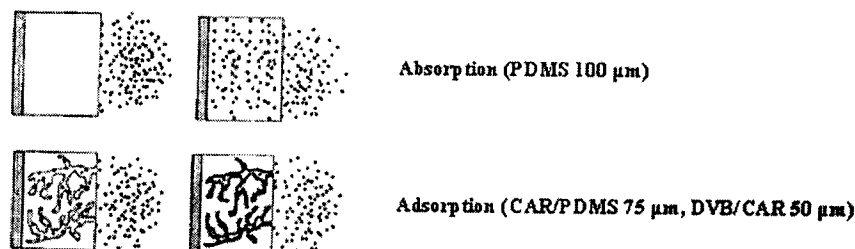


Figure 52 : Comparaison adsorption/absorption sur fibres de SPME [19].

La fibre Polyacrylate 85 μm semble particulièrement adaptée pour les acides gras à courte chaîne, c'est-à-dire moins de 12 atomes de carbone, ^[15,20] mais aussi pour les acides gras à plus longue chaîne tels que l'acide palmitique, oléique et linoléique en phase liquide ^[21]. Nous donnons ici quelques exemples d'utilisations des différentes fibres selon le type de composés privilégié pour l'analyse :

- La CAR/PDMS 75 μm est utilisée pour l'analyse de la qualité des eaux de rivières ^[13] et des acides gras à courte chaîne dans les eaux usées ^[12], des petites molécules et acides ^[22].
- La CW/DVB est appropriée pour déterminer les acides gras en phase gazeuse dans l'espace de tête plutôt qu'en immersion en phase liquide ^[21].
- La PDMS/DVB est efficace pour capter les diterpènes, bien plus que la PDMS, CAR/PDMS, CW/DVB, CAR/DVB/PDMS ^[23].
- La CAR/DVB/PDMS est appropriée pour l'analyse des principaux composés volatils du bois de chêne: le furfural, l'eugénol, la vanilline, et le syringaldéhyde ^[24]. Elle permet aussi l'extraction d'autres phénols volatils du chêne ^[25].

De nombreux travaux ont été réalisés afin de déterminer le type de fibre le plus performant pour l'extraction des composés volatils des plantes. Ainsi, Bicchi C. et coll. ^[26] ont étudié l'influence de la nature de la fibre sur l'extraction par MEPS des composés aromatiques et médicinales. Ils ont montré que les fibres revêtues avec 50/30 μm DVB/CAR-PDMS offrent le meilleur rendement d'extraction.

Les travaux de Jahouach W. et coll. ^[27] ont montré que la fibre la plus performante pour l'analyse des composés volatils de l'huile d'olive est celle à revêtement triple DVB/CAR/PDMS.

II.3.5. Optimisation des paramètres de captage des composés volatils

Si le choix de la fibre appropriée pour l'extraction est une composante fondamentale pour la bonne réalisation des analyses, le temps et la température d'extraction jouent un rôle prépondérant lorsque nous souhaitons obtenir une sensibilité et une quantification optimale des composés, que nous soyons en phase gazeuse ou en phase liquide.

La plupart des études en Headspace-MEPS précisent la durée de l'extraction ainsi que la température optimale à laquelle nous obtenons une quantité de composés. Généralement, les temps d'extraction correspondent à la période nécessaire pour que les concentrations des composés volatils atteignent l'équilibre entre la phase solide de la fibre et la phase gazeuse de l'espace de tête. Avant l'équilibre, le facteur temps est très important, mais une fois atteint, de petites variations dans les temps d'extraction n'ont aucune influence notable sur les résultats quantitatifs ^[5]. La durée est variable

selon le volume du flacon (le *vial*) dans lequel se trouve l'échantillon analysé, la masse molaire ou la taille moléculaire des analytes, le type de fibre, etc.

Pour des composés terpéniques (mono-, sesqui- et diterpènes), la durée optimale d'extraction se situe entre 5 et 20 minutes ^[23-28]. La figure 53 montre que l'équilibre est atteint au bout de 300 secondes environ, soit 5 minutes pour de l' α -pinène. Pour d'autres monoterpènes comme le β -pinène et le limonène, l'équilibre est atteint entre 5 et 15 minutes ^[29]. Il est à noter que plus la masse molaire du composé terpénique est élevée plus le temps d'extraction avant l'équilibre est élevé aussi. Ainsi pour des sesquiterpènes et diterpènes, l'équilibre est atteint au bout de 20 minutes ^[23-29] même que l'extraction de certains sesquiterpènes comme l'humulène et le β -caryophyllène peut prendre jusqu'à trois heures avant d'atteindre l'équilibre. Zabarras et Wyllie ^[30] estiment quant à eux que 60 minutes suffisent à capter les composés terpéniques.

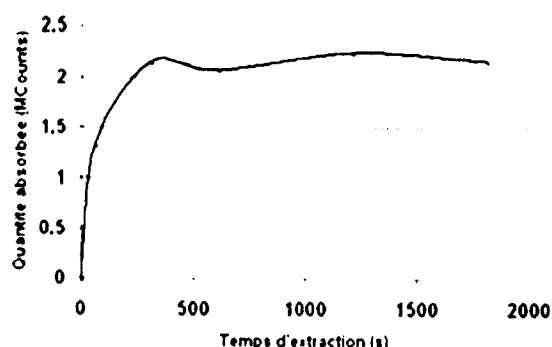


Figure 53 : α -pinène recueilli sur PDMS 100 μm ^[28].

En outre, quelques études rapportent l'utilisation de paramètres extérieurs pour optimiser les résultats de l'analyse et/ou raccourcir les temps d'extraction. Parmi ces différents moyens nous pouvons mentionner l'ajout de sel (ou *salting-out* avec KCl, NaCl, Na₂SO₄) dans la phase liquide, technique fréquemment employée pour améliorer la sensibilité des analyses en espace de tête des composés polaires ^[13]. Cela vise à saturer la solution et augmenter la volatilité des composés potentiellement gazeux. Par contre pour les composés non polaires, l'ajout de sel ne semble pas donner d'effets significatifs sur l'optimisation de l'extraction.

III. Purification & méthodes d'identifications des constituants d'un mélange

III.1. Méthodes chromatographiques

III.1.1. Introduction

Les techniques de chromatographie se sont développées avec une telle rapidité au cours de ces 40 dernières années que leur utilisation en chimie analytique est devenue incontournable tant en laboratoire de recherche qu'en laboratoire de contrôle. A l'origine utilisée pour la séparation de

substances colorées (d'où son nom), la chromatographie est aujourd'hui une méthode puissante d'analyse qualitative et quantitative.

Dès 1903 quelques essais montrèrent qu'il était possible de mettre à profit les phénomènes d'adsorption pour séparer les constituants d'un mélange, mais ce n'est réellement qu'en 1906, à la suite des travaux du botaniste russe Tswett, que naquit la méthode à laquelle cet auteur donna le nom de *chromatographie* (étymologie : *chroma*= couleur)^[1].

III.1.2. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode simple et rapide qui permet de suivre l'évolution d'une réaction ou de tester la pureté de composés organiques.

III.1.3 Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est une technique fondée principalement sur des phénomènes d'adsorption. Elle s'apparente étroitement à la CCM au niveau des phases impliquées et du mécanisme mis en œuvre pour séparer les composants^[1].

III.1.3.1.Principe de la technique

Les principes sur lesquels repose la séparation des composants sont les mêmes que ceux de la CCM : d'une part, les substances les plus polaires sont fortement retenues par l'adsorbant dans la colonne, d'autre part les solvants polaires entraînent facilement les composés polaires. Pour toute substance adsorbée, il s'établit donc un équilibre de distribution entre l'adsorbant et l'éluant, la proportion des molécules adsorbées dépend de leur nature et du pouvoir de dissolution de l'éluant^[2].

Colonne chromatographique

Il s'agit, en général, d'un tube cylindrique vertical de verre dont la longueur peut varier de quelques centimètres à un mètre et parfois plus. Le diamètre moyen est voisin du quinzième de la partie inférieure qui est obturée par une plaque de verre pour les techniques manuelles, ou par des frittés métalliques de porosité égale ou inférieure à 2 µm.

Le remplissage de cette colonne par la phase stationnaire est une opération très importante car de son homogénéité dépend la régularité de la chromatographie^[1].

III.1.4 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

III.1.4.1. Historique

Arpinos P. et coll.^[31] attribue la découverte de la CPG à Archer John Porter MARTIN et Richard Laurence, Millington SYNGE, qui publient dès 1941 la théorie de la chromatographie de partage^[32]. Ils reçoivent en 1950 le prix Nobel de chimie pour cette découverte qui bouleversera le monde de l'analyse. Les progrès de l'instrumentation (colonne capillaire, détecteurs, etc.) et sa relative facilité d'emploi font de la CPG une technique d'analyse de routine essentielle dans de nombreux laboratoires.

III.1.4.2. Définition et principe

La CPG s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition dans l'injecteur.

La phase mobile est alors un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur, qui balaie en permanence la colonne. Cette dernière, placée dans un four thermostaté, est un tube de faible section enroulé sur lui-même et contenant la phase stationnaire. Un grand choix de détecteurs permet l'analyse sélective et parfois l'identification de mélanges très complexes. Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer, nous parlons de chromatographie gaz-liquide ou chromatographie de partage. Si la phase stationnaire est un solide absorbant (silice, alumine, zéolites ou autres polymères adsorbants), c'est de la chromatographie gaz-solide ou chromatographie d'adsorption.

III.1.4.3. Instrumentation

a) Colonnes

Deux grands types de colonnes sont employés à l'heure actuelle : les colonnes remplies et les colonnes capillaires. Les colonnes remplies, encore utilisées pour l'analyse de gaz, sont généralement constituées d'un tube en métal de diamètre intérieur de 2 à 4 mm et de longueur 1 à 6 m, rempli d'un granulé poreux. Dans les colonnes capillaires, la phase stationnaire est déposée sous la forme d'un film régulier (d'épaisseur 0.1 à 5 μm). Leur diamètre intérieur varie entre 0.05 et 0.6 mm pour une longueur de 10 à 100 m. Les principaux avantages de telles colonnes sont : une grande efficacité, un faible débit et une faible capacité d'échantillon. ^[31]

Il existe un grand nombre de phases stationnaires, principalement des liquides, classés en fonction de leur polarité : hydrocarbures ramifiés (squalane), polydialkylsiloxanes (silicones SE30[®], OV17[®], CPSIL5[®]) greffés ou non, polyéthers (Carbowax[®]) et polyesters (DEGS).

b) Détecteur

Le détecteur est un appareil de mesure physico-chimique qui doit donner un signal au passage de chaque constituant, sans interaction avec le gaz vecteur. Nous distinguons des détecteurs universels, répondant à tous les types de composés (catharomètre, balance de densité de gaz ou pour les composés organiques le détecteur à ionisation de flamme). Les détecteurs spécifiques présentent une très grande sensibilité pour certaines familles de composés (détecteur à capture d'électrons, thermo-ionique, photomètre de flamme, etc.). D'autres détecteurs fournissent des données structurales permettant l'identification, comme la spectrométrie de masse et la spectroscopie infrarouge.

Le plus usuel des détecteurs en analyse organique est le détecteur à ionisation de flamme. L'éluant pénètre dans une flamme obtenue par combustion d'hydrogène et d'air. Les composés

organiques forment alors des ions collectés par deux électrodes, entre lesquelles nous appliquons une différence de potentiel. Il en résulte un courant électrique recueilli par un électromètre qui le transforme en courant que nous pouvons enregistrer^[31].

III.1.4.4. Applications

La CPG permet l'analyse et l'identification d'un très grand nombre de matériaux organiques. Elle est donc totalement adaptée à l'analyse de la composition d'un grand nombre d'objets de notre patrimoine moderne ou ancien, qui sont constitués de mélanges complexes de produits naturels (cires, résines, gommes, tanins, huiles, etc.).

Ainsi, un nombre très important de travaux concernent l'analyse des adhésifs archéologiques^[33], des baumes de momification^[34], des objets de musées en bitume^[35], des encres^[36], des liants de peintures^[37], des reliures anciennes^[38], et des sculptures en cires^[39], etc.

III.1.5. Chromatographie gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)

III.1.5.1 Définition et principe

La spectrométrie de masse^[40] est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires.

Le spectromètre de masse est souvent couplé avec un système de CPG. Ce type d'association, d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification, permet d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces (quelques nanogrammes de mélange). Le principe de la spectrométrie de masse est le suivant :

Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique à 70 eV. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

III.1.5.2. Instrumentation^[41]

Un spectromètre de masse est constitué de cinq parties principales :

- Le système d'introduction qui fait pénétrer l'échantillon dans le spectromètre de masse.
- La source d'ions dans laquelle les molécules sont ionisées après bombardement électronique. Il existe plusieurs méthodes d'ionisation, le choix de celle-ci est directement lié à la nature de l'échantillon et au type d'analyse souhaitée.

- L'analyseur qui réalise le tri des ions fragments en fonction du rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique.
- Un détecteur qui collecte les ions fragments et amplifie le signal associé aux ions.
- Un ensemble informatique de traitement des données qui permet de transformer les informations reçues par le détecteur en spectre de masse.

II.1.5.3. Applications

De nombreuses substances organiques, le plus souvent d'origine naturelle, sous forme pure ou dans un mélange, peuvent être identifiées par l'utilisation du couplage CPG/SM. Il est ainsi possible de mettre en évidence la présence d'huiles ^[42], de cires, de résines terpéniques ^[43], de gommes polysaccharidiques ^[44] et de colles animales, à partir de micro-prélèvements effectués sur des œuvres d'art.

III.1.6. La chromatographie liquide haute performance (CLHP)

II.1.6.1. Historique

Après les travaux de Mikhail Semenovitch Tswett du début du siècle dernier, c'est dans un premier temps la chromatographie sur colonne qui prend un essor considérable. Ainsi, Reichstein, en 1938, montre le principe de l'élution des composés dans une colonne après leur séparation. En 1952, l'utilité des gradients d'élution est montrée puis, vers les années 1960, la chromatographie par perméation sur gel se développe. Nous pouvons situer vers 1967, grâce aux travaux de Huber et Huzsman, le début de la chromatographie liquide à haute vitesse, plus tard appelée à juste titre chromatographie liquide haute performance (CLHP) ^[45].

La CLHP présente un champ d'application très vaste (molécules sensibles à la chaleur ou de hautes masses moléculaires) en raison d'un choix important de phases stationnaires et de l'évolution des détecteurs.

III.1.6.2. Principe

L'échantillon doit être totalement soluble dans la phase mobile appelé éluant (solvant ou mélange de solvants). Celui-ci doit être poussé à haute pression afin d'assurer un débit constant dans la colonne et y éviter toute perte de charges. La CLHP classique fait intervenir des mécanismes d'échange soluté/phase mobile/phase stationnaire, basés sur les coefficients de partage ou d'adsorption selon la nature des phases en présence. Nous pouvons également y associer deux types de chromatographie liquide : la chromatographie ionique et la chromatographie d'exclusion.

III.1.6.3. Instrumentation

Dans tous les appareils de CLHP, nous retrouvons un ensemble de modules reliés entre eux par des tubes de faible diamètre. Une ou plusieurs pompes assurent le débit du solvant d'élution. En amont de l'injecteur se trouve la ou les colonnes où s'effectuera la séparation puis en bout de chaîne le détecteur.

III.1.6.4. Exemples d'applications

Quand la CPG n'est pas applicable à des mélanges organiques complexes, en raison de leur masse moléculaire ou de leur polarité trop importante, la CLHP permet de réaliser de nombreuses identifications ou dosages sans modification de l'échantillon initial. Ainsi, un nombre important de travaux concernent l'analyse des pigments ou colorants des textiles ^[46], de patines d'objets divers ^[47], de tanins ^[48], de résines ^[49], ou de liants de peintures ^[50].

Bibliographie

- [1] G. Mahuzie, M. Hamon, D. Ferrier, P. Prognon, Chimie analytique , Méthodes de séparation, Tome 2, 3^{ème} édition, Masson, Paris, 1999, p. 19-20-70-71-125-171-172.
- [2] M. Chavanne, A. Julien, G.J. Beaudoin, E. Flamand, Chimie organique expérimentale, Edition J. G. Beaudoin, 1986, p. 142-143-296.
- [3] J. Namiesnik, B. Zabiegala, A. Kot-Wasik, M. Partyka, A. Wasik, Passive sampling and/or extraction techniques in environmental analysis: a review *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 381, 279-301.
- [4] C.C. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase micro extraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 2145.
- [5] G. Vas, K. Vékey, Solid Phase Micro Extraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis, *J. Mass. Spectro.*, **2004**, 39, 233-254.
- [6] F.J. Santos, M.T. Galceran, The application of gas chromatography to environmental analysis, *Trends anal. Chem.*, **2002**, 21, (9/10), 672-685.
- [7] S.N. Sinha, H.V. Bhatt, Chromatography-Mass spectrometric techniques for air pollutants: a commentary, *J. Occup. Health*, **2004**, 46, 82-86.
- [8] J. Koziel, M. Jia, J. Pawliszyn, Air sampling with porous solid-phase micro extraction fibers, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, (21), 5178-5186.
- [9] J. Pawliszyn, Solid Phase Micro Extraction: Theory and Practice, Edition Wiley-VCH, New York, 1997, p. 24.
- [10] P.A. Martos, J. Pawliszyn, Calibration of Solid Phase Micro extraction for air analyses based on physical chemical properties of the coating, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 206-215.
- [11] M. Liompart, K. Li, M. Fingas, Headspace Solid Phase Micro Extraction (HSSPME) for the determination of volatile and semi volatile pollutants in soils, *Talanta*, **1999**, 48, 451-459.
- [12] M. Abalos, J.M. Bayona, J. Pawliszyn, Development of a headspace solid-phase micro extraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters, *J. Chromato. A.*, **2000**, 873, 107-115.
- [13] B. Pons, M.A. Fernandez-Torroba, G. Ortiz, M.T. Tena, Monitoring and evolution of the pollution by volatile organic compounds (VOCs) in the ground waters of the Najerilla river basin (Spain), *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **2003**, 83, (6), 495-506.
- [14] S. Fuster, J. Beltran, F.J. Lopez, F. Hernandez, Application of solid phase micro extraction for the determination of soil fumigants in water and soil samples, *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28, 98-103.

- [15] O. Pinho, I.M. Ferreira, M.A. Ferreira, Solid phase micro extraction in combination with GC/MS for quantification of the major volatile free fatty acids in ewe cheese, *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 5199-5204.
- [16] E. Razote, I. Jeon, R. Maghirang, W. Chobpattana, Dynamic air sampling of volatile organic compounds using solid phase micro extraction, *J. Environ. Sci. Health*, **2002**, B37, (4), 365-378.
- [17] V. Jacob, I. Denis, P. Foster, La métrologie des Composés Organiques Volatils (COV) : méthodes et difficultés, *Anal. Magazine*, **1998**, 26, (9), 33-37.365-378.
- [18] J. Koziel, M. Jia, J. Pawliszyn, Air sampling with porous Solid phase micro extraction fibers, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, (21), 5178-5186.
- [19] Z. Penton, Comparison of static headspace and headspace SPME for determining EPA 5021 volatiles in water, Varian, SPME n/d, Application Note 19.
- [20] L. Pan, M. Adams, J. Pawliszyn, Determination of fatty acids using Solid phase micro extraction, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 4396-4403.
- [21] R. Maile, F. R. Dani, G. R. Jones, E. D. Morgan, D. Ortius, Sampling techniques for gas chromatographic-mass spectrometric analysis of long-chain free fatty acids from insect exocrine glands, *J. Chromato. A.*, **1998**, 816, 169-175.
- [22] D.D. Roberts, P. Pollien, C. Milo, Solid phase micro extraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 2430-2437.
- [23] S. Hamm, E. Lesellier, J. Bleton, J. Tchaplá, Optimization of headspace solid phase micro extraction for gas chromatography/mass spectrometry analysis of widely different volatility and polarity terpenoids in olibanum, *J. Chromato. A.*, **2003**, 1018, 73-83.
- [24] C.D. Maroto, E.S. Palomo, S.P. Coello, Fast screening method for volatile compounds of oak wood used for aging wines by headspace SPME-GC-MS (SIM), *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 6857-6861.
- [25] J. D. Carillo, A. Garrido-Lopez, M. T. Tena, Determination of volatile oak compounds in wine by headspace solid-phase micro extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromato. A.*, **2006**, 1102, 26-36.
- [26] C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, B. Sgorbini, P. Rubiolo, Headspace sampling of the volatil fraction of vegetable matrices, *J. Chromato. A.*, **2008**, 1184, (1-2), 220-233.
- [27] W.J. Rabai, M. Trabelsi, V. Van Hoed, A. Adams, R. Verhé, N. De Kimpe, M. H. Frikha, Influence of bleaching by ultrasound on fatty acids and minor compounds of olive oil, Qualitative and quantitative analysis of volatile compounds (by SPME coupled to GC/MS), *Ultrasonics Sonochem.*, **2008**, 15, (4), 590-597.
- [28] P. Bengtsson, Physical and chemical characterization of the emissions from softwood drying, Licentiate Thesis, Växjö, **2004c**.

- [29] D. Vereen, J.P. McCall, D.J. Butcher, Solid phase micro extraction for the determination of volatile organic compounds in the foliage of Fraser fir (*Abies fraseri*), *Microchem. J.*, **2000**, 65, 269-276.
- [30] D. Zabarras, S.G. Wyllie, Quantitative analysis of terpenoids in the gas phase using headspace solid phase micro extraction (HS-SPME), *Flavour Fragr. J.*, **2001**, 16, 411-416.
- [31] P. Arpinos, A. Prévot, J. Serpinet, J. Tranchant, A. Vergnol, P. Wittier, Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Edition Masson, Paris, **1995**.
- [32] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, A new form of chromatogram employing two liquid phases, 1. A theory of chromatography, 2. Application of the micro determination of the higher mono aminoacids in proteins, *Biochem. J.*, **1941**, 35, 1358-1368.
- [33] M. Regert, C. Rolando, Archéologie des résidus organiques - De la chimie analytique à l'archéologie : un état de la question, *Techné.*, **1996**, 3, 118-128.
- [34] P. Mejanelle, J. Bleton, S. Goursaud, A. Tchaplà, Analyse de baumes de momification d'Égypte ancienne par chromatographie gazeuse capillaire, spectrométrie de masse, *Anal. Magazine*, août-septembre **1996**, 24 (7), M16-M20.
- [35] J. Connan, O. Deschesne, *Le bitume à Suse-Collection du Musée du Louvre*, Réunion des Musées Nationaux et Elf Aquitaine Production, Paris et Pau, **1996**.
- [36] J. Bleton, C. Coupry, J. Sansoulet, Approche d'étude des encres anciennes- *Studies in Conservation*, **1996**, 41, 95-108.
- [37] A. Casoli, P. Mirti, G. Palla, Characterization of medieval proteinaceous painting media using gas chromatography and gas chromatography- mass spectrometry - *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **1995**, 352 (3-4), 372-379.
- [38] P. Richardin, S. Copy, C. Chahine, F. Saltron, S. Bonnassies - TERMES , GC and GC/MS characterization of degradation amino acids in naturally and artificially aged leathers, *J. Am. Leather Chem. Asso.*(JALCA), **1996**, 91 (1), 2-17.
- [39] S. Colinart, CH. IV - Matériaux constitutifs- in: *Sculptures en cire de l'ancienne Égypte à l'art abstrait*, Ed: Ministère de la Culture et de la Communication - Editions de la réunion des musées nationaux, Paris, **1987**, p. 29-57.
- [40] J. Graeve, F. Berthou, M. Prost, Méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse, Edition Masson, Paris, **1986**.
- [41] T. C. Zerarka, Méthodes spectroscopiques d'analyses chimiques, OPU, **1994**, p. 108-109.
- [42] J. Bleton, A. Tchaplà, Identification par GC/MS de constituants d'un linoléum du Titanic, Les rencontres du CRCDG: « Autour du Titanic », 10 Janvier **1997**, p. 33-39.
- [43] R. White, J. Kirby, Rembrandt and his circle: Seventeenth-century dutch paint media re-examined, *Nat. Gallery Techn. Bull.*, **1994**, 15, 64-77.

- [44] J. Bleton, J. Sansoulet, J. Rivallain, Analyse d'objets africains par chromatographie gazeuse capillaire couplée à la spectrométrie de masse, *Anal.*, **1996**, 24, 28-31.
- [45] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, Manuel pratique de chromatographie en phase liquide, Edition Masson, Paris, **1982**, p. 146-148.
- [46] A. Quye, J. Wouters, J.J. BOON, A preliminary study of light-ageing effect on the analysis of natural flavanoid-dye wools by photodiode array HPLC and by direct temperature mass spectrometry - In : "Committee for Conservation, ICOM", Edimbourg, **1996**, 2, 704-713.
- [47] P. Pastore, F. Magno, S. Volpain, G. Biscontin, Chromatographic determination of oxalate ion in patinas covering ancient materials, *Ann. Chim.*, Rome, **1991**, 81(5-6), 233-241.
- [48] A. Wallert, Tannins of the Parchment of the Dead Sea Scrolls - In: " Committee for Conservation, ICOM ", Edimbourg, **1996**, Vol. 2, 560-564.
- [49] C. Vieillescazes, J. Coen, Caractérisation de quelques résines utilisées en Egypte ancienne, *Studies in Conservation*, **1993**, 38, 255-264.
- [50] S.M. Halpine, Amino acid analysis of proteinaceous media from Cosimo Tura's 'The Annunciation with Saint Francis and Saint Louis of Toulouse', *Studies in Conservation*, **1992**, 37(1), 22-38.

Chapitre V

Travaux Réalisés : Résultats et Discussions

I. Introduction

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs.

La première étape dans la connaissance de ces composés consiste en leur mise en évidence par une étude phytochimique. Cette dernière est basée sur des réactions simples de coloration et de précipitation réalisées dans des tubes à essais. La seconde étape fait appel à des méthodes d'extraction, de purification et de caractérisation par les méthodes d'analyse telles que IRTF, RMN ^1H et ^{13}C , CPG/SM, CLHP etc. Ces techniques permettent l'identification de molécules nouvelles et/ou de molécules déjà citées dans la littérature dotées d'activité biologique intéressantes.

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à l'étude chimique de la *Rhaponticum acaule* L., plante de la région de l'ouest algérien. Cette plante est connue dans la région pour son utilisation dans le traitement des complications stomachiques, résultat d'une enquête ethnopharmacologique. Il est à noter qu'une recherche bibliographique minutieuse ne révèle aucun travail se rapportant à la chimie de cette plante. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle nous nous sommes investis dans cette recherche afin de trouver de nouvelles molécules biologiquement actives. Nos investigations futures seront ensuite orientées vers la recherche des vertus inconnues de cette espèce.

II. Matière végétale

II.1. Identification Botanique

La *Rhaponticum acaule* L. a été identifiée par le Professeur N. Benabadji et son équipe du Laboratoire D'ÉCOLOGIE ET GESTION DES ÉCOSYSTEMES NATURELS, Université Aboubekr Belkaïd, Tlemcen.

II.2. Origine et période de récolte

Les différentes récoltes des racines de la *Rhaponticum acaule* L. ont été effectuées dans la commune de Bensekrane, en Avril 2007.

- **Caractéristiques géographiques et bioclimatiques de la commune de Bensekrane**

a) Distance

Bensekrane chef lieu de la commune se trouve à 107 Km d'Oran, route nationale N° 2 au nord, 32 Km de Tlemcen, route nationale N° 2 au sud, 11 Km de Sidi Abdelli, route départementale N° 53 à l'est, 15 Km de Ain Youcef.

b) Climat

Bensekrane est situé dans la partie méridionale de la zone tempérée du nord de l'Algérie. Protégé des vents du sud par les massifs de Tlemcen et de Ouled Mimoun, du djebel Nador au sud jusqu'au djebel Ramdja au sud-est. Soumis à l'influence méditerranéenne et d'un relief peu élevé, il jouit d'un climat modéré, excellent dans l'ensemble.

Les hivers sont doux, la neige y est très rare. Les étés sont vraiment pénibles lorsque le siroco souffle. La chaleur est également moins lourde que sur le littoral bien que la température y soit plus élevée. La température moyenne annuelle du territoire est 18°C. Elle varie de 25°C à 35°C en été et de 5°C à 12°C en Décembre.

II.3. Préparation des échantillons

Après la récolte, les racines sont tout d'abord séchées dans un endroit aéré à l'abri de la lumière puis broyées. Elles sont ensuite conservées dans des bocaux en verres hermétiquement fermés.

III. Examen phytochimique

III.1. Introduction

Cet examen consiste à faire une exploration de toutes les familles de composés présentes dans les racines de la *Rhaponticum acaule* L. recueillies dans la région de Bensekrane.

III.2. Résultats et discussions

Les résultats de l'examen phytochimique qualitatif réalisé sur la partie souterraine de la *Rhaponticum acaule* L. épuisée par le méthanol, l'eau et l'éther diéthylique sont regroupés dans les tableaux 12,13 et 14. Le choix de ces trois solvants est basé sur la différence de leur polarité.

Tableau 12 : Epuisement au méthanol.

Famille de composés	Racines
Alcaloïdes sels	-
Flavonoïdes	-
Stérols et stéroïdes	+
Tanins	++
Composés réducteurs	+++
Anthracénosides	-
Coumarines	-
Anthocyanosides	-

Tableau 13 : Epuisement à l'eau.

Famille de composés	Racines
Amidon	-
Composés réducteurs	+++
Saponosides	+
Tanins	++
Alcaloïdes sels	-
Coumarines	-
Anthracénosides	-
Anthocyanosides	-
Anthraquinones	-
Ergolines	-

Tableau 14 : Epuisement à l'éther diéthylique.

Familles de composés	Racines
Huiles volatiles	+
Acides gras	+
Stérols et stéroïdes	+
Alcaloïdes bases	-
Emodols	-
Coumarines	-

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

Le criblage phytochimique a permis de caractériser différentes familles de composés chimiques présentes dans les racines de la *Rhaponticum acaule* L. Les résultats révèlent la présence des polyphénols (tanins) et des composés réducteurs en quantité appréciable. De plus, les tests qualitatifs des acides gras, huiles essentielles, saponosides, stéroïdes et stérols sont positifs et indiquent la présence de ces composés en faible quantité.

Les différentes réactions de caractérisations donnant un test positif sont résumées ci-dessous :

- Les tanins condensés sont confirmés par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique donnant une coloration verte foncée.
- Les composés réducteurs sont détectés par le test de la liqueur de Fehling conduisant à un précipité rouge brique.
- La présence des saponosides est confirmée par l'apparition d'une mousse persistante après vive agitation à température ambiante.
- L'addition du réactif de Libermann-Burchardt, à l'extrait, renseigne sur la présence des stéroïdes et des stérols par apparition d'une coloration verte.

Il est donc évident que les propriétés thérapeutiques connues de la Rhapontique sont dues, essentiellement, à la présence de l'un de ces composés ou de l'effet synergique de l'ensemble réuni.

D'autre part, l'examen souligne l'absence totale des alcaloïdes sels et bases, des flavonoïdes, des coumarines, des anthracénosides, des anthocyanosides, des anthraquinones, des ergolines et des emodols.

IV. Réactions de dosages

Afin de mieux exploiter les résultats du screening phytochimique, nous nous sommes proposé de faire quelques dosages simples pour quantifier les polyphénols et les saponosides.

IV.1. Dosage des composés phénoliques

Après extraction de la racine de la *Rhaponticum acaule* L. avec un mélange de solvants MeOH/H₂O dans des proportions égales et l'ajout d'une solution aqueuse de sulfite de sodium pour éviter les phénomènes d'oxydation, nous obtenons une solution de l'extrait polyphénolique notée : solution A. Cette dernière est utilisée comme solution mère dans les opérations de dosages des phénols totaux et des tanins condensés.

La teneur en phénols totaux ^[1], exprimée en mg/g de matière sèche, est évaluée par la méthode de bleu de Prusse. Ce dosage est basé sur la réduction de l'ion ferrique en ion ferreux par les composés phénoliques. La formation d'un complexe de couleur bleu de Prusse révèle la présence de phénols totaux.

Concernant les tanins condensés ^[2], leur taux est mesuré en équivalent leucocyanidine. Les résultats sont regroupés dans le tableau 15 suivant :

Tableau 15 : Résultats du dosage des composés phénoliques.

Dosage	Teneur
Phénols totaux	50.85 mg/g
Tanins condensés	1.95%

Ces résultats montrent que la plupart des composés phénoliques se trouvent sous la forme de phénols totaux.

IV.2. Dosage des saponosides ^[3]

Le test phytochimique qualitatif des saponosides s'est révélé faiblement positif. L'autre moyen permettant d'estimer quantitativement la teneur en saponosides consiste à évaluer par calcul l'indice de mousse. Les résultats, très largement inférieur à 100, regroupés dans le tableau 16 ci-dessous confirme la teneur faible en saponosides.

Tableau 16 : Calcul de l'indice de mousse.

Organe	Racines									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tubes										
Concentration %	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Hauteur (cm)	/	/	/	/	/	/	/	/	0.2	0.3
Indice de mousse	/	/	/	/	/	/	/	/	11.11	15

V. Extraction et purification

V.1. Dégraissage des racines

Avant d'entamer toute opération d'extraction de la racine de la *Rhaponticum acaule* L., il est conseillé de faire un dégraissage en utilisant des solvants apolaires. Ce dégraissage est important car souvent les plantes contiennent, en plus des molécules bioactives, des graisses, des cires, de terpènes, de pigments et d'autres substances lipophiles qui peuvent perturber le processus d'extraction. Les résultats du dégraissage des racines par l'éther de pétrole et l'hexane sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 17 : Dégraissage des racines par différents solvants.

	Ether de pétrole	Hexane
Rendement (%)	0.43	0.71
Aspect	Pâteux marron	Pâteux marron

Ce tableau montre que l'emploi de l'hexane comme solvant de dégraissage fourni une huile pâteuse marron avec un rendement supérieur à celui obtenu avec l'éther de pétrole.

V.2. Acides gras et insaponifiables ^[4]

Nous avons soumis la fraction résultante du dégraissage des racines de la *Rhaponticum acaule* L. à différents traitements chimiques. La fraction grasse fournie, après saponification avec une solution éthanolique de KOH et extraction avec de l'hexane, une cire jaunâtre regroupant tous les composés insaponifiables. D'autre part, les acides gras solubles dans la phase aqueuse sous forme de carboxylate sont régénérés par simple réaction d'acidification.

Tableau 18 : Résultats des acides gras et insaponifiables.

	Insaponifiables	Acides gras
Masse (g)	0.43	0.93
Rendement (%)	19.02	41.15
Aspect	Cire jaune pâle	Pâteux marron

Ces résultats montrent la richesse des racines en acides gras ; les matières insaponifiables représentent 19% et sont à l'origine de l'odeur si caractéristique des racines.

V.3. Estérification des acides gras

Dans le but de faciliter la caractérisation des acides gras obtenus lors de l'opération précédente, nous avons soumis le mélange d'acides à une réaction d'estérification dans du méthanol acidifié. Les esters méthyliques résultants sont, ensuite, extraits de la phase aqueuse avec du chloroforme.

Tableau 19 : Esters méthyliques.

Esters méthyliques	
Masse (g)	0.56
Rendement (%)	59.57
Aspect	Liquide marron

La formation des esters méthyliques est confirmée par IRTF. En effet, le spectre sur la figure 54 montre, en plus des bandes correspondantes aux vibrations d'élongation et de déformation angulaire des liaisons C-H (ν (cm^{-1}) : 2926.32, 2854.96, 1461.30, 1364.38, 723.48), une bande d'absorption C=O intense située vers 1741.75 cm^{-1} et trois bandes d'élongation du groupe C-O vers 1171.56, 1197 et 1257.49 cm^{-1} .

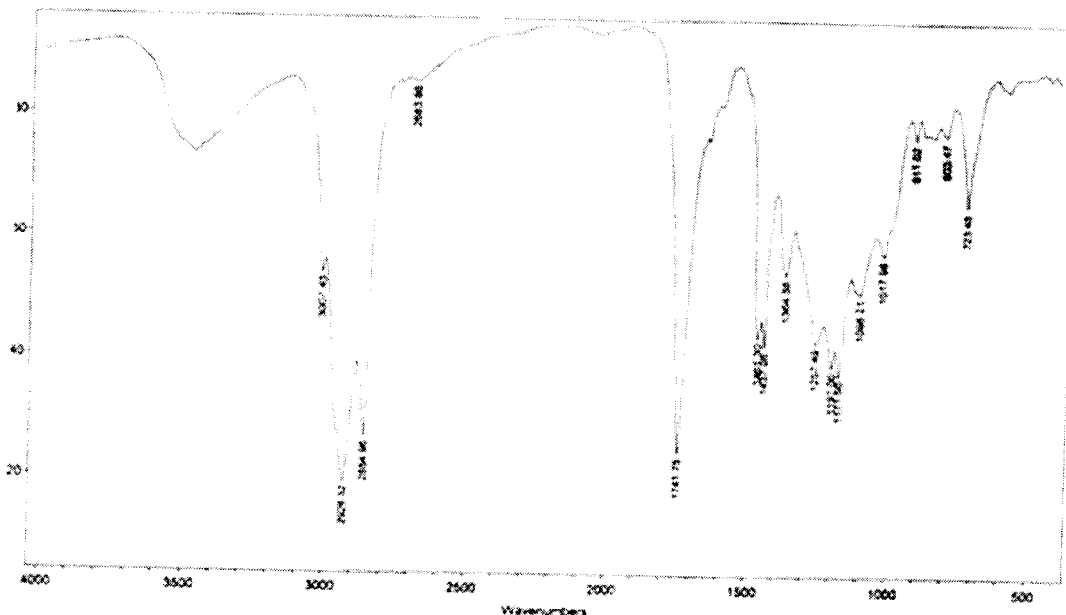


Figure 54 : Spectre IR des esters méthyliques.

Les analyses chromatographiques (CPG et CPG/SM) des acides gras, des insaponifiables et des esters méthyliques sont en cours de réalisation.

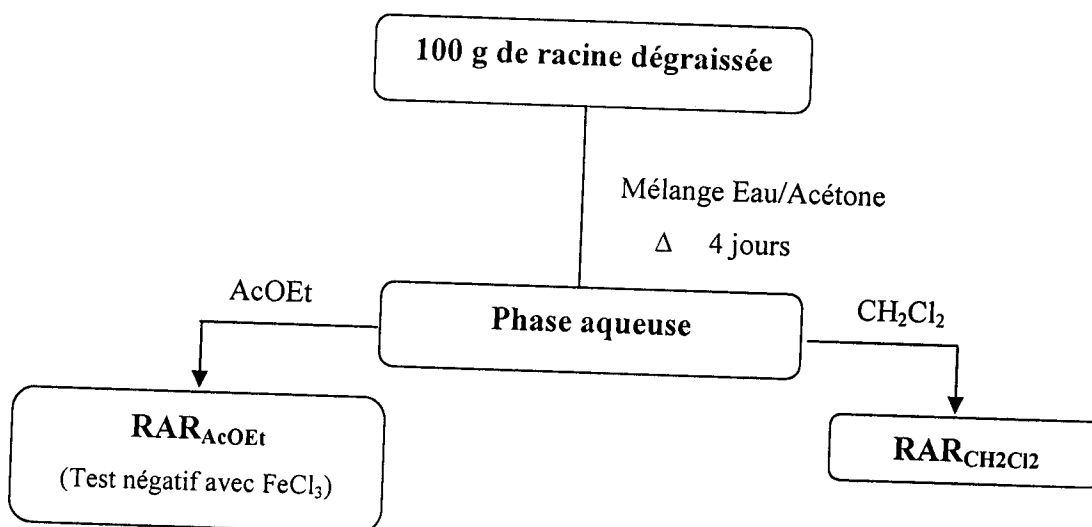
V.4. Extraction des polyphénols ^[5]

L'extraction des polyphénols est, en règle générale, réalisée par un mélange eau/acétone. Un rendement optimal est obtenu avec les tissus frais ou conservés par congélation car, dans les drogues sèches, une partie des tanins est irréversiblement combinée à d'autres polymères. Après élimination

de l'acétone par distillation, la solution aqueuse est débarrassée des pigments et des lipides par un solvant tel que le CH_2Cl_2 . L'extraction de cette solution aqueuse par l'AcOEt permet de séparer les proanthocyanidols dimères et la plupart des tanins galliques. Les proanthocyanidols polymères et les tanins galliques de masse moléculaire élevée restent dans la phase aqueuse. L'obtention des molécules pures nécessite le recours à des techniques chromatographiques appropriées le plus souvent une (ou des) chromatographie(s) d'exclusion sur gel suivie de chromatographies en phase inverse, toujours en milieu hydro-alcoolique ou hydro-alcool-acétonique.

V.4.1. Extraction avec Eau/Acétone

Sur la base des résultats de l'examen phytochimique réalisé sur les racines de la *Rhaponticum acaule* L., nous avons tenté d'extraire les polyphénols, surtout la fraction tannique car les flavonoïdes sont absents. Pour ce faire, nous avons appliqué le protocole d'extraction des polyphénols décrit ci-dessus. Cette méthode d'extraction est résumée sur l'organigramme 2 suivant :



Organigramme 2 : Extraction avec un mélange Eau/Acétone.

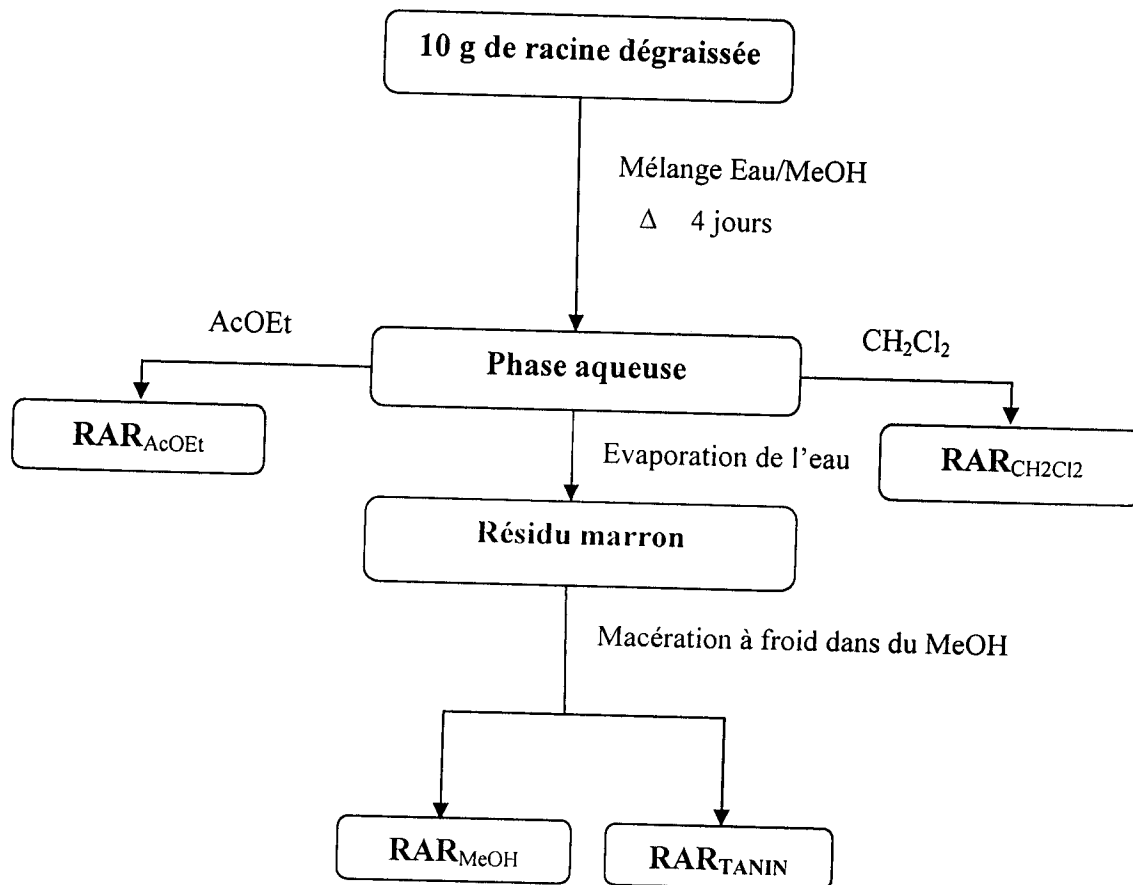
Sur cet organigramme, nous désignons par les appellations $\text{RAR}_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$ et $\text{RAR}_{\text{AcOEt}}$ les fractions obtenues après extraction de la *Rhaponticum* (R) acaule (A) Racine (R) respectivement avec du CH_2Cl_2 et de l'AcOEt.

Malheureusement, cette méthode n'a pas conduit au résultat escompté. En effet, nous avons confirmé l'absence des tanins dans la fraction AcOEt par un simple test avec une solution FeCl_3 dans un tube à essai. Dans un souci de rechercher les tanins, nous avons soumis la phase aqueuse au même test qui s'est révélé positif. A ce stade de nos investigations, il nous a paru inutile de rechercher un autre solvant d'extraction car l'AcOEt est le solvant le plus recommandé, dans la littérature, pour de telles extractions.

Devant cet échec, nous avons opté pour une méthode qui emploie un mélange Eau/MeOH.

V.4.2. Extraction avec Eau/Méthanol

En pratique, le mode d'extraction des tanins avec un mélange eau/MeOH est identique à celui déjà appliqué lors de l'utilisation d'un mélange Eau/Acétone. L'organigramme 3 représenté ci-dessous rend compte de cette similitude. Notons qu'en plus des fractions $RAR_{CH_2Cl_2}$ et RAR_{AcOEt} décrites ci-dessus, nous avons obtenu deux nouvelles fractions RAR_{MeOH} et RAR_{TANIN} .



Organigramme 3 : Extraction avec un mélange Eau/MeOH.

Au cours de cette opération, nous avons obtenu un test négatif avec une solution de $FeCl_3$ dans le cas de la fraction RAR_{AcOEt} ; ce résultat est identique à celui obtenu précédemment, c'est-à-dire une absence totale des tanins. Le même test réalisé en utilisant la phase aqueuse s'est révélé positif.

A ce stade et pour contourner cette difficulté, nous avons concentré la phase aqueuse jusqu'à évaporation totale de l'eau. Un résidu marron est obtenu. Ce dernier est, ensuite, macéré à froid dans du MeOH. Cette opération fournit deux fractions RAR_{MeOH} et RAR_{TANIN} représentant respectivement une partie soluble dans le MeOH et une autre insoluble qui reste en suspension sous forme solide marron cristallin récupéré, ensuite, par simple filtration puis solubilisé dans l'eau.

Ces nouvelles fractions sont testées avec la solution de FeCl_3 et la liqueur de Fehling. La fraction RAR_{MeOH} donne un test négatif avec FeCl_3 et un test positif avec la liqueur de Fehling indiquant la présence des sucres. D'autre part, l'examen de la fraction $\text{RAR}_{\text{TANIN}}$ montre la présence des tanins et l'absence totale des sucres.

Les résultats de l'extraction des racines de la *Rhaponticum acaule* L. sont regroupés dans le tableau 20 suivant :

Tableau 20 : Résultats de l'extraction des racines de la *Rhaponticum acaule* L.

Extraits	Aspect physique	Masse (g)	Rdt (%)
$\text{RAR}_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$	Pâteux jaune	0.015	0.15
$\text{RAR}_{\text{AcOEt}}$	Pâteux jaune	0.15	1.5
RAR_{MeOH}	Poudre jaune	1.91	19.1
$\text{RAR}_{\text{TANIN}}$	Poudre marron	0.04	0.4

Après extraction, nous nous sommes intéressés surtout, en une première approche, aux fractions $\text{RAR}_{\text{AcOEt}}$, RAR_{MeOH} et $\text{RAR}_{\text{TANIN}}$; la fraction $\text{RAR}_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$ étant constituée de pigments et de lipides.

Plusieurs CCM sont réalisées en employant divers mélanges éluants tels que $\text{AcOEt}/n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ (1/4), $\text{AcOEt}/\text{Et}_2\text{O}$ (1/4), etc. Le meilleur mélange éluant retenu, permettant la meilleure séparation des constituants de la fraction $\text{RAR}_{\text{AcOEt}}$, est constitué de l'éther de pétrole, AcOEt et MeOH dans les proportions respectives 8, 1 et 1. Dans le cas de RAR_{MeOH} , nous avons retenu le mélange $\text{MeOH}/\text{Et}_2\text{O}$ (3/7).

Tableau 21 : Résultats des CCM.

Extrait	Eluant	Taches	R_f
$\text{RAR}_{\text{AcOEt}}$	Ether de pétrole/ AcOEt/MeOH (8/1/1)	1	Ne migre pas
		2	0.06
		3	0.37
		4	0.84
		5	0.93
RAR_{MeOH}	$\text{MeOH}/\text{Et}_2\text{O}$ (3/7)	1	Ne migre pas
		2	0.31
		3	0.48
		4	0.64
		5	Tache intense

Nous avons réalisé, ensuite, le fractionnement de l'extrait $\text{RAR}_{\text{AcOEt}}$ (150 mg) sur colonne de gel de silice en utilisant comme mélange éluant : Ether de pétrole/ AcOEt/MeOH (8/1/1).

Deux fractions notées RAR_1 et RAR_2 sont obtenues avec un rendement global de 73.33%. Les résultats sont regroupés dans le tableau 22 suivant :

Tableau 22 : Résultats de la chromatographie sur colonne de l'extrait RAR_{AcOEt}.

Aspect physique	Masse	Chromatographie sur colonne			
		Fractions	Masse (mg)	R _f	Rendement (%)
Pâte jaunâtre	150 mg	RAR1	70	Ne migre pas 0.04 0.28 0.55 0.75 0.91	46.67
		RAR2	40	Ne migre pas 0.04 0.77	26.67

Les fractions RAR1 et RAR2 résultantes sont conservées dans des flacons étiquetés pour des analyses futures très poussées qui permettront, en plus de caractériser la nature des composés extraits, une évaluation de leur activité biologiques. Concernant l'extrait RAR_{MeOH}, nous avons jugé inutile de réaliser son fractionnement pour la simple raison qu'il ne contient que des sucres. Ces derniers seront extraits des racines de la Rhapontique selon un mode d'extraction décrit dans le paragraphe V-5 ci-dessous.

Pour ce qui est de l'extrait RAR_{TANIN} renfermant un solide cristallin soluble dans l'eau, nous avons tenté de le caractériser par les méthodes d'analyse (IRTF, RMN ¹H et CLHP). Il est à noter que ce produit s'est dégradé à une température de 220°C lors de la mesure de son point de fusion. Son analyse par CLHP est effectuée dans les conditions modifiées de la référence [6] :

- Colonne : ZORBAX SB-C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm).
- Détecteur : UV-visible
- Phase mobile : 80% CH₃OH ; 20% CH₃CN
- Débit : 1ml/min
- λ max : 280 nm
- Pression : 56 bars
- T : 20°C
- Volume injecté : 20 µl

Le chromatogramme et les résultats sont indiqués ci-dessous :

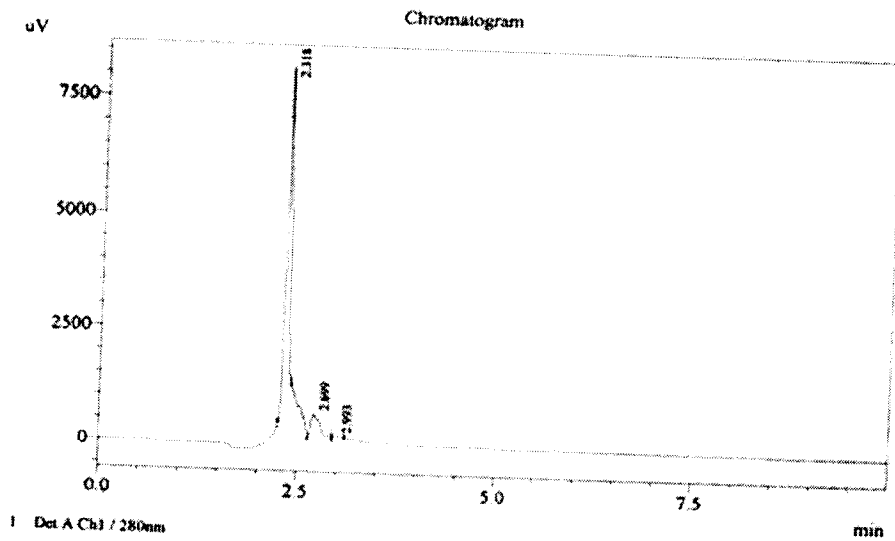


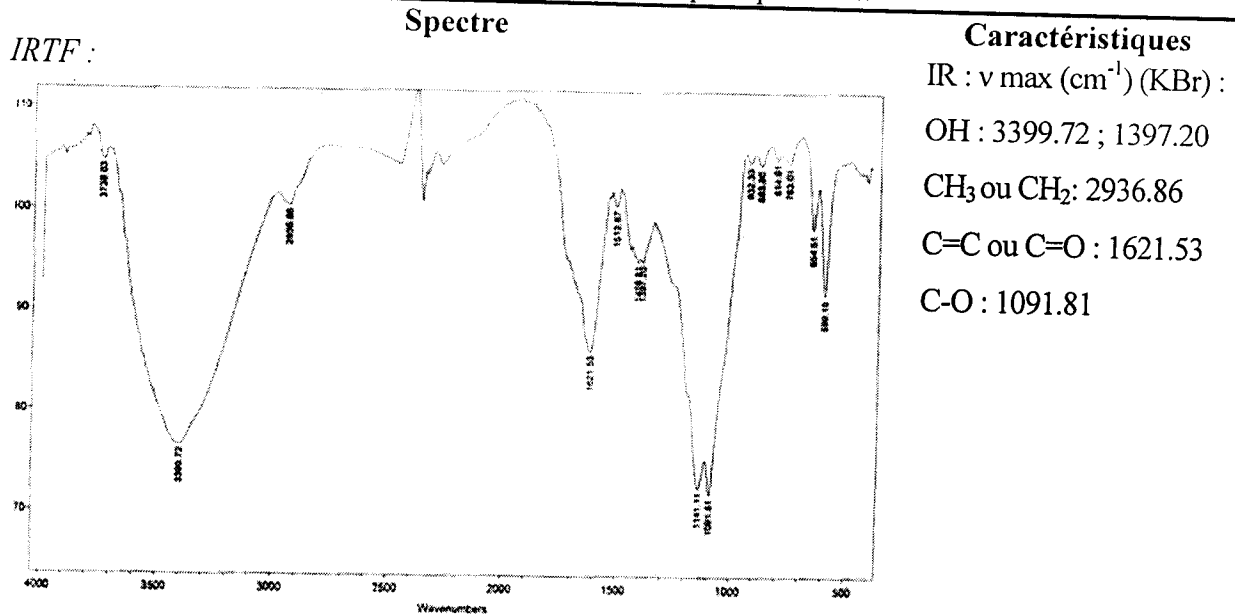
Figure 55 : Chromatogramme CLHP des tanins.

Tableau 23 : Analyse CLHP des tanins.

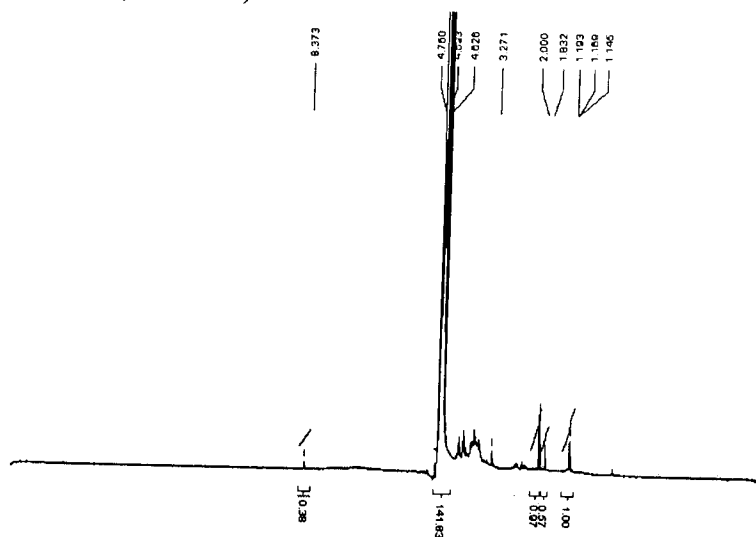
N° pic	Temps de rétention	Surface	Hauteur	% Aire	% Hauteur
1	2.318	24185	7341	86.219	93.138
2	2.699	3635	500	12.960	6.346
3	2.993	230	41	0.812	0.516
Total		28050	7882	100.000	100.000

La CLHP révèle la présence de trois pics dont un majoritaire avec une pureté de 86.219 % en unité d'aire. L'application des autres méthodes d'analyse fournit les données spectrales regroupées dans le tableau 24 ci-dessous.

Tableau 24 : Caractéristiques spectrales.



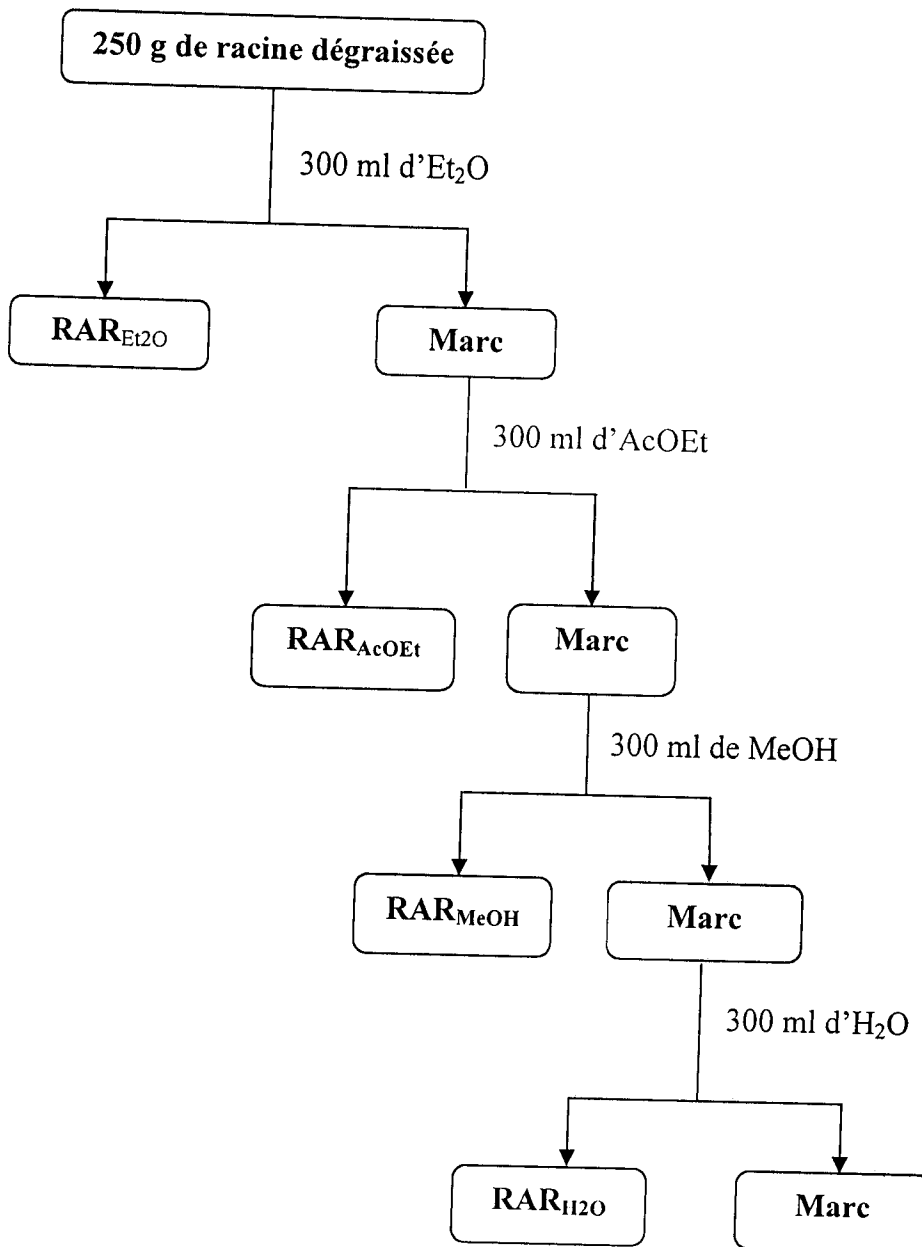
RMN ¹H (300MHz)



Ces analyses ne sont pas suffisantes pour identifier l'extrait RAR_{TANIN}, l'utilisation d'autres méthodes d'analyse est indispensable telles que : RMN ¹³C, Spectrométrie de Masse (SM), et l'analyse élémentaire.

V.5. Extraction par solvants de polarité croissante

Dans le but de pousser plus loin nos investigations dans l'étude de la racine de la *Rhaponticum acaule* L., nous avons soumis les racines, préalablement dégraissées avec de l'hexane, à une série d'extraction en utilisant le soxhlet. Plusieurs solvants organiques à gradient de polarité croissante, tels que l'Et₂O, l'AcOEt, le MeOH et l'eau, sont employés. Le but essentiel de cette opération consiste à séparer les composés sur la base de leur différence de solubilité dans les solvants choisis. L'ensemble des extractions effectuées est résumé dans l'organigramme 4 suivant :



Organigramme 4 : Protocole d'extraction des racines de la *Rhaponticum acaule* L.

Où : RAR_{Et_2O} , RAR_{AcOEt} , RAR_{MeOH} et RAR_{H_2O} représentent respectivement l'extraction des racines dégraissées de la *Rhaponticum acaule* L. par les solvants suivants de polarité croissante : éther diéthylique, AcOEt, MeOH et l'eau.

Nous avons étudié, ensuite, les extraits ainsi obtenus par CCM en utilisant plusieurs mélanges éluants pour chaque extrait. Les mélanges éluants les plus intéressants sont mentionnés sur le tableau 25 regroupant, en plus, tous les résultats de cette analyse.

Tableau 25 : Les CCM des différents extraits des racines de la *Rhaponticum acaule* L.

Extrait	Aspect	CCM			
		Masse (g)	Eluant	R_f	Rdt(%)
RAR_{Et_2O}	Pâteux jaune	0.27	EtO ₂ /MeOH (9/1)	Ne migre pas 0.1 0.76	0.11
RAR_{AcOEt}	Pâteux marron	2.43	AcOEt/MeOH (6/1)	Ne migre pas 0.34 0.95	0.98
RAR_{MeOH}	Visqueux marron	42.73	MeOH/EtO ₂ (4/1)	Ne migre pas 0.58 0.72	20.34
RAR_{H_2O}	Poudre marron	1.70	/	/	8.95

Nous avons soumis les fractions RAR_{Et_2O} , RAR_{AcOEt} , RAR_{MeOH} et RAR_{H_2O} aux deux tests précédemment décrits, notamment ceux de $FeCl_3$ et de la liqueur de Fehling. Il en résulte un test positif pour RAR_{H_2O} et faiblement positif pour RAR_{MeOH} avec une solution de $FeCl_3$. Le test à la liqueur de Fehling montre la présence des sucres dans l'extrait méthanolique. D'autre part, les mêmes tests appliqués aux autres extraits RAR_{Et_2O} et RAR_{AcOEt} se sont révélés négatifs.

Devant ces résultats, nous avons orienté notre étude vers la caractérisation de la fraction glucidique. Pour ce faire, nous avons soumis l'extrait méthanolique, d'aspect visqueux ressemblant au caramel, à une analyse CLHP en phase inverse. Cinq monosaccharides commercialisés utilisés comme étalons externes: D(+)-glucose ; D(+)-maltose ; D(-)-fructose ; D(+)-xylose ; D(+)-sucrose, sont employés. Ils sont injectés, séparément, dans les mêmes conditions CLHP [6] que celles de l'analyse de la fraction RAR_{MeOH} dont le chromatogramme est représenté ci-dessous :

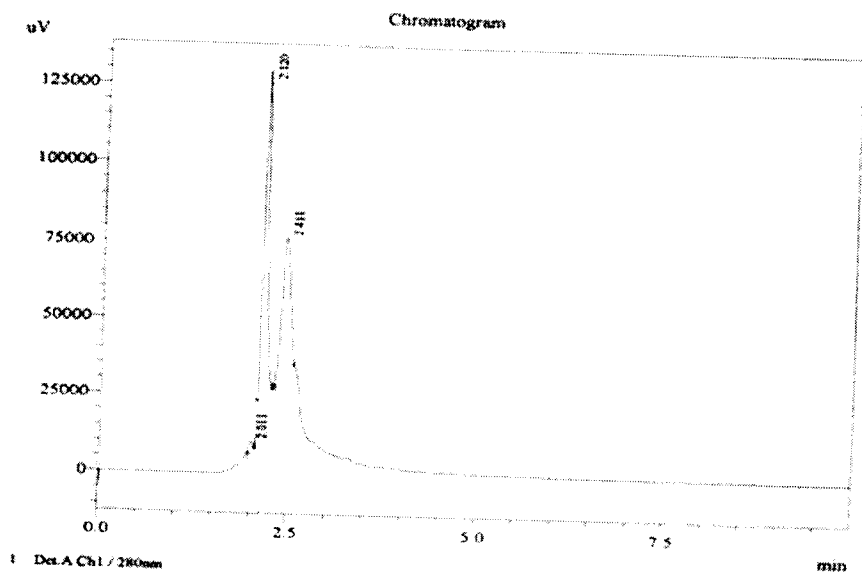


Figure 56 : Chromatogramme CLHP des sucres.

Tableau 26 : Analyse CLHP des sucres.

N° pic	Temps de rétention	Surface	Hauteur	% Aire	% Hauteur
1	2.011	8983	2949	1.107	1.907
2	2.120	459689	105956	56.656	68.497
3	2.411	342701	45782	42.237	29.597
Total		811373	154688	100.000	100.000

L'identification est réalisée par comparaison des temps de rétention des étalons sucres avec ceux des pics de l'extrait RAR_{MeOH}. En examinant les différents chromatogrammes CLHP obtenus dans les conditions modifiées de la référence 6, nous concluons que les seuls sucres caractérisés par nos soins sont le D(+)-maltose et le D(+)-sucrose. En effet leurs temps de rétention respectifs $Tr = 2.095$ et $Tr = 2.122$ min, sont très voisins de ceux des pics représentant les constituants de l'extrait glucidique.

Il est à noter que ce faible taux de caractérisation peut être expliqué par les conditions opératoires très spécifiques des sucres lors d'une analyse CLHP. En effet, il est primordial de réunir toutes les conditions nécessaires (phase mobile, température etc.) pour une analyse fiable et complète. Les conditions les plus communément citées dans la littérature ^[6, 7] sont :

- Colonne : RP-C18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m)
- Détecteur : UV-visible (190-700 nm)
- Phases mobiles : Phase A : CH₃CN ; Phase B : KH₂PO₄ 0.045% - Et₃N 0.05% (pH 7.0) avec un gradient d'élution de 90-89-86% B par décroissance linéaire de 0-15-40 min
- Débit : 1ml/min ; λ max : 250 nm ; Pression : 56 bars
- T : 35°C
- Volume injecté : 20 μ l

V.6. Extraction et analyse des huiles essentielles des racines

Pour accéder à l'huile essentielle des racines de la *Rhaponticum acaule* L., nous avons utilisé la méthode d'hydrodistillation (HD) en employant un montage particulier en verre de type Clevenger (Figure 57). Ce système de distillation a été élaboré par J.F.Clevenger et décrit la première fois en 1928 dans *American Perfumer & Essential Oil Review* [8]. Actuellement, cette méthode est recommandée par la Pharmacopée Européenne [9] pour l'extraction des huiles essentielles à des fins analytiques. Son intérêt majeur réside dans l'utilisation d'un système de cohobation permettant une distillation en continue sans modifier la teneur en eau de la matrice.

Le montage en verre utilisé est constitué d'un ballon surmonté d'une colonne à distillation, d'un réfrigérant qui condense les vapeurs, et d'un essencier pour récupérer l'huile essentielle (Voire figure 57).

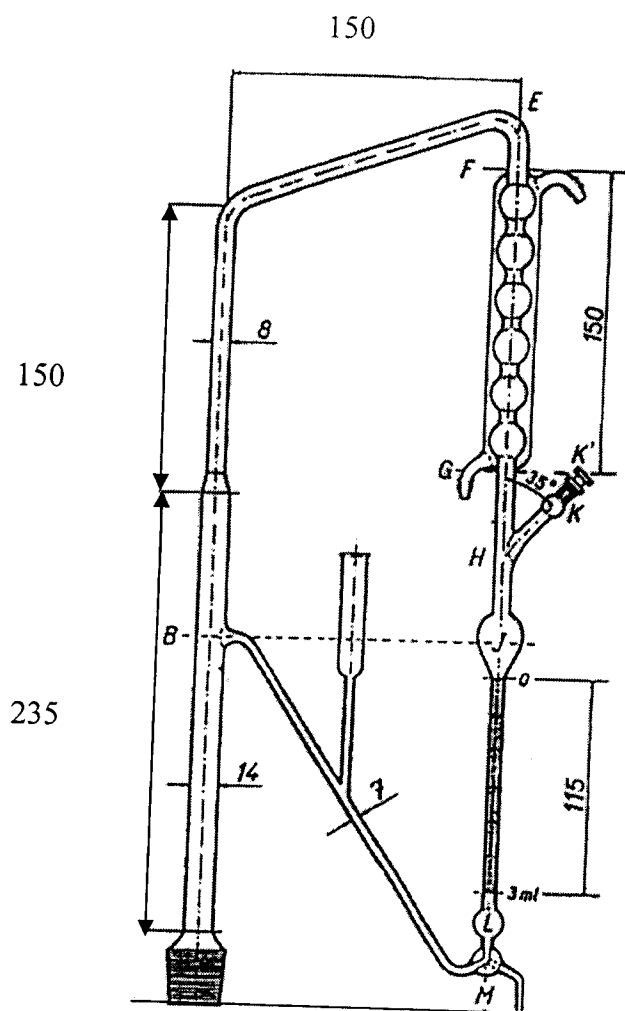


Figure 57 : Appareil pour le dosage des huiles essentielles dans les drogues végétales
(Dimensions en mm)

L'usage du montage décrit ci-dessus, nous a permis l'obtention de l'huile essentielle à partir des racines de la *Rhaponticum acaule* L. cultivée au cours du mois de septembre 2007 dans la région de Bensekrane.

Les résultats de l'extraction sont résumés dans le tableau 27.

Tableau 27 : Résultats d'extraction en huile essentielle par HD.

Méthode d'extraction	Masse végétale (g)	Durée d'extraction (h)	Rendement (%)	Aspect
Hydrodistillation	250	5	0.025	Liquide jaunâtre

D'après ces résultats, nous constatons le faible rendement en huile essentielle. En effet, une masse de 63 mg est obtenue à partir de 250 g de la matière végétale soit un rendement de 0.025%. Ce résultat été prévisible parce qu'il s'agit des racines, organe pauvre en huile, et aussi parce que le rendement en huile essentielle, en général, varie beaucoup selon la méthode d'extraction, la période et le lieu de la récolte etc.

Nous avons soumis l'huile essentielle obtenue aux différentes méthodes chromatographiques (CPG et CPG/SM) :

- Les chromatogrammes CPG (voire figure 58 & 59) 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 μ m) respectivement apolaire (Rtx-1, Polydiméthyl siloxane) et polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol). 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 μ l.
- Les chromatogrammes CPG/SM 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-1 ; la température de la source d'ions, 150°C ; énergie d'ionisation, 70 eV. L'ionisation électronique (EI) est obtenue sur l'intervalle des masses 35-350 Da.



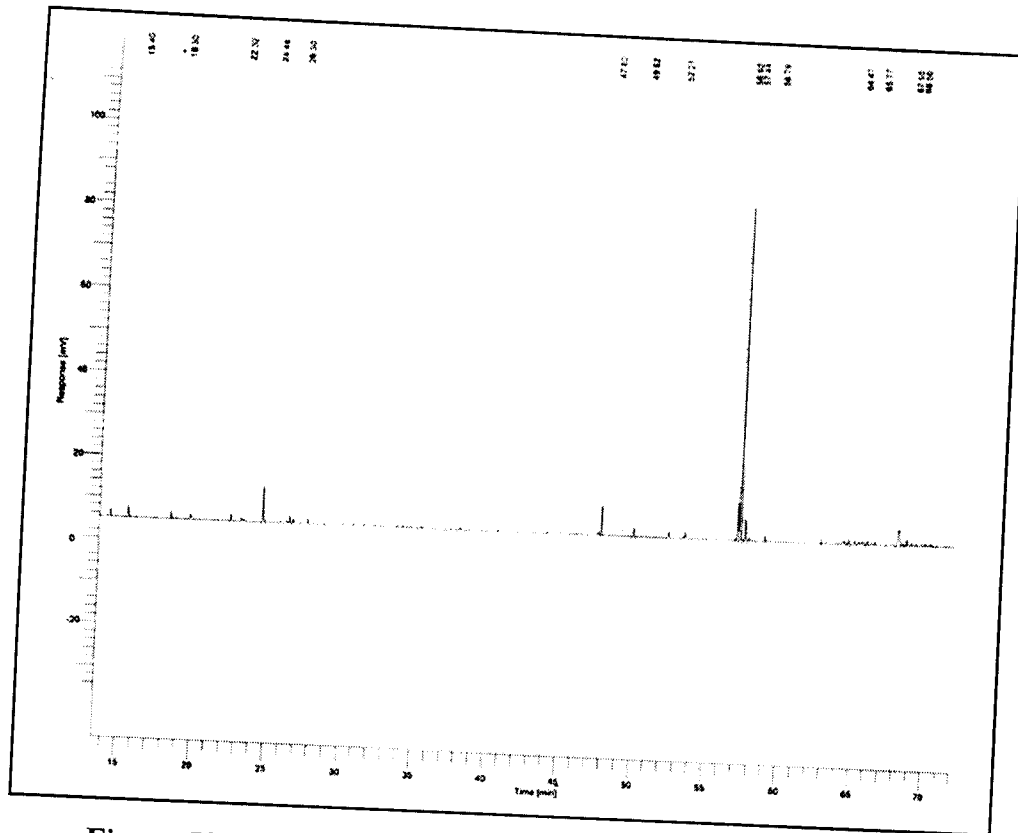


Figure 58 : Chromatogramme enregistrés sur colonne apolaire.

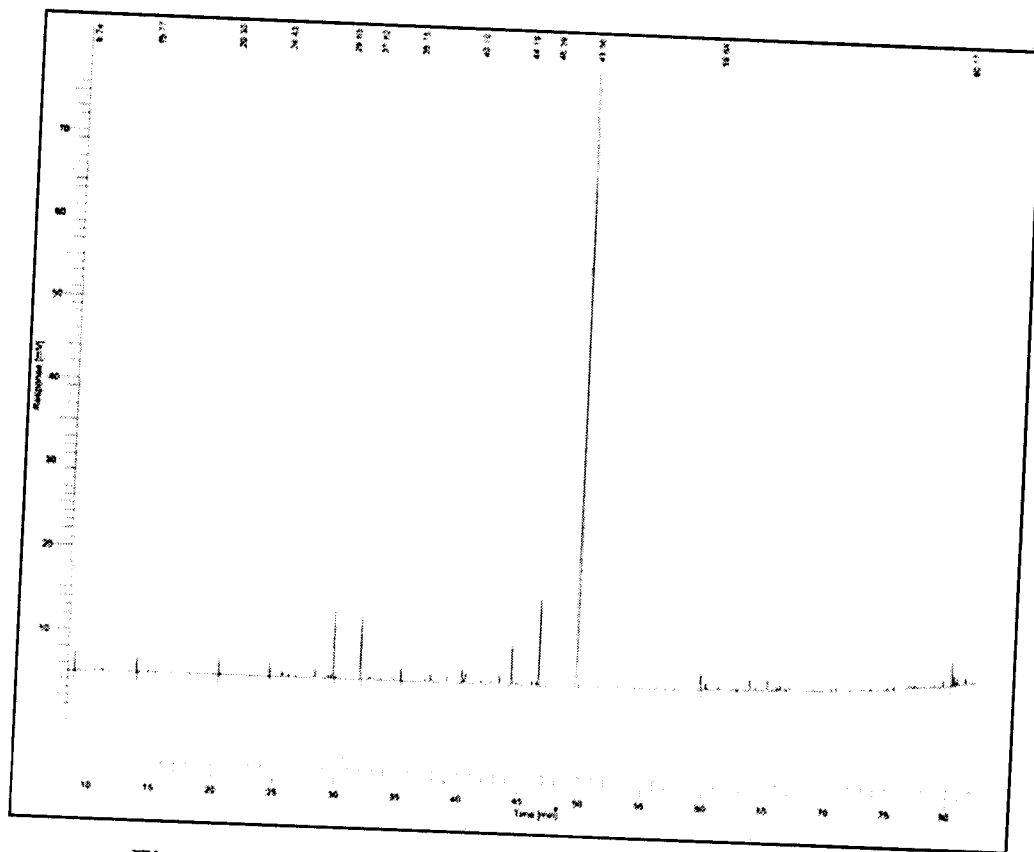


Figure 59 : chromatogramme obtenu sur colonne polaire.

Le dépouillement des chromatogrammes CPG et CPG/SM, nous a permis de dresser le tableau 28 regroupant les composés constitutifs de l'huile essentielle.

Tableau 28 : Composition chimique de l'huile essentielle de la *Rhaponticum acaule* L.

Pic	Tr (mn)	% Aire	%	IR	Composés
1	22.322	6.114	1.06	1086.57	Nonanal
2	24.482	31.414	5.46	1120.71	Camphre
3	26.296	7.010	1.22	1148.70	But-3-ène-2-ol
4	47.619	29.681	5.16	1488.59	Pentadécène
5	52.207	8.444	1.47	1568.78	Bis-(3,5,5-triméthyl hexyl)-éther
6	56.919	43.234	7.52	1654.33	Dodéca-9,11-diène-1-ol
7	57.081	346.502	60.25	1657.33	Octadéca-9, 12,15-triène-1-ol
8	57.437	21.732	3.78	1663.90	Hexadécyne
Composés identifiés			85.92		

Il est à noter que la CPG montre, en réalité, 16 pics. Malheureusement, nos investigations n'ont permis de caractériser que 8 composés. Ces caractérisations sont effectuées sur la base de la comparaison des temps de rétention, d'un examen minutieux des spectres de masse et aussi le recours aux sites bibliographiques contenant des banques de données informatisées. Le site que nous avons le plus exploité est : <http://webbook.nist.gov/chemistry>

Le pourcentage de caractérisation est estimé à 85.92%. Nous remarquons que l'huile est constituée en grande majorité d'alcools (68.99%). Notons que parmi tous les composés identifiés, l'Octadéca-9,12,15-triène-1-ol représente le composé majoritaire avec plus de 60%. De plus, le camphre est le seul monoterpène oxygéné présent (5.46%). D'autres composés tels que : le nonanal, le pentadécène, l'hexadécyne sont aussi présents.

Afin de compléter notre caractérisation de l'huile de la racine de la *Rhaponticum acaule* L., nous avons exploité une méthode de choix appelée la MEPS (Voire Chapitre IV). En effet, cette technique de préconcentration des composés volatiles à l'état de traces contenus dans les racines, présente de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes. Parmi lesquels, nous citons son coût peu élevé, sa rapidité d'analyse, sa reproductibilité et sa fiabilité. De plus, elle ne nécessite pas de solvant et où la préparation de l'échantillon est très souvent limitée à son prélèvement.

Dans notre cas, nous avons réalisé la MEPS sur un échantillon des racines (5 g) pendant une demi-heure. Ces conditions sont beaucoup plus avantageuses que celles employées lors de l'HD, méthode nécessitant plus de matière végétale et un temps d'extraction plus long (5 heures).

Les résultats de la MEPS couplée aux méthodes chromatographiques (CPG et CPG/SM) sont représentés sur les chromatogrammes suivants (Figures 60 et 61) :

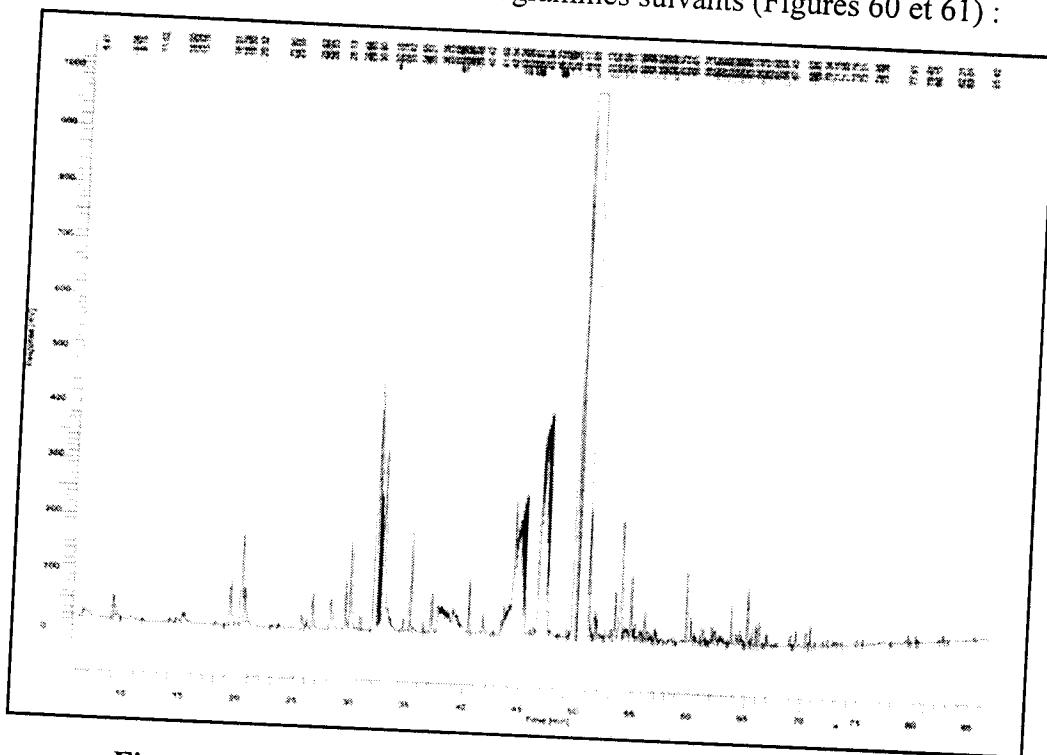


Figure 60 : Chromatogramme enregistré sur colonne polaire.

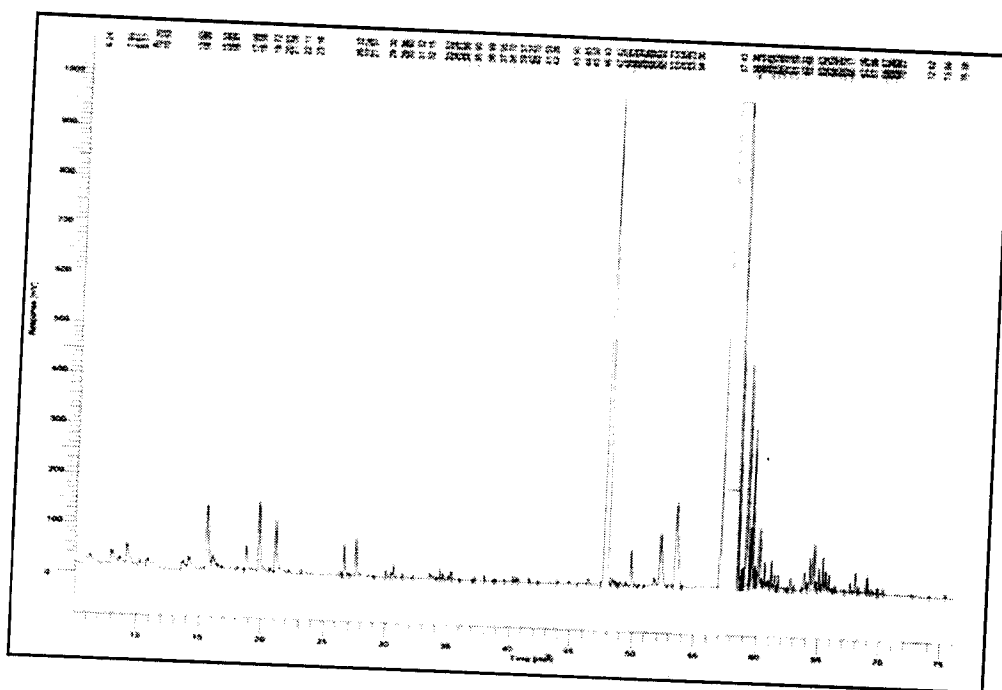


Figure 61 : Chromatogramme obtenu sur colonne apolaire.

A partir de ces analyses, nous dressons le tableau 29 suivant regroupant le complément de la composition chimique de l'huile des racines. Ces composés représentent, au fait, toutes les parties volatiles que nous n'avons pas pu récupérer lors de la HD.

Tableau 29: Composition chimique de la fraction volatile de la *Rhaponticum acaule* L.

Pic	Tr	% Aire	%	Indice	Composés
1	7.989	48.767	0.04	787.16	Hexanal
2	8.614	14.955	0.01	809.41	3-Furancarboxaldéhyde
3	10.198	17.520	0.02	852.68	Hexanol
4	10.828	26.198	0.02	869.90	<i>cis</i> -Heptan-4-al
5	13.605	22.888	0.02	932.71	Benzaldéhyde
6	14.086	28.305	0.03	942.10	<i>cis</i> -Hept-3-ène-1-ol
7	16.024	67.843	0.06	979.95	2-Pentylfurane
8	16.406	3.144	0.00	987.42	(E, E)-Heptadiénal
9	16.737	3.923	0.00	993.89	Trans isolimonène
10	17.991	5.841	0.01	1015.45	Trans-oct-3-ène-2-one
11	18.576	16.777	0.02	1025.06	O-guicol
12	18.723	502.636	0.45	1027.47	Crésol
13	19.716	1.519.231	1.36	1043.77	<i>cis</i> -oct-5-ène-1-ol
14	20.614	5.692	0.01	1058.52	Nonan-2-one
15	21.078	896.845	0.80	1066.14	Octa-3,5-dièn-2-one
16	22.111	3.127	0.00	1083.10	Nonanal
17	23.156	66.584	0.06	1100.25	Dodécane
18	26.602	400.018	0.36	1153.42	Trans-non-2-ène-1-ol
19	27.572	449.485	0.40	1168.39	Dodécatriène
20	29.959	89.925	0.08	1205.24	(E)-Nona-3,8-diène-2-one
21	30.399	64.155	0.06	1212.06	Cuminaldéhyde
22	30.602	165.850	0.15	1215.21	Carvone
23	32.149	42.018	0.04	1239.15	(4Z)-Décèn-1-ol
24	33.523	46.380	0.04	1260.42	(E)-Anéthol
25	34.350	100.500	0.09	1273.22	Undécan-2-one
26	34.610	48.239	0.04	1277.25	Carvacrol
27	46.427	79.888	0.07	1468.62	α -Curcumène
28	48.016	13.576.645	12.17	1495.24	Pentadécène
29	52.216	62.332	1.06	1568.94	Bis-(3,5,5-triméthyl hexyl éther)
30	53.476	2.639.927	2.37	1591.13	(Z)-Hexadécène
31	57.425	67.324.642	60.36	1663.68	Octadéca-9,12,15-triène-1-ol
32	58.357	7.027.531	6.30	1680.91	Octadéc-5-yne ou Eicosyne
33	59.222	3.317.778	2.97	1696.89	Heptadéc-1-ène
34	59.413	460.773	0.41	1700.45	Tétradéc-5-ène-3-yne
35	59.636	1.838.542	1.65	1704.80	α -Santolina alcool
36	60.190	811.519	0.73	1715.59	Tétradéc-3-ène-5-yne
37	64.281	419.057	0.38	1795.34	(E)-Hexadéc-4-èn-6-yne
38	64.588	709.176	0.64	1807.40	Pentadéc-2-yne-1-ol
Composés identifiés			93.28		

L'étude de la partie volatile de l'huile des racines permet la caractérisation 38 composés avec un pourcentage d'identification de 93.28%. La fraction alcool constitue à elle seule plus de 64%.

Nous remarquons que l'Octadéca-9,12,15-triène-1-ol représente le composé majoritaire (60.36%) déjà identifié dans l'analyse précédente. Ce dernier est accompagné de plusieurs produits de nature différente comme les alcools (64.46%), les alcènes dont un produit majoritaire en C₁₅ (17.91%), les alcynes (7.82%), les cétones (0.99%), les monoterpènes oxygénés (Carvone et Carvacrol) (0.19%), les aldéhydes (0.15%), un alcane (Dodécane) (0.06%), un aromatique ((E)-Anéthol) (0.04%) et autres (1.66%), présents avec des pourcentages variés. Ces résultats révèlent la richesse de l'huile en produits oxygénés notamment les alcools.

VI. Conclusion

La *Rhaponticum acaule* L. est une plante très peu connue. Cette étude permet d'initier un certain nombre d'axes de recherche qui pourront être valorisés dans des travaux futurs. En effet, des fractions d'acides gras et insaponifiables sont préparées et seront dans un futur proche analysées. Nous nous sommes aussi intéressés aux deux fractions tannique et glucidique. Cette dernière révèle la présence de deux sucres le D(+)-maltose et le D(+)-sucrose. D'autre part, les constituants chimiques de l'huile essentielle des racines sont identifiés par CPG/SM. Les résultats de cette analyse révèlent la présence de plusieurs composés en proportion variée dont les plus importants sont les alcools et les alcènes.

Bibliographique

- [1] E. C. Bate-Smith, Analysis of tannin: the concept of relative astringency, *Phytochem.*, **1973**, 907-912.
- [2] L.J. Porter, L.N. Hrstich, B.G. Chan, The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin, *Phytochem.*, **1986**, 25, 223-230.
- [3] N. Dohou, K. Yamani, S. Tahrouche, L.M. Idrissi Hassani, A. Badoc, N. Gmira, Screening phytochimique d'une endémique Ibero-Marocaine, *Thymelaea lythroïdes*, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **2003**, 142, 61-78.
- [4] P. Champagnat, G. Figueredo, A. P. Carnat, A. Carnat, J. L. Lamaison, Acides gras et insaponifiables d'extraits obtenus à partir des sommités fleuries et des rhizomes de *Vetiveria nigriflora* (Benth.) Stapf, Poaceae, *OCL*, **Mars-Juin 2006**, 13(2-3), p. 191.
- [5] J. Bruneton, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 2ème Edition, Tec & Doc., Lavoisier, Paris, **1993**, p. 323.
- [6] 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.
- [7] Y. Lv, X. Yang, Y. Zhao, Y. Ruan, Y. Yang, Z. Wang, Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection, *Food chem.*, **2009**, 112, 742-746.
- [8] Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type J.F.Clevenger, *American Perfumer & Essential Oil Review*, **1928**, 467-503.
- [9] Normes AFNOR, Recueil des normes françaises, Huiles essentielles, AFNOR, Paris, **1992**.

Chapitre VI

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.

Le point de fusion a été mesuré avec un fusionomètre digital de la série IA 9200 d'Electrothermal en utilisant des tubes capillaires.

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 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 μm) respectivement apolaire (Rtx-1, Polydiméthyl siloxane) et polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol). 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 μl .

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-1 ; 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.

Le spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (^1H) (300 MHz) a été enregistré sur un appareil Brücker AC 300. La référence interne est le tétraméthylsilane (TMS). Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en ppm. Les constantes de couplage J sont exprimées en Hz. Ces analyses ont été effectuées au niveau du Laboratoire de Chimie des Polymères, université Es-Sénia, Oran.

Partie Expérimentale

I. Examen phytochimique

Afin de caractériser les différentes familles de composés présents dans les racines de la *Rhaponticum acaule* L., nous avons réalisé des tests phytochimiques. Ces derniers sont basés sur des réactions de précipitation ou de coloration en utilisant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés. Au cours de ces tests, trois solvants de polarité croissante (Et_2O , MeOH et H_2O) ont été utilisés.

II. Dosages

II.1. Dosage des composés phénoliques

II.1.1. Méthode d'extraction

Extraction avec Méthanol /Eau

Extraire 0.2 g de la racine sèche avec un mélange MeOH/ H_2O (50/50: v/v) à chaud pendant 1 heure. Ajouter, ensuite, une solution aqueuse du sulfite de sodium à 0.2% à raison de 1 ml pour 100 ml de mélange de solvant afin d'éviter les phénomènes d'oxydation dans l'extrait polyphénolique : solution A.

II.1.2. Dosage des phénols totaux (Méthode de bleu de Prusse)

II.1.2.1. Principe

Cette méthode est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{+3}) en ion ferreux (Fe^{2+}) par les composés phénoliques conduisant à la formation d'un complexe de couleur bleu de Prusse d'où le nom de la méthode.

II.1.2.2. Mode opératoire

Diluer 0.1 ml de la solution A dans 30 ml d'eau distillée. Ajouter 0.5 ml d'une solution de chlorure ferrique acidifiée (FeCl_3 0.1M/HCl 0.1N : v/v) suivie immédiatement de 0.5 ml d'hexacyanoferrate de potassium 0.008 M. Laisser réagir 10 min à température ambiante puis lire l'absorbance à 725 nm.

II.1.2.3. Expression des résultats

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

$$T = A \times \frac{V \times D}{P_s}$$

T : teneur en phénols totaux

A : absorbance à 725 nm

V : volume de l'extrait total

D : facteur de dilution.

P_s : poids de matière sèche

II.1.3. Dosage des tanins condensés

II.1.3.1. Mode opératoire

Mélanger 1 ml de la solution A et 6 ml du réactif (1) dans un tube à essai. Ajouter ensuite 0.2 ml du réactif (2) puis mettre le tube au bain-marie pendant 60 min. Lire attentivement l'absorbance à 550 nm.

Réactifs:

(1) : Butanol-HCl (95/5 : v/v) : Mélanger 95 ml du *n*-butanol avec 5 ml de HCl concentré (37%).

(2) : 2% de sulfate d'ammonium ferrique dans une solution HCl 2N (v/v).

II.1.3.2. Expression des résultats

La formule suivante permet le calcul de la teneur en tanins condensés en équivalent leucocyanidine.

$$T(\%) = 78.26 \times \frac{A \times D}{P_s}$$

T : teneur en tanins condensés

A : Absorbance à 550 nm

D : facteur de dilution

P_s : poids de la matière sèche

II.2. Dosage des saponosides

Dans un ballon équipé d'une agitation magnétique, mettre 10 g de matière végétale sèche dans 100 ml d'eau. Porter à ébullition pendant 30 mn. Après refroidissement et filtration, réajuster le volume à 100 ml. A partir de cette solution mère, préparer 10 tubes à essai avec 1, 2, ... 10 ml. Réajuster le volume final à 10 ml avec de l'eau distillée. Agiter chacun des tubes vigoureusement en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, mesurer la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de 1 cm dans le *x*e tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante :

$$I = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le } x\text{e tube} \times 5/0.0x.$$

Confirmer la présence des saponosides dans la racine de la plante étudiée quand l'indice est supérieur à 100.

III. Extractions et purifications

III.1. Dégraissage des racines

En utilisant l'extracteur du soxhlet, procéder à une extraction de 100 g de racine sèche par l'éther de pétrole ou l'hexane. Filtrer, ensuite, évaporer le solvant. Le résidu obtenu, se présentant sous une forme huileuse, représente la fraction grasse.

III.2. Acides gras et insaponifiables

Dans un ballon de 250 ml surmonté d'un réfrigérant, mettre 2.26 g de la matière grasse puis ajouter 150 ml de la solution éthanolique de KOH 2N. Porter le mélange à reflux pendant 1h 30min. Après refroidissement, ajouter 100 ml d'eau puis extraire les insaponifiables avec 100 ml d'hexane. Acidifier, ensuite, la solution savonneuse jusqu'à précipitation des acides gras (pH compris entre [5-6]). Extraire la phase aqueuse résultante avec 3x100 ml d'Et₂O.

III.3. Estérification des acides gras

Dans un ballon de 250 ml, surmonté d'un réfrigérant, mettre 0.94 g d'acide gras en présence de 50 ml de MeOH. Ajouter lentement 0.5 ml d'H₂SO₄ concentré. Porter l'ensemble à reflux pendant 4h. Interrompre alors le chauffage et ajouter 30 ml d'H₂O. Evaporer le MeOH. Transvaser le contenu du ballon dans une ampoule à décanter contenant 60 ml d'eau glacée. Extraire la phase aqueuse avec du chloroforme. Laver la phase organique avec une solution de NaHCO₃ 10%, puis avec de l'eau. Sécher sur CaSO₄ anhydre puis évaporer le solvant.

III.4. Extraction des polyphénols

III.4.1. Extraction avec Eau/Acétone

Dans un ballon de 500 ml surmonté d'un réfrigérant, mettre 100 g de la racine dégraissée en présence de 180 ml d'eau distillée et 100 ml d'acétone. Porter l'ensemble à reflux pendant 4 jours. Filtrer puis concentrer la solution jusqu'à ce que le milieu ne contienne plus que de l'eau. Extraire, ensuite, la phase aqueuse avec 3x200 ml de CH₂Cl₂, puis avec 3x150 ml d'AcOEt.

III.4.2. Extraction avec Eau/Méthanol

Dans un ballon de 250 ml surmonté d'un réfrigérant, mettre 10 g de racine dégraissée dans un mélange de 50 ml d'eau distillée et 50 ml de CH₃OH. Chauffer le mélange à reflux pendant 4 jours. Filtrer puis concentrer la solution jusqu'à évaporation totale du CH₃OH. Extraire, ensuite, la phase aqueuse avec 4x50 ml de CH₂Cl₂, puis avec 3x50 ml d'AcOEt.

III.5. Extractions par solvants de polarité croissante

Dans un ballon de 500 ml surmonté d'un appareil soxhlet, extraire 250 g de racine, préalablement dégraissée, en utilisant 300 ml d'Et₂O. Après plusieurs siphonages et épuisement

totale de la drogue par le solvant, reprendre le marc respectivement avec à chaque fois 300 ml d'AcOEt, de CH₃OH et d'H₂O dans les mêmes conditions.

III.6. Extraction des huiles essentielles

Nous avons employé une méthode simple pour extraire l'huile essentielle de la *Rhaponticum acaule* L. Elle est basée sur le principe d'une hydrodistillation (HD), une méthode couramment employée utilisant un montage particulier en verre de type Clevenger. Pour compléter l'identification des différents constituants de l'huile, nous avons exploité la technique de micro extraction en phase solide (MEPS).

III.6.1. Extraction avec un montage Clevenger

Dans un ballon de 2l, mettre 250 g de racines finement broyées dans l'eau distillée. Chauffer l'ensemble pendant 5 heures. Les vapeurs refroidies décantent, et grâce au système Clevenger la quantité d'eau au sein du ballon reste quasiment la même tout au long de la distillation. Séparer l'huile essentielle obtenue, puis peser.

Aucun solvant organique n'est utilisé au cours de ce protocole. Les huiles essentielles ainsi obtenues sont directement analysées.

III.6.2. MEPS

Placer 5g de la racine finement broyée dans un flacon en verre. Boucher puis sertir le flacon minutieusement. Après 2 heures d'équilibre, percer le septum avec l'aiguille contenant la fibre. Immerger, ensuite, la fibre dans l'espace de tête par pression sur le piston, pendant 30 min. Optimiser la température d'extraction à 90°C.

La fibre utilisée est une fibre triple (DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm, 2 cm) avec : DVB : Divinyl benzène ; CAR : Carboxen et PDMS : Polydiméthyl siloxane.

III.6.3. Analyses

La composition chimique des huiles essentielles est déterminée par CPG et CPG/SM.

III.6.3.1. Analyse CPG

L'analyse CPG est effectuée à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem GC, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID), d'un injecteur diviseur et de deux colonnes (60m x 0.22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0.25 µm) respectivement polaire (RTx-Wax, Polyéthylène glycol) et apolaire (RTx-1, Polydiméthyl siloxane).

Nous avons employé les conditions opératoires décrites ci-dessous :

- La température de l'injecteur est de 250°C, et celle du détecteur de 280°C. La programmation de la température est de 60 à 230°C, à raison 2°C/min, puis un palier de 45 min à 230°C.
- L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50.
- La quantité d'huile essentielle injectée est de 0.2 µl.

- Le gaz vecteur est l'hélium (1ml/mn) avec une pression en tête de colonne de 25 p.s.i.

Pour chacun des composés, les indices de rétention polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane.

III.6.3.2. Couplage CPG/SM

L'analyse CPG/SM est réalisée à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60m x 0.22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0.25 μ m) polaire (RTx-Wax) et apolaire (RTx-1), couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer Turbo Mass.

Nous avons utilisé les conditions opératoires suivantes :

- La température de l'injecteur est de 250°C, la programmation de température est de 60°C à 230°C à raison de 2°C/min puis un palier de 35 min à 230°C.
- L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80.
- La quantité d'huile essentielle injectée est de 0.2 μ l.
- La détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. La température de la source est de 150°C.
- Le gaz vecteur est l'hélium (1ml/min) avec une pression en tête de colonne de 25 p.s.i.

III.6.3.3. Identification des constituants de l'huile

Nous avons réalisé l'identification de l'huile par exploitation des spectres de masse de ses constituants et aussi en comparant leurs indices de rétention avec ceux des composés standards regroupés dans les banques de données informatisées (Wiley, Adams, Joulain, Nist, Arômes).

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Le présent travail apporte une modeste contribution à la valorisation des plantes médicinales de la flore d'Algérie. Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux racines de la *Rhaponticum acaule* L. (Astéracées), connue dans la région de l'ouest algérien pour ses vertus thérapeutiques : stomachique, tonique, etc.

L'intérêt que nous portons à cette partie de la plante, à pour origine, une enquête ethnopharmacologique réalisée auprès des herboristes et tradipraticiens sur les plantes médicinales.

Au cours de nos travaux, nous avons, tout d'abord, mis en évidence les constituants chimiques des racines. En effet, les tests chimiques qualitatifs de coloration et de précipitation ont permis de caractériser la présence des composés réducteurs et des polyphénols. D'autres familles de composés sont aussi présentes en quantité variable, notamment, les acides gras, huile essentielle, saponosides, etc.

Pour estimer la teneur des racines fraîches en composés chimiques, des dosages sont réalisés. Ces derniers révèlent la présence d'une faible quantité de saponosides prouvée par un indice de mousses inférieur à 100. De plus, ils montrent que la teneur en phénols totaux (50.85 mg/g de matière sèche) est plus élevée que celle des tanins condensés, mesurée par référence à la leucocyanidine (1.95%).

Après ces résultats, nous avons abordé plusieurs axes de recherche dont les plus importants se rapportent à :

- Extraction des acides gras et insaponifiables.
- Etude des tanins dans les racines de la *Rhaponticum acaule* L.
- Essais d'isolement et d'identification de la fraction glucidique résultante de l'hydrolyse des glycosides.
- L'usage des techniques chromatographiques telles que CPG et CPG/SM pour la caractérisation de l'huile essentielle des racines.

Nous espérons dans des travaux futurs :

- Approfondir nos investigations sur la racine de la *Rhaponticum acaule* L. en utilisant des techniques spectrales performantes pour la caractérisation des produits isolés.
- Evaluation des activités biologiques (antimicrobiennes, antioxydantes, antiulcéreuses, etc.) des extraits obtenus.