

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique



Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Alimentaires

# Polycopié de cours

2<sup>ème</sup> Cycle : Master  
Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire

Matière :

## Méthodes d'extraction et d'analyse des substances bioactives d'origine végétale

Présenté par :  
**Dr BRAHMI Fatiha**  
Enseignante-Chercheur



Année Universitaire : 2022/2023

## ***Avant-propos***

Ce polycopié est un appui d'une section du cours ``Substances Bioactives Appliquées à l'Agroalimentaire``. Il est intitulé : « Méthodes d'extraction et d'analyse de substances bioactives d'origine végétale » et il est assuré pour les étudiants de master II Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire (QPSA). Ce cours est scindé en trois grands chapitres dont l'un est dépendant de l'autre. Le premier chapitre est dédié à la présentation des substances bioactives d'origine végétale où l'importance est donnée à trois grandes catégories qui sont les dérivés phénols, les dérivés terpène et les dérivés azotés dont les alcaloïdes. Pour chaque catégorie, la définition de la classe de composés, leur classification, leurs sources végétales, et des exemples de structures de composés sont donnés. Le deuxième chapitre est consacré aux méthodes utilisées pour l'extraction des substances bioactives en occurrences les méthodes conventionnelles et innovantes dont les principes des techniques et leur mise en place ont été illustrés. Dans le troisième chapitre, les techniques d'analyse des substances bioactives ont été abordées où un accent est mis sur les méthodes de mise en évidence, d'identification et de séparation des produits naturels.

Le contenu de ce cours est d'intérêt majeur pas seulement pour les étudiants de la spécialité susmentionnée mais aussi pour les étudiants de d'autres spécialités du domaine sciences de la nature et de la vie. Il peut même servir pour la préparation des mémoires fin de cycles et pour les étudiants de post-graduation de différentes disciplines faisant leurs travaux de recherche sur les substances naturelles bioactives.

# Table des matières

<b>I. Présentation des substances bioactives d'origine végétale .....</b>	<b>1</b>
I.1. Définition d'un composé bioactif .....	1
I.2. Composés de type phénols .....	1
I.2.1. Définition.....	1
I.2.2. Classification .....	2
I.3. Composés de type terpène.....	11
I.3.1. Définition .....	11
I.3.2. Classification .....	12
I.4. Composés de type azotés .....	30
I.4.1. Alcaloïdes.....	30
I.4.1.1. Définition .....	30
I.4.1.2. Classification .....	31
<b>II. Procédés d'extraction des substances naturelles bioactives .....</b>	<b>39</b>
II .1. Historique sur l'extraction .....	39
II. 2. Définition de l'extraction .....	39
II. 3. Techniques d'extraction traditionnelles .....	41
II.3.1. Percolations .....	41
II.3.2. Enfleurage .....	41
II.3.3. Pressage .....	42
II.3.4. Infusions .....	43
II.3.5. Décoctions .....	43
II.3.6. Macérations .....	44
II.3.7. Extraction par distillation .....	46
II.3.8. Extraction par Soxhlet .....	49
II.3.9. Extraction en mode batch .....	50
II. 4. Techniques nouvelles.....	52
II.4.1. Extraction accélérée par solvant .....	52
II.4.2. Extraction assistée par sonication .....	54
II.4.3. Extraction assistée par microondes .....	57
II.4.4. Extraction au CO <sub>2</sub> supercritique .....	65

<b>III. Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation .....</b>	<b>73</b>
III.1. Tests rapides confirmant l'existence des métabolites secondaires dans un extrait .....	73
III.1.1. Réaction colorés .....	73
III.1.2. Tests de mise en évidence par CCM .....	76
III.2. Techniques de séparation et purification de métabolites secondaires ..	80
III.2.1. Extraction (partage) liquide-liquide .....	80
III.2.2. Méthodes chromatographiques .....	84
III.2.2.1. Chromatographie à Contre Courant .....	85
III.2.2.2. Chromatographie sur colonne .....	87
III.2.2.3. Flash chromatographie .....	90
III.2.2.4. Chromatographie Liquide sous Vide .....	91
III.2.2.5. Chromatographie d'exclusion .....	92
III.2.2.6. Chromatographie liquide moyenne pression .....	94
III.2.2.7. Chromatographie sur couche mince .....	95
III.2.2.8. Chromatographie sur couche mince haute performance .....	98
III.2.2.9. Chromatographie liquide à haute performance ...	101
III.2.2.10. Chromatographie en phase gazeuse .....	103
III.3. Techniques d'identification spectrophotométriques des métabolites secondaires .....	106
III.3.1. Spectrométrie UV/Visible .....	106
III.3.2. Spectrométrie de masse .....	108
III.3.3. Spectrométrie d'infrarouge .....	113
III.3.4. Résonance magnétique nucléaire .....	117

## Liste des figures

---

<b>Figure 1.</b> Squelette phénylbenzopyrane, structure de base des flavonoïdes	<b>2</b>
<b>Figure 2.</b> Différentes familles de flavonoïdes .....	<b>6</b>
<b>Figure 3.</b> Structures des acides phénoliques .....	<b>10</b>
<b>Figure 4.</b> D'autres composés phénoliques non flavonoïdes .....	<b>11</b>
<b>Figure 5.</b> Origine de différents types d'alcaloïdes .....	<b>31</b>
<b>Figure 6.</b> Structures squelettiques des alcaloïdes de base dans les produits naturels .....	<b>32</b>
<b>Figure 7.</b> Structures de bétacyanine et de bétaxanthine .....	<b>34</b>
<b>Figure 8.</b> Structure des bétalaïnes naturelles .....	<b>35</b>
<b>Figure 9.</b> Schéma de la dissociation d'une molécule de glycoside cyanogène .....	<b>37</b>
<b>Figure 10.</b> Schéma de la dissociation d'une molécule de glucosinolates ...	<b>38</b>
<b>Figure 11.</b> Extraction par percolation (lixiviation).....	<b>41</b>
<b>Figure 12.</b> Enfleurage de pétales de rose .....	<b>42</b>
<b>Figure 13.</b> Extraction par pressage .....	<b>43</b>
<b>Figure 14.</b> Extraction par infusion .....	<b>43</b>
<b>Figure 15.</b> Extraction par décoction .....	<b>44</b>
<b>Figure 16.</b> Extraction par macération .....	<b>46</b>
<b>Figure 17.</b> Processus de l'hydro-distillation en continu des plantes .....	<b>47</b>
<b>Figure 18.</b> Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau .....	<b>48</b>

---

---

<b>Figure 19.</b> Montage d'hydrodiffusion .....	<b>49</b>
--	-----------

---

<b>Figure 20.</b> Représentation schématique d'un extracteur Soxhlet .....	<b>50</b>
--	-----------

---

<b>Figure 21.</b> Photographie de l'agitateur secoueur utilisé pour l'extraction batch. ....	<b>51</b>
--	-----------

---

<b>Figure 22.</b> Montage de l'extraction par liquide pressurisé et schéma simplifié d'une cellule d'extraction PLE .....	<b>53</b>
---	-----------

---

<b>Figure 23.</b> Classification du son selon les fréquences .....	<b>54</b>
--	-----------

---

<b>Figure 24.</b> Appareillages utilisés pour l'extraction aux ultrasons .....	<b>54</b>
--	-----------

---

<b>Figure 25.</b> Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation .....	<b>55</b>
---	-----------

---

<b>Figure 26.</b> Formation des bulles de cavitation au cours de l'extraction aux ultrasons .....	<b>55</b>
---	-----------

---

<b>Figure 27.</b> Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide .....	<b>56</b>
--	-----------

---

<b>Figure 28.</b> Mécanisme de dommage cellulaire par ultrasons .....	<b>57</b>
---	-----------

---

<b>Figure 29.</b> Représentation du spectre électromagnétique et positionnement des micro-ondes domestiques .....	<b>59</b>
---	-----------

---

<b>Figure 30.</b> Schéma d'un four micro-ondes monomode (A) et multimode (B) .....	<b>59</b>
--	-----------

---

<b>Figure 31.</b> Dispositif d'extraction par microonde .....	<b>60</b>
---	-----------

---

<b>Figure 32.</b> Transferts thermiques sous les deux modes de chauffage .....	<b>61</b>
--	-----------

---

<b>Figure 33.</b> Représentation schématique du comportement de molécules possédant un dipôle en l'absence de champ électrique, sous l'effet d'un champ électrique continu et sous l'effet d'un champ électrique de haute fréquence .....	<b>62</b>
---	-----------

---

<b>Figure 34.</b> Etapes de l'extraction des substances bioactives à partir de la matière végétale .....	<b>63</b>
--	-----------

---

---

<b>Figure 35.</b> Extraction par solvant assistée par micro-ondes .....	<b>63</b>
<b>Figure 36.</b> Entraînement à l'air assisté par micro-ondes .....	<b>64</b>
<b>Figure 37.</b> Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite (VMHD) .....	<b>65</b>
<b>Figure 38.</b> Diagramme de phases d'un corps pur .....	<b>66</b>
<b>Figure 39.</b> Changement de phase de dioxyde de carbone supercritique ...	<b>68</b>
<b>Figure 40.</b> Phénomène d'agrégation dans un fluide supercritique .....	<b>68</b>
<b>Figure 41.</b> Schéma simplifié d'une opération d'extraction au CO <sub>2</sub> SC avec séparation par détente .....	<b>70</b>
<b>Figure 42.</b> Allure générale d'une cinétique d'extraction .....	<b>71</b>
<b>Figure 43.</b> Appareillage utilisé pour l'extraction au CO <sub>2</sub> supercritique .....	<b>72</b>
<b>Figure 44.</b> Coloration obtenues au cours de la mise en évidence des alcaloïdes .....	<b>75</b>
<b>Figure 45.</b> Mise en évidence des stérols et terpènes par CCM .....	<b>78</b>
<b>Figure 46.</b> Mise en évidence des flavonoïdes par CCM .....	<b>78</b>
<b>Figure 47.</b> Mise en évidence des coumarines par CCM .....	<b>79</b>
<b>Figure 48.</b> Tannins révélés par FeCl <sub>3</sub> dans le visible (gris, brun) .....	<b>79</b>
<b>Figure 49.</b> Saponines révélés sous UV/366 nm.....	<b>79</b>
<b>Figure 50.</b> Alcaloïdes révélés dans le visible (orange) .....	<b>80</b>
<b>Figure 51.</b> Extraction liquide-liquide à l'aide d'une ampoule à décanter .....	<b>81</b>
<b>Figure 52.</b> Principe de partage des composés entre les deux phases au cours d'une extraction liquide-liquide.....	<b>81</b>
<b>Figure 53.</b> Partage liquide-liquide des extraits bruts au dichlorométhane	

---

(DCM) et au butanol .....	82
<b>Figure 54.</b> Organigramme de partage liquide-liquide par polarité ascendante d'un extrait brut .....	83
<b>Figure 55.</b> Photographie d'une colonne de 200 mL d'un appareil Fast CPC et détail d'un des disques constitutifs de la colonne.....	85
<b>Figure 56.</b> Représentation schématique des modes ascendant et descendant en CPC .....	86
<b>Figure 57.</b> Représentation schématique du système de fractionnement par CPC .....	87
<b>Figure 58.</b> Séparation des composés d'un mélange par chromatographie sur colonne .....	89
<b>Figure 59.</b> Résultats de la séparation par C.C de l'extrait d'acétate d'éthyle révélé par l'acide sulfurique.....	90
<b>Figures 60.</b> Avantages de la chromatographie Flash .....	91
<b>Figure 61.</b> Chromatographie d'exclusion .....	93
<b>Figure 62.</b> Exemple d'une plaque illuminée sous lumière blanche et sous lumière UV à 254 et 366 nm .....	96
<b>Figure 63.</b> Schéma d'une plaque développée .....	97
<b>Figure 64.</b> Profil chromatographique d'extraits hydrolysés et non hydrolysés des espèces du genre <i>Mentha</i> sur gel de silice 60 F <sub>254</sub> .....	98
<b>Figure 65.</b> Différentes composantes de l'HPTLC .....	99
<b>Figure 66.</b> Densitogramme obtenu à partir d'un profil visuel.....	100
<b>Figure 67.</b> Profils HPTLC d'extraits de menthes et de l'acide rosmarinique sous UV366 et 254 nm .....	100
<b>Figure 68.</b> Chromatogramme en HPLC de scopolamine (tr= 7,64 min) et de l'atropine (tr = 13,37 min).....	102
<b>Figure 69.</b> Profils HPLC d'une espèce du genre <i>Mentha</i> .....	103

---

<b>Figure 70.</b> Chromatogramme de l'huile essentielle d'une plante obtenue par GC-MS .....	<b>105</b>
<b>Figure 71.</b> Spectre UV/Vis des flavonoïdes .....	<b>107</b>
<b>Figure 72.</b> Spectres en spectroscopie Ultra-Violette de la fraction à l'acétate d'éthyle des feuilles de <i>Alchornea cordifolia</i> .....	<b>108</b>
<b>Figure 73.</b> Mécanisme de l'ionisation par electrospray .....	<b>110</b>
<b>Figure 74.</b> Schéma de fragmentation des squelettes chalcone et flavanone par spectrométrie de masse .....	<b>111</b>
<b>Figure 75.</b> Spectre de masse EI de composée triterpénique <i>des feuilles de Agauriak Polyphylla</i> .....	<b>111</b>
<b>Figure 76.</b> Spectre de masse d'ester méthylique de l'acide coumarique ..	<b>112</b>
<b>Figure 77.</b> Décomposition de d'ester méthylique de l'acide coumarique .	<b>112</b>
<b>Figure 78.</b> Spectre infrarouge.....	<b>113</b>
<b>Figure 79.</b> Caractéristiques d'un spectre infrarouge .....	<b>114</b>
<b>Figure 80.</b> Spectre infrarouge du taxol .....	<b>115</b>
<b>Figure 81.</b> Spectres FTIR d'une fraction d'un extrait hexanique d' <i>Alchornea cordifolia</i> .....	<b>116</b>
<b>Figure 82.</b> Principe de la spectroscopie de la RMN du proton. ....	<b>117</b>
<b>Figure 83.</b> Zone du signal de différents protons.....	<b>118</b>
<b>Figure 84.</b> Spectre de RMN <sup>13</sup> C d'un composé. ....	<b>118</b>
<b>Figure 85.</b> Paramètres influant l'identification d'une structure à partir d'un spectre. ....	<b>120</b>
<b>Figure 85.</b> Spectre RMN du squalène.....	<b>120</b>
<b>Figure 78.</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) d'un composé isolé d'une plante.....	<b>121</b>
<b>Figure 79.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) d'un composé isolé d'une plante .....	<b>121</b>

---

## Liste des tableaux

---

**Tableau I.** Classes de flavonoïdes, exemples de composés et leurs sources .4

---

**Tableau II.** Composés non flavonoïdes et autres composés phénoliques, exemples de composés et leurs sources .....9

---

**Tableau III.** Classification des terpénoïdes ..... 12

---

**Tableau IV.** Structures chimiques, origines et habitats des hémiterpénoïdes ..... 13

---

**Tableau V.** Structures chimiques, origines et habitats des monoterpénoïdes ..... 14

---

**Tableau VI.** Structures chimiques, origines et habitats des iridoïdes ..... 16

---

**Tableau VII.** Structures chimiques, origines et habitats des sesquiterpénoïdes ..... 17

---

**Tableau VIII.** Trois groupes majeurs des sesquiterpène lactones ..... 19

---

**Tableau IX.** Structures chimiques, origines et habitats de diterpénoïdes 21

---

**Tableau X.** Structures chimiques, origines et habitats des triterpénoïdes et stéroïdes représentatifs ..... 23

---

**Tableau XI.** Structures chimiques, origines et habitats des caroténoïdes . 27

---

**Tableau XII.** Structures chimiques, origines et habitats des caoutchoucs ..... 28

---

**Tableau XIII.** Structures chimiques, origines et habitats de terpénoïdes irréguliers ..... 29

---

---

<b>Tableau XIV.</b> Principales espèces végétales productrices de bétalaïnes. ....	<b>36</b>
<b>Tableau XV.</b> Classification des solvants utiles pour les extractions végétales .....	<b>45</b>
<b>Tableau XVI.</b> Coordonnées critiques de quelques composés .....	<b>66</b>
<b>Tableau XVII.</b> Propriétés physico-chimiques typiques des états gazeux, liquide et supercritique .....	<b>67</b>
<b>Tableau XVIII.</b> Révélation des familles chimiques par CCM .....	<b>77</b>
<b>Tableau XXIV.</b> Comparaison entre CCM et HPTLC .....	<b>99</b>
<b>Tableau XX.</b> Analyse des données de la spectroscopie UV des composés d'une fraction.....	<b>106</b>
<b>Tableau XXI.</b> Exemples de composés volatils identifiés par GC/MS dans une huile essentielle .....	<b>108</b>
<b>Tableau XXII.</b> Analyse du spectre infrarouge du taxol .....	<b>115</b>

---



### I.1. Définition d'un composé bioactif

Un composé bioactif est une molécule (ou ensemble de molécules) issue du vivant pouvant avoir des propriétés bénéfiques sur la santé. Les composés bioactifs peuvent avoir une origine animale, végétale, ou être issus de micro-organismes mais, dans ce polycopié nous allons nous concentrer sur les composés issus de végétaux.

Les substances bioactives sont issues du métabolisme secondaire qui par exclusion, n'appartient pas au métabolisme primaire. Ce dernier est indispensable à la nutrition, il assure la croissance et le développement d'un organisme. Tandis que, les métabolites secondaires participent à la vie de relation de la plante (ou de leur organisme hôte), et ils ont des rôles très variés. Ils peuvent servir de défense (sécrétions amères ou toxiques pour les prédateurs) ou au contraire, attirer certaines espèces ayant des rôles bénéfiques. Ils peuvent également permettre la communication entre les plantes, ou faire partie de la structure de la plante.

À ce jour, plus de 100 000 métabolites secondaires ont été identifiés et il est estimé que chaque végétal produit au moins une centaine de molécules différentes. Les métabolites secondaires se classent en de nombreux groupes, dont les trois grands chez les plantes sont de :

- ◆ De type *phénol* : tannins, lignines, flavonoïdes.
- ◆ De type *azoté* : alcaloïdes, bétalaines, hétérosides cyanogènes et glucosinolates.
- ◆ De type terpène.

### I.2. Composés de type phénols

#### I.2.1. Définition

Les composés phénoliques sont des molécules aromatiques constituées d'un groupement phényle (C6) et d'un hydroxyle (-OH). La plupart de ces composés dérivent d'acides aminés aromatiques : la tyrosine et la phénylalanine. Ils sont typiques des plantes vasculaires et omniprésents

dans la plupart des tissus végétaux, y compris les parties comestibles telles que les fruits, les graines, les feuilles, les tiges, les racines, etc.

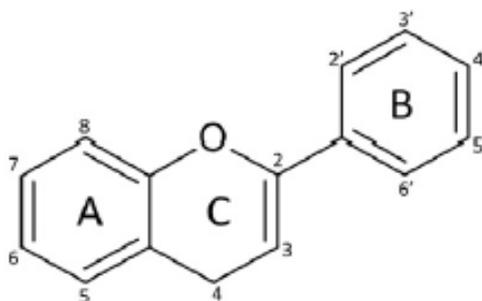
Il y a plus que 8000 composés phénoliques, avec une grande variabilité structurale ; ils peuvent être classés en deux groupes principaux : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

### I.2.2. Classification

#### A/Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés phénoliques les plus abondants dans les fruits et légumes, ils représentent près des deux tiers des composés phénoliques alimentaires ; et, en tant que groupe, ils sont les plus bioactifs. Ils contiennent un squelette phényl benzopyrane : deux cycles phényle (**A et B**) reliés par un hétérocycle de type pyrane (**Cycle C** ; Figure 1).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en six groupes ou familles, selon les différences dans le cycle pyrane. Dans chaque famille, les composés individuels diffèrent par leur schéma d'hydroxylation et de méthylation des cycles A et B. Le squelette de base et la numérotation des atomes de carbone dans les flavonoïdes sont illustrés dans la Figure 1.



**Figure 1.** Squelette phénylbenzopyrane, structure de base des flavonoïdes.

■ **Les flavones** : ont la structure la plus basique des flavonoïdes. Ils contiennent un groupe céto en C4, une double liaison entre C2 et C3 et le cycle B est attaché à C2. Les flavones les plus abondantes dans les fruits et légumes comprennent l'apigénine, la lutéoline et leurs glycosides (Figure 2), dans lesquels un glucide (mono- ou disaccharide) est lié à la fraction flavonoïde (appelée aglycone) par l'intermédiaire d'un OH.

■ **Les isoflavones** : sont des flavones dans lesquelles le cycle B est attaché à C3 au lieu de C2. Cette caractéristique structurale fait que les isoflavones ressemblent aux œstrogènes de sorte qu'elles possèdent une activité œstrogénique légère et sont connus sous le nom de phytoestrogènes.

■ **Les flavonols** : sont des flavones hydroxylées en C3. Ils font partie des meilleurs flavonoïdes antioxydants en raison de leur schéma d'hydroxylation, où l'OH en C3 est censé augmenter la stabilité du flavonoïde radical formé une fois que le composé a agi comme capteur de radicaux. Ce sont également les flavonoïdes les plus abondants dans les fruits et légumes.

■ **Les flavanones et les dihydroflavonols (ou flavanonols)** : le cycle C présente un groupe pyrane saturé (pas de double liaison entre C2 et C3), ils possèdent également le groupe céto en C4 et les dihydroflavonols contiennent un OH en C3.

### *Remarque*

Les flavanones et les dihydroflavonols, ainsi que d'autres flavonoïdes non conventionnels (chalcones et aurones), sont considérés comme des flavonoïdes mineurs car ils ne sont pas abondants dans la nature.

■ **Les flavanols ou flavan-3-ols** : n'ont pas la double liaison entre C2 et C3 et le groupe oxo en C4, et contiennent un OH en C3. Ces caractéristiques structurales deviennent C2 et C3 au niveau de cycle C dans les centres chiraux puisque quatre groupes différents sont attachés à chacun de ces atomes de carbone, les flavan-3-ols possèdent donc plusieurs configurations différentes. Les flavan-3-ols sont rarement trouvés sous forme de glycosides. Les catéchines et les épicatechines sont des stéréoisomères en C3 (comme pour les gallocatéchines et les épigallocatéchines) ; tandis que les gallates sont estérifiés avec de l'acide gallique en C3.

Les flavan-3-ols oligomères sont appelés **pronathocyanidines** (car la dégradation acide en présence d'alcools donne des anthocyanidines libres),

tandis que les formes polymères sont appelées **tannins condensés**, bien que les termes soient généralement interchangeables.

Les proanthocyanidines de type B sont constituées de flavan-3-ols réunis par une liaison C-C, tandis que dans les composés de type A, les unités monomères sont reliées par deux liaisons ; les deux types peuvent être constitués uniquement de catéchine/épicatéchine (procyanidines) ou contiennent également des unités de gallocatéchine/épigallocatéchine (prodelphinidines).

### *Remarque*

Les flavan-3-ols sont les flavonoïdes les plus abondants dans la nature. Leur formes polymériques et oligomériques sont les composés phénoliques d'origine végétale les plus abondants.

■ **Les anthocyanidines** : comme les flavan-3-ols, ne présentent pas de groupe céto en C4 et possèdent un OH en C3, et deux doubles liaisons dans le cycle C ; en raison de ces structures caractéristiques, ce sont les seuls flavonoïdes ioniques.

Le squelette de base des anthocyanidines est le cation flavilium, qui confère à ces flavonoïdes une propriété : elles constituent le groupe le plus important et probablement les plus importants pigments végétaux solubles dans l'eau et leurs changements de couleur en fonction du pH de la matrice. Par exemple, à faible pH, ils apparaissent roses ; violet dans des conditions neutres et jaune verdâtre à pH basique, ce qui en fait des indicateurs de pH naturels. Si le pH est très alcalin, ils sont incolores.

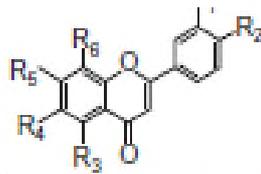
Dans la nature, les anthocyanidines sont invariablement glycosilées, formant des anthocyanes, la plupart des glycosylations se produisent en C3, bien qu'elles soient également fréquentes en C7 et C5. Presque tous les anthocyanes glycosylés sont dérivés de six anthocyanidines : la pélargonidine, la cyanidine, la delphinidine, la péonidine, la pétunidine et la malvidine (Figure 2).

Le tableau I illustre les différentes classes de flavonoïdes avec des exemples de principaux composés et leurs sources.

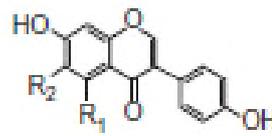
**Tableau I.** Classes de flavonoïdes, exemples de composés et leurs sources.

Classe de composé	Exemples de principaux composés	Source de composés
<b>Flavones</b>	L'apigénine, la lutéoline et leurs glycosides	Les herbes et les épices : le céleri, le persil, le thym; certains fruits : cantaloup et la pastèque, et les légumes : les piments doux et forts, le chou chinois et les artichauts.
<b>Isoflavones</b>	La daidzéine, la génistéine et la glycitéine et leurs 7-O-glycosides : daidzine, génistine, et la glycitine, respectivement	Les fèves de soja et les produits à base de soja ; d'autres légumineuses : les haricots communs et les cacahuètes.
<b>Flavonols</b>	Le kaempférol, la quercétine et la myricétine et leurs glycosides.	Le kaempférol : chou frisé et divers légumes-feuilles et les herbes (aneth et estragon), les haricots communs et les baies (les raisins). La quercétine : les baies, les cerises, les pommes, les artichauts, le chou chinois, les piments forts, la laitue et l'oignon. La myricétine : les baies et les noix.
<b>Flavanones</b>	La naringénine, l'ériodictyol et l'hespérétine.	Les agrumes et les jus et dans certaines herbes comme l'origan mexicain et la menthe poivrée.
<b>Flavanonols</b>	La taxifoline (ou dihydroquercétine).	L'origan mexicain.
<b>Flavanols (pronathocyanidines)</b>	La catéchine, l'épicatéchine, la gallocatéchine, l'épigallocatéchine, leurs polymères et oligomères 3-O-gallates.	Le thé, le chocolat, le vin rouge, les noix, le raisin, la fraise, la mûre, la pêche, la nectarine, la pomme et les jus de fruits.
<b>Anthocyanidines</b> <b>Forme glycosylée : anthocyanes</b>	La pélagonidine, la cyanidine, la delphinidine, la péonidine, la pétunidine et la malvidine.	Les baies, les fruits colorés : les raisins, les cerises, les prunes, les nectarines, les pêches et les légumes comme les haricots noirs, la laitue rouge et l'oignon rouge.

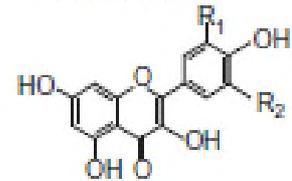
**Flavones**



**Isoflavones**



**Flavonols**

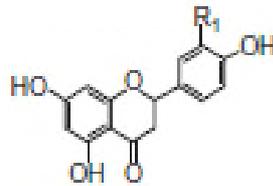


	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Apigénine	H	OH	OH	H	OH	H
Lutéoline	OH	OH	OH	H	OH	H
Tangerétine	H	OCH <sub>3</sub>				
Nobiletine	OCH <sub>3</sub>					

	R1	R2
Daidzeine	H	H
Genistéine	OH	H
Glycitéine	H	OCH <sub>3</sub>

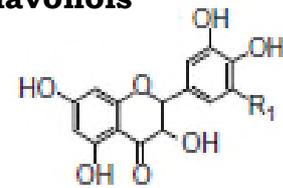
	R1	R2
Kaempférol	H	H
Quercétine	OH	H
Myricétine	OH	OH

**Flavanones**



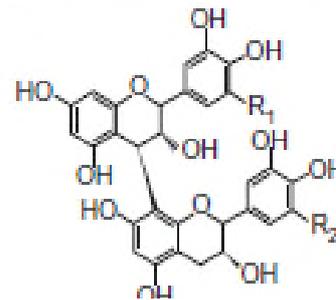
	R1
Naringénine	H
Eriodictyol	OH
Hespéritine	OCH <sub>3</sub>

**Dihydroflavonols**



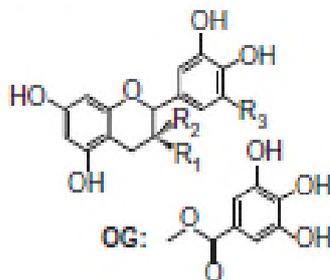
	R1
Taxifolin	H
Ampelopsine	OH

**Proanthocyanidines (oligomère flavan-3-ols)**



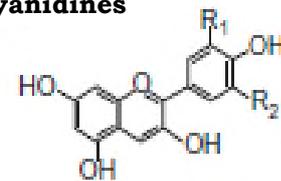
	R1	R2
Procyanidine B1 RC -(4b-8)-c	H	H
Prodelfinidine B1 RGC-(4b-8a-GC	OH	OH

**Flavan-3-ols (monomères)**



	R1	R2	R3
(+) catéchine	OH	H	H
(-) épicatechine	H	OH	H
(+) gallocatéchine	OH	H	OH
(-) épigallocatéchine	H	OH	OH
(+) catéchine gallate	OG	H	H
(-) épicatechine gallate	H	OG	H
(+) gallocatechine gallate	OG	H	OH
(-) épigallocatéchine gallate	H	OG	OH

**Anthocyanidines**



	R1	R2
Pélagonidine	H	H
Cyanidine	OH	H
Delphinidine	OH	OH
Peonidine	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidine	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Figure 2. Différentes familles de flavonoïdes.

### B/Non flavonoïdes

Le groupe des non flavonoïdes comprend des composés phénoliques avec des structures chimiques très diverses, la plupart d'entre eux sont plus petits et plus simples que les flavonoïdes, mais il y a aussi certains composés avec des structures complexes et des poids moléculaires élevés. Le groupe le plus important de non flavonoïdes est celui des acides phénoliques, qui contiennent un seul groupe phényle substitué par un groupe carboxylique et un ou plusieurs groupes OH.

◆ **Les acides phénoliques** : peuvent être divisés en *acides hydroxybenzoïques*, *acides hydroxycinnamiques* et *autres acides hydroxyphényles* (acétique, propanoïque et pentaénoïque), différant entre eux par la longueur de la chaîne contenant le groupe carboxylique.

► *Les acides hydroxybenzoïques* : ils ont une structure de base de type C6-C1 (Figure 3) et sont rarement trouvés sous leur forme libre, ils apparaissent généralement glycosylés, liés à de petits acides organiques (quiniques, maléïques ou tartriques) ou liés à des composants structuraux des cellules végétales (cellulose, protéines ou lignine). Autres dérivés communs des acides hydroxybenzoïques, les aldéhydes hydroxybenzoïques comme la vanilline (dérivé de l'acide vanillique) et le syringaldéhyde (de l'acide syringique).

Parfois, l'acide gallique forme des structures complexes avec des carbohydrates, appelés **tannins hydrolysables**, qui peuvent être subdivisés en :

- *Gallotannins*, qui fournissent du sucre et de l'acide gallique lors de l'hydrolyse.
- *Ellagitannins*, qui produisent également du sucre et de l'acide ellagique (un dimère de l'acide gallique ; Figure 3).

► *Les acides hydroxycinnamiques* possèdent un squelette basique de type C6-C3 (phénylpropanoïde) (Figure 3). Comme pour les autres acides

phénoliques, les acides hydroxycinnamiques sont presque toujours liés à de petites ou grandes molécules.

### Remarque

Dans l'ensemble, les acides phénoliques représentent près d'un tiers des composés phénoliques alimentaires, donc les flavonoïdes plus les acides phénoliques constituent la grande majorité des composés phénoliques des produits comestibles.

### C/Autres composés

Certains composés phénoliques ne sont pas inclus dans ces groupes de flavonoïdes et non flavonoïdes mais sont des composants caractéristiques voire majeurs de certains fruits, légumes ou autres produits alimentaires. Parmi ces composés :

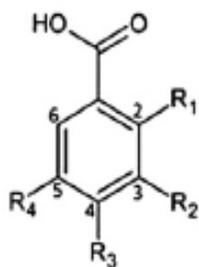
- ▶ Les *lignanes* sont formés de deux phénylpropanoïdes (C6-C3-C3-C6).
- ▶ Les *chalcones* et les *dihydrochalcones* peuvent être considérés comme des flavonoïdes en raison de leur structure de base C6-C3-C6 ; cependant, la chaîne C3 n'est pas fermée, formant un cycle pyranne.
- ▶ Les *stilbènes* ont un squelette C6-C2-C6 ; ce sont des nonflavonoïdes typiques du raisin et du vin.
- ▶ Les *furanocoumarines* (squelette de type furano benzopyrane) sont une classe de coumarines.
- ▶ Les *composés phénoliques volatils*, comme l'eugénol (un hydroxyphényl propène ; Figure 4) qui le principal composé phénolique des clous de girofle, ou le carvacrol (terpène phénolique ; Figure 4), un composant typique de l'origan.
- ▶ La curcumine (diferuloylméthane ; Figure 4) et les curcuminoïdes sont des composés phénoliques que l'on ne trouve que dans les rhizomes de *Curcuma longa*, dont est extrait le curcuma, ingrédient principal du curry.
- ▶ Les *capsaïcinoïdes* ne se trouvent que dans les fruits des plantes du genre *Capsicum*, ils contiennent un groupe vanillyl lié à une chaîne d'acides gras par une liaison amide et la capsaïcine (Figure 4) est le principal représentant de ce groupe. Les capsaïcinoïdes ont de

nombreuses actions biologiques, mais ils sont surtout reconnus pour être l'ingrédient piquant des piments forts.

Le tableau II illustre les composés non flavonoïdes et autres composés phénoliques avec des exemples de principaux composés et leurs sources.

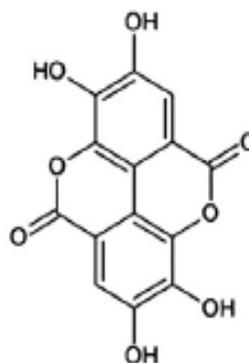
**Tableau II.** Composés non flavonoïdes et autres composés phénoliques, exemples de composés et leurs sources.

Classe de composé	Exemples de principaux composés	Source de composés
<b>Les acides phénoliques</b>		Les baies, les noix, le thé, la chicorée et certaines épices sont de bonnes sources de ces composés.
<b>Les acides hydroxybenzoïques</b>	Acide gallique	Les noix de galle, le sumac, l'hamamélis, les feuilles de thé, l'écorce de chêne.
<b>Tannins hydrolysables</b>	<i>Gallotannins</i>	Les baies, la mangue et les noix
	<i>Ellagitannins</i> : La punicalagine	L'enveloppe de la grenade, et son jus.
<b>Les acides hydroxycinnamiques</b>	L'acide <i>p</i> -coumarique, l'acide caféique et les formes méthylées des acides férulique et sinapique.	La canneberge, les haricots communs, les arachides, le maïs, et clou de girofle.
	Acide chlorogénique (acide 5-caféoylquinique : ester des acides caféique et quinique. Ses isomères : les acides néo-chlorogénique (acide 3-caféoylquinique) et crypto-chlorogénique (acide 4-caféoylquinique).	Grains de café et des boissons au café ; la prune, les baies, la nectarine, la pêche, la pomme, la poire, brocoli, tomate, chicorée, laitue, artichaut, etc.
<b>Les lignanes</b>	Le matairesinol, le lariciresinol et le pinoresinol sont les lignanes les plus courants.	Les céréales, les fruits, les noix, les légumes, graines de lin.
<b>Les chalcones et les dihydrochalcones</b>	La phlorétine et son glucoside phloridzine.	La pomme et certains produits à base de pommes.
<b>Les stilbènes</b>	Le trans-resvératrol	Le vin rouge et dans la peau des raisins rouges, mais aussi, en faible quantité, dans d'autres raisins et baies, cacahuètes et pistaches
<b>Les furanocoumarines</b>	Bergaptène et le psoralène, la bergamottine.	Le céleri, le persil, le jus de pamplemousse.

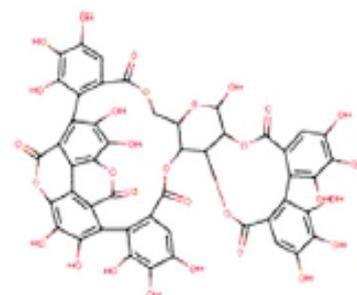


	R1	R2	R3	R4
<b>Acide salicylic</b>	OH	H	H	H
<b>Acide p-Hydroxybenzoïque</b>	H	H	OH	H
<b>Acide protocatéchique</b>	H	OH	OH	H
<b>Acide vanillique</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
<b>Acide gallique</b>	H	OH	OH	OH
<b>Acide syringique</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

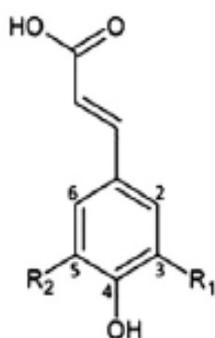
Acide ellagique



Punicalagine

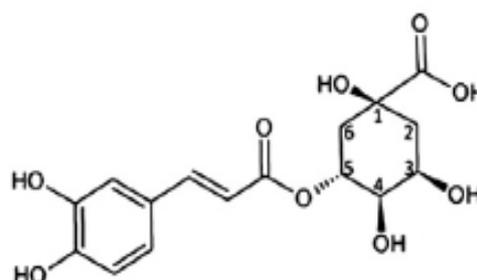


Acides hydroxycinnamiques



	R1	R2
<b>Acide p-coumarique</b>	H	H
<b>Acide caféique</b>	OH	H
<b>Acide férulique</b>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>Acide sinapic</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Acide chlorogénique



Figures 3. Structures des acides phénoliques.

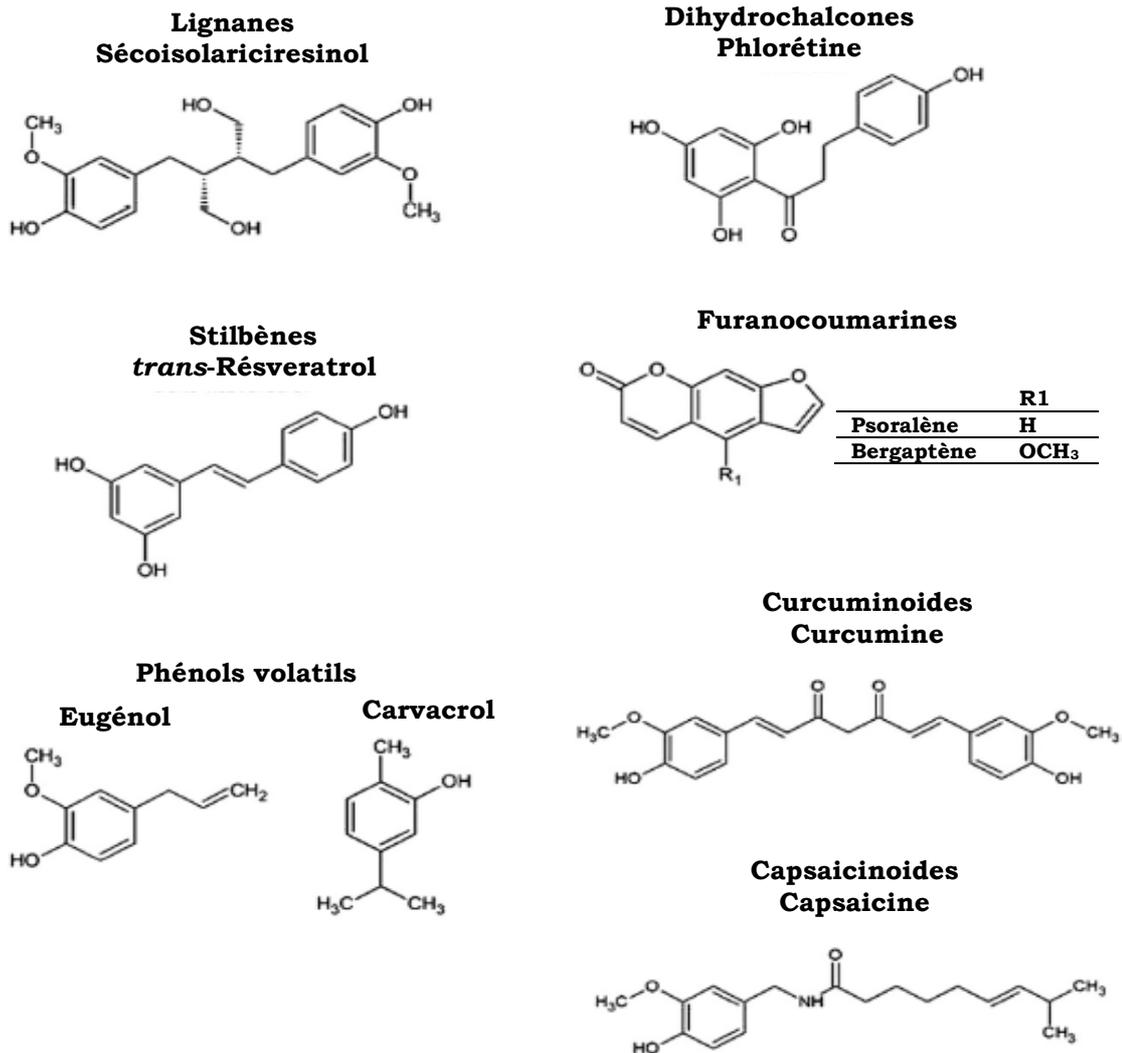


Figure 4. D'autres composés phénoliques non flavonoïdes.

### I.3. Composés de type terpène

#### I.3.1. Définition

Les terpénoïdes sont des molécules à nombre de carbones multiple de 5, et dont le précurseur est **l'isopentényl diphosphate** ou **IPP**. Ce sont des lipides synthétisés à partir de l'acétyl-CoA est donc des molécules hydrophobes. Il existe 20 000 molécules connues avec comme motif commun cette base isoprène. Les terpénoïdes sont stockés dans les vacuoles au niveau de l'écorce, des épines, des racines ou encore des feuilles. Ils se retrouvent aussi dans le latex.

Les terpénoïdes sont également connus sous le nom d'isoprénoïdes, ce sont les produits naturels les plus nombreux et structurellement diversifiés.

Le nom générique « terpène » était à l'origine appliqué aux hydrocarbures trouvés dans la térébenthine, le suffixe « ène » indiquant la présence des liaisons oléfiniques.

### I.3.2. Classification

Les terpénoïdes sont classés en fonction du nombre et de l'organisation structurelle des carbones formés par l'arrangement linéaire d'unités isoprène suivie d'une cyclisation et de réarrangements du squelette carboné avec une caractéristique empirique connue sous le nom de règle de l'isoprène.

L'isoprène, le "bloc de construction" des terpénoïdes, est le 2-méthylbuta-1,3-diène (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) (Figure 5). L'unité isoprène unique représente donc la classe la plus élémentaire de terpénoïdes, les hémiterpénoïdes. Les noms d'autres groupes de terpénoïdes sont présentés dans le tableau III.

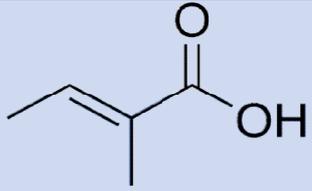
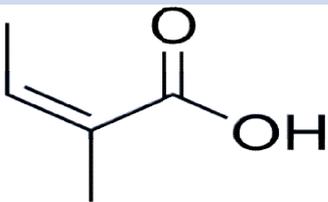
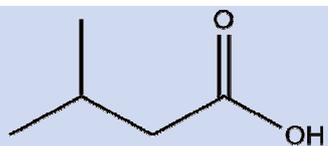
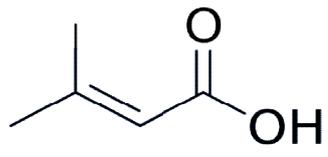
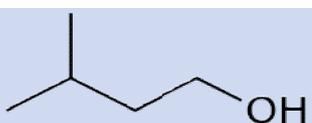
**Tableau III.** Classification des terpenoides.

Nom	Nombre d'unités isoprénisue	Nombre d'atome de carbone	Formule générale
<b>Hémiterpénoïdes</b>	1	5	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>
<b>Monoterpénoïdes</b>	2	10	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
<b>Sesquiterpénoïdes</b>	3	15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
<b>Diterpénoïdes</b>	4	20	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>
<b>Sesterpénoïdes</b>	5	25	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub>
<b>Triterpénoïdes</b>	6	30	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub>
<b>Tétraterpénoïdes</b>	8	40	C <sub>40</sub> H <sub>64</sub>
<b>Polyterpénoïdes</b>	> 8	> 40	(C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ) <sub>n</sub>

#### ■ Hémiterpénoïdes

Les hémiterpénoïdes sont les composés les plus simples parmi les terpénoïdes. L'hémiterpène le plus important, l'isoprène (point d'ébullition 34 °C) est émis par les feuilles de nombreux arbres (y compris les conifères, les peupliers, les chênes et les saules) et les herbes (par exemple, *Hamamelis japonica*). Les autres hémiterpénoïdes connus trouvés dans les plantes sont les acides tigliques, angéliques, isovalériques et sénécioides, ainsi que l'alcool isoamylique (Tableau IV).

Tableau IV. Structures chimiques, origines et habitats des hémiterpénoïdes.

Noms de composés	Structure	Origine	Habitat
<b>Acide tiglique</b>		<i>Schoenocaulon officinale</i> (Schltdl. & Cham. ) A. Gray (Melanthiaceae) <i>Croton tiglium</i> L. (Euphorbiaceae)	Sud de l'Amérique du Nord, Guatemala, Venezuela, Afrique, Amérique du Sud, sous-continent indien
<b>Acide angélique</b>		<i>Archangelica officinalis</i> Hoffm. (Apiaceae) <i>Peucedanum ostruthium</i> (L.) Koch (Apiaceae) <i>Levisticum officinale</i> Koch (Apiaceae)	Europe, États-Unis Europe centrale et méridionale Europe et sud-ouest d'Asie
<b>Acide isovalérique</b>		<i>Valeriana officinalis</i> L. (Caprifoliaceae)	Europe, Asie du Nord
<b>Acide senecioïc</b>		<i>Senecio</i> sp. (ex., <i>S. mikanioides</i> Walp.) (Asteraceae) <i>Ligularia</i> sp. (Asteraceae)	Distribution mondiale Asie centrale et orientale
<b>Alcool isoamylique</b>		<i>Tuber melanosporum</i> (Tuberaceae)	Europe du Sud

### ■ Monoterpénoïdes

Les monoterpénoïdes sont constitués d'une structure à 10 carbones (2 unités d'isoprène) et peuvent être subdivisés en trois sous-groupes : acycliques, monocycliques et bicycliques. Au sein de chaque groupe, les monoterpénoïdes peuvent être de simples hydrocarbures insaturés ou peuvent avoir des groupes fonctionnels et être des alcools, des aldéhydes et des cétones. Les exemples aliphatiques courants incluent le myrcène, le citral, le géraniol, le lavandulol et le linalol.

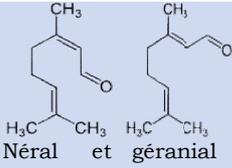
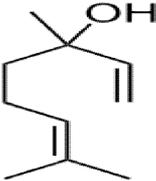
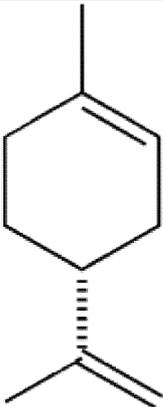
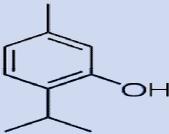
► Les représentants importants des monoterpénoïdes monocycliques sont l' $\alpha$ -terpinéol, limonène, thymol, menthol, carvone, eucalyptol et périllaldéhyde.

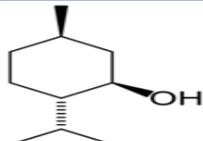
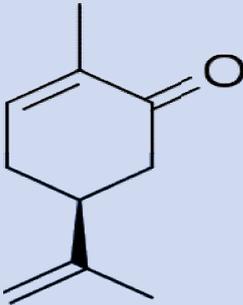
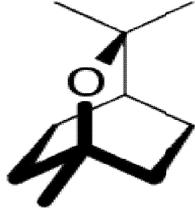
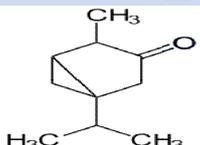
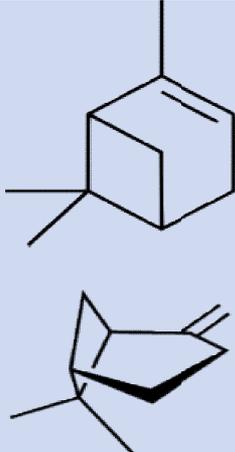
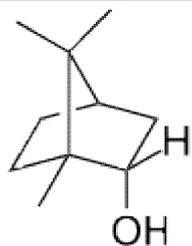
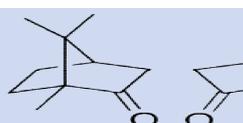
► Les monoterpènes bicycliques peuvent être subdivisés en trois classes selon la taille du deuxième cycle. Le premier étant un cycle à six chaînons dans

chaque classe tandis que le second peut être un cycle à trois, quatre ou cinq chaînons. La thuyone et le  $\Delta^3$ -carène sont des représentants du groupe contenant les cycles à 6 + 3 chaînons,  $\alpha$ - et  $\beta$ -pinène représentent un groupe à 6 + 4, tandis que le bornéol et le camphre, un groupe à 6 + 5.

Quelques exemples typiques sont présentés dans le tableau V.

**Tableau V.** Structures chimiques, origines et habitats des monoterpénoïdes.

Nom de composé	Structure	Origine	Habitat
<b>Monoterpénoïdes acycliques</b>			
<b>Myrcène</b>		Huile de verveine ( <i>Lippia citriodora</i> Kunth., Verbanaceae). Huile de baie de laurier ( <i>Laurus nobilis</i> ., Lauraceae)	Amérique du Sud et centrale, Afrique tropicale La région méditerranéenne
<b>Citral</b>		Huile de citronnelle ( <i>Cymbopogon flexuosus</i> (Nees ex Steud) J.F. Waston et <i>Cymbopogon citratus</i> (DC. Ex Nees) Stapf, Poaceae)	Malaisie
<b>Linalool</b>		Huile de feuilles de Ho ( <i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl, Lauraceae) Huile essentielle de coriandre ( <i>Coriandrum sativum</i> L., Apiaceae)	Chine, Taïwan, sud du Japon, Corée, Vietnam Europe du Sud, Afrique du Nord et Sud-Ouest
<b>Monoterpénoïdes monocycliques</b>			
<b>Limonène</b>		Constituant majeur de plusieurs huiles essentielles d'agrumes (Rutaceae) : orange ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck, citron ( <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. F.), mandarine ( <i>Citrus reticulata</i> Blanco), citron vert ( <i>Citrus aurantifolia</i> (Chrism.) Swing) et pamplemousse ( <i>Citrus paradisi</i> Macfad)	Asie du Sud-Est (sud de la Chine, Inde, Indonésie, archipel malais)
<b>Thymol</b>		Huile de thym ( <i>Thymus vulgaris</i> L, Lamiaceae)	Europe du Sud de l'ouest de la Méditerranée au sud de l'Italie

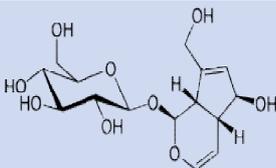
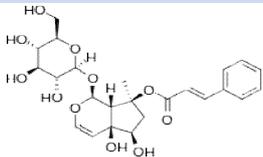
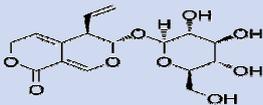
<b>Menthol</b>		Huile essentielle de menthe poivrée ( <i>Mentha piperita</i> L., Lamiaceae)	Originaires d'Europe et du Moyen-Orient
<b>Carvone</b>		Huile de carvi ( <i>Carum carvi</i> L., Apiaceae) (essentiellement S-(+)-carvone) Huile de la menthe verte ( <i>Mentha spicata</i> L., Lamiaceae) (essentiellement R-(-)-carvone)	Originaires d'Asie occidentale, d'Europe et d'Afrique du Nord Originaires d'une grande partie de l'Europe et de l'Asie (Moyen-Orient, Himalaya, Chine)
<b>Eucalyptol (1,8-cineole)</b>		Huiles des feuilles d'eucalyptus ( <i>Eucalyptus globulus</i> Labill., Myrtaceae) Romarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L., Lamiaceae)	Originaires d'Australie et de Tasmanie Originaires de la région méditerranéenne
<b>Monoterpénoides bicycliques</b>			
<b>La thuyone</b>		Grande absinthe ( <i>Artemisia absinthium</i> L., Astéraceae)	Native aux régions tempérées d'Eurasie et d'Afrique du Nord
<b>α et β-pinène</b>		Ils proviennent généralement de la térébenthine et sont également présents dans les pins galbanum et d'autres conifères (+)-α-pinène principalement dans <i>Pinus palustris</i> Mill. (-)-β-pinène principalement chez <i>Pinus caribaea</i> Morelet et <i>P. pinaster</i> Aiton	La plupart des régions de l'hémisphère nord abritent des espèces indigènes de pins Originaires du sud-est des États-Unis Originaires d'Amérique centrale, de Cuba, des Bahamas Originaires de la région méditerranéenne occidentale et sud-ouest
<b>Bornéol</b>		Peut être trouvé dans plusieurs espèces d' <i>Artemisia</i> (ex., <i>A. annua</i> L., Asteraceae) <i>Blumea balsamifera</i> (L.) DC. Asteraceae) et <i>Kaempferia galanga</i> L. (Zingiberaceae)	Climats tempérés des deux hémisphères Zones tropicales et subtropicales d'Asie, en particulier le sous-continent indien et l'Asie du Sud-est Indonésie, sud de la Chine, Taïwan, Cambodge et Inde
<b>Camphor</b>		Camphrier ( <i>Cinnamomum camphora</i> T. Nees & Ebermeier, Lauraceae)	Originaires du Japon, de la Chine et de Taïwan

○ Iridoïdes

Les iridoïdes comprennent un grand groupe de monoterpénoïdes, caractérisés par des squelettes dans lesquels un cycle à six chaînons, contenant un atome d'oxygène, est fusionné à un cycle cyclopentane (squelette d'iridane). Ces composés se trouvent le plus souvent dans les plantes combinées avec du sucre et sont donc classés comme des glycosides qui sont ensuite divisés en quatre groupes principaux.

Il s'agit des glycosides iridoïdes (aucubine, harpagoside), des iridoïdes non glycosylés ou simples (loganine), des secoiridoïdes (gentiopicroside), et des bisiridoïdes, formés par dimérisation des iridoïdes et des secoiridoïdes (Tableau VI).

**Tableau VI.** Structures chimiques, origines et habitats des iridoïdes.

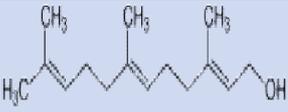
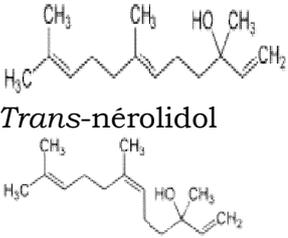
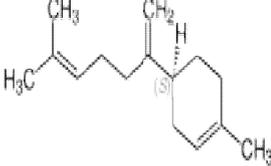
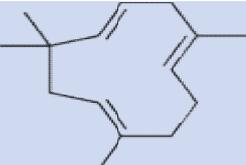
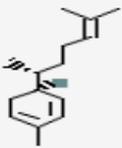
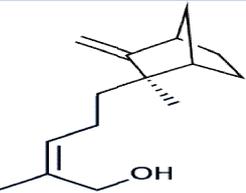
Noms de composés	Structure	Origine	Habitat
<b>Aucubine</b>		<i>Euphrasia officinalis</i> L. <i>Euphrasia rostkoviana</i> Hayne (Scrophulariaceae)	Europe Europe, Asie
<b>Harpagoside</b>		<i>Harpagophytum procumbens</i> (Burch) DC. Ex Meisn (Pedaliaceae)	Originnaire d'Afrique australe
<b>Gentiopicroside</b>		<i>Gentiana lutea</i> L. (Gentianaceae)	Originnaire des montagnes d'Europe centrale et méridionale

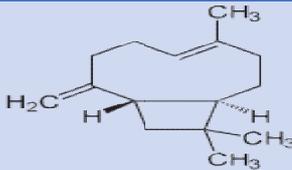
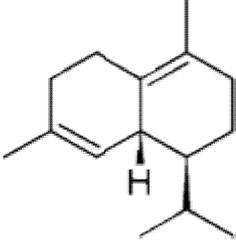
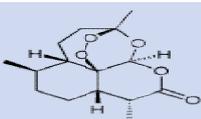
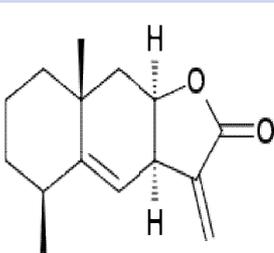
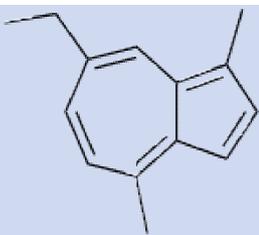
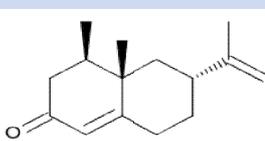
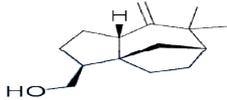
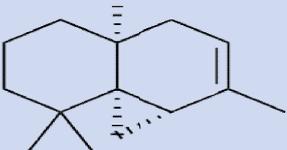
■ Sesquiterpénoïdes

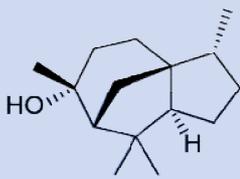
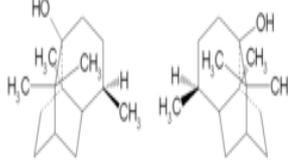
Les sesquiterpénoïdes sont dérivés de trois unités d'isoprène et existent sous une grande variété de formes, y compris linéaire, monocyclique, bicyclique et tricyclique. Ils constituent le groupe le plus diversifié de terpénoïdes.

Les exemples les plus caractéristiques des composés appartenant à chacun des groupes mentionnés sont présentés dans le tableau VII.

**Tableau VII.** Structures chimiques, origines et habitats des sesquiterpénoïdes.

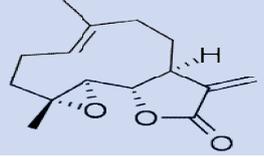
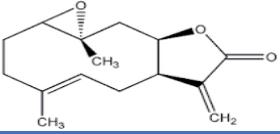
Noms de composés	Structure	Origine	Habitat
<b>Sesquiterpènes acycliques</b>			
<b>Farnésol</b>		Présent dans de nombreuses huiles essentielles, ex., citronnelle (espèce <i>Cymbopogon</i> , <i>Poaceae</i> ) <i>Cyclamen</i> (espèces de <i>Cyclamen</i> , <i>Myrsinaceae</i> ), tubéreuse ( <i>Polianthes tuberosa</i> L., <i>Asparagaceae</i> )	Sud de l'Inde, Malaisie, originaire d'Europe et du bassin méditerranéen à l'est de l'Iran, avec une espèce en Somalie Originaire du Mexique
<b>β-Nérolidol</b>	 <i>Trans</i> -nérolidol <i>Cis</i> -nérolidol	Huile essentielle de Néroli ( <i>Citrus aurantium</i> subsp. <i>Amara</i> L., <i>Rutaceae</i> ) (Huile de jasmin ( <i>Jasminum officinale</i> L., <i>Oleaceae</i> ))	Originaire du sud du Vietnam originaire des régions tropicales et tempérées chaudes de l'Eurasie, de l'Australasie et de l'Océanie
<b>Sesquiterpénoïdes monocycliques</b>			
<b>β-Bisabolène</b>		Gingembre ( <i>Zingiber officinale</i> Roscoe, <i>Zingiberaceae</i> ) Cubeb ( <i>Piper cubeba</i> L.f., <i>Piperaceae</i> )	Indigène du sud de la Chine et s'est propagé à d'autres parties de l'Asie, puis à l'Afrique de l'Ouest et aux Caraïbes Java et Sumatra
<b>α-Humulène</b>		Huile d'espoir ( <i>Humulus lupulus</i> L., <i>Cannabaceae</i> )	Originaire d'Europe, d'Asie occidentale et d'Amérique du Nord
<b>α-Zingiberène</b>		Gingembre ( <i>Zingiber officinale</i> Roscoe, <i>Zingiberaceae</i> ) Curcuma ( <i>Curcuma longa</i> L., <i>Zingiberaceae</i> )	Originaire du sud-est de l'Inde
<b>Sesquiterpénoïdes bicycliques</b>			
<b>β-Santalol</b>		Bois de santal ( <i>Santalum album</i> L. <i>Santalaceae</i> )	C'est un arbre hémiparasite, originaire des zones semi-arides du sous-continent indien

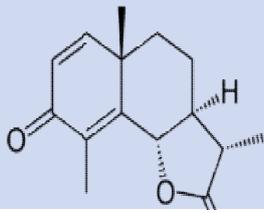
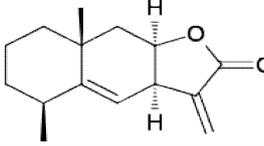
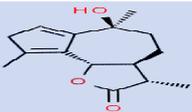
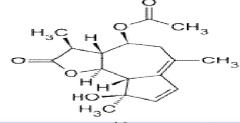
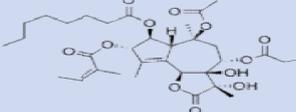
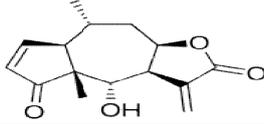
<p><b>β-Caryophyllène</b></p>		<p>huile de clou de girofle (<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merrill &amp; Perry ; syn. <i>Caryophyllus aromaticus</i> L., Myrtaceae)</p>	<p>Originnaire des îles Maluku en Indonésie</p>
<p><b>δ-Cadinène</b></p>		<p>Genévrier Cade (<i>Juniperus oxycedrus</i> L., Cupressaceae)</p>	<p>Originnaire de toute la région méditerranéenne du Maroc et du Portugal, du nord au sud de la France, de l'est à l'extrême ouest de l'Iran et du sud au Liban et en Israël</p>
<p><b>Artémisinine</b></p>		<p>Absinthe douce (<i>Artemisia annua</i> L., Asteraceae)</p>	<p>Originnaire d'Asie tempérée</p>
<p><b>Alantolactone</b></p>		<p>Grande aunée (<i>Inula helenium</i> L., Asteraceae)</p>	<p>Commun dans de nombreuses régions de Grande-Bretagne, et s'étend dans toute l'Europe centrale et méridionale, et en Asie jusqu'à l'Himalaya.</p>
<p><b>Chamazulène</b></p>		<p>Huile de camomille (<i>Matricaria chamomilla</i> L., Asteraceae) Huile d'absinthe (<i>Artemisia absinthum</i> L., Asteraceae) Huile d'achillée millefeuille (<i>Achillea millefolium</i> L., Asteraceae)</p>	<p>Europe et Asie tempérée Originnaire des régions tempérées d'Eurasie et d'Afrique du Nord Originnaire des régions tempérées d'Eurasie et d'Afrique du Nord</p>
<p><b>Nootkatone</b></p>		<p>Pamplemousse (<i>Citrus paradisi</i> Macfad., Rutaceae)</p>	<p>Asie du Sud-Est (sud de la Chine, Inde, Indonésie, archipel malais)</p>
<p><b>Sesquiterpénoïdes tricycliques</b></p>			
<p><b>Khushimol</b></p>		<p>Vétiver (<i>Chrysopogon zizanioides</i> (L.) Rberty, Poaceae)</p>	<p>Originnaire d'Inde</p>
<p><b>Thujopsène</b></p>		<p>Huile de bois de cèdre (arbres de la famille des Cupressaceae, ex., <i>Juniperus</i> et <i>Cupressus</i> spp.)</p>	<p>Présent dans divers habitats sur tous les continents sauf l'Antarctique</p>

<b>β-Cédrol</b>		<p>Huile essentielle de conifères (huile de cèdre), notamment dans les genres <i>Cupressus</i> (cyprès) et <i>Juniperus</i> (genévrier). Il a également été identifié dans <i>Origanum onites</i></p>	
<b>Patchoulol</b>		<p>Patchouli (<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth., Lamiaceae) Nard (<i>Nardostachys jatamansi</i> (D. Don) DC., Caprifoliaceae)</p>	<p>Originaire des régions tropicales d'Asie Pousse dans l'est de l'Himalaya, principalement dans une ceinture passant par le Kumaon, le Népal, le Sikkim et le Bhoutan</p>

- Les lactones sesquiterpéniques sont chimiquement distinctes des autres sesquiterpénoïdes par la présence d'un système γ-lactone, et peuvent être divisés en deux classes structurales: 6,12- (par exemple, costunolide, parthénolide, santonine, artabsine, matricine) et 8,12-olides (par exemple, inunolide, alantolactone, thapsigargine, hélénaline). Il existe trois grands types de lactones sesquiterpéniques qui sont les germacranolides, les eudesmanolides et les guaianolides (Tableau VIII).

**Tableau VIII.** Trois groupes majeurs des sesquiterpène lactones.

Type	Structure générale	Exemple	Occurrence
<b>Germacranolides</b>		Costunolide	Costus ( <i>Saussurea costus</i> (Falc.) Lipsch., Asteraceae)
		Parthénolide	Feverfew ( <i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip., Asteraceae)
		Inunolide	<i>Inula racemosa</i> (Hook. f., Asteraceae)

<b>Eudesmanolides</b>		Santonine	<i>Santonica</i> ( <i>Artemisia cina</i> Berg ; <i>A. chamaemelifolia</i> Vill., <i>A. maritima</i> var. <i>Stechmanniana</i> Bess, Asteraceae)
		Alantolactone	Elecampane ( <i>Inula helenium</i> L., Asteraceae)
<b>Guaianolides</b>		Artabsine	Absinthe wormwood ( <i>Artemisia absinthium</i> L., Asteraceae)
		Matricine	Chamomile ( <i>Matricaria chamomilla</i> L., Asteraceae)
		Thapsigargin	<i>Thapsia garganica</i> L., Apiaceae
		Héliénaline	Arnica ( <i>Arnica montana</i> L., Asteraceae)

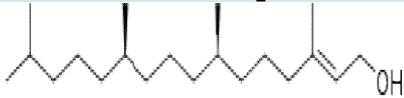
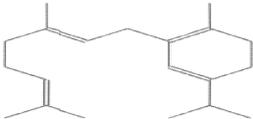
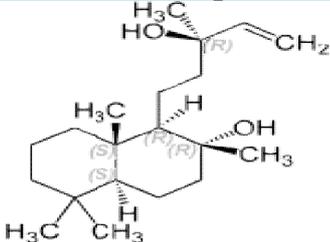
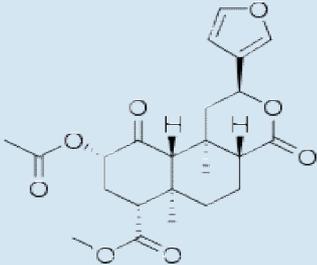
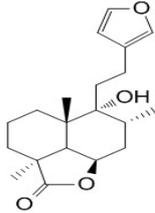
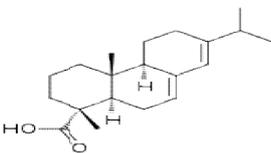
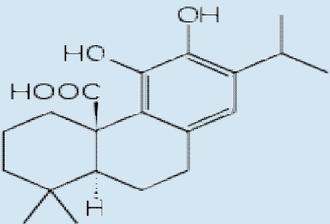
## ■ Diterpénoïdes

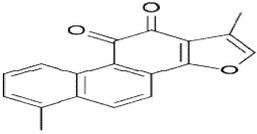
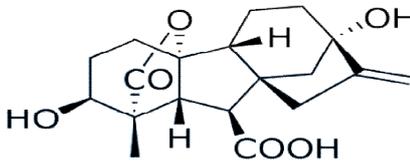
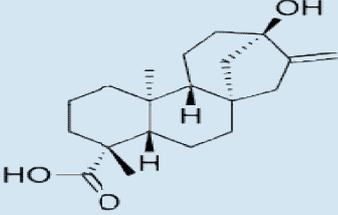
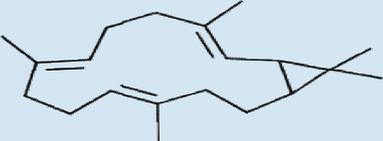
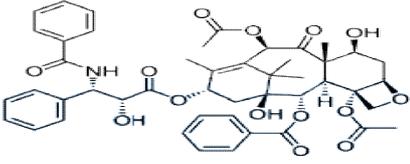
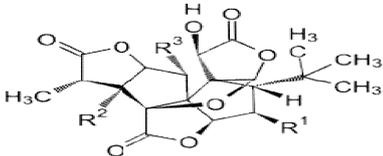
Les diterpénoïdes comprennent un groupe chimiquement hétérogène de composés, tous avec un squelette carboné C<sub>20</sub> basé sur quatre unités isoprènes. Ils peuvent être classés en diterpènes linéaires, bicycliques, tricycliques, tétracycliques, pentacycliques ou macrocycliques en fonction de leur noyau squelettique. Dans la nature, on les trouve couramment sous une forme polyoxygénée avec des groupes céto et hydroxyle, ceux-ci sont souvent estérifiés par des acides aliphatiques ou aromatiques de petite taille.

Les ginkgolides sont des constituants uniques du *Ginkgo biloba* et se trouvent exclusivement dans cet arbre. Ce sont des diterpènes dont le squelette cage est constitué de six cycles à cinq chaînons : un cycle carbocyclique spiro[4.4]-nonane, trois lactones et un cycle tétrahydrofurane, par exemple le ginkgolide A.

Les représentants de chaque groupe sont présentés dans le tableau IX.

Tableau IX. Structures chimiques, origines et habitats de diterpénoïdes.

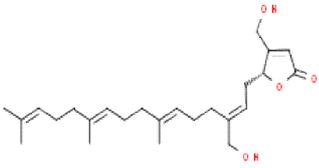
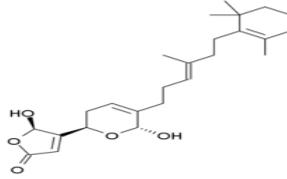
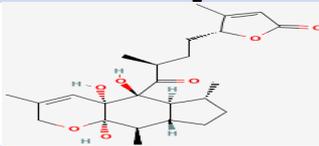
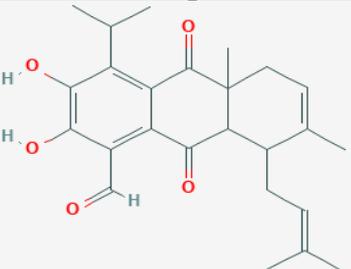
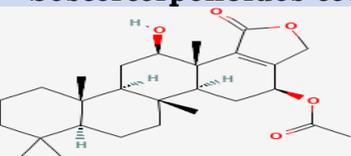
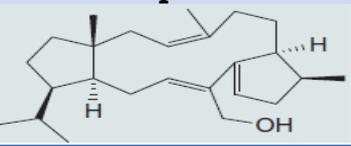
Noms des composés	Structure	Origine	Habitat
<b>Diterpénoïdes acycliques</b>			
<b>Phytol</b>		Présent comme attachement ester dans la molécule de chlorophylle	
<b>Diterpénoïdes monocycliques</b>			
<b>9-Géranyl-<math>\alpha</math>-terpinéol</b>		<i>Helichrysum heterolasium</i> Hilliard (Asteraceae)	Afrique du sud
<b>Diterpénoïdes bicycliques</b>			
<b>Sclaréol</b>		Sauge sclarée ( <i>Salvia sclarea</i> L., Lamiaceae)	Originaire du nord de la Méditerranée, ainsi que de certaines régions d'Afrique du Nord et d'Asie centrale
<b>Salvinorine A</b>		Sauge devin ( <i>Salvia divinorum</i> Epling & Jativa (Lamiaceae)	Originaire de la Sierra Mazateca d'Oaxaca, au Mexique, où il pousse dans des endroits ombragés et humides
<b>Marrubiin</b>		Marrube blanc ( <i>Marrubium vulgare</i> L., Lamiaceae)	Originaire d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie du Sud-Ouest et centrale
<b>Diterpénoïdes tricycliques</b>			
<b>Acide Abiétique</b>		Résine de conifères, ex., pin ( <i>Pinus sylvestris</i> L., Pinaceae)	Originaire d'Europe et d'Asie
<b>Acide carnosique</b>		Sauge commune ( <i>Salvia officinalis</i> L., Lamiaceae) Romarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L., Lamiaceae)	Tous deux originaires de la région méditerranéenne

<b>Tanshinone 1</b>		Danshen ( <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge, Lamiaceae)	Originnaire de Chine et du Japon
<b>Diterpénoïdes tétracycliques</b>			
<b>Gigгерelline A1</b>		Appartient aux gibbérellines-hormones végétales qui régulent la croissance. Isolé pour la première fois à partir de souches fongiques ( <i>Giberella fujikuroi</i> )	
<b>Steviol</b>		<i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.) Bertoni, Asteraceae	Originnaire de la vallée du Rio Monday dans les hautes terres du nord-est du Paraguay en Amérique du Sud
<b>Diterpénoïdes macrocycliques</b>			
<b>Casbène</b>		Haricot de Castor ( <i>Ricinus communis</i> L., Euphorbiaceae)	Indigène du sud-est du bassin méditerranéen, de l'Afrique de l'Est et de l'Inde
<b>Taxol</b>		Écorce de l'if du Pacifique, <i>Taxus brevifolia</i> Nott. (Taxaceae)	Originnaire du Pacifique Nord-Ouest de l'Amérique du Nord
<b>Diterpénoïdes divers</b>			
<b>Ginkgolide A</b>		<i>Ginkgo biloba</i> L., Ginkgoaceae	Originnaire de Chine

## ■ Sesterterpénoïdes

Les sesterterpénoïdes sont constitués d'un squelette de 25 carbones (5 unités d'isoprène). Ils existent sous une grande variété de formes, y compris linéaires, monocycliques, bicycliques, tricycliques, tétracycliques et macrocycliques. Quelques exemples typiques sont montrés dans le tableau X.

Tableau X. Structures chimiques, origines et habitats des sesterpénoïdes.

Noms des composés	Structure	Origine	Habitat
<b>Sesterterpénoïdes acycliques</b>			
<b>Hippolide E</b>		Eponge marine <i>Hippospongia lachne</i> de Laubenfels (Spongiidae)	Distribué dans le monde entier dans l'Atlantique centre-ouest
<b>Sesterterpénoïdes monocycliques</b>			
<b>Manoalide</b>		Eponge marine <i>Luffariella variabilis</i> Polejaeff (Thorectida)	Largement distribué dans l'Indo-Pacifique
<b>Sesterterpénoïdes bicycliques</b>			
<b>Leucosceptrine</b>		<i>Leucosceptrum Canum</i> Sm., Lamiaceae	Originaire du sud-ouest de la Chine (Sichuan, Tibet, Yunnan)
<b>Sesterterpénoïdes tricycliques</b>			
<b>Heliocide H1</b>		Coton upland ( <i>Gossypium hirsutum</i> L., Malvaceae)	Originaire du Mexique, des Antilles, du nord de l'Amérique du Sud et de l'Amérique centrale
<b>Sesterterpénoïdes tétracycliques</b>			
<b>Sesterstatine 7</b>		Eponge marine <i>Hyrtios erecta</i> Keller (Thorectidae)	Largement distribué (Océan Atlantique Nord, Océan Indien)
<b>Sesterterpénoïdes macrocycliques</b>			
<b>Nitiol</b>		<i>Gentianella nitida</i> (Griseb.) Fabris, Gentianaceae	Originaire des hautes Andes du Pérou

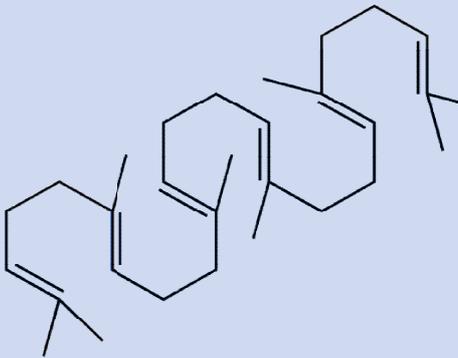
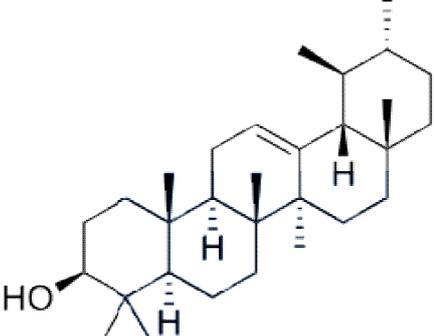
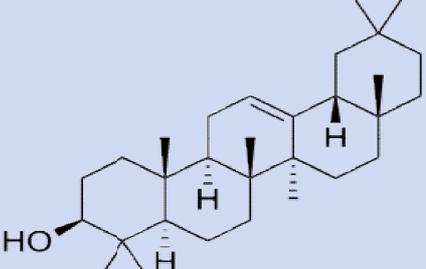
## ■ Triterpénoïdes

Les triterpénoïdes sont des composés à squelette carboné à base de six unités isoprènes issues de la biosynthèse de l'hydrocarbure acyclique en C30, le squalène. Ils ont des structures cycliques relativement complexes, la plupart étant soit des alcools, des aldéhydes ou des acides carboxyliques.

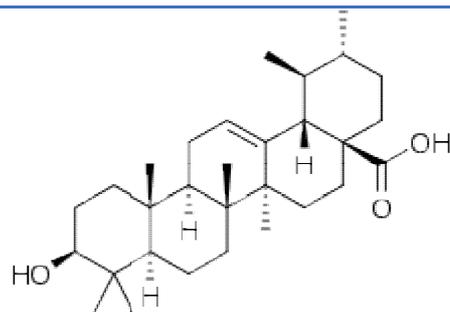
## Chapitre I Présentation des substances bioactives d'origine végétale

Les stérols sont des triterpènes basés sur le système cyclique cyclopentane perhydrophénanthrène. Les stérols végétaux appelés les «phytostérols», par exemple, le sitostérol, le stigmastérol et le campestérol sont répandus dans les plantes supérieures. Un composé moins commun, l' $\alpha$ -spinastérol (isomère du stigmastérol) a été trouvé dans les épinards, la luzerne et la racine de senega. D'autres se trouvent principalement dans les plantes inférieures, par exemple les algues. Les exemples de triterpènes les plus importants sont présentés dans le tableau X.

**Tableau X.** Structures chimiques, origines et habitats des triterpénoïdes et stérols représentatifs.

Noms des composés	Structure	Origine	Habitat
<b>Squalène</b>		Huile de foie de requin (par exemple, requin gris de récif, <i>Carcharhinus amblyrhynchos</i> ). Huile d'olive du fruit d' <i>Olea europaea</i> L., Oleaceae	L'Afrique, le bassin méditerranéen du Portugal au Levant, la péninsule arabique et l'Asie du Sud jusqu'à la Chine, ainsi que les îles Canaries, l'île Maurice et la Réunion
<b><math>\alpha</math>-Amyrine</b>		Résines des espèces de <i>Bursera</i> et <i>Protium</i> (Burseraceae) <i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg., Asteraceae	Originaire du sud des États-Unis jusqu'au nord de l'Argentine Originaire des néotropiques, de Madagascar, de la Nouvelle-Guinée et du sud de l'Asie
<b><math>\beta</math>-Amyrine</b>		Lotus ( <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn., Nelumbonaceae) Cuachalalate ( <i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltdl.) Standl., Anacardiaceae)	Originaire d'Asie tropicale et du Queensland, Australie Centre et sud du Mexique

**Acide ursolique**

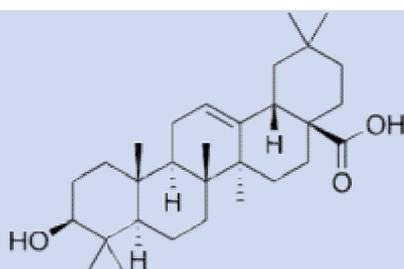


Basilic sacré  
(*Ocimum sanctum* L., Lamiaceae)  
Myrtille  
(*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae)

Originaire du sous-continent indien  
Originaire d'Europe, du nord de l'Asie, du Groenland, de l'ouest du Canada et de l'ouest des USA  
Originaire de la région méditerranéenne

Romarin  
(*Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae)

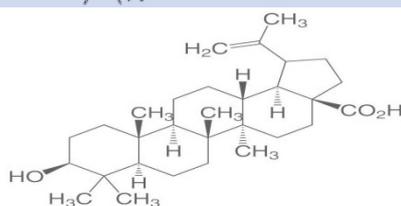
**Acide oléanolique**



Feuilles d'olivier  
(*Olea europaea* L., Oleaceae)  
Pot souci  
(*Calendula officinalis* L., Asteraceae)

Originaire du sud de l'Europe

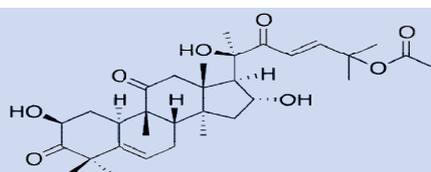
**Acide bétulinique**



Bouleau blanc  
(*Betula pubescens* Ehrh., Betulaceae)

Indigène et abondant dans tout le nord de l'Europe, l'Islande, le nord de l'Asie et le Groenland

**Cucurbitacine B**



Diverses espèces de la famille des Cucurbitaceae

Originaire des zones tempérées et tropicales

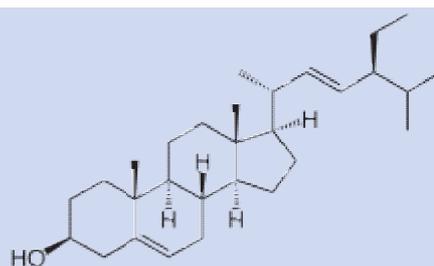
**Sitostérol**



Ortie commune  
(*Urtica dioica* L., Urticaceae)  
*Nigella sativa* L., Ranunculaceae

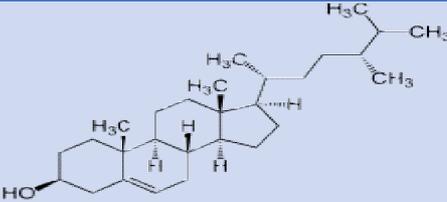
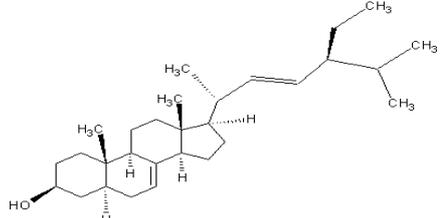
Originaire d'Europe, d'Asie, d'Afrique du Nord et d'Amérique du Nord  
Originaire d'Asie du Sud et du Sud-Ouest

**Stigmastérol**



Haricot de Calabar  
(*Physostigma venenosum* Balf., Fabaceae)  
Graines de colza  
(*Brassica napus* L. Brassicaceae)

Originaire d'Afrique tropicale  
Des formes sauvages se produisent en Suède, aux Pays-Bas et en Grande-Bretagne

<b>Campestérol</b>		Bananier (espèces de <i>Musa</i> , par exemple <i>Musa acuminata</i> Colla., Musaceae)	Originaire de l'Indomalaya tropicale et de l'Australie
<b><math>\alpha</math>-Spinastérol</b>		Épinard ( <i>Spinacia oleracea</i> L., Amaranthaceae)	Originaire d'Asie centrale et du sud-ouest

## ■ Tétraterpénoïdes

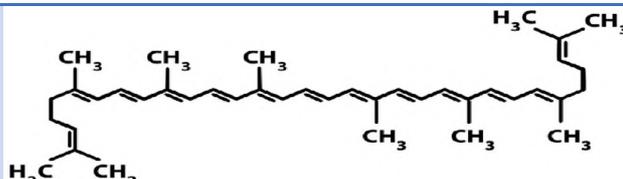
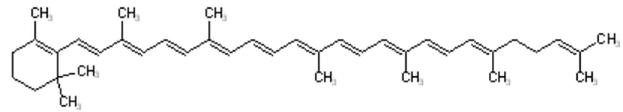
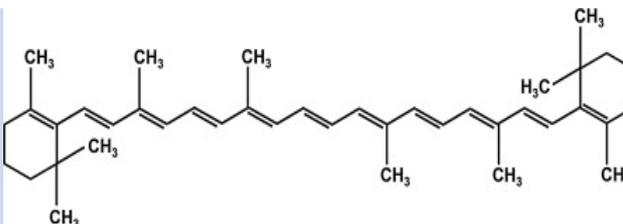
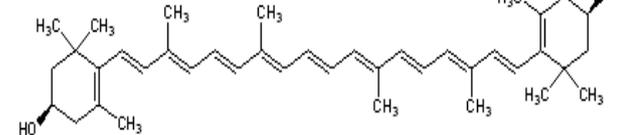
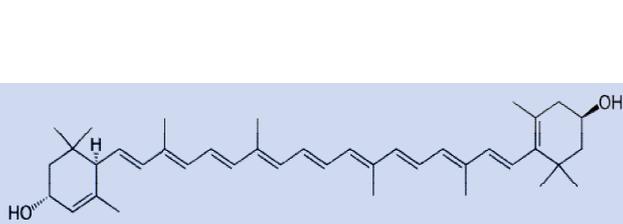
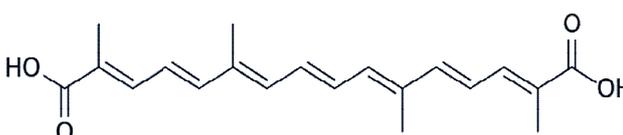
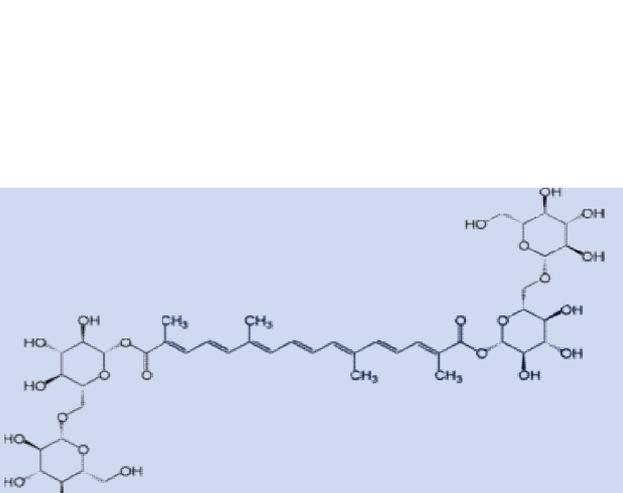
Les tétraterpénoïdes sont constitués de huit unités isoprène et ont la formule moléculaire  $C_{40}H_{64}$ . Les tétraterpénoïdes les plus courants sont des caroténoïdes, qui sont des pigments naturels liposolubles. Structurellement, les caroténoïdes présentent trois aspects:

Les caroténoïdes les plus connus sont soit de simples hydrocarbures insaturés ayant la structure de base du **lycopène**, soit leurs analogues oxygénés correspondants, appelés **xanthophylles** (lutéine, zéaxanthine). La cyclisation du lycopène aux deux extrémités de la molécule donne un hydrocarbure bicyclique communément appelé  **$\beta$ -carotène**, qui se trouve le plus abondamment dans les plantes supérieures.

Des formes combinées de caroténoïdes se produisent, en particulier dans les fleurs et les fruits des plantes supérieures, et ce sont généralement des xanthophylles estérifié avec des résidus d'acides gras, par exemple des acides palmitique, oléique ou linoléique. Les glycosides sont normalement très rares; dans les plantes supérieures, la plus connue étant la crocine soluble dans l'eau, le gentiobiose dérivé d'un caroténoïde en C20 inhabituel, la crocétine (le pigment jaune du safran des prés, *Crocus sativus* L.).

Les représentants les plus caractéristiques des caroténoïdes sont présentés dans le tableau XI.

Tableau XI. Structures chimiques, origines et habitats des caroténoïdes.

Noms de composés	Structure	Origine	Habitat
Lycopène		Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L. Solanaceae)	Originaire des Andes sud-américaines
$\gamma$ -carotène		Souci ( <i>Calendula officinalis</i> L. Asteraceae)	Originaire du sud de l'Europe
$\beta$ -carotène		Carotte ( <i>Daucus carota</i> L. Apiaceae)	Originaire des régions tempérées d'Europe et d'Asie du sud-ouest
Zéaxanthine		Paprika ( <i>Capsicum anuum</i> L. Solanaceae)	Originaire du sud de l'Amérique du Nord et du nord de l'Amérique du Sud
Lutéine		Epinard ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) Amaranthaceae	Originaire d'Asie centrale et du sud-ouest
Crocétine		Gardénia ( <i>Gardenia jasminoides</i> j. Elis, Rubiaceae)	Originaire d'Asie et pousse au Vietnam, dans le sud de la Chine, à Taïwan, au Japon, au Myanmar et en Inde
Crocine		Safran des prés ( <i>Crocus sativus</i> L., Iridaceae)	Europe centrale et méridionale, Afrique du Nord et Moyen-Orient

## ■ Polyterpénoïdes

Les polyterpénoïdes sont des hydrocarbures isoprénoïdes polymères, constitués de plus de huit unités isoprènes. Cette classe de composés a été habituellement confirmée pour inclure les caoutchoucs. La molécule de caoutchouc naturel est une molécule de haut poids moléculaire, c'est un polymère pondéral constitué d'unités isoprènes en configuration *cis*. Certaines plantes produisent un polyisoprène avec des doubles liaisons *trans*. Il s'agit de gutta-percha de *Palaquium gutta* (Sapotaceae) et de balata de *Mimusops balata* (Sapotaceae) (Tableau XII).

**Tableau XII.** Structures chimiques, origines et habitats des caoutchoucs.

Noms de composés	Structure	Origine	Habitat
<b>Caoutchouc naturel</b>		Arbre à caoutchouc ( <i>Hevea brasiliensis</i> Mull. Arg., Euphorbiaceae)	Originaire du Brésil (parties du bassin amazonien et du Matto Grosso) et des Guyanes
<b>Gutta percha ou balata</b>		<i>Palaquium gutta</i> (Hook.) Blurck, Sapotaceae	Trouvé à Sumatra, en Malaisie péninsulaire, à Singapour et à Bornéo
		<i>Manilkara bidentata</i> (Aubl.) C.F. Gaertn., Sapotaceae)	Originaire du nord de l'Amérique du Sud, de l'Amérique centrale et des Caraïbes

## ■ Terpénoïdes irréguliers

### ► Monoterpénoïdes irréguliers

Il existe deux grands types de monoterpénoïdes irréguliers :

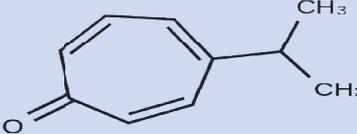
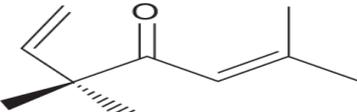
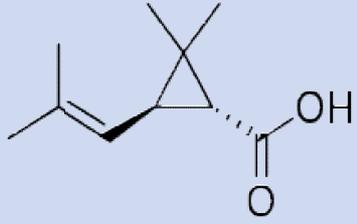
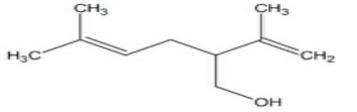
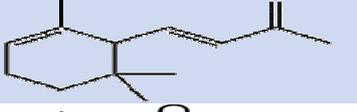
1. Les monoterpènes de cycloheptane substitués, appelés tropones (par exemple, nezukone). De tels composés surviennent très probablement par une expansion cyclique inconnue du squelette du cyclohexane.

2. Composés formés par condensation tête-moyenne d'unités isoprène. Les membres importants comprennent la cétone d'artémisia, l'acide chrysanthémique et le lavandulol. Ces composés se trouvent principalement dans les familles d'Astéracées et de Lamiacées.

### ► Ionones et damascons

Les ionones et les damascons sont des composés qui appartiennent aux norisoprénoïdes en C13 (norterpénoïdes), qui sont des composés aromatiques dérivés de caroténoïdes. Les représentants les plus connus sont l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -ionone, et l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -damascone qui se trouvent dans de nombreuses huiles essentielles (Tableau XIII).

**Tableau XIII.** Structures chimiques, origines, et habitats de terpénoïdes irréguliers.

Noms de composés	Structure	Origine	Habitat
<b>Nezukone</b>		<i>Thuja standishii</i> (Gordon) Carr. (Cupressaceae)	Originaire du sud du Japon
<b>Artemisia cétone</b>		<i>Artemisia annua</i> L. (Asteraceae)	Originaire d'Asie tempérée
<b>Acide Chrysanthémique</b>		<i>Tanacetum parthenium</i> (L. Sch. Bip. (syn <i>Chysanthemum parthenium</i> (L.) Bernh.) (Asteraceae)	Originaire d'Eurasie ; spécifiquement la péninsule balkanique, l'Anatolie et le Caucase
<b>Lavandulol</b>		<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. (Lamiaceae)	Originaire de la Méditerranée occidentale
<b><math>\alpha</math>-Ionone</b>		<i>Viola odorata</i> L. (Violaceae)	Originaire d'Europe et d'Asie
<b><math>\beta</math>-Damascone</b>		<i>Rosa x damascena</i> Mill. (Rosaceae)	Originaire du Moyen-Orient

### Remarques

- ❖ La règle dite de l'isoprène stipule que tous les terpénoïdes sont dérivés de la jonction ordonnée, tête-queue, d'unités de l'isoprène. Une fusion tête-

queue est la plus courante; cependant, une condensation non tête-queue des unités isoprènes se produit également.

- ❖ Les fusions tête-à-tête sont courantes parmi les triterpénoïdes et les caroténoïdes, tandis que certains composés sont formés par tête-à-moyennes fusions (par exemple, monoterpénoïdes irréguliers).
- ❖ Les terpénoïdes sont dérivés de la voie du mévalonate (MVA), active dans le cytosol, ou de la voie plastidique qui est la voie du 2-C-méthyl-D-érythriol 4-phosphate (MEP). Les héli-, mono-, di- et triterpénoïdes sont principalement synthétisés par la voie MEP tandis que les sesqui- et triterpénoïdes par la voie MVA, bien qu'il y ait des exceptions et diaphonie entre les deux voies.
- ❖ Les terpénoïdes nous sont peut-être plus familiers en tant que composants majeurs des huiles essentielles, qui comprennent les fractions distillables à la vapeur, à l'eau ou à sec, ou les fractions obtenues au moyen d'un traitement mécanique, responsables de parfum, odeur et/ou odeur caractéristique de nombreuses plantes. Chimiquement, les huiles essentielles terpéniques peuvent être divisées en deux classes, les mono- et sesquiterpénoïdes, qui diffèrent par leur plage de points d'ébullition (monoterpénoïdes 140-180 °C, sesquiterpénoïdes 200 °C).

### **I.4. Composés de type azotés**

#### **I.4.1. Alcaloïdes**

##### **I.4.1.1. Définition**

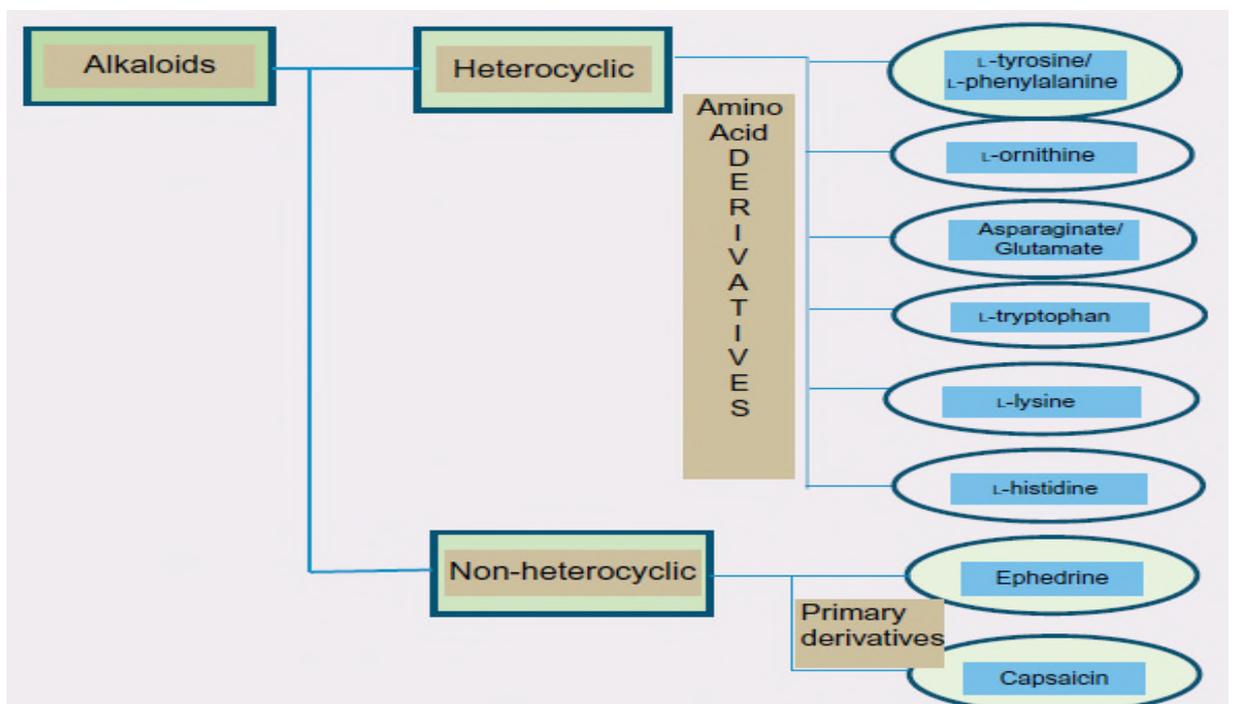
Ce sont des produits d'origine végétale souvent basiques (goût amer) et plutôt hydrophiles. Les alcaloïdes ont été établis pour être présents dans le règne végétal et chez les animaux, y compris les humains, les organismes marins, les champignons et d'autres micro-organismes. Cependant, les plantes sont toujours perçues comme les principales sources naturelles de ces produits naturels abondants (environ 27 000 alcaloïdes décrits à ce jour).

Les alcaloïdes sont des hétérocycles possédant tous au moins un atome d'azote. Ils possèdent de forts effets pharmacologiques qui se

traduisent par une surveillance étroite des produits comestibles pouvant contenir de tels composés. Les principaux précurseurs sont des acides aminés simples comme la tyrosine (tyr), le tryptophane (trp), l'ornithine, l'arginine (arg) ou la lysine (lys).

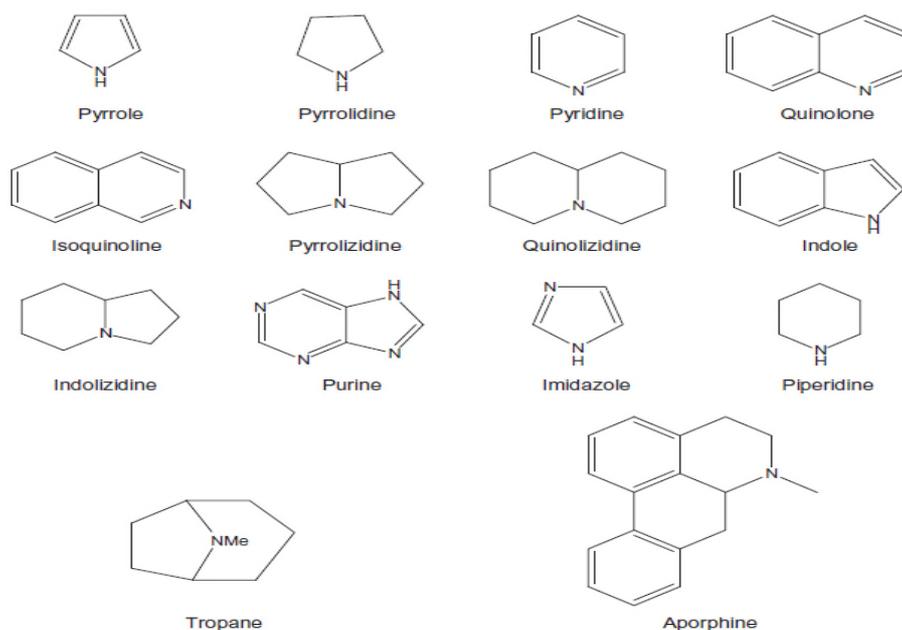
#### **I.4.1.2. Classification**

Les alcaloïdes peuvent être classés en fonction de leur structure chimique, de leur activité biologique, de la voie de leur biosynthèse, et ils peuvent être classés selon la présence dans un hétérocycle ou non tels que les protoalcaloïdes appelés amines biologiques (Figure 5).



**Figure 5.** Origine de différents types d'alcaloïdes.

Généralement la classification est basée sur les structures, les alcaloïdes peuvent ainsi être divisés en différentes classes telles que les indoles, les quinoléines, les isoquinoléines, les pyrrolidines, les pyridines, les pyrrolizidines, les tropanes, les terpénoïdes et les stéroïdes (Figure 6).



**Figure 6.** Structures squelettiques des alcaloïdes de base dans les produits naturels.

Un autre système de classification est lié à une famille d'espèces végétales qu'ils produisent. L'un des exemples est les alcaloïdes de l'opium présents dans le pavot à opium (*Papaver somniferum*). Ces deux systèmes de classification différents entraînent une confusion entre leur distribution biologique et les types chimiques d'alcaloïdes, car il n'y a pas de corrélation indubitable.

Il est plus facile de les classer en fonction de leur précurseur, plutôt qu'en fonction de leur structure :

- Les alcaloïdes issus du L-glutamate transformé en L-ornithine contiennent le système cyclique pyrrolidine ainsi que le système cyclique tropane, que l'on retrouve dans la cocaïne, l'atropine ou la scopolamine.
- Le système cyclique pyrrolizidine est une autre structure dérivée de la voie de la L-arginine.
- Le deuxième groupe d'alcaloïdes dérive de l'acide aminé L-lysine forme la structure centrale de la pipéridine. L'un des alcaloïdes les plus connus basés sur cette structure est la pipérine trouvée dans le poivre noir. La L-lysine est également le précurseur de la structure quinolizidine. Il en va de même pour les alcaloïdes dérivés de la structure indolizidine.

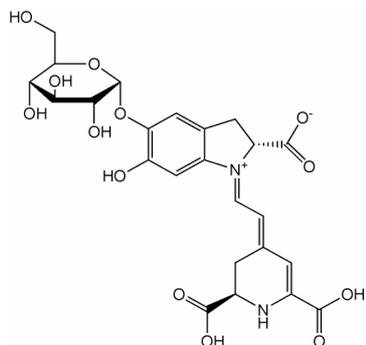
- ▶ Les alcaloïdes pyridiniques, en tant que famille de la vitamine B, sont plus répandus dans l'alimentation humaine (par exemple, la niacine), contiennent une telle structure centrale et proviennent de l'acide aspartique.
- ▶ Les alcaloïdes obtenus à partir du tryptophane peuvent être construits avec la structure du noyau indole (tryptamine, harmine, sérotonine), et plus rarement, sous forme d'alcaloïdes pyrroloindole.
- ▶ L'acide anthranilique, en tant qu'intermédiaire du tryptophane, peut également conduire à des alcaloïdes présents dans la nature (quinazoline, quinoléine et acridine).
- ▶ Les alcaloïdes à structure imidazole, dérivés de l'histidine.
- ▶ La dernière famille d'alcaloïdes que nous rapportons, sont les alcaloïdes dérivés de la purine, qui sont extrêmement bien connus pour leur présence et large consommation. Ils sont principalement représentés par la caféine, la théobromine et la théophylline.
- ▶ Tous les autres alcaloïdes sont généralement des combinaisons des alcaloïdes purs décrits ici avec une combinaison avec d'autres familles telles que les alcaloïdes terpéniques (taxol) ou alcaloïdes stéroïdiques (tomatidine).

### ■ **Bétalaïnes**

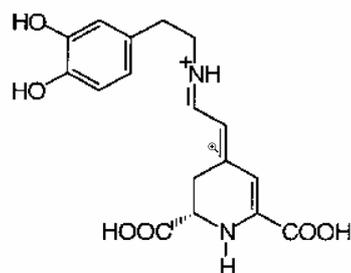
Ces composés sont inclus par certains auteurs parmi les alcaloïdes malgré leur faible activité biologique, les bétalaïnes sont souvent associées dans les manuels aux composés phénoliques en raison de l'équivalence fonctionnelle avec les anthocyanes. Les bétalaïnes sont des pigments hydrosolubles à hétérocycles azotés dérivés de la tyrosine et qui s'accumulent dans les vacuoles.

La présence de bétalaïnes est limitée aux plantes de l'ordre Caryophyllales et à certains Basidiomycota, où ces pigments remplacent les anthocyanes dus à la présence de 4,5-extradiol dioxygénase qui catalyse l'oxydation de la L-DOPA en acide bétalamique. Deux sous-familles sont distinguées (Figure 7):

- Les **bétaxanthines** (pigments jaunes, non glycosylés).
- Les **bétacyanines** (pigments pourpre/rouge, le plus souvent les molécules sont glycosylées) dans les pétales ou les tissus d'un certain nombre de plantes comme la betterave (*Chenopodiaceae*), les cactus (*Cactaceae*) et la lavande de mer (*Limonium vulgare*, une *Plombaginaceae*).



Exemple de bétacyanine:  
La bétanine = forme glycosylée de la bétanidine

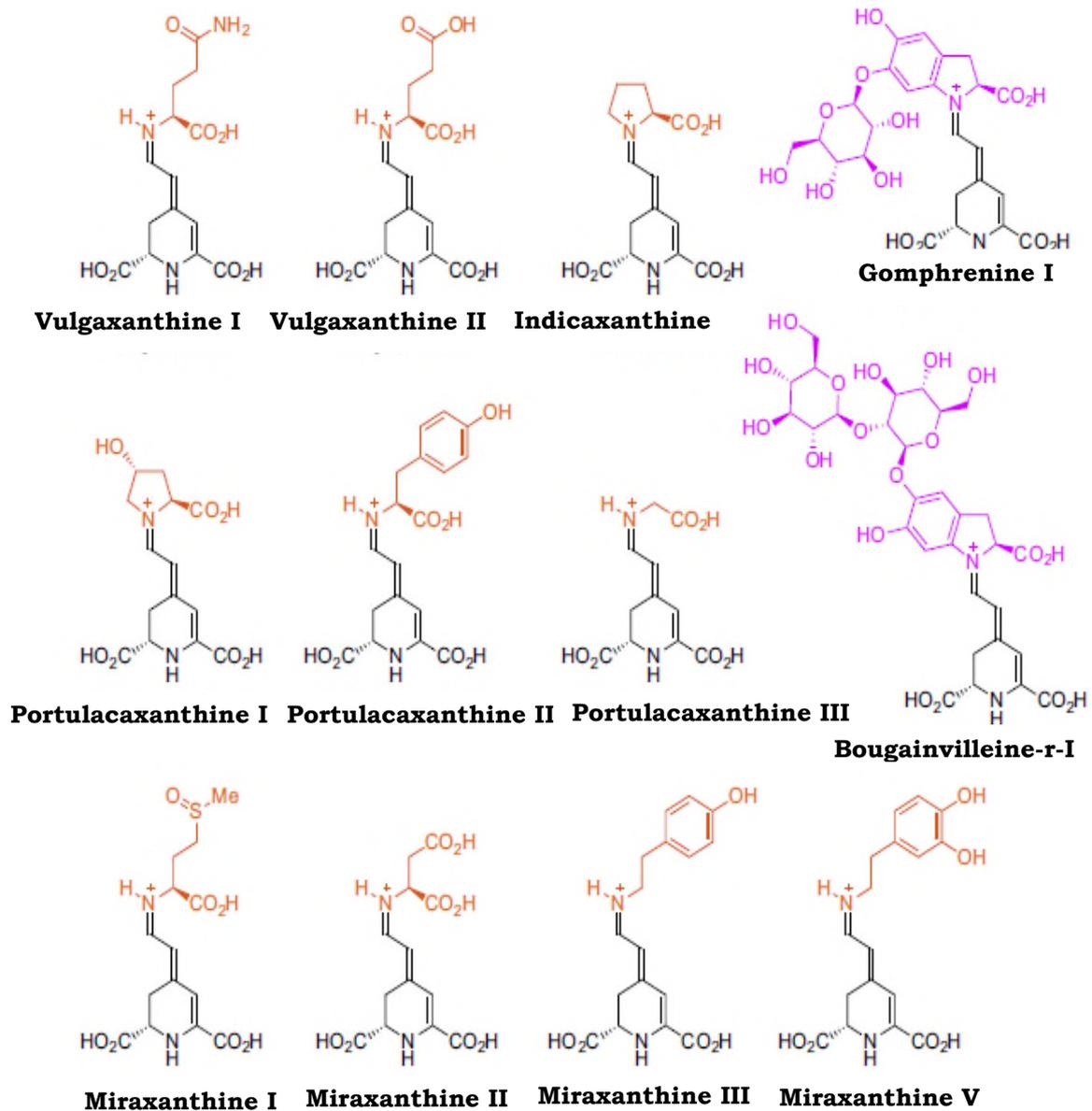


Exemple de bétaxanthine:  
la myraxanthine

**Figure 7.** Structures de bétacyanine et de bétaxanthine.

Des bétalaïnes ont été trouvées également dans les pétales fluorescents des variétés jaunes de *Mirabilis jalapa* et *Portulaca grandiflora*. Les adduits d'acide bétalamique et de cyclo-L-3-(3,4-dihydroxyphényl)-alanine (cyclo-DOPA) sont classés comme des bétacyanines, en raison de leur couleur rouge-violet vibrante. Plus de 70 exemples de bétalaïnes naturelles sont connus.

Plusieurs bétacyanines glycosylées ont été trouvées *in vivo* et les dérivés acylés semblent être plus stables que les non acylés, prétendument en raison de la copigmentation. Les bétaxanthines jaune-orange sont les bétalaïnes formées à partir d'acide bétalamique et d'autres acides aminés et amines. Quelques exemples de bétalaïnes trouvées chez les angiospermes sont illustrés dans la figure 8.



**Figure 8.** Structure des bétalaïnes naturelles. Les bétacyanines sont des bétalaïnes magenta portant une fraction cyclo-DOPA, tandis que les bétaxanthines sont des bétalaïnes jaune-orange dérivées d'amines ou d'acides aminés.

Les principales espèces végétales qui produisent les bétalaïnes sont données en tableau XIV.

**Tableau XIV.** Principales espèces végétales productrices de bétalaïnes.

<b>Famille</b>	<b>Espèces</b>	<b>Nom commun</b>	<b>Bétalaïne</b>
<b>Amaranthaceae</b>	<i>Beta vulgaris</i>	Betterave rouge	Vulgaxanthine (I,II), indicaxanthine, bétanine, prebétanine, isobétanine, néobétanine
	<i>B. vulgaris</i> L. ssp. Cicla [L.] Alef	Bette à carde	Bétaxanthines (20 types) Bétacyanines (9 types)
	<i>Chenopodium rubrum</i>	Chénopode rouge	Vulgaxanthine I et II, amaranthine, celosianine, bétanine
<b>Cactaceae</b>	<i>Hylocereus polyrhizus</i>	Pitaya rouge-violet	Bétanine, isobétanine, phyllocactine, isophyllocactine, hylocérenine, bougainvilleine-r-I
	<i>Optuntia ficus-indica</i>	Figue de Barbarie	Hylocerenine et isohylocerenine, minor apiofuranosyl bétacyanines
<b>Amaranthaceae</b>	<i>Amaranthus</i> sp.	Amaranth	Amaranthine, isoamaranthine
<b>Portulacaceae</b>	<i>Portulaca grandiflora</i>	Rose mousse	Dopaxanthine, vulgaxanthine I, portulacaxanthine II, miraxanthine V, indicaxanthine
<b>Aizoaceae</b>	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Plante de glace	Bétacyanines, mésembryanthine
<b>Nyctaginaceae</b>	<i>Bougainvillea</i> sp.		Gomphrénine I, dérivés de bougainvilleine V, diverses bétaxanthines

■ **Hétérosides cyanogènes et glucosinolates**

▶ **Hétérosides cyanogènes**

Les glycosides cyanogènes, cyanoglycosides ou hétéroside cyanogénétiques, sont des toxines végétales (phytotoxines) très répandues, du groupe des glycosides. Ils se composent d'un glycoside, c'est-à-dire la combinaison d'un alcool et d'un hydrate de carbone (sucre), qui porte en outre un groupe nitrile -CN.

Ce sont des hétérosides dérivés d'acides aminés capables de libérer de l'acide cyanhydrique suite aux actions successives de deux enzymes : une  $\alpha$ -glucosidase qui libère la fraction glucidique, et une hydroxynitrile lyase qui libère l'acide cyanhydrique (toxique) (d'où le nom de cyanogène) + la fraction aglycone (Figure 9).

Dans le cas de l'amygdaline, un hétéroside cyanogène présent dans les noyaux de certaines Rosacées, la fraction aglycone correspond à du benzaldéhyde responsable d'un arôme caractéristique d'amande amère.

Les quantités d'acide cyanhydrique libérées peuvent poser des réels problèmes dans le cadre de l'alimentation animale et humaine. Les exemples classiques sont le sorgho et le manioc. Les jeunes pousses de sorgho contiennent des quantités importantes de dhurrine pouvant provoquer des intoxications du bétail. La consommation du manioc implique une étape de cuisson qui permet de volatiliser l'acide cyanhydrique.

Dans le cas du sorgho, les glycosidases et les hydroxynitrile lyases sont localisées dans les cellules du mésophylle tandis que les hétérosides sont accumulés dans les cellules épidermiques.

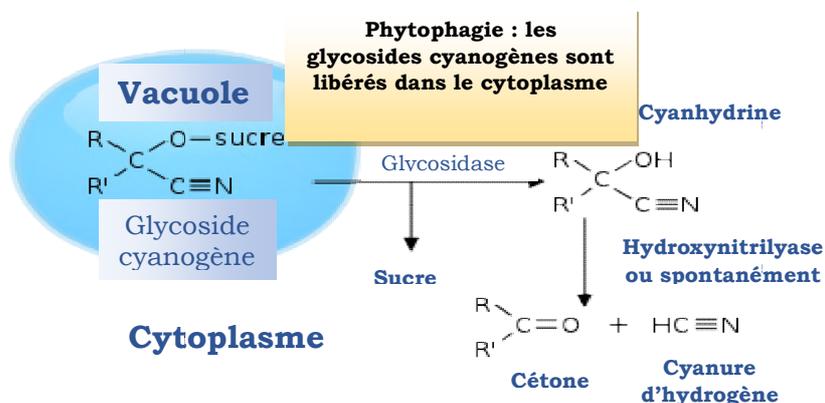
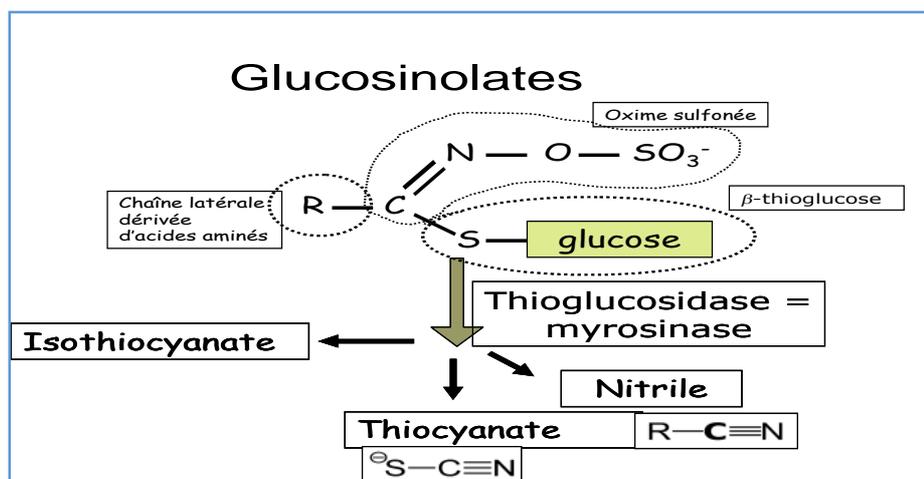


Figure 9. Schéma de la dissociation d'une molécule de glycoside cyanogène.

► **Glucosinolates**

Les hétérosides soufrés (**thiogluco-sides**) dont les génines sont dérivées d'acides aminés, sont relativement caractéristiques des plantes de l'ordre des Brassicales et responsables du goût âcre caractéristique des choux, de la moutarde. L'hydrolyse de ces composés par des enzymes spécifiques des plantes qui les synthétisent produit différents composés toxiques: l'isothiocyanate, le thiocyanate et du nitrile (Figure 10).

Ces composés ont un effet goitrogène lié à l'inhibition du métabolisme de l'iode dans la thyroïde. Ces composés sont également des phagodétendants puissants bien que certains insectes spécialistes aient contourné le problème et même à faire de la présence de glucosinolates un déterminant de leur comportement alimentaire et reproducteur. Des variétés de colza à faibles teneurs en glucosinolates dans les graines ont été développées pour limiter les phénomènes d'inappétence concernant l'utilisation des tourteaux en alimentation animale.



**Figure 10.** Schéma de la dissociation d'une molécule de glucosinolates.

*Remarque*

La distribution taxonomique des glucosinolates est beaucoup plus restreinte que celle des hétérosides cyanogènes.

## Chapitre II Procédés d'extraction des substances naturelles bioactives

La recherche des substances naturelles s'effectue toujours suivant la même démarche scientifique:

- ◆ Prospection et récolte.
- ◆ Identification.
- ◆ **Extraction de substances par solvants.**
- ◆ Screening biologique.
- ◆ Séparation et purification du principe actif.
- ◆ Analyse structurale.
- ◆ Analyses pharmacologiques.
- ◆ Phase industrielle - Synthèse chimique du produit.

### II.1. Historique sur l'extraction

De tout temps, pour peindre ou pour colorer les tissus, les Hommes ont du extraire les couleurs des plantes ou des animaux.

Les Egyptiens utilisaient une technique d'enfleurage ou de diffusion de molécules aromatiques sur divers support gras, en Asie, les décoctions et tisanes étaient préférées. Pour la civilisation Arabe pour qu'un usage en soit fait dans le domaine de l'extraction, la distillation alcoolique était née en utilisant un chauffage traditionnel par le feu.

Au 13<sup>ème</sup> siècle, la distillation, technique issue du Moyen-Orient, permet d'obtenir des huiles essentielles odorantes. C'était jusqu'au 19<sup>ème</sup> siècle où le développement de nouveaux solvants a permis d'isoler de certaines plantes, les molécules chimiques, utilisées, par exemple, comme principes actifs de médicaments.

### II.2. Définition de l'extraction

L'extraction végétale sert à isoler une molécule d'intérêt contenue initialement dans une plante. C'est une opération fréquente dans l'industrie agro-alimentaire (fabrication du sucre de betterave, extraction des huiles végétales...).

## Chapitre II Procédés d'extraction des substances naturelles bioactives

C'est habituellement une opération solide-liquide où un solvant de la molécule d'intérêt est mis en contact avec la matrice végétale, en général sous forme sèche et broyée, de façon à ce que le solvant imprègne le solide.

A l'intérieur des particules de solide la molécule d'intérêt (le soluté) se dissout dans le solvant et diffuse vers l'extérieur des particules pour s'accumuler dans le solvant. A la fin de cette étape, le solvant est en général évaporé et le soluté extrait est récupéré.

### Remarques

- Le solvant vaporisé peut être condensé pour être recyclé vers l'opération d'extraction.
- Quand le soluté à extraire est polaire l'eau est utilisée comme solvant ou des solutions hydro-alcooliques. Quand le soluté est plutôt hydrophobe des solvants organiques sont utilisés, par exemple l'hexane.
- En général un solvant dans lequel le soluté est très soluble est choisi et le phénomène d'extraction est alors limité par le transfert de matière de l'intérieur des particules vers leur surface (diffusion interne) ou de la surface des particules vers le cœur du solvant (transfert de matière externe).

Plusieurs techniques d'extraction peuvent être mises en œuvre pour extraire les principes actifs des plantes, toujours très recherchés pour toutes sortes d'applications : en alimentaire, nutraceutique, cosmétique et pharmacie. Ces techniques peuvent être dites *conventionnelles* (utilisées depuis longtemps) et *nouvelles* (développées plus récemment).

Les techniques conventionnelles utilisent des solvants organiques (tels que l'hexane, l'acétone, le méthanol, l'éthanol etc.) ou l'eau et se réalisent, en général, à pression atmosphérique. Les nouvelles techniques utilisent des pressions et/ou des températures élevées.

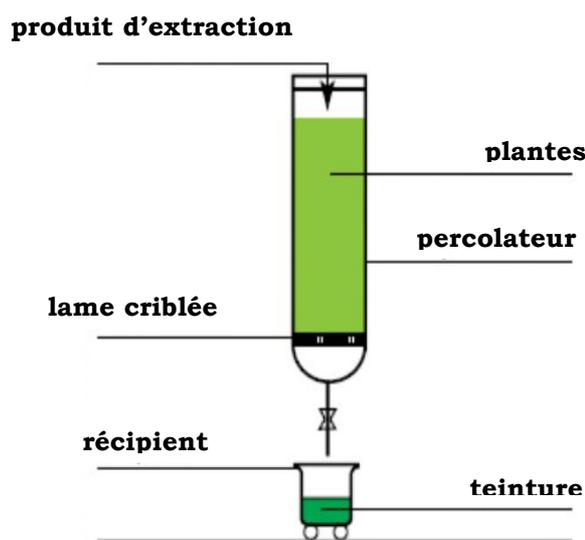
### II.3. Techniques d'extraction traditionnelles

Les techniques conventionnelles qui sont basées sur la solubilité d'un soluté dans un solvant. Ces techniques utilisent souvent une grande quantité de solvant pour extraire le soluté désiré.

Parmi les techniques d'extractions classiques nous pouvons citer :

#### II.3.1. Percolations

Encore nommé lixiviation, ce principe est le même que celui des cafetières portant le même nom. La poudre de plante finement broyée est recouverte par un solvant pendant près d'une journée. Le ruissellement du solvant va s'effectuer très lentement, de l'ordre de quelques gouttes par minute, et le marc sera ensuite pressé (Figure 11). Même si ce procédé est un mode d'extraction efficace, il est de moins en moins employé de nos jours.



**Figure 11.** Extraction par percolation (lixiviation).

#### II.3.2. Enfleurage

Il consiste à extraire naturellement le parfum des fleurs grâce à l'absorption effectuée par les corps gras. Il existe deux types d'enfleurage: à chaud et à froid selon la résistance de la plante à la chaleur.

- *Enfleurage à chaud* (macération): consiste à faire infuser les fleurs ou autres éléments odorants dans des matières grasses, huiles ou graisses,

## Chapitre II Procédés d'extraction des substances naturelles bioactives

préalablement chauffées. Les mélanges obtenus sont ensuite filtrés à travers des tissus afin d'obtenir des onguents parfumés.

► *Enfleurage à froid*: les fleurs les plus fragiles qui ne supportent pas la chaleur sont disposées sur des châssis de verre enduit de graisse et renouvelées tous les 3 à 7 jours selon les espèces. Lorsque le parfumeur considère que la graisse est saturée, elle est grattée et mélangée à un peu d'alcool pour obtenir des pommades ou bien épuisée par de l'alcool. Un liquide nommé l'absolu est alors obtenu (Figure 12).



**Figure 12.** Enfleurage de pétales de rose.

### II.3.3. Pressage

C'est une technique "physique" simple où par exemple, il s'agit d'exercer une pression sur une orange pour obtenir le jus (Figure 13), ou d'écraser des fleurs pour extraire les arômes comme le faisaient les égyptiens. Les écorces des agrumes (citron, orange,...) sont aussi pressées à froid pour extraire leurs huiles essentielles en utilisant des rouleaux ou des éponges.

Les purs jus de plantes obtenus par pression à froid, et donc uniquement par des moyens mécaniques, sont garantis sans conservateurs, sans alcool et sans colorants. Comme les jus de plantes rencontrent un problème majeur de stabilité, ils subissent généralement une stérilisation qui leur permet une conservation optimale dans le temps.



**Figure 13.** Extraction par pressage.

#### **II.3.4. Infusions**

Ce type de procédé est utilisé quand les principes actifs de la plante sont hydrosolubles et peuvent facilement être obtenus à partir du tissu de la plante. L'infusion convient donc parfaitement pour les feuilles, les fleurs, les sommités fleuries et les tiges non ligneuses.

De l'eau très chaude (80°C) est donc ajoutée à la plante moulue ou écrasée et ce mélange repose de quelques minutes à une demi-heure, en le remuant de temps en temps. Le mélange final est tamisé et le liquide obtenu est souvent clair (Figure 14).



**Figure 14.** Extraction par infusion.

#### **II.3.5. Décoctions**

Ce procédé d'extraction est recommandé pour les racines, les écorces et les tiges ligneuses. En effet, il est utilisé quand les substances actives sont hydrosolubles mais pas facilement accessibles. De l'eau froide est donc

## Chapitre II Procédés d'extraction des substances naturelles bioactives

versée sur les parties de plantes coupées, moulues ou écrasées et le tout est mis à bouillir (100°C) de plusieurs minutes (5 à 15 minutes) à quelques heures (Figure 15). Et ce n'est qu'après refroidissement que le mélange est tamisé.



**Figure 15.** Extraction par décoction.

### *Remarque*

Les infusions et les décoctions utilisent la chaleur et sont susceptibles de détériorer certaines substances actives particulièrement thermosensibles. D'autre part, elles ne permettent d'extraire que les composés hydrosolubles et pas les substances liposolubles. Comme tous les constituants actifs ne peuvent être présents dans ces préparations liquides, le principe de macération est souvent utilisé.

### **II.3.6. Macérations**

La macération est une extraction solide-liquide dans laquelle le composé bioactif (soluté) à l'intérieur de la matière végétale est extrait par un solvant spécifique pendant une période de temps bien déterminée. L'efficacité du processus de macération est déterminée par deux facteurs principaux la solubilité et la diffusion. La macération est le choix le plus fréquent des chercheurs vu la simplicité de la mise d'un système d'extraction par macération.

L'inconvénient de la macération est la longue durée d'extraction réduite toutefois par agitation.

## Chapitre II Procédés d'extraction des substances naturelles bioactives

C'est une méthode qui consiste à laisser la plante ou sa poudre en contact prolongé avec un solvant à température ambiante, en vase clos, dans un endroit sombre et frais (Figure 16).

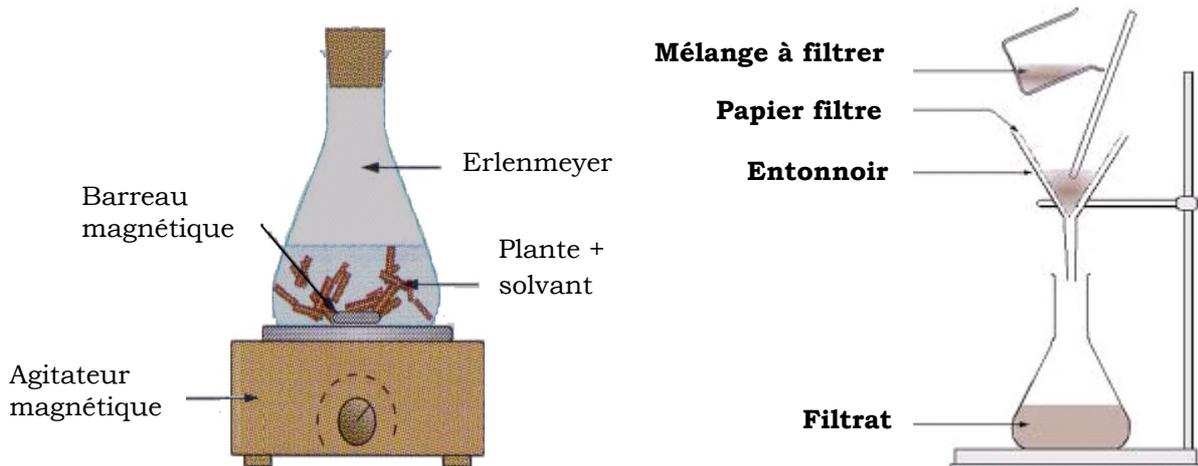
Le choix du solvant repose sur la nature des substances à extraire en tenant compte de sa température d'ébullition et sa viscosité. La solubilisation d'un composé dans un solvant dépend des paramètres suivants : la polarité, le caractère protique ou aprotique. La solubilisation est plus favorisée d'autant plus que ces paramètres sont proches pour le solvant et le soluté. Dans les solvants les plus utilisés figurent l'eau, les alcools (éthanol ou méthanol), l'hexane, le dichlorométhane et l'acétone (Tableau XV) ou aussi des mélanges de solvant.

**Tableau XV.** Classification des solvants utiles pour les extractions végétales.

	<b>Solvants polaires</b>	<b>Solvants moyennement polaires</b>	<b>Solvants apolaires</b>
<b>Protique</b>	Eau Méthanol Ethanol	Acétate d'éthyle Butanol	
<b>Aprotique</b>	Acétone	Chloroforme Dichlorométhane	Hexane

Dans la plupart des cas, le solvant utilisé est un mélange d'eau et d'alcool pour prévenir la fermentation et/ou la détérioration. Ils possèdent l'avantage d'être plus facilement éliminés, dans le cas où l'on veut concentrer l'extrait sous vide. L'utilisation de l'eau est intéressante si l'on veut fractionner la solution obtenue.

A la fin de la période de macération qui est propre à chaque plante, le liquide est égoutté, le marc humide pressé, filtré et mis en flacon ou bouteille. Le produit ainsi obtenu est couramment appelé teinture.



**Figure 16.** Extraction par macération.

Cette méthode présente un avantage en conservant les molécules fragiles. Cependant, la durée de l'opération est longue et nécessite l'emploi d'une quantité importante de solvant.

Parmi les techniques conventionnelles, il existe également l'extraction par distillation, l'extraction par Soxhlet et l'extraction en mode batch.

### II.3.7. Extraction par distillation

Il existe 3 différents procédés utilisant le principe de la distillation. Il s'agit de l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. Ces techniques d'extraction reposent toutes sur le même principe, basé sur l'entraînement des molécules volatiles de la plante par la vapeur d'eau. Le degré de contact entre la plante et l'eau est le seul paramètre qui diffère.

#### ► Hydrodistillation

Dans le cas de l'hydrodistillation, la plante se trouve dans un réacteur où elle est en contact direct avec l'eau bouillante (Figure 17). Selon la densité ou la quantité de la plante utilisée, elle peut flotter ou être complètement immergée dans l'eau. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique.

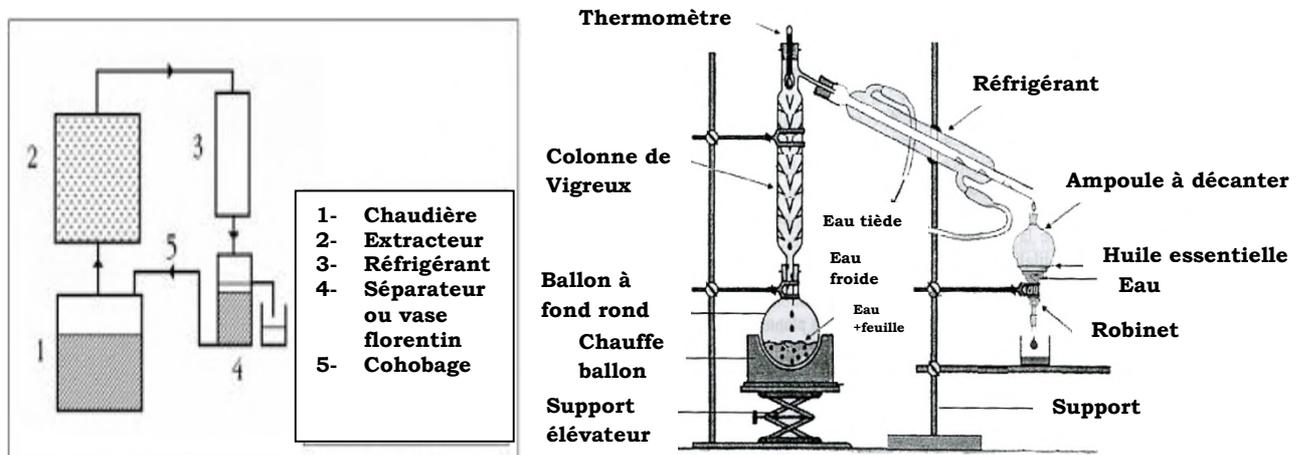
## Chapitre II Procédés d'extraction des substances naturelles bioactives

La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes (huiles parfumées ou huiles essentielles) contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Il est ensuite refroidi et condensé dans un essencier ou vase florentin. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle.

### Remarque

La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage. En laboratoire le système équipé d'une cohobe qui est généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la Pharmacopée Européenne est le Clevenger.

Elle présente l'avantage d'abaisser la température de distillation; les composés volatils sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition.



**Figure 17.** Processus de l'hydro-distillation en continu des plantes.

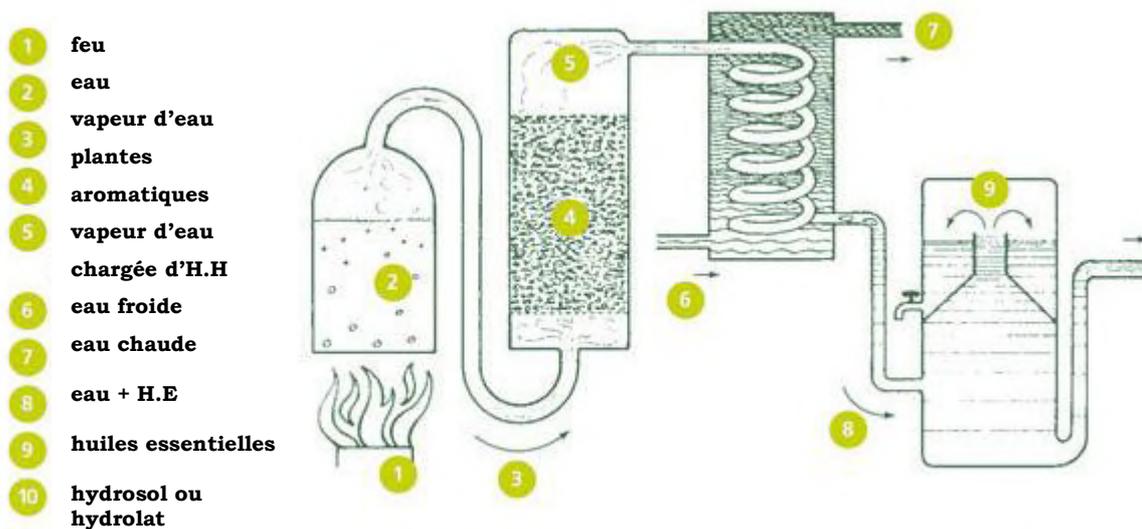
### ► Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles et c'est le moyen le plus répandu pour extraire les molécules volatiles. Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, mais la vapeur d'eau produite par une chaudière est injectée et

traverse la matière végétale de bas en haut, éclate les cellules et entraîne les molécules volatiles (Figure 18).

En traversant un tube réfrigérant, la vapeur d'eau saturée en composés volatils se condense en un mélange hétérogène composé d'huile essentielle et d'hydrolat. On peut également récupérer la phase aqueuse, comportant une faible proportion de composés aromatiques, qui porte alors le nom d'eau florale.

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile.

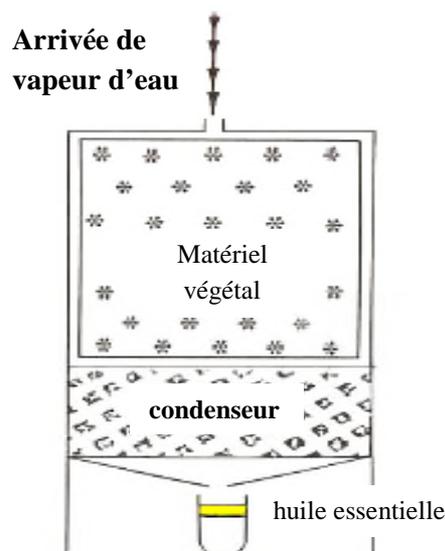


**Figure 18.** Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau.

### ► Extraction par hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur d'eau, dans le cas de l'hydrodiffusion, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant (Figure 19). Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange (vapeur d'eau-huile essentielle) dispersé dans la matière végétale.

Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau, de plus l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur.



**Figure 19.** Montage d'hydrodiffusion.

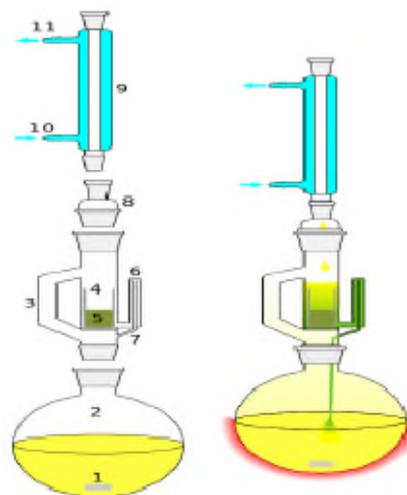
### **II.3.8. Extraction par Soxhlet**

L'extraction par l'appareil de Soxhlet consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisque distillé à chaque cycle (Figure 20).

Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvants passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'adducteur, faisant ainsi macérer les résidus dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites.

Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement en composés solubles. La taille du corps en verre étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives pour récupérer une quantité suffisante d'extrait.

- 1 Agitateur magnétique
- 2 Ballon à col rodé
- 3 Retour de distillation (tube d'adduction)
- 4 Corps en verre
- 5 Filtre
- 6 Haut du siphon
- 7 Sortie du siphon
- 8 Adaptateur d'expansion
- 9 Condenseur
- 10 Entrée de l'eau de refroidissement
- 11 Sortie de l'eau de refroidissement



**Figure 20.** Représentation schématique d'un extracteur Soxhlet.

Cette technique est loin d'être exclusive aux molécules aromatiques et peut être utilisée quelque soit la matrice végétale. Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction de lipides, ou de diverses autres catégories de molécules. De plus, elle ne nécessite pas de filtration après extraction.

Ses inconvénients les plus significatifs sont la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée (devant être ultérieurement évaporé), ce qui limite sa rentabilité économique et la rend peu écologique. Il n'y pas de possibilité de travailler à froid, ce qui peut être gênant avec des substances sensibles à la chaleur. Cette technique est limitée d'un point de vue de la sélectivité du solvant et n'est pas facilement automatisable.

### II.3.9. Extraction en mode batch (échelle laboratoire)

Il s'agit d'un dispositif simple composé de fioles de 500 mL (où l'on dispose la matière première et le solvant) et d'un agitateur secoueur thermostaté (Figure 21). Les expériences qui ont été réalisées grâce à cette technique nous ont permis d'estimer l'influence de divers paramètres (nature et concentration du solvant, hydromodule (rapport solvant-matière solide), granulométrie, température etc.).

Son avantage majeur vs le Soxhlet est la possibilité de travailler facilement avec des mélanges de solvants (ex: différents ratios alcool-eau) et

## Chapitre II Procédés d'extraction des substances naturelles bioactives

de contrôler la température d'extraction pour éviter le risque de destruction des composés thermolabiles. C'est une méthode simple et efficace mais qui exige des procédures ultérieures de filtration et de concentration relativement longues.



**Figure 21.** Photographie de l'agitateur secoueur utilisé pour l'extraction batch.

### *Remarques*

Il y a habituellement deux modes opératoires qui se déroulent durant l'extraction :

- ▶ **L'extraction discontinue** par macération, infusion, décoction, etc... On laisse tremper les particules de solide dans une cuve contenant le solvant (chaud ou froid) avec ou sans agitation.
- ▶ **L'extraction discontinue avec régénération du solvant** (type Soxhlet) : le solvant pur issu de l'évaporation est condensé puis percole par gravité à travers le solide où il extrait le soluté qui s'accumule dans la solution riche d'où a lieu l'évaporation.

Bien que ces méthodes conventionnelles ou traditionnelles d'extraction sont des procédures simples, elles présentent une série d'inconvénients : faible sélectivité et faibles pourcentages de récupération ou rendements d'extraction. Ce sont également des procédés très laborieux et chronophages ; ils utilisent également de grandes quantités de solvants organiques qui, dans de nombreux cas, peuvent être toxique et peuvent rester à l'état de traces dans les extraits.

### **II.4. Techniques nouvelles**

Les techniques innovantes donnent plus d'efficacité, nécessitent moins de temps et utilisent des matières premières renouvelables, par conséquent moins de pollution. Ces techniques se résument essentiellement en extraction assistée par ultrasons (UAE), extraction assistée par micro-ondes (MAE), extraction accélérée par solvant (ASE) et extraction par fluide supercritique (SFE).

Il existe également d'autres techniques extractives, moins répandues, comme, par exemple, l'extraction solide-liquide à moyenne pression (medium-pressure solid-liquid extraction - MSLE) dont le principe est le suivant : le solvant, alimenté par une pompe, traverse sous une certaine pression (~10 bar) une colonne remplie de matériel à extraire (colonne à lit fixe).

#### **II.4.1. Extraction accélérée par solvant (ou PLE : extraction par liquide pressurisé)**

Cette technique a été introduite en 1995 et fut rapidement adoptée dans les laboratoires puisqu'elle a l'avantage d'effectuer des extractions beaucoup plus rapides (15-25 minutes) en utilisant moins de solvant (15-45 mL).

C'est une technique d'extraction moderne utilisée pour l'extraction des molécules bioactives en utilisant des solvants à haute température et haute pression, mais sans atteindre le point critique.

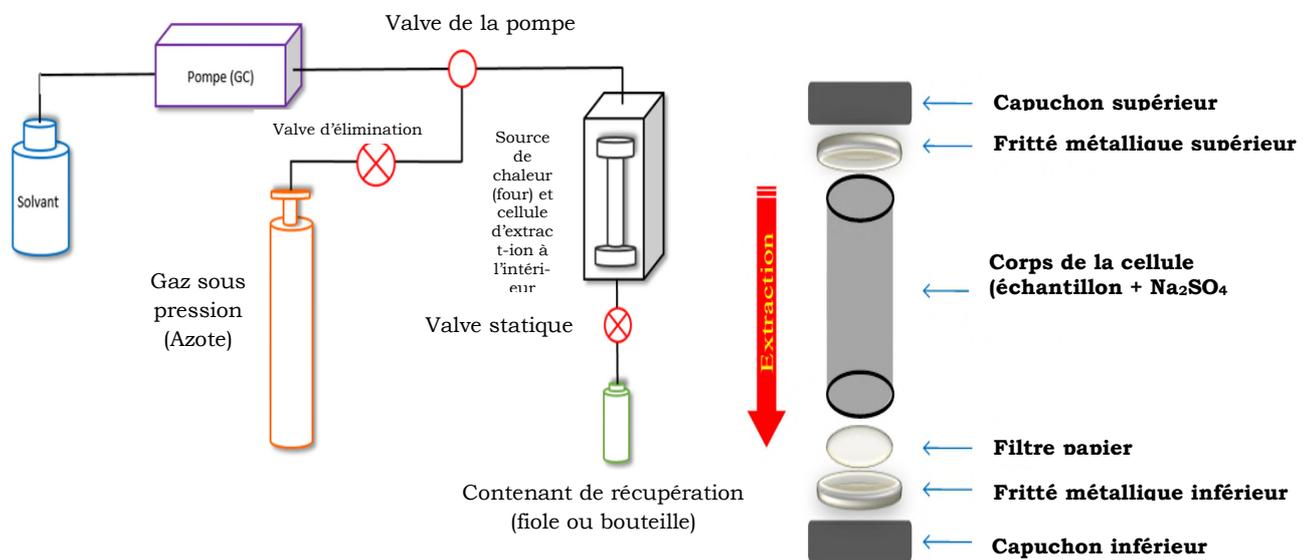
Avec l'extraction par liquide pressurisé, un échantillon solide ou semi-solide est introduit dans une cellule d'extraction de la taille la plus près de la taille de l'échantillon. Celui-ci sera soumis à des températures très élevées (de 50 à 200 °C). La pression est de 1500 psi afin de garder le solvant à l'état liquide. Les solvants principalement utilisés sont l'eau, le méthanol, l'acétone ou l'hexane. La température élevée diminue la viscosité des solvants en phase liquide ce qui permet une meilleure interaction entre la matrice et le solvant. L'augmentation de la pression permet au solvant de s'introduire dans des zones de la matrice qui ne sont pas normalement accessibles dans les conditions atmosphériques.

L'échantillon est sec et finement fragmenté et la cellule d'extraction est chauffée avant de mettre le solvant qui est en suite, pompé dans la cellule d'extraction afin de la remplir. Le remplissage est arrêté pour permettre à la cellule d'être sous pression et jusqu'à ce que la pression ciblée soit obtenue.

Après que la pression soit obtenue et stable, il y a alors une période statique où le solvant est constamment en circulation grâce à la pompe, et ce, à température (entre 50–200 °C) et pression élevées (entre 500-3000 psi). Cette période dure environ 5 minutes. C'est pendant cette période que l'analyte passe de la matrice au solvant.

Après que la période statique soit terminée, du solvant frais est pompé dans la cellule afin de la rincer. Du diazote compressé force le solvant à sortir de la cellule d'extraction.

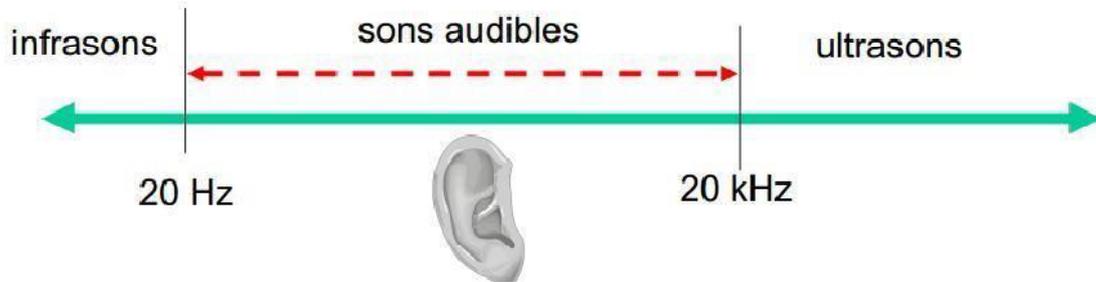
Toutefois, lors de l'extraction, la matrice est introduite dans une cellule en acier inoxydable qui contient un filtre positionné dans la partie basse de celle-ci. Ainsi, l'extrait obtenu est filtré avant d'être envoyé vers un flacon de récupération ce qui élimine l'étape de filtration (Figure 22).



**Figure 22.** Montage de l'extraction par liquide pressurisé et schéma simplifié d'une cellule d'extraction PLE.

### II.4.2. Extraction assistée par sonication

La gamme de fréquences des ultrasons se situe entre 20 kilohertz et 1gigahertz, trop élevées pour être perçues par l'oreille humaine (Figure 23).



Infrasons	Sons	Ultrasons	Méga sons	Hyper sons
1Hz....	20Hz....	20KHz....	1MHz....	1GHz....

Figure 23. Classification du son selon les fréquences.

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. Dans un milieu liquide la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (**haute Pression**) et de raréfaction (**basse pression**) (Figure 24).

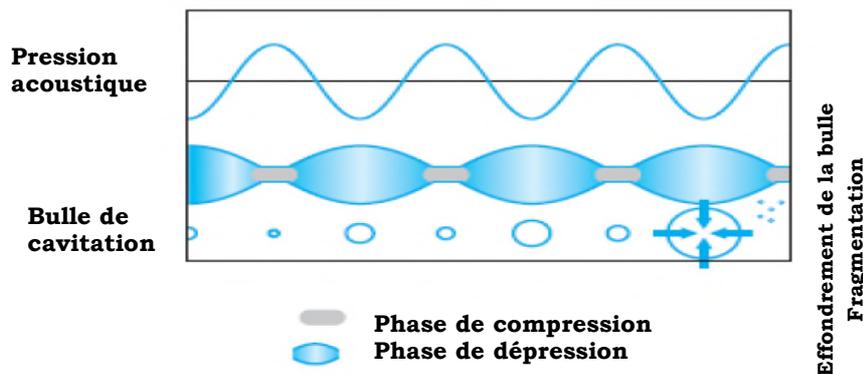
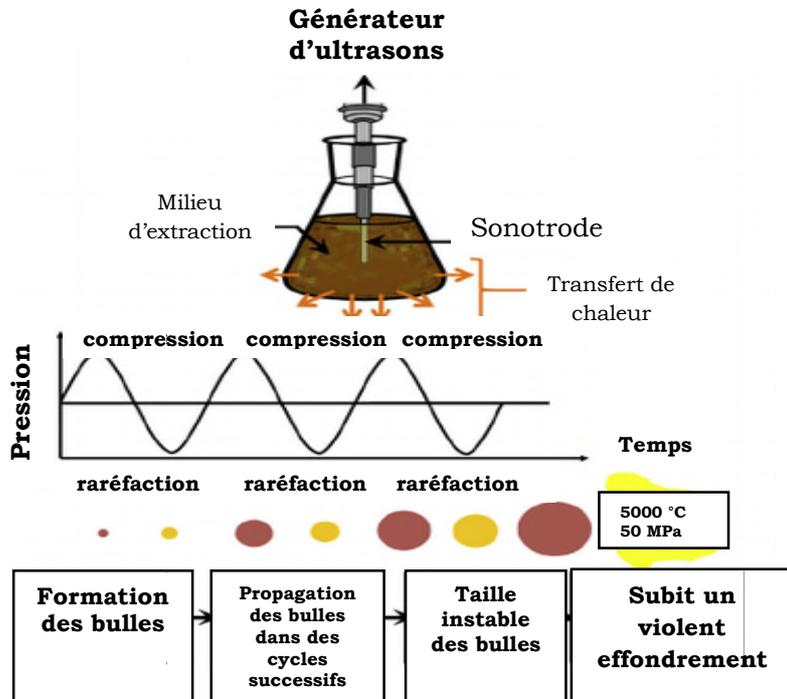


Figure 24. Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation.

Cette différence de pression va générer des mouvements moléculaires au sein du milieu. Lors d'un cycle de raréfaction la distance entre molécules est augmentée et au dessus d'une certaine distance, dépendant de chaque milieu, des bulles de cavitations vont se former. Ces bulles vont croître

pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression. La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité de matière (Figure 25).



**Figure 25.** Formation des bulles de cavitation au cours de l'extraction aux ultrasons.

Lorsque les bulles de cavitation sont formées à proximité d'une surface solide elles deviennent asymétriques, et l'implosion qui en résulte produit des jets de liquide projetés à très grande vitesse vers la surface du solide, ainsi qu'une augmentation locale de la température et de la pression (Figure 26).

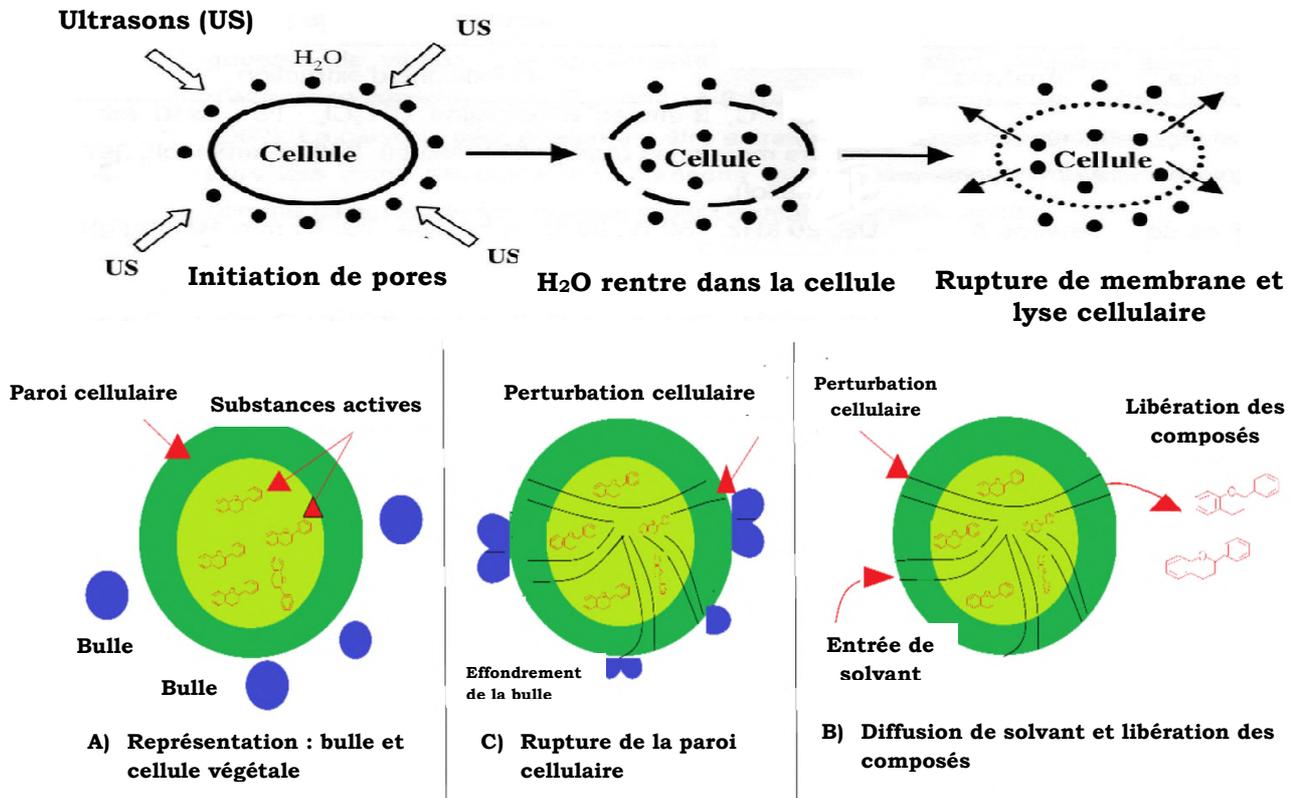


**Figure 26.** Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide.

Dans le cas d'une matrice végétale, ces jets de liquides vont percer les parois végétales et permettre ainsi la libération des molécules dans le milieu liquide.

## Chapitre II Procédés d'extraction des substances naturelles bioactives

L'effet mécanique des ultra-sons sur la matrice végétale induit une meilleure pénétration du solvant dans les cellules, ce qui améliore ainsi le transfert de masse et augmente le rendement d'extraction et la cinétique d'extraction (Figure 27).



**Figure 27.** Mécanisme de dommage cellulaire par ultrasons.

L'extraction assistée par sonication est une méthode facile à mettre en œuvre, efficace et peu coûteuse. Par rapport à une extraction classique, elle permet de réduire le ratio solvant/soluté et offre une accélération de la cinétique, ce qui conduit à une augmentation du rendement d'extraction des composés bioactifs. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. L'extraction par sonication permet d'utiliser une large gamme de solvants afin d'obtenir différents composés naturels.

Deux types d'équipements à ultrasons sont couramment utilisés dans les laboratoires. Le premier est le bain à ultrasons qui est couramment utilisé pour la dispersion de solides dans un solvant ou pour le dégazage des

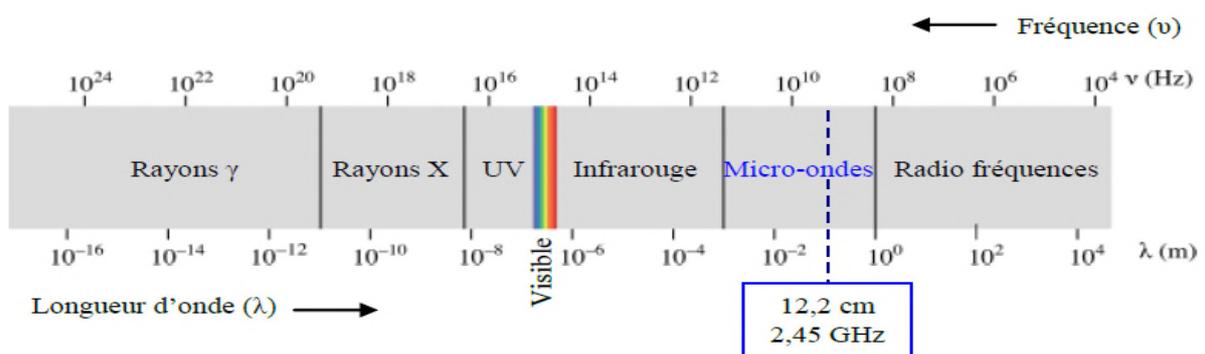
solutions. Le second équipement, une sonde à ultrasons, est beaucoup plus puissant en raison d'une intensité ultrasonore délivrée sur une petite surface (pointe de la sonde) par rapport au bain à ultrasons (Figure 28).



**Figure 28.** Appareillages utilisés pour l'extraction aux ultrasons.

### II.4.3. Extraction assistée par microondes

Les rayonnements micro-ondes sont des ondes électromagnétiques non ionisantes qui se propagent dans le vide à la vitesse de la lumière. Elles sont caractérisées par une fréquence comprise entre 0,3 et 30 GHz, c'est-à-dire par une longueur d'onde comprise entre 1 m et 1 cm. Sur le spectre électromagnétique, elles sont situées entre les radiofréquences et les infrarouges (Figure 29).



**Figure 29.** Représentation du spectre électromagnétique et positionnement des micro-ondes domestiques.

Le pouvoir énergétique des micro-ondes a été mis en évidence à la fin de la seconde guerre mondiale, fin 1945, d'une façon anecdotique par un physicien, le Dr Spencer, suite à l'oubli de son sandwich sur un émetteur d'ondes ! Alors que jusqu'ici, les micro-ondes ou hyperfréquences étaient

uniquement utilisées comme vecteur d'information, elles investirent les foyers puis les laboratoires de chimie dans les années 80.

### ■ Technologie du four à micro-ondes

Un four à micro-ondes est constitué de trois éléments principaux (Figure 30):

- ◆ le générateur micro-ondes,
- ◆ le guide d'onde,
- ◆ la cavité micro-ondes.

Les micro-ondes de forte puissance sont produites par des tubes à vide dont le plus habituel est le magnétron : il s'agit d'une diode thermoïonique composée d'une cathode chauffée qui émet des électrons et d'une anode polarisée positivement par rapport à la cathode pour attirer les électrons par le champ électrique continu  $E_0$ . Ce champ à haute tension est produit par une alimentation électrique à 50 Hz à partir du secteur redressé.

Le guide d'onde permet de convoier et de guider les ondes émises par le magnétron. Le guide est généralement un tube métallique ou un conducteur cylindrique dont la section droite est limitée par un contour fermé pouvant contenir d'autres contours. Sa génératrice sera choisie comme axe de propagation. Deux modes de propagation peuvent exister : le mode TM (transverse magnétique), ou bien, le mode TE (transverse électrique).

L'applicateur est une cavité fermée qui doit assurer le transfert au matériau à traiter de l'énergie électromagnétique provenant du magnétron. Deux grandes catégories d'applicateurs existent : les applicateurs monomodes et les applicateurs multimodes. Un applicateur est dit monomode lorsque ses dimensions géométriques sont choisies de telle sorte qu'à la fréquence de travail, il n'existe qu'une configuration de champ. L'énergie électromagnétique emprisonnée se réfléchit sur les parois et donne lieu à des ondes stationnaires. Ce type d'applicateur permet ainsi le contrôle précis du champ électrique, il est cependant réservé aux matériaux de petit volume.

L'applicateur multimode consiste en une cavité suffisamment grande afin qu'il existe plusieurs types de configurations de champ. Le champ électrique n'y est pas stable comme dans une cavité monomode et sa distribution varie. Il est préférable donc d'utiliser des applicateurs multimodes pour le traitement des volumes importants, et des matériaux dont les paramètres électriques et magnétiques varient peu.

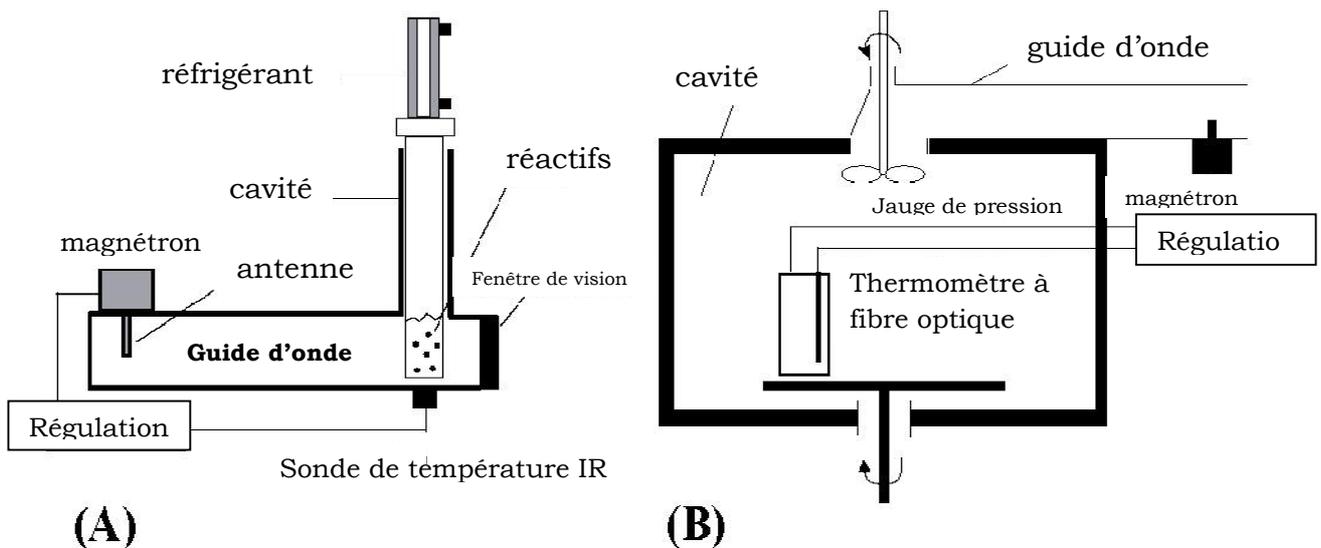


Figure 30. Schéma d'un four micro-ondes monomode (A) et multimode (B).

Les premiers travaux utilisant les micro-ondes pour extraire des composés organiques ont été publiés en 1986. Le dispositif utilisé pour l'extraction est donné en figure 31.

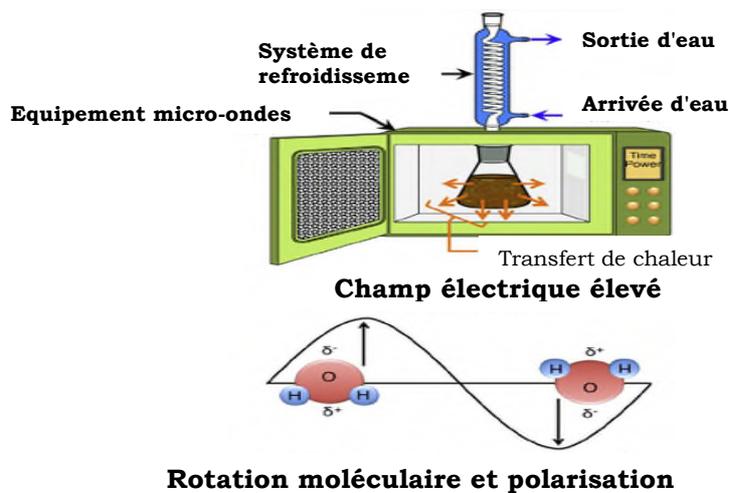


Figure 31. Dispositif d'extraction par microonde.

### Le chauffage micro-ondes

Le transfert de chaleur sous chauffage micro-ondes est complètement inversé par rapport au chauffage conventionnel. Le transfert de chaleur classique se transmet de l'extérieur vers l'intérieur du récipient. Sous chauffage micro-ondes, le volume traité devient lui même source de chaleur. On parle de dégagement de la chaleur de l'intérieur vers l'extérieur du récipient.

La paroi externe du réacteur est plus froide que le milieu du réacteur dans le cas du chauffage micro-ondes, et inversement pour le cas du chauffage conventionnel par double enveloppe, plaque chauffante et flamme.

C'est un mode de chauffage instantané en volume et non en surface. Les phénomènes thermiques de conduction et de convection ne jouent plus qu'un rôle secondaire d'équilibrage de la température. Des surchauffes locales peuvent également se produire. La figure 32 illustre les deux modes de chauffage.

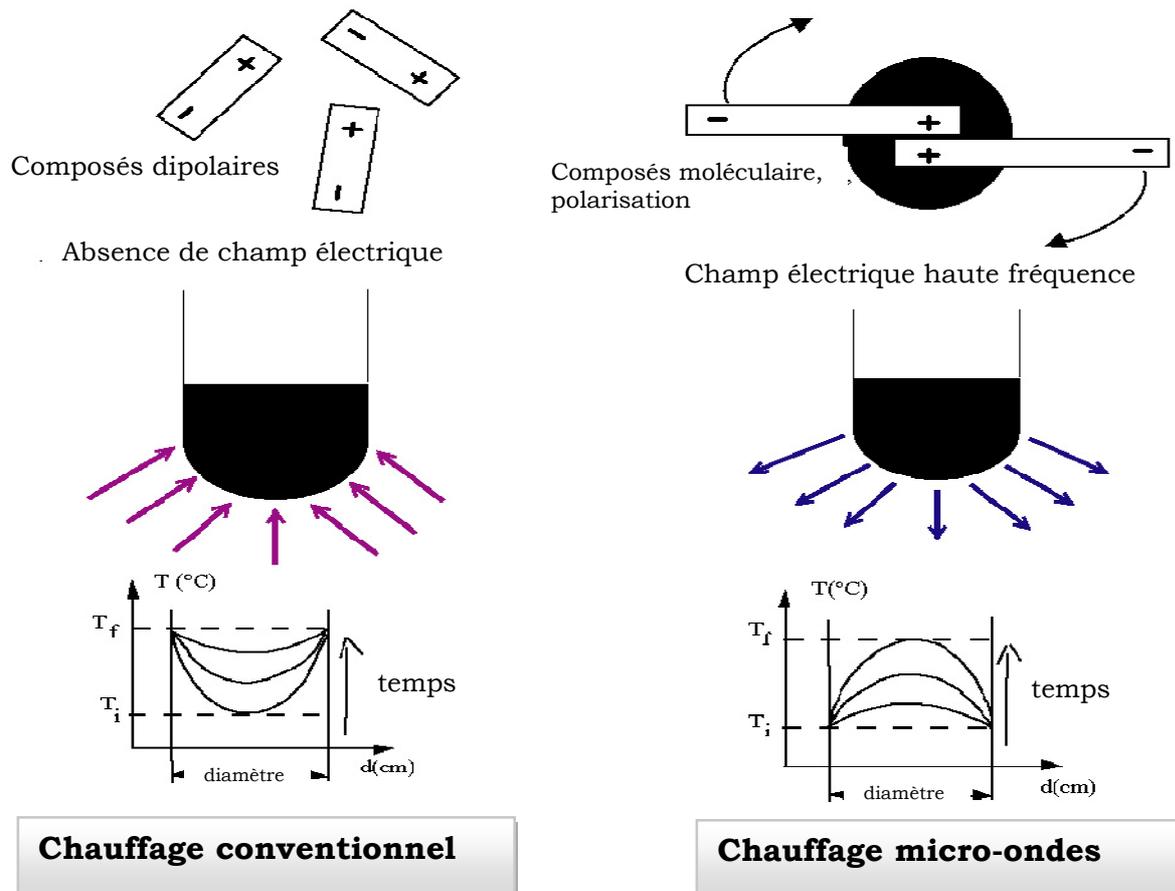


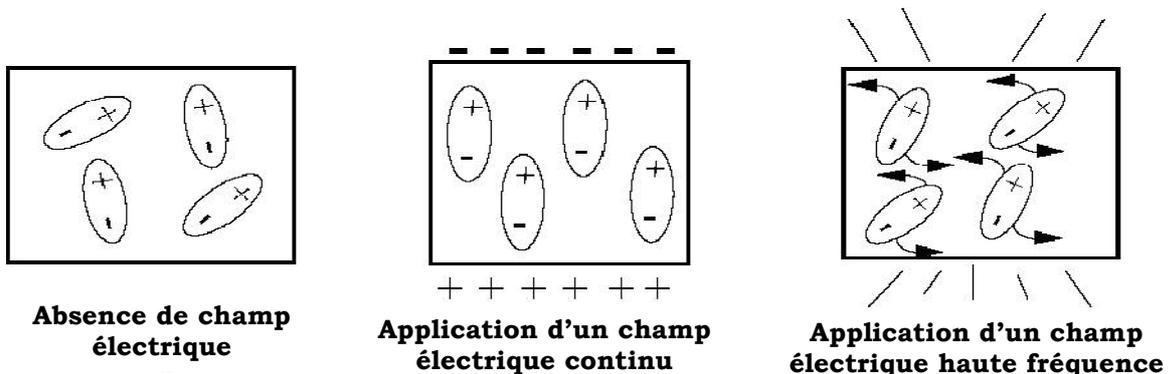
Figure 32. Transferts thermiques sous les deux modes de chauffage.

Le principe de chauffage de la matière par les micro-ondes est dû à deux phénomènes qui interviennent simultanément: la conduction ionique et la rotation dipolaire.

► **La conduction ionique** est due à la migration électrophorétique des ions dans un champ électromagnétique. La résistance du milieu à ces courants ioniques induit des frictions libérant de la chaleur par effet Joule.

► **La rotation dipolaire** correspond au phénomène d'alignement/réalignement des molécules possédant un dipôle dans un champ électrique alternatif de haute fréquence. En l'absence de champ électrique, les molécules constituées d'un dipôle diélectrique sont orientées aléatoirement. Sous l'effet d'un champ électrique continu, les molécules s'orientent dans la direction du champ électrique. Et lorsque les molécules dipolaires sont soumises à l'effet d'un champ électrique alternatif de haute fréquence, elles s'orientent dans la direction du champ, se désorientent lorsque le champ s'annule puis se réorientent dans l'autre sens du champ (Figure 33).

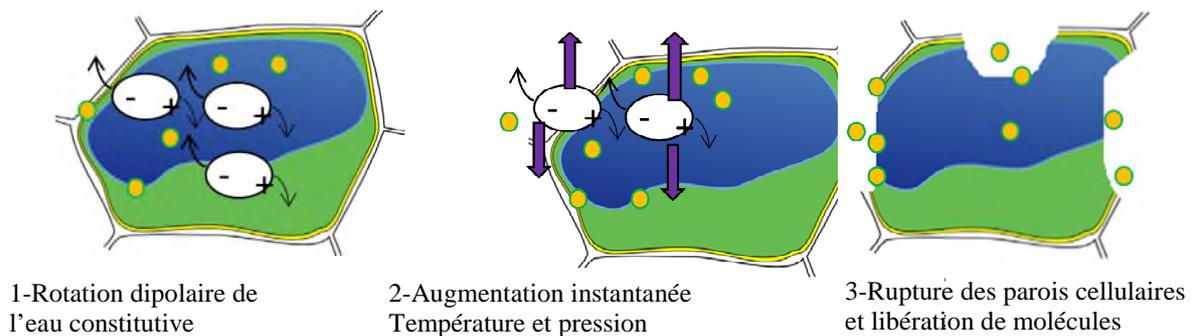
Les mouvements de réalignement vont être perturbés par les liaisons qui existent entre les molécules (liaisons hydrogène, liaisons de Van der Waals) induisant des frictions entre molécules et par conséquent une libération d'énergie thermique. Avec une fréquence de travail de 2,4 GHz, ce phénomène intervient  $4,9 \cdot 10^9$  fois par seconde ce qui se traduit par un échauffement de la matière très rapide voire quasi instantané.



**Figure 33.** Représentation schématique du comportement de molécules possédant un dipôle en l'absence de champ électrique, sous l'effet d'un champ électrique continu et sous l'effet d'un champ électrique de haute fréquence.

Cet échauffement rapide constitue l'une des spécificités du chauffage micro-onde. Du fait de l'habilité des micro-ondes à pénétrer directement au cœur des biomatériaux et atteindraient directement les systèmes glandulaires et vasculaires du végétal, le transfert de chaleur s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur de celui-ci, au contraire des chauffages classiques par conduction, pour lesquels le transfert de chaleur s'effectue de l'extérieur vers l'intérieur induisant une cinétique d'extraction plus longue.

Cette particularité entraîne une extraction des principes actifs végétaux par surpression interne (une perturbation de la structure cellulaire) et effet osmotique, ce qui facilite la diffusion du composé bioactif à partir de la matrice végétale (Figure 34) et permet une extraction très efficace avec une grande concentration des extraits.

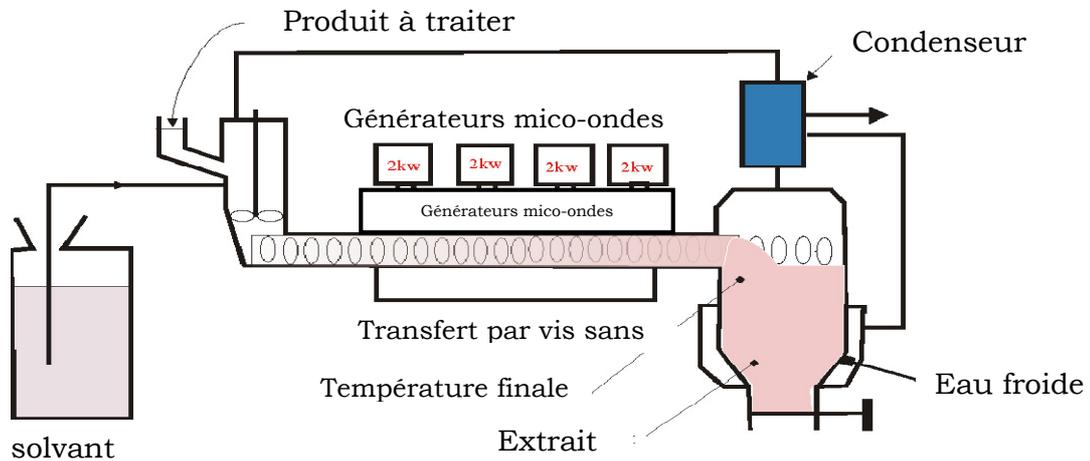


**Figure 34.** Etapes de l'extraction des substances bioactives à partir de la matière végétale.

L'extraction micro-ondes peut être directe ou assistée à la vapeur, à l'eau ou à un solvant, sous pression ou sous vide, sous atmosphère contrôlée (azote). Donc, l'extraction par micro-ondes regroupe différents procédés parmi lesquels :

▀ *L'extraction par solvant assistée par micro-ondes* ou « MAE : microwave assisted extraction » (Figure 35). Ce procédé consistait à irradier par micro-ondes de la matière, végétale ou non, broyée au préalable en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (exemple : le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en

présence d'un solvant n'absorbant pas les microondes (exemple : hexane) pour l'extraction de composés apolaires. L'ensemble était chauffé sans jamais atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupés par des étapes de refroidissement.



**Figure 35.** Extraction par solvant assistée par micro-ondes.

- *L'entraînement à l'air* : consiste à extraire de l'huile essentielle par chauffage micro-ondes sans solvant en utilisant un compresseur à air. Le système proposé est inspiré du procédé de l'entraînement à la vapeur classique. Il se compose en fait de trois parties : un compresseur envoyant de l'air dans le ballon où se trouve la matière végétale placée dans un four micro-ondes domestique (Figure 36).

Ce ballon est soumis aux radiations micro-ondes. La vapeur d'eau saturée en molécules volatiles est ensuite entraînée vers un second ballon de récupération plongé dans de la glace et situé à l'extérieur du four à micro-ondes. L'eau ainsi que les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle sont donc condensées dans ce ballon extérieur.

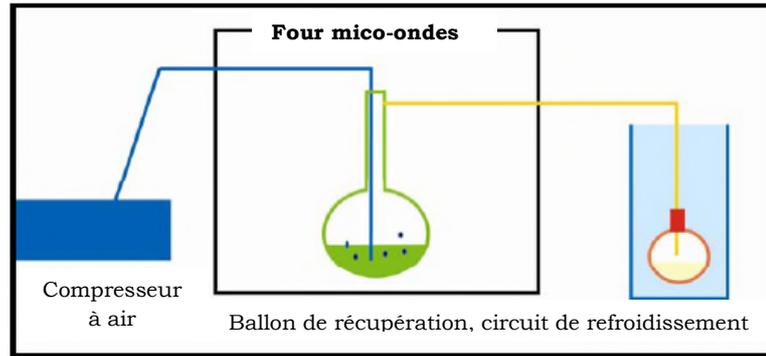


Figure 36. Entraînement à l'air assisté par micro-ondes.

- L'hydrodistillation sous pression réduite « VMHD : vacuum microwave hydrodistillation » ou hydrodistillation par microondes sous vide (Hydro Distillation par Micro-ondes sous Vide pulsé (VMHD)) : cette technique d'extraction, dont l'origine est l'hydrodistillation classique, est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé.

Le matériel végétal à traiter frais ou sec (auquel cas on lui rajoute une quantité d'eau requise) est soumis durant une période  $\delta_1$  aux micro-ondes dont le rôle est d'assurer le transfert de matière, puis durant un temps  $\delta_2$  à un vide pulsé qui permet l'entraînement azéotropique des substances volatiles à une température inférieure à  $100^\circ\text{C}$  (Figure 37). Cette opération peut être répétée plusieurs fois.

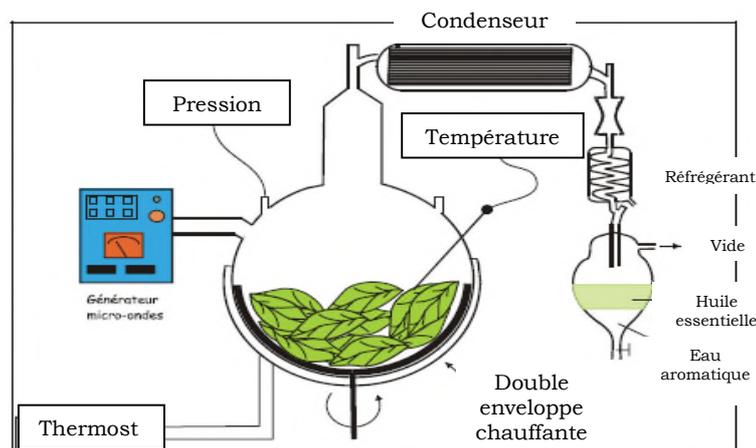


Figure 37. Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite (VMHD).

### Remarque

D'après les concepteurs du VMHD, l'extraction serait dix fois plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement équivalent et un extrait de composition identique.

Les notes « crues » les plus thermosensibles semblent être conservées après une extraction par VMHD contrairement à une hydrodistillation classique.

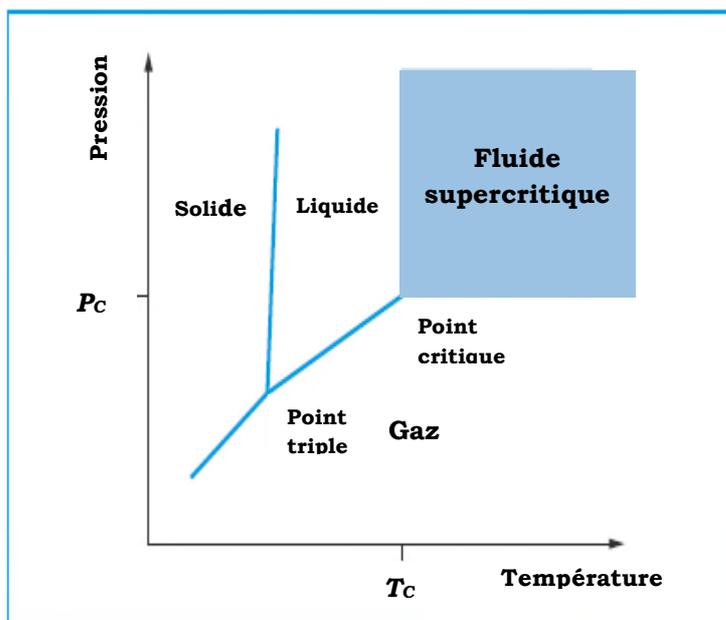
- *L'hydrodistillation* : ce procédé basé entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique consiste à placer une partie du montage d'hydrodistillation dans le four à micro-ondes. Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique.

### II.4.4.Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique (procédé écologique/économique)

Le développement de nouvelles technologies de séparation dans l'industrie chimique, pharmaceutique, cosmétique et alimentaire est lié aux exigences pour la protection de l'environnement, la santé publique et au besoin de minimiser la consommation énergétique des procédés.

L'extraction supercritique est apparue au stade industriel vers la fin des années 1970 comme procédé alternatif à la distillation de plantes.

Un composé est en conditions supercritique lorsqu'il est porté à une température et à une pression supérieures à sa température et sa pression critique ( $T_c$  et  $P_c$ ), comme représenté sur la figure 38. A titre d'exemple les coordonnées critiques de quelques composés sont indiquées dans le tableau XVI.



**Figure 38.** Diagramme de phases d'un corps pur.

Un fluide supercritique peut être considéré comme un gaz dense, possédant des propriétés physico-chimiques intermédiaires entre celles de l'état liquide et de l'état gazeux. Pour illustrer ce propos, les valeurs typiques des propriétés physiques du fluide aux états gazeux, liquide et supercritique (FSC) sont répertoriées dans le tableau XVII.

On peut y observer que la masse volumique est plutôt proche de celle des liquides alors que la viscosité sera plutôt faible comme celle d'un gaz, la diffusivité étant intermédiaire entre celles des états gazeux et liquides (d'où le terme de gaz dense). Il en résulte également que d'autres propriétés telles que la conductivité thermique, la tension interfaciale ou la capacité calorifique ont un comportement singulier.

**Tableau XVI.** Coordonnées critiques de quelques composés.

<b>Solvant</b>	<b>T<sub>c</sub> (°C)</b>	<b>P<sub>c</sub> (bar)</b>
<b>Eau</b>	374	218
<b>CO<sub>2</sub></b>	31	74
<b>Propane</b>	97	42
<b>Ethane</b>	32	48
<b>Butane</b>	152	38
<b>Acétone</b>	235	47
<b>Ethanol</b>	243	63
<b>Pyridine</b>	347	55

**Tableau XVII.** Propriétés physico-chimiques typiques des états gazeux, liquide et supercritique.

Propriété physique	Gaz ( $T_{amb}$ )	FSC ( $T_c$ ' $P_c$ )	Liquide ( $T_{amb}$ )
<b>Densité (kg.m<sup>-3</sup>)</b>	0,6 2	200 500	600 1600
<b>Viscosité dynamique <math>\mu</math> (mPas)</b>	0,01-0,3	0,01 – 0,03	0,2 -3
<b>Viscosité cinétique <math>\eta</math> (10<sup>6</sup> m<sup>2</sup>. S<sup>-1</sup>) (a)</b>	5-500	0,2 -0,1	0,1 - 5
<b>Conductivité thermique <math>\lambda</math> (W/mK)</b>	0,01-0,025	Maximum (b)	0,1 – 0,2
<b>Coefficient de diffusion D (10<sup>6</sup> m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>)</b>	10 40	0,07	0,0002 0,002
<b>Tension de surface (Dyn/cm<sup>2</sup>)</b>	-	-	20-40

(a) La viscosité cinétique est définie par la relation  $\eta = \mu/\rho$ .

(b) La conductivité thermique présente des valeurs maximales autour du point critique où elle est hautement dépendante de la température.

De par ses propriétés spécifiques, le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est le composé le plus utilisé à l'état supercritique : il possède un bon pouvoir solvant pour l'extraction de composés apolaires tels que les molécules hydrophobes (alcanes, huiles) et peut dissoudre certaines molécules faiblement polaires et volatiles telles que les alcools, les esters, les aldéhydes et les cétones.

### Solubilité dans le CO<sub>2</sub> supercritique

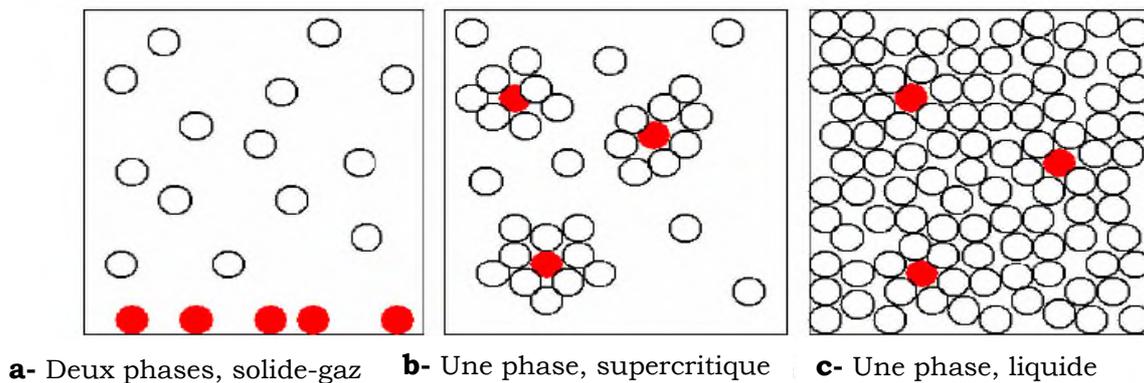
Le pouvoir solvant du CO<sub>2</sub> supercritique dépend exponentiellement de sa masse volumique. Dans le domaine supercritique, la densité des molécules est voisine de celle du liquide, favorisant ainsi les interactions intermoléculaires. Cela confère à cet état un certain pouvoir solvant vis-à-vis de solutés normalement à l'état liquide ou solide dans ces conditions de pression et de température.

La figure 39 illustre le changement de phase du CO<sub>2</sub> à partir des phases gaz et liquide distinctes vers une phase homogène supercritique.



**Figure 39.** Changement de phase de dioxyde de carbone supercritique.

La figure 40 présente une vision simplifiée de la situation d'un soluté non volatil présent dans les différents états d'un solvant.



**Figure 40.** Phénomène d'agrégation dans un fluide supercritique. Blanc : molécule de solvant, rouge : molécule de soluté.

En effet, dans le cas d'un soluté solide soumis à la pression d'un gaz, les interactions sont très faibles et aucune solvation significative ne se produit (Figure 40a). En phase liquide, la concentration de la solution est telle que la solvation est grande et une seule phase est observée (Figure 40c). On constate que la densité pour un fluide supercritique est modérée, plus faible que dans le cas d'une phase liquide mais très supérieure à celle observée en phase gaz. Les agrégats formés autour des molécules de solutés montrent que la densité locale est élevée avec une solvation relative (Figure

## Chapitre II Procédés d'extraction des substances naturelles bioactives

40b). Pour de faibles concentrations en soluté, une seule phase serait observée.

L'utilisation du CO<sub>2</sub> supercritique (CO<sub>2</sub> SC) comme solvant d'extraction de molécules organiques à partir de plantes est l'application la plus ancienne et la plus développée à l'échelle industrielle, notamment dans le secteur agroalimentaire.

Le premier exemple d'industrialisation de ce procédé concerne la décaféination du café. Le CO<sub>2</sub> de par ses propriétés physico-chimiques (incolore, inodore, non toxique, non inflammable, largement disponible à de très hauts degrés de pureté et à des coûts modérés) est le fluide supercritique le plus utilisé (solvant vert). De plus, du fait de ses conditions critiques modérées (T<sub>c</sub> = 31 °C, P<sub>c</sub> = 73,8 bar), le CO<sub>2</sub> SC est très rapidement apparu comme un candidat particulièrement approprié à l'extraction végétale.

Parmi les avantages de l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique (CO<sub>2</sub>SC) par rapport aux procédés classiques, on peut citer :

- ▶ Diffusivité facilitée dans les matières solides.
- ▶ Pouvoir solvant « à géométrie variable » (élevé en conditions supercritiques et très faible à l'état gazeux).
- ▶ Conditions douces de température.
- ▶ Facilité de récupération et purification des extraits par dépressurisation.
- ▶ Pas de réactions indésirables avec le solvant.
- ▶ Minimisation voire élimination des solvants chimiques.
- ▶ Extrapolation simple.

Quelques inconvénients cependant :

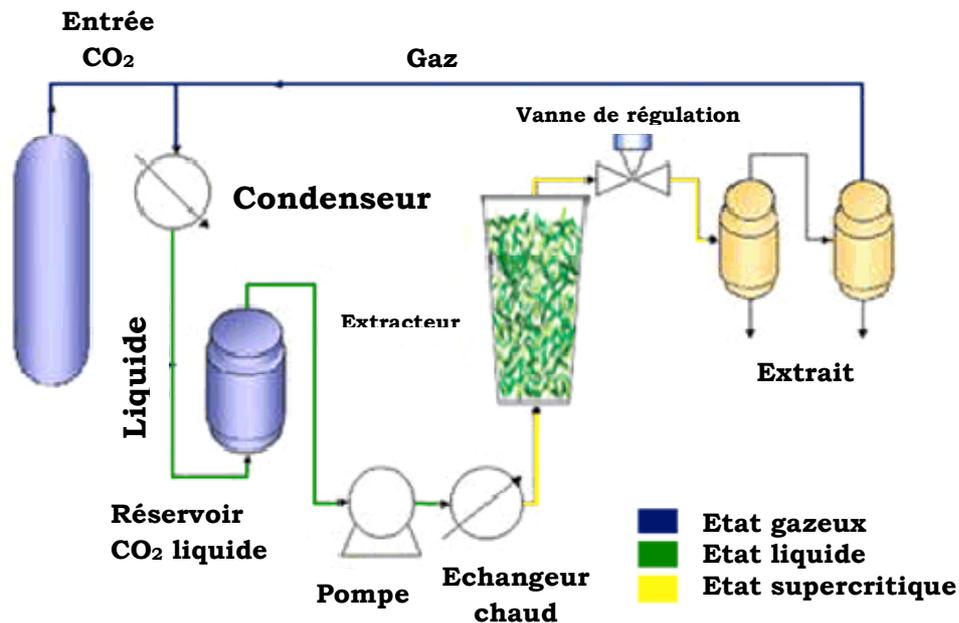
- ▶ Pouvoir solvant souvent plus faible que solvants chimiques traditionnels.
- ▶ Difficulté de traitement en cas de matières végétales humides.
- ▶ Coût d'investissement plus élevé.

### Mode opératoire et caractéristiques de l'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique

Le CO<sub>2</sub> sous pression et à température supérieure à 31 °C, le gaz carbonique se trouve dans un état «supercritique », la matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO<sub>2</sub> est introduit sous pression et réfrigéré. Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion. La pression y étant réduite, le CO<sub>2</sub> reprend ainsi sa forme gazeuse et est complètement éliminé. En sortie d'extracteur, l'extract est détendu ce qui provoque une séparation des solutés et du CO<sub>2</sub>, puis le CO<sub>2</sub> est re-comprimé, comme schématisé sur la figure 41. L'extract végétal est isolé, les matières premières ainsi obtenues sont proches du produit naturel d'origine sans trace résiduelle de solvant.

#### Remarque

L'extraction par le CO<sub>2</sub> supercritique utilise le mode Soxhlet où la régénération du solvant est réalisée habituellement par changement de pression.



**Figure 41.** Schéma simplifié d'une opération d'extraction au CO<sub>2</sub>SC avec séparation par détente.

Ainsi, le cycle complet que subit le fluide comporte 3 zones :

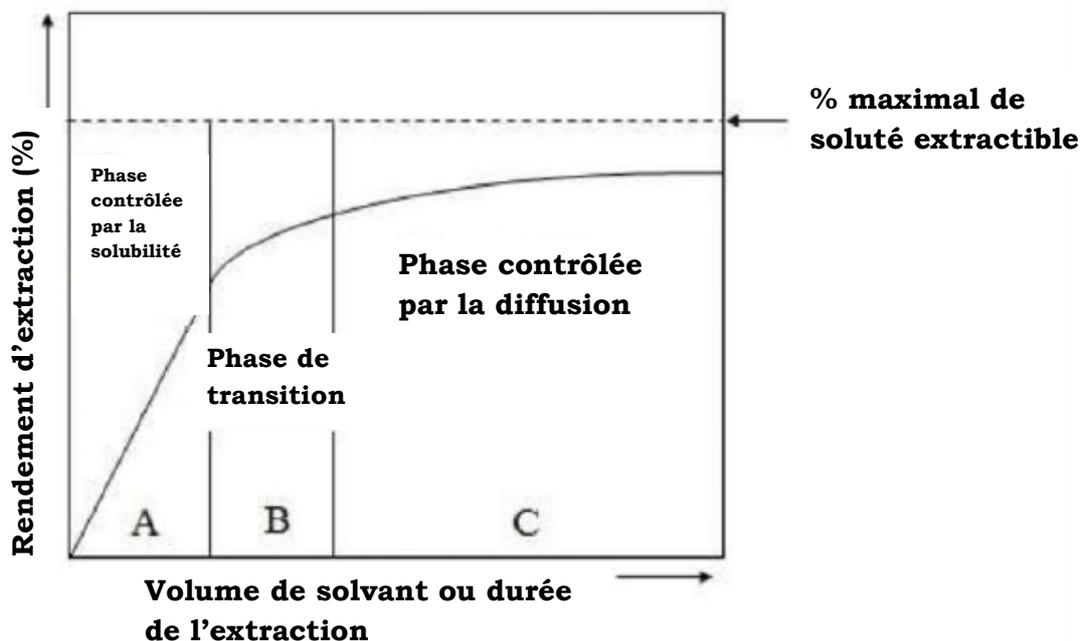
- la zone où le fluide est en état supercritique et où s'effectue l'opération d'extraction ;

- ◆ la zone de séparation où l'on récupère le fluide quasi-pur ;
- ◆ La zone de recyclage où il est remis en état supercritique pour entamer un nouveau cycle.

Contrairement à l'extraction solide-liquide classique, il est fréquent de mettre en évidence une extraction limitée par la solubilité du soluté car le CO<sub>2</sub> supercritique n'est pas un très bon solvant. Les paramètres thermodynamiques (pression, température) deviennent alors déterminants. L'extraction au cours du temps comporte donc en général deux phases distinctes :

- ▶ Une partie où l'extraction est contrôlée par la solubilité du/des solutés dans le CO<sub>2</sub> (contrôle thermodynamique).
- ▶ Une seconde partie où l'extraction est contrôlée par la diffusion interne au sein des particules (contrôle par le transfert). Une limitation par le transfert externe est beaucoup moins fréquente.

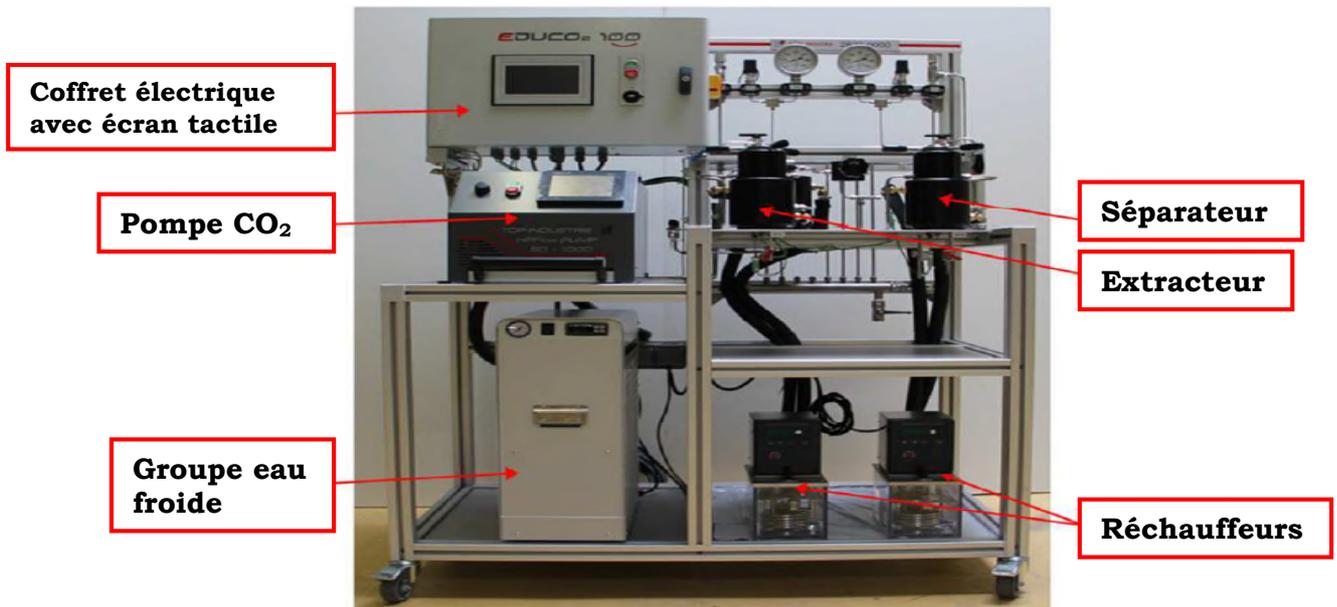
Ces phases sont visibles sur la courbe de la figure 42 représentant schématiquement une cinétique d'extraction.



**Figure 42.** Allure générale d'une cinétique d'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique.

### ✚ Présentation de l'installation

L'installation d'extraction supercritique est présentée ci-dessous (Figure 43).



**Figure 43.** Appareillage utilisé pour l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique.

L'installation comprend :

- une pompe à CO<sub>2</sub> avec débitmètre intégré et écran tactile,
- un réchauffeur,
- un extracteur d'une contenance de 0,22L,
- un séparateur d'une contenance de 0,22L,
- 2 bains chauffant permettant de chauffer l'extracteur et le séparateur,
- un système de refroidissement pour la pompe,
- un coffret de commande avec écran tactile et port USB,
- un crochet permettant de sortir la cellule d'extraction de l'extracteur,
- 2 capteurs de pression (extracteur + séparateur),
- 2 manomètres (extracteur + séparateur),
- 3 soupapes de sécurité,
- 10 vannes manuelles,
- un déverseur manuel,
- 3 entrées (CO<sub>2</sub> + co-solvant + nettoyage),
- 6 capteurs de température.

## **Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation**

L'isolement et la caractérisation de composés bioactifs constituent un sujet de recherche très actuel. De nombreuses études explorent aujourd'hui la possibilité de leur transformation en ingrédients incorporables dans différents produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques. Cet intérêt particulier est dû au fait qu'au cours des dernières années, les Hommes ont commencé à se réorienter vers l'utilisation de produits naturels au détriment de ceux issus de la synthèse chimique. Les multiples effets bénéfiques de ces composés issus de sources naturelles sont attribués à leurs diverses activités biologiques (antioxydante, antimicrobienne, antivirale, anti inflammatoire etc.).

### **III.1. Tests rapides confirmant l'existence des métabolites secondaires dans un extrait**

Ca consiste à détecter la présence des différentes grandes familles de métabolites secondaires. Il s'agit de : composés phénoliques, flavonoïdes, coumarines, tanins (galliques et catéchiqes), quinones, dérivés anthracéniques, phlobotanins, chalcones, alcaloïdes, stérols et polyterpènes, saponines (triterpènes et stéroïdes) et glycosides cardiotoniques.

La méthode fait appel aux réactifs spécifiques de chaque famille. En effet, cette dernière met en évidence ses caractéristiques en donnant naissance à des réactions de précipitation, de floculation et de complexation en présence de ses réactifs spécifiques.

#### **III.1.1. Réactions colorées**

##### **► Polyphénols totaux**

Pour mettre en évidence les polyphénols, la réaction au chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) a été utilisée. Ainsi, à 2 mL de chaque solution, est ajoutée une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés polyphénoliques l'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée.

## **Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation**

### **► Flavonoïdes**

Les flavonoïdes ont été recherchés par la réaction à la cyanidine. Deux (2) mL d'extrait ont été évaporés et le résidu a été repris dans 5 mL d'alcool chlorhydrique dilué 2 fois. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il y a un dégagement de chaleur puis une coloration rose orangé ou violacée. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique intensifié cette coloration qui confirme la présence de flavonoïdes.

### **► Tannins catéchiques**

La recherche des tannins catéchiques s'est réalisée à partir du réactif de Stiasny. Cinq (5) mL de chaque extrait ont été évaporés à sec. Après l'ajout de 15 mL du réactif de Stiasny au résidu, le mélange a été maintenu au bain-Marie à 80 °C pendant 30 min. L'observation d'un précipité en gros flocons caractérise les tannins catéchiques.

### **► Tannins galliques**

L'extrait est recueilli et saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl<sub>3</sub> provoquerait l'apparition d'une coloration bleu-noir intense, signe de la présence de tannins galliques.

### **► Quinones**

Les substances quinoniques ont été recherchées à partir du réactif de Bornstraëgen. Deux (2) mL d'extrait ont été évaporés à sec. Le résidu est trituré dans 5 mL d'acide chlorhydrique au 1/5. Le triturât est versé dans un tube à essais. Le triturât est porté ensuite au bain-Marie pendant 30 min. Après refroidissement, il est extrait par 20 mL de chloroforme. L'ammoniaque diluée 2 fois (0,5 mL) a été ajouté à la solution chloroformique. Une coloration rouge ou violette constituait le signe de la présence de quinones.

### **► Terpénoides totaux**

Pour mettre en évidence les stérols et les polyterpènes, on utilise le réactif de LIEBERMANN. En effet, cinq (5) mL d'un extrait de plante est

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

évaporé à sec dans une capsule sur bain de sable ou bain Marie. Le résidu est dissout à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique. L'addition de 0,5 mL d'acide sulfurique concentré au triturât induit l'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre et violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive.

#### ► Saponosides

Pour rechercher les saponosides, 10 mL de l'extrait total aqueux sont versés dans un tube à essais. Le tube est agité pendant 15 s puis laissé au repos durant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indiquait la présence de saponosides.

#### ► Alcaloïdes totaux

L'extrait sec est repris dans 6 mL d'alcool à 60 °C et deux gouttes de chaque réactif sont ajoutées à la solution alcoolique. Les sels d'alcaloïdes donnent avec les complexes iodés de métaux lourds des précipités colorés caractéristiques. Les trois réactifs les plus utilisés sont :

- le réactif de **BOUCHARDAT** : solution iodo-iodurée : précipités bruns;
- le réactif de **DRAGENDORFF** : solution iodo-bismuthite de potassium : précipités orangés à rouge-vermillon ;
- Le réactif de **VALSER-MAYER** : solution de mercuri-iodure de potassium : précipité blanc-jaunâtre (Figure 44).



**Figure 44.** Coloration obtenues au cours de la mise en évidence des alcaloïdes.

## Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

### ► Composés cyanogéniques

Le matériel végétal sec (2 g) est humecté avec de l'eau. Ensuite, 1 mL de  $\text{CHCl}_3$  est versé. Une bandelette de papier filtre imprégnée de solution fraîchement préparée de picrate de sodium (préparée en mélangeant 5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,5 g d'acide picrique et 100 mL d'eau distillée) est insérée au-dessus de la drogue et pliée sur le bord du tube à essai. Le tube est ensuite bouchée avec du coton hydrophile et chauffée au bain Marie à 35 °C pendant 3 h. Le virage de la coloration du papier picrosodé au rouge orangé par production de vapeur d'acide cyanhydrique HCN indique un résultat positif du test.

### ► Iridoïdes

#### ■ Réaction avec HCl dilué suivi de chauffage

0,5 mL de HCl 12% aqueux est additionné à 1 mL de solution limpide d'extrait organique. Le mélange est ensuite chauffé au bain-Marie à 80 °C pendant 2 à 3 min.

#### ■ Réaction de Trim et Hill

Le réactif utilisé est préparé à partir d'un volume égal de solution aqueuse de  $\text{CuSO}_4$  à 5% (*m/v*) et de HCl 12% aqueux. 0,5 mL de ce réactif est ajouté à 1 mL de solution limpide d'extrait. Le mélange est ensuite chauffé au bain Marie à 80 °C pendant 2 à 3 min.

Pour chaque réaction, l'apparition de précipité noir après chauffage indique la présence des iridoïdes.

### III.1.2. Tests de mise en évidence par CCM

Cette technique de détection CCM est simple, reproductible et sensible car permet la détection de la présence de plusieurs phytosubstances.

La révélation des familles chimiques de substances se fait au moyen des réactifs révélateurs spécifiques (Tableau XVIII). En effet, après pulvérisation du chromatogramme par le réactif de révélation, une observation de la coloration dans le visible ou par rayonnements UV 254 nm

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

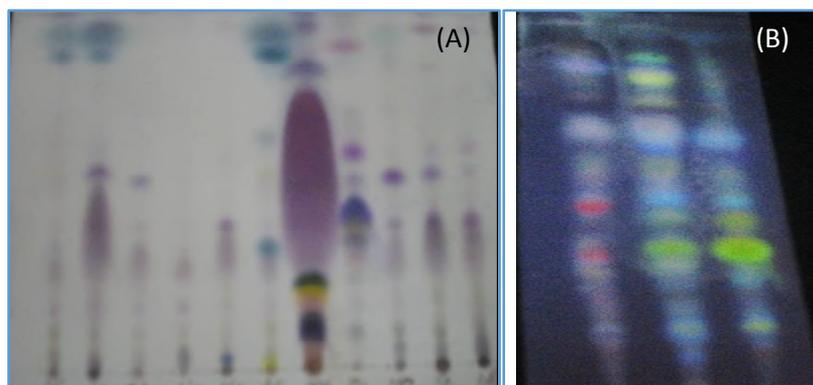
et UV 365 nm permet l'évaluation de la famille chimique des substances actives présentes.

**Tableau XVIII.** Révélation des familles chimiques par CCM.

Réactifs révélateurs	Composés révélés	Visualisation		
		Dans le visible	Sous UV 254 nm	Sous UV 365 nm
<b>Sans réactif</b>	Coumarines			Jaune, vert
	Xanthones			Orange
	Flavonols et/ou aurone			Jaune quelconque
	Coumarine/flavones méthylées			Bleu pourpre
<b>AlCl<sub>3</sub> à 1% dans l'éthanol absolu</b>	Flavonoïdes	Jaune		Jaune
	Flavonoïdes	Jaune		Vert
	Flavonoïdes	Jaune pale		Bleu
	Flavonoïdes	Jaune pale		Vert
<b>KOH à 7% dans le méthanol</b>	Coumarine	Jaune		Vert
	Coumarine	Jaune pale		Bleu
	Coumarine	Jaune pale		Vert
	Coumarine	Jaune vert		Vert
<b>Réactif de LIEBERMANN-BURCHARD suivi de chauffage pendant 10 min à 110 °C</b>	Stéroïdes		Bleu	Jaune vert
	Triterpènes de type oléane, ursane		Bleu	Rouge
	Ursane			
	Stéroïdes		Bleu	Jaune vert
	Stéroïdes		Non révélé	Jaune

#### Exemples

- **Stérols et polyterpènes: Liebermann-Bürchard; Vanilline sulfurique** (Figure 45).

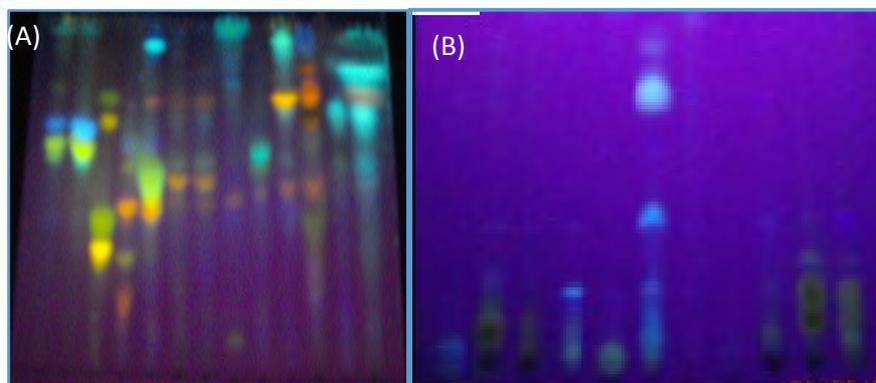


**Figure 45.** Mise en évidence des stérols et terpènes par CCM.

(A) Stérols et terpènes révélés dans le visible (stérols : brun, vert ; triterpènes : bleu, violet).

(B) Stérols et terpènes révélés sous UV/366 nm (stérols : Jaune, jaune-vert ; triterpènes : rouge, jaune orangée).

◆ **Flavonoïdes:  $AlCl_3$ ; Réactif de Neu; Ammoniaque** (Figure 46).

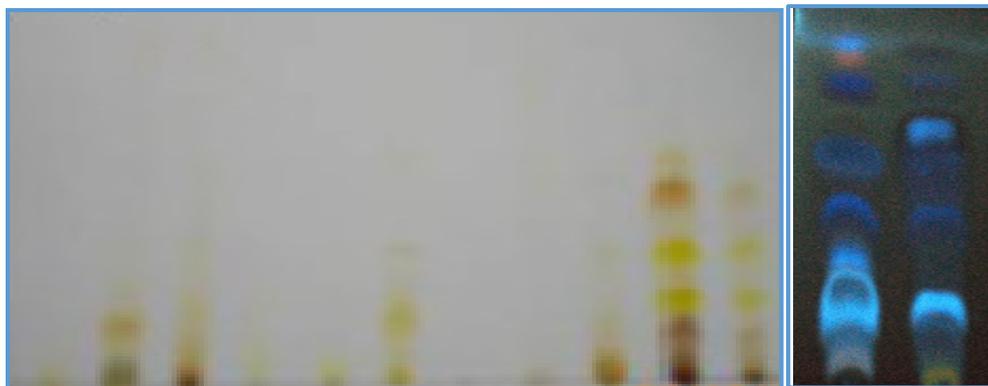


**Figure 46.** Mise en évidence des flavonoïdes par CCM.

(A) Flavonoïdes révélés par le réactif de Neu sous UV/366 nm (Jaune, marron).

(B) Flavonoïdes révélés par  $AlCl_3$  sous UV/366 nm (Bleu, brun, Jaune-vert).

- ◆ **Coumarines:** *KOH; Acétate de plomb basique, Ammoniaque* (Figure 47).

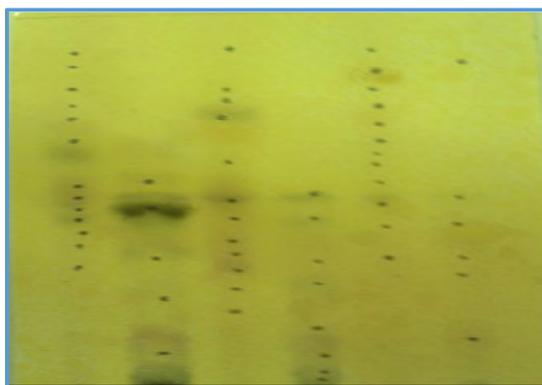


**Figure 47.** Mise en évidence des coumarines par CCM.

(A) Coumarines révélées par KOH dans le visible (jaune).

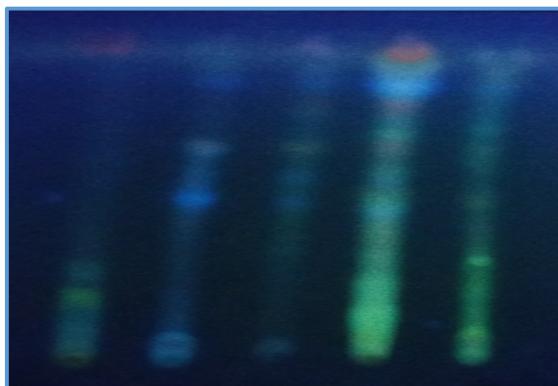
(B) Coumarine révélées par KOH sous UV/366 nm (colorations diverses).

- ◆ **Tannins** → *FeCl<sub>3</sub>* (Figure 48).



**Figure 48.** Tannins révélés par FeCl<sub>3</sub> dans le visible (gris, brun).

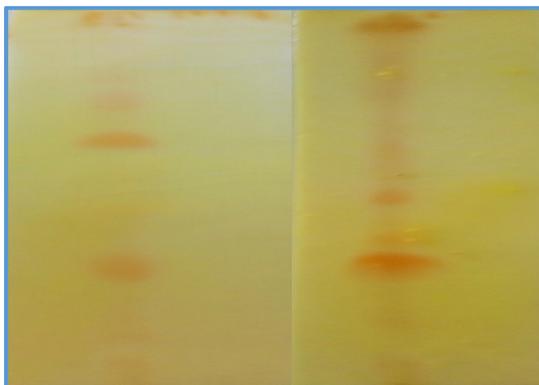
- ◆ **Saponines** → *Trichlorure d'antimoine (SbCl<sub>3</sub>)* (Figure 49).



**Figure 49.** Saponines révélés sous UV/366 nm.

Saponines stéroïdiques : jaune ; saponines triterpéniques : rose-violet.

◆ **Alcaloïdes** → *Dragendorff* (Figure 50).



**Figure 50.** Alcaloïdes révélés dans le visible (orange).

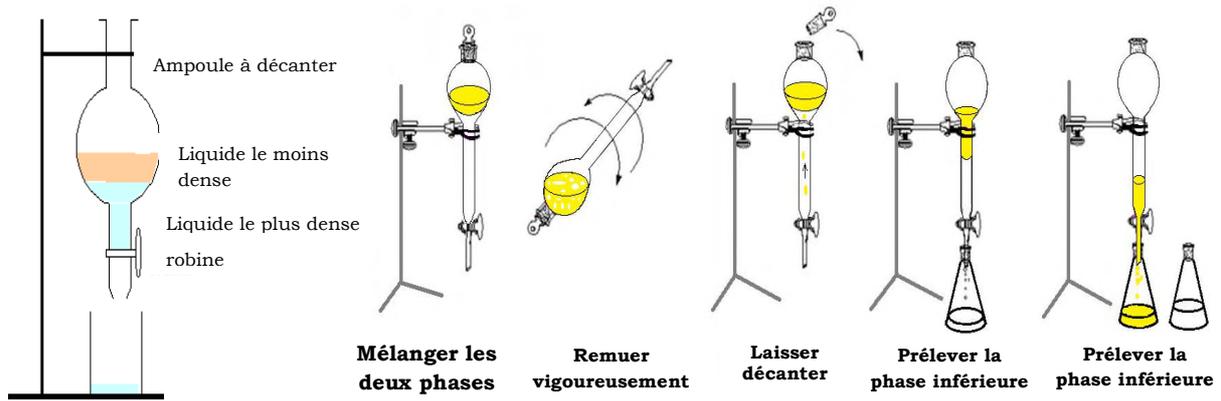
## **III.2. Techniques de séparation et purification de métabolites secondaires**

### **III.2.1. Extraction (partage) liquide-liquide**

L'extraction liquide-liquide est la plus simple des méthodes de séparation. C'est un procédé qui consiste à isoler un ou plusieurs constituants d'un mélange en mettant à profit leur distribution inégale entre deux solvants pratiquement non miscibles. Les substances à extraire doivent être plus solubles dans le solvant d'extraction que dans le solvant où elles se trouvent.

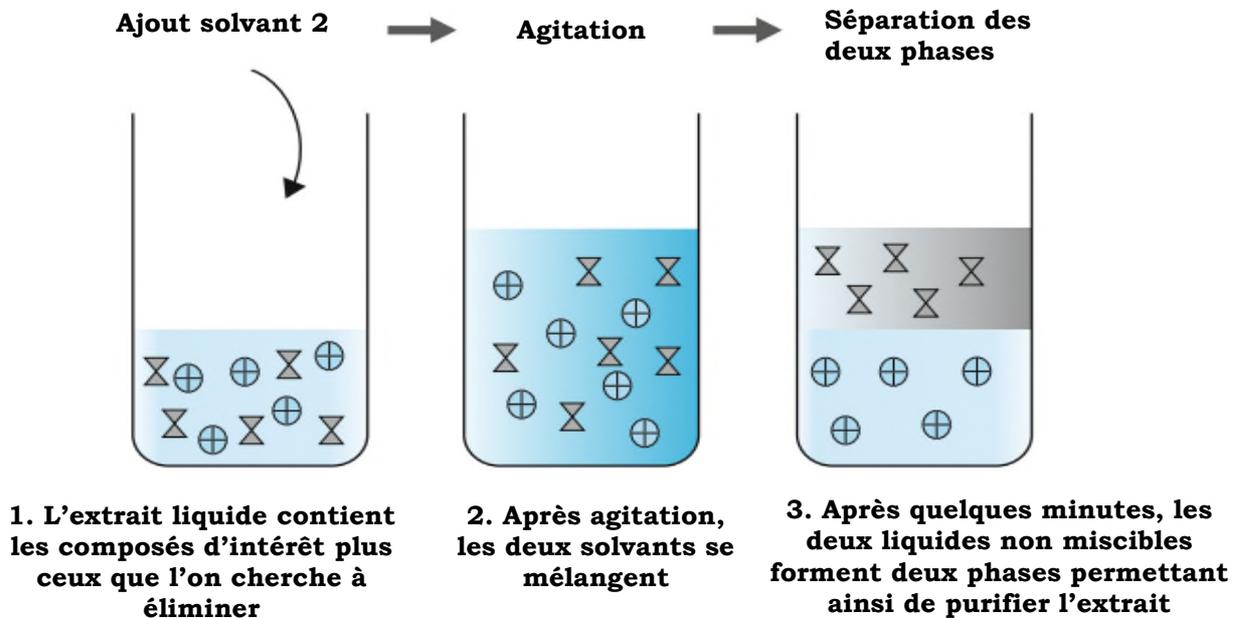
L'extraction liquide-liquide est la succession de plusieurs étapes. La première étape est la mise en contact des deux phases. Pour augmenter la surface d'échange, la phase à extraire et la phase d'extraction sont mélangées. La seconde étape consiste à obtenir l'équilibre du système (saturation de la phase d'extraction) qui est régi par les lois de la diffusion et de la solubilité (coefficient de partage). La dernière étape est la séparation des phases (décantation) (Figure 51).

## Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation



**Figure 51.** Extraction liquide-liquide à l'aide d'une ampoule à décanter.

Le principe de répartition des composés entre les deux phases est illustré dans la figure 52 :



**Figure 52.** Principe de partage des composés entre les deux phases au cours d'une extraction liquide-liquide.

En pratique, les solutés sont souvent dans une phase aqueuse. Un solvant organique (éther diéthylique, acétate d'éthyle, chloroforme etc.) est utilisé pour les extraire. La quantité de soluté A extraite est estimée par la constante de distribution ou par le coefficient de partage exprimé par :

$$K_{\text{org/aq}} = [C]_{\text{org}} / [C]_{\text{aq}}$$

$[C]_{\text{org}}$  : Concentration de soluté A dans la phase organique.

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

$[C]_{aq}$  : Concentration de A qui reste dans la phase aqueuse à l'équilibre.

Il est à noter que plus le coefficient K est grand, plus le volume de solvant organique nécessaire à une bonne extraction est petit.

Le procédé consiste à mettre en contact le solvant et la solution dans des appareils conçus pour mélanger des phases (ampoules, colonnes, mélangeurs). Afin d'augmenter la surface de contact et la diffusion des substances dans chaque solvant, une agitation est utile.

#### ◆ Fractionnement par partage liquide-liquide discontinu de l'extrait brut

L'extrait brut est préalablement dissout dans un mélange volume à volume d'éthanol et d'eau avant le partage. La solution est ensuite versée dans une ampoule à décanter et le premier solvant de volume égal à la phase aqueuse est ajouté. Le mélange est agité puis laissé se décanter afin d'avoir deux phases bien distinctes (Figure 53).



Partage au dichlorométhane (DCM)



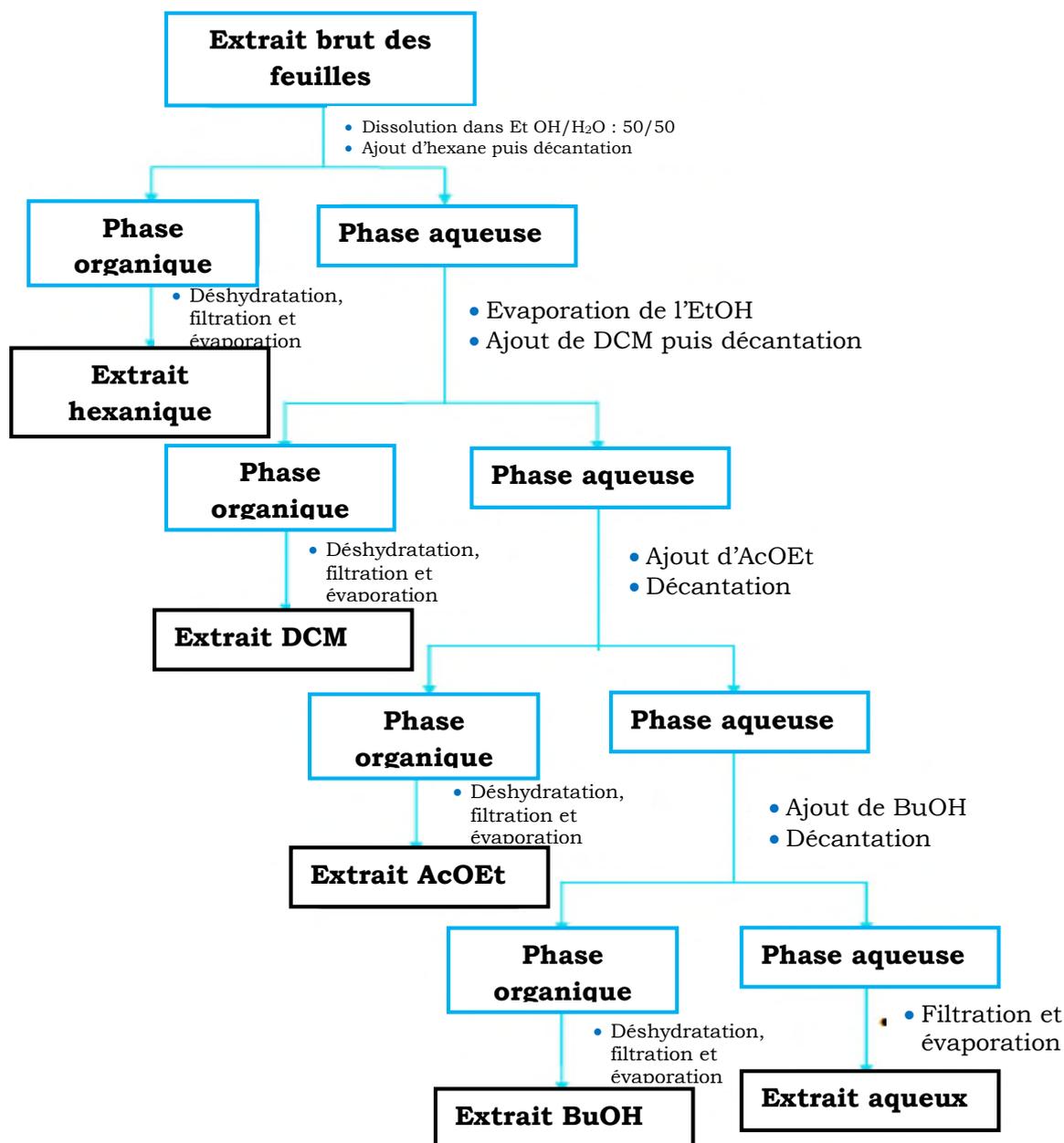
Partage au butanol

**Figure 53.** Partage liquide-liquide des extraits bruts au dichlorométhane (DCM) et au butanol.

Les mêmes étapes sont réalisées en utilisant des solvants de polarités différentes tels que l'hexane, le dichlorométhane (DCM), l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le butanol (BuOH). A la fin, la phase organique est récupérée, le solvant est éliminé par évaporation au rotavapor. Après évaporation des solvants, ce partage a donc permis d'obtenir quatre fractions de polarité croissante : hexane, DCM, AcOEt et BuOH (Figure 54).

L'organigramme qui suit illustre les étapes du partage liquide-liquide de l'extrait brut :

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation



**Figure 54.** Organigramme de partage liquide-liquide par polarité ascendante d'un extrait brut.

EtOH : éthanol, DCM : dichlorométhane, BuOH : butanol, AcOEt : acétate d'éthyle.

#### Remarques

L'extraction liquide-liquide discontinue, en pratique, est une étape de préparation d'échantillons très utilisée présentant de multiples inconvénients lorsqu'elle est pratiquée avec une ampoule à décanter:

- ◆ Multiplication des étapes d'extraction pour obtenir un rendement optimum.

### **Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation**

- ◆ Utilisation d'importants volumes de solvants organiques dont les coûts de recyclage deviennent de plus en plus chers.
- ◆ Difficulté d'émulsion qui ne permet pas la récupération de 100% de l'extrait.
- ◆ Traces d'éluant dans le raffinat qui nécessite un traitement supplémentaire de l'échantillon avant l'étape d'évaporation.

En outre, lorsque le produit à isoler est relativement soluble dans la phase à extraire, l'extraction discontinue peut se révéler insuffisante. Une méthode d'extraction en continu peut être alors utilisée. Le solvant est recyclé et passe continuellement à travers la solution à extraire.

#### **III.2.2. Méthodes chromatographiques**

Les méthodes chromatographiques sont des méthodes permettant de séparer les éléments d'un extrait végétal en solution plus ou moins complexe. Le mélange est entraîné par une phase mobile qui circule au contact d'une phase stationnaire liquide ou solide. Cette séparation peut être effectuée dans un but analytique quantitatif ou qualitatif ou dans un but préparatif.

La chromatographie analytique permet d'identifier qualitativement les constituants d'un mélange plus ou moins complexe. D'un autre côté, la chromatographie préparative possède à la fois l'objectif de séparer ainsi que de récupérer, elle est utilisée pour isoler des molécules importantes.

La séparation d'un extrait et l'obtention de composés purs nécessitent l'utilisation combinée de plusieurs techniques chromatographiques, comme la chromatographie à contre courant (CCC), la chromatographie sur colonne (C.C), la chromatographie liquide sous vide (*Vacuum Liquid Chromatography*, VLC), la chromatographie d'exclusion, la chromatographie liquide moyenne pression (*Medium Pressure Liquid Chromatography*, MPLC) et la chromatographie liquide haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Ces diverses techniques doivent être le plus souvent utilisées successivement avec un changement de support ou d'éluant afin d'atteindre un niveau de séparation optimal.

## Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

### Remarque

Des contrôles réguliers à chaque étape de fractionnement sont réalisés par Chromatographie sur Couche Mince (CCM).

### III.2.2.1. Chromatographie à Contre Courant (CCC)

C'est une technique de chromatographie préparative moderne qui a largement été employée pour le fractionnement et la purification de produits naturels d'origine végétale.

Les deux principales variantes: la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) et la High-Speed CCC (HSCCC) se différencient respectivement par un système d'équilibre de phases hydrostatique et hydrodynamique.

La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide préparative qui utilise un système de solvant biphasique et pas de phase stationnaire solide. De ce fait, la séparation des molécules est basée sur leur différence de partage entre les deux phases liquides non miscibles.

D'une manière simplifiée, une colonne CPC est constituée d'un empilement de disques en acier inoxydable dans lesquels sont gravées des cellules de partage reliées entre-elles par des capillaires (Figure 55).



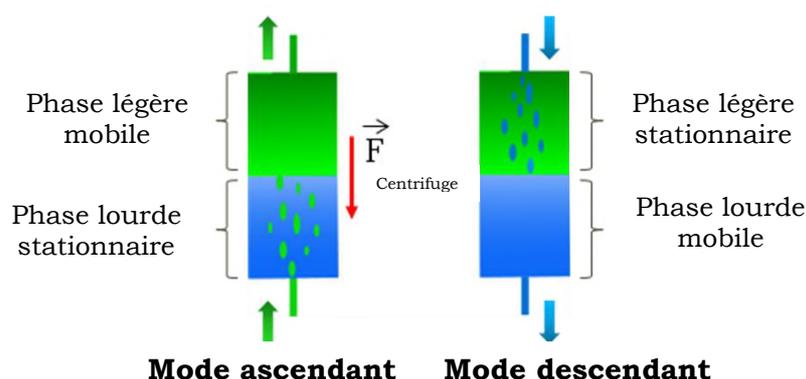
**Figure 55.** Photographie d'une colonne de 200 mL d'un appareil Fast CPC et détail d'un des disques constitutifs de la colonne.

Quand la colonne est mise en rotation le champ de force centrifuge maintient la phase stationnaire liquide au sein de la colonne. La phase dite mobile, quant à elle, est pompée au travers de la phase stationnaire liquide.

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

Des systèmes de solvants biphasiques variés peuvent être appliqués lorsque l'on travaille sur des échantillons naturels. En effet, des systèmes couvrant toute la gamme de polarité et constitués de deux à cinq solvants sont aujourd'hui largement utilisés pour le fractionnement d'extraits végétaux. Il peut être cité, le mélange de cinq solvants Hexane/Acétate d'Ethyle/Butanol/Méthanol/Eau (Hex/AE/BuOH/MeOH/H<sub>2</sub>O).

L'utilisation d'appareil CPC permet d'inverser facilement le sens de pompage de la phase mobile via une vanne 4 voies située avant la colonne. Lorsque la phase stationnaire est la plus dense, la phase mobile est alors pompée en mode ascendant à contre sens du champ de force centrifuge. Au contraire, lorsque la phase stationnaire est la plus légère la phase mobile est introduite dans le sens du champ de force centrifuge, on parle alors de mode descendant (Figure 56).



**Figure 56.** Représentation schématique des modes ascendant et descendant en CPC.

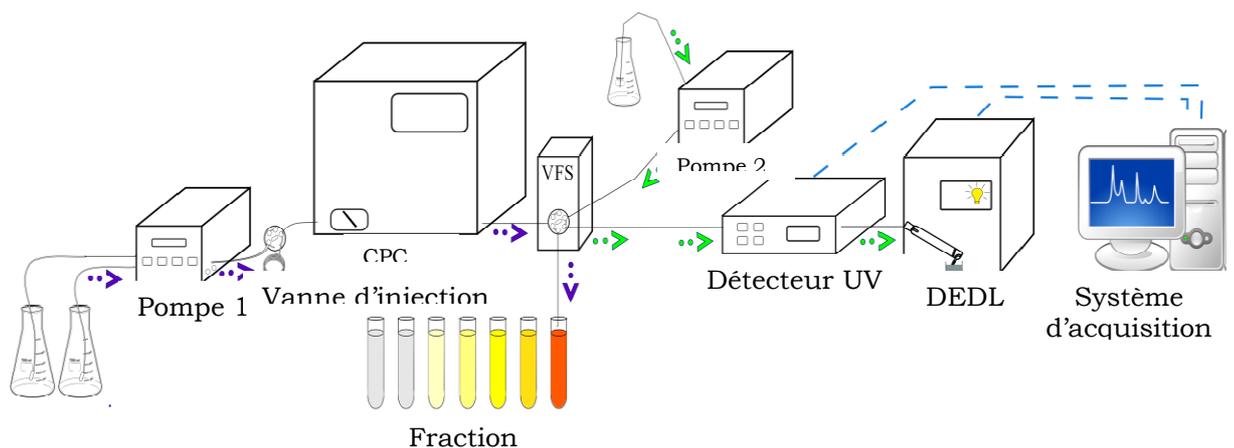
Grâce à l'utilisation d'une phase stationnaire liquide, la CPC présente plusieurs avantages qui sont appréciables lorsque l'on travaille sur des produits naturels:

- Pas d'adsorption irréversible.
- Peu ou pas de dégradation des molécules.
- Aucune perte d'échantillon.
- Technique versatile (plusieurs modes de développement).
- Forte capacité de charge.

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

Néanmoins, elle a pour principal défaut d'avoir une plus faible efficacité (nombre de plateau théorique) que l'HPLC préparative, et nécessite une bonne étanchéité du système pour éviter les fuites de solvants et d'échantillon lorsque la colonne est en rotation.

Le système utilisé lors du développement des méthodes CPC est constitué d'éléments communs à d'autres types de chromatographie liquide préparative c'est-à-dire une pompe, un système d'injection, l'appareil CPC contenant une colonne de volume défini, des tubes de collecte, un système de détection et d'acquisition. La différence est l'utilisation d'un split actif en sortie de CPC permettant de prélever un volume constant de l'effluent CPC à des intervalles de temps très court et de le transférer grâce à une pompe auxiliaire vers le système de détection (Figure 57).



**Figure 57.** Représentation schématique du système de fractionnement par CPC.

Les flèches bleues représentent le circuit principal alors que les vertes représentent le circuit auxiliaire.

#### III.2.2.2. Chromatographie sur colonne

Cette méthode figure parmi les méthodes de séparation ainsi que de purification ; elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre parfois jusqu'à plusieurs grammes.

## **Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation**

### **■ Principe**

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne de longueur variable : l'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. Cet écoulement entraîne la succession des zones cylindriques de substances séparées migrant vers le bas. On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des composés.

### *Remarque*

Le gel de silice 60 F254 utilisé comme adsorbant présente une forte polarité tandis que le système éluant est préalablement mis au point.

Le choix de l'éluant doit se référer à des essais sur CCM pour avoir une bonne séparation entre les produits. Les expériences tiennent compte de la polarité, l'acidité, la basicité des solvants et la solubilité des constituants de l'extrait.

### **■ Préparation de la colonne**

Le remplissage de la colonne se fait par voie humide. Tout d'abord, un morceau de coton installé au fond est trempé de solvant pour éliminer l'air emprisonné dedans. Le solvant utilisé est le solvant de dissolution de l'extrait. Pour que la phase stationnaire ne puisse pas s'échapper de la colonne, un demi-centimètre de sable est insérée.

La colonne est remplie en réalisant une suspension du gel de silice dans le solvant de dissolution. Le gel ainsi formé est introduit dans la colonne à l'aide d'un entonnoir. A robinet ouvert, on rince avec du solvant et on laisse s'écouler pour effectuer le tassement de l'adsorbant. Cette opération est réalisée pendant deux heures.

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

Une fois la colonne remplie, un demi-centimètre de sable est rajouté au-dessus de la surface de silice bien plate. Cette couche permet la réalisation du dépôt et l'ajout d'éluant sans perturber la surface de silice.

#### Remarque

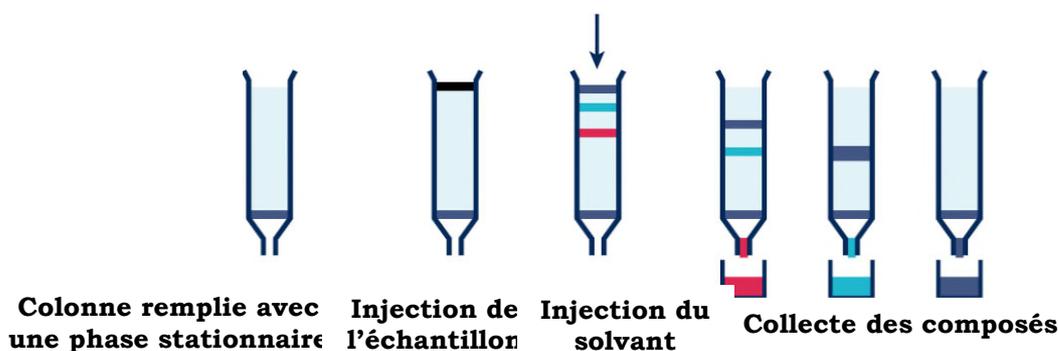
Tout au long du procédé, la phase stationnaire ne doit jamais être asséchée. Il est nécessaire que le niveau d'éluant soit toujours au-dessus de la surface du sable.

#### ■ Dépôt de l'extrait

La solution concentrée d'éluant est déposée en haut de la colonne à l'aide d'une pipette pasteur. Le robinet est ouvert afin que l'extrait atteigne le niveau de la silice. Quelques millilitres de solvant sont introduits afin de s'assurer que toute la solution soit en tête de colonne de silice.

#### ■ Éluion

L'éluant choisi est alors versé progressivement par écoulement continu en dessus de la colonne. Les fractions éluées sont recueillies par des tubes à essais numérotés disposés dans des portoirs (Figure 58).



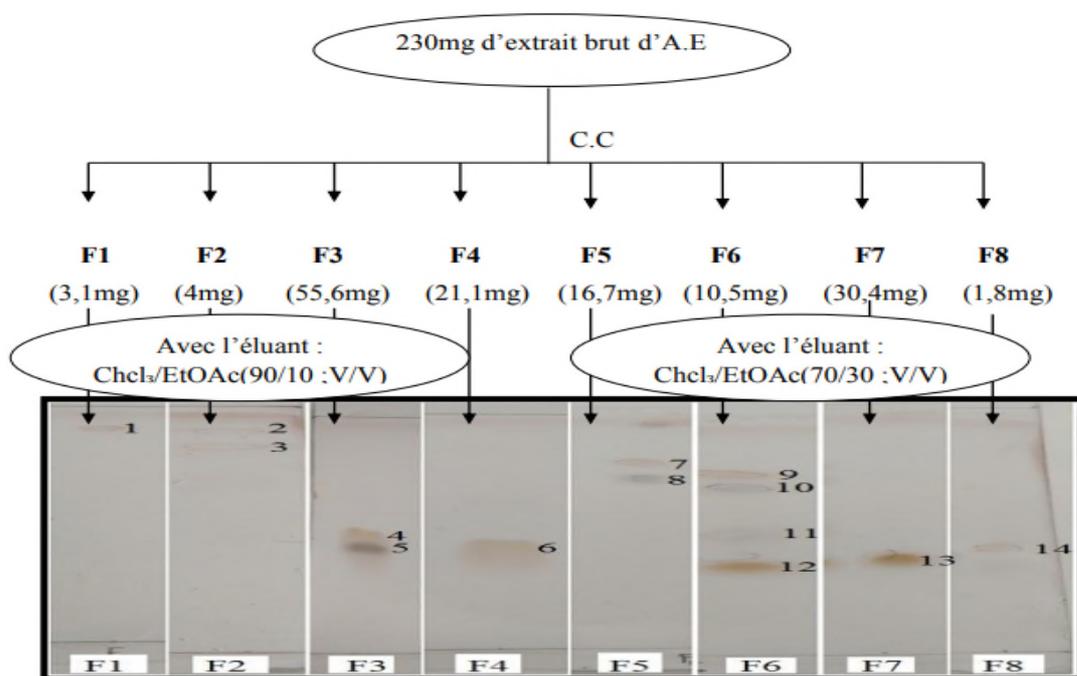
**Figure 58.** Séparation des composés d'un mélange par chromatographie sur colonne.

#### ✚ Exemple

La purification par une C.C a été réalisée sur 200 mg d'extrait d'acétate d'éthyle, pour l'isolement des métabolites secondaires, dont on a pu collecter 142 fractions de 4 mL par éluion de polarité croissante. Les

## Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

fractions récoltées de la colonne ont été contrôlées sur des plaques de CCM de gel de silice en utilisant deux systèmes solvants : chloroforme/Acétate d'éthyle avec les proportions (90/10 ; *v/v*) pour les fractions 1-2-3 et 4 et (70/30 ; *v/v*) pour les fractions 5-6-7 et 8. L'examen des plaques a été effectué sous UV à 254 nm, avec révélation à l'acide sulfurique et par le réactif Dragen Dorff. Les 8 fractions obtenues, leurs rendements et leurs chromatogrammes révélés avec la solution d'acide sulfurique ont été résumé dans la figure suivante.



**Figure 59.** Résultats de la séparation par C.C. de l'extrait d'acétate d'éthyle révélé par l'acide sulfurique.

### III.2.2.3. Flash chromatographie

La Flash chromatographie est une technique utilisée pour purifier un échantillon brut.

#### ■ Principe

La particularité de la Flash chromatographie est qu'elle est basée sur l'interaction entre les composés que l'on souhaite séparer, la phase stationnaire et la phase mobile. La pression nécessaire est faible (moins de 320 psi) comparé à l'HPLC où elle est supérieure à 1000 psi. Le but est, à

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

partir d'un échantillon brut, d'isoler et obtenir des composés purs. Il s'agit du même procédé décrit précédemment pour la chromatographie. La séparation n'est possible que si tous les composés ont des propriétés d'adsorption et désorption différentes avec la phase mobile et la phase stationnaire.

#### ◆ Les avantages de la Flash chromatographie

Cette technique de séparation et purification est très populaire dans les laboratoires car ses avantages sont nombreux (Figure 60).

- Grande rapidité de la purification, gain de temps important.
- Volume de collecte plus faible.
- Temps d'évaporation réduit.
- Coût de l'instrumentation très abordable.
- Coût des consommables très attractifs, colonne économique.
- Grande capacité de charge des colonnes.
- Colonne réutilisable de très nombreuses fois pour des silices greffées.
- Grande diversité de phase stationnaire (Silice vierge, silice greffée (NH<sub>2</sub>, diol, C<sub>n</sub>, ...), Alumine, Echange d'ion...).
- Large gamme (détecteurs, passeur d'échantillons ...).

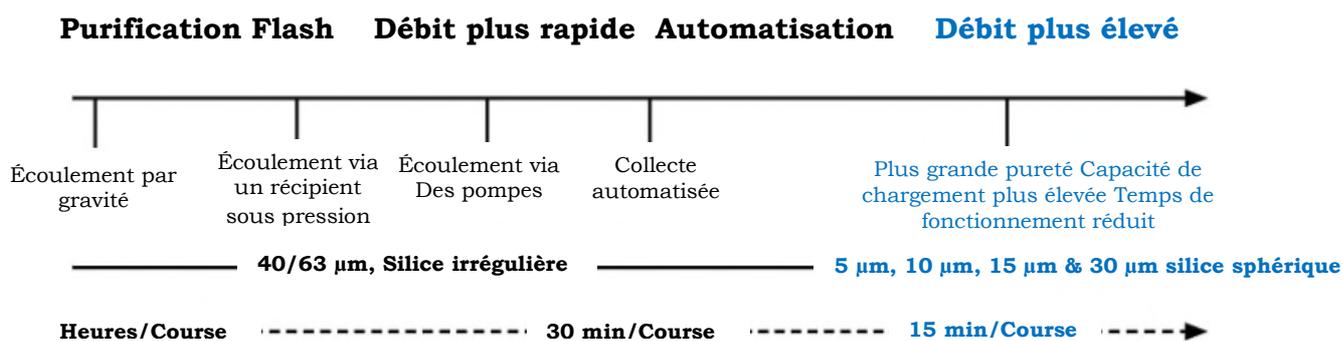


Figure 60. Avantages de la chromatographie Flash.

#### III.2.2.4. Chromatographie Liquide sous Vide (VLC)

La VLC est une technique de fractionnement préliminaire de l'extrait brut. Cette technique peut être considérée comme une CC (chromatographie sur colonne) préparative sous vide permettant un fractionnement grossier des constituants de l'extrait selon leur polarité. C'est une étape qui précède

### **Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation**

généralement les étapes de séparation les plus avancées telles que la MPLC, HPLC, etc.

En pratique, elle permet principalement la séparation des composés lipophiles comme les chlorophylles, des composés amphiphiles comme les saponines, et des composés polaires comme les sucres libres et les tanins.

#### **✚ Exemple de séparation des saponines**

Un filtre en verre fritté de porosité fixe est utilisé dont la taille est choisie en fonction de la masse d'extrait à séparer. La phase stationnaire est du silicagel 60 en phase normale (Silicycle, 15-40  $\mu\text{m}$ ) relativement polaire ou Silicagel RP-18 en phase inverse (Silicycle, 75-200  $\mu\text{m}$ ), une silice apolaire greffée de groupements alkyls à 18 atomes de carbones. L'élution est réalisée comme suit :

-RP-18 : gradient  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ , qui permet d'éliminer les sucres avec l'eau et de recueillir les saponines dans les fractions 50:50 et 30:70.

-Silice 60 normale : gradient  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ , qui permet d'éliminer les tanins très polaires qui restent le plus souvent adsorbés à la silice, et d'obtenir des fractions enrichies en saponines.

#### **III.2.2.5. Chromatographie d'exclusion**

##### **■ Principe**

Elle repose en « première approximation » sur la masse molaire et la dimension des molécules à séparer. Elle est valable seulement pour des molécules sphériques.

La chromatographie d'exclusion ou chromatographie sur gel est une méthode qui permet une séparation des constituants d'un mélange par taille moléculaire décroissante au travers d'un gel poreux.

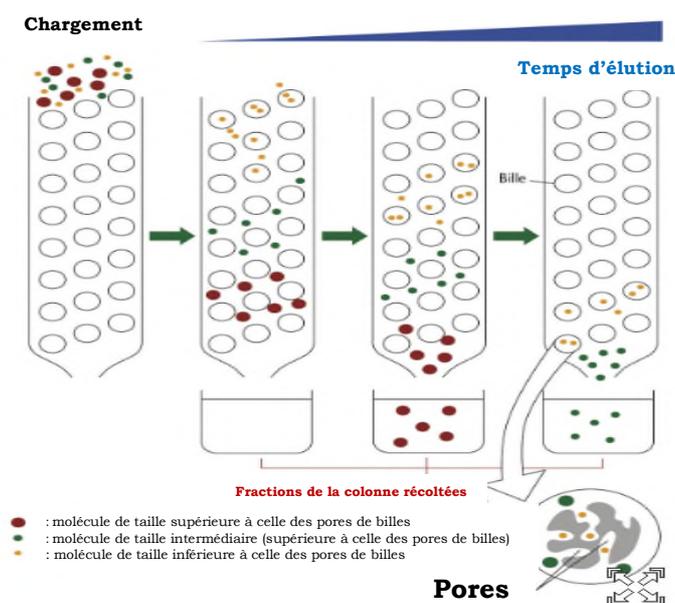
Cette technique s'utilise comme suit: une colonne remplie d'une phase stationnaire constituée par des billes de polymère, poreuses et calibrées, imprégnées par la phase mobile. Le mélange de produits que l'on veut

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

séparer est placé en tête de la colonne, puis la solution adéquate est éluée au travers. Toutes les molécules ayant une taille supérieure à celle des pores du support, et qui n'y peuvent donc pas pénétrer, sont entraînées au travers de la colonne à l'extérieur des billes à la même vitesse que la phase mobile.

Par contre, les autres molécules de petites tailles seront les seules à pouvoir pénétrer dans les pores du gel et donc plus ou moins retardées dans leur traversée de la colonne en fonction de leur taille (Figure 61).

Les molécules de taille plus importante que la taille moyenne des pores du support, comme par exemple les tannins, sont donc éluées en premier. Les molécules qui sont nettement plus petites comme les sucres libres peuvent pénétrer dans leur « labyrinthe » et sont donc les dernières à être éluées. Les saponines et les flavonoïdes présentent une élution intermédiaire.



**Figure 61.** Chromatographie d'exclusion.

#### ✚ Exemple pour la séparation des saponines

#### ◆ Conditions chromatographiques

**Phase stationnaire :** Sephadex® LH-20 est un gel de dextrane (Polyoside d' $\alpha$ -glucose) ayant subi une alkylation contenant un réseau de chéneaux et de pores uniformes dans lesquels les molécules de soluté et de solvant peuvent diffuser.

## **Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation**

**Phase mobile :** Elution isocratique, MeOH (100%) le plus souvent ou mélange binaire MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1) (v/v)

### **III.2.2.6. Chromatographie liquide moyenne pression (MPLC)**

C'est une technique plus fine de chromatographie sur colonne, supportant des pressions modérées, permettant ainsi d'accroître légèrement les débits. Cette technique permet le fractionnement et la purification en une ou plusieurs étapes des composants d'un mélange complexe. Elle est réalisée sur les fractions obtenues par VLC.

#### **✚ Exemple :** séparation des saponines

Elution par des mélanges MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50) et/ou MeOH. La colonne utilisée est équilibrée pendant 5 min avec le solvant d'élution en réalisant préalablement une migration sur plaque CCM de l'échantillon à séparer dans le but de situer sa polarité. L'échantillon dissout dans le solvant d'élution est déposé sur la colonne.

Les systèmes de solvants utilisés pour l'élution sont généralement des mélanges dans des proportions variables en mode isocratique ou en gradient.

#### **◆ Conditions chromatographiques**

Matériel : Colonnes de séparation à silice : - Pré-colonne : 110 x 15 mm - Colonne : 460 x 25 mm, 460 x 15 mm, 230 x 15 mm Pompe pour l'appareillage MPLC en phase normale : -HPLC pump 426. 36 Pompe pour l'appareillage MPLC en phase inverse, RP-18. Pump manager C-605. Pump module C-601 Collecteur. Fraction Collector C-660, 4 racks; 240 tubes. Phase stationnaire Silice en phase normale (60 Å, 15-40 µm). Silice en phase inverse, RP-18 Spherical C18 (300 Å, 75-200 µm, Silicycle). Phase mobile - Silice en phase normale : CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:20:2, 70:30:5, 60:32:7) (v/v) - Silice en phase inverse, C-18 : Plusieurs types de gradients d'élution peuvent être utilisés, en gradient H<sub>2</sub>O-MeOH pendant un temps déterminé, ou en gradient H<sub>2</sub>O-MeOH par plateaux (50:50, 40:60, 30:70...) (v/v).

### **III.2.2.7. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

La chromatographie sur couche mince est une méthode employée pour dénombrer le nombre de soluté dans un extrait (CCM analytique), vérifier la pureté d'une substance (CCM préparatrice), déterminer l'éluant idéal pour une bonne séparation des solutés afin de mettre en œuvre la chromatographie sur colonne, etc. Elle est également utilisée pour l'identification de la composition d'un mélange.

#### **□ Les phases**

La phase stationnaire telle la silice est fixée en couche mince sur un support en verre, plastique ou en aluminium. La phase mobile est formée par un solvant ou un mélange de solvants. Le choix de l'éluant est d'une importance cruciale, il détermine une bonne séparation des solutés.

#### **□ Principe**

La solution d'échantillon à analyser est déposée sur une ligne de dépôt à la base de la plaque qui sera ensuite introduit dans la cuve chromatographique contenant l'éluant.

Après que l'échantillon ait été déposé, les substances migrent essentiellement par capillarité. La vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques (comme les forces de Van der Waals ou les liaisons hydrogène) retenant le composant sur la phase stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Chaque composant du mélange migre à des vitesses différentes selon leur affinité à l'égard de la phase stationnaire et leur solubilité dans la phase mobile. Ordinairement, les composés de faible polarité se déplacent plus vite que ceux polaires. Dans le cas de phase stationnaire polaire, les composés polaires sont adsorbés par celle-ci et migrent lentement. Néanmoins, l'emploi d'un éluant polaire augmente la vitesse de migration des derniers. La plaque est sortie de la cuve avant même que l'éluant atteigne le front de la plaque (Figure 62).

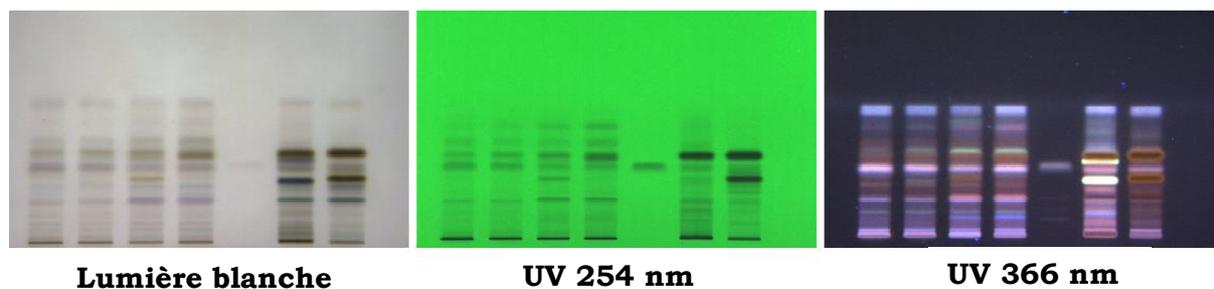
## Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

### □ Interprétation des résultats

Après migration, les composés apparaissent sous forme de taches rondes ou ovales. Ils peuvent être visibles à l'œil nu ou nécessiter d'autres méthodes de révélation. Chaque composé est aussi caractérisé par son rapport frontal  $R_f$  en fonction de phases employées.

### □ Méthode de révélation

Si les constituants sont colorés, ils sont directement visibles à l'œil nu sur la plaque chromatographique. Sinon, les substances absorbantes sous rayonnement UV seront visualisées sous formes de taches sombres aux UV. Des réactifs plus ou moins spécifiques de certaines fonctions peuvent aussi être utilisés afin de colorer par réaction chimique les substances à révéler (Figure 62).



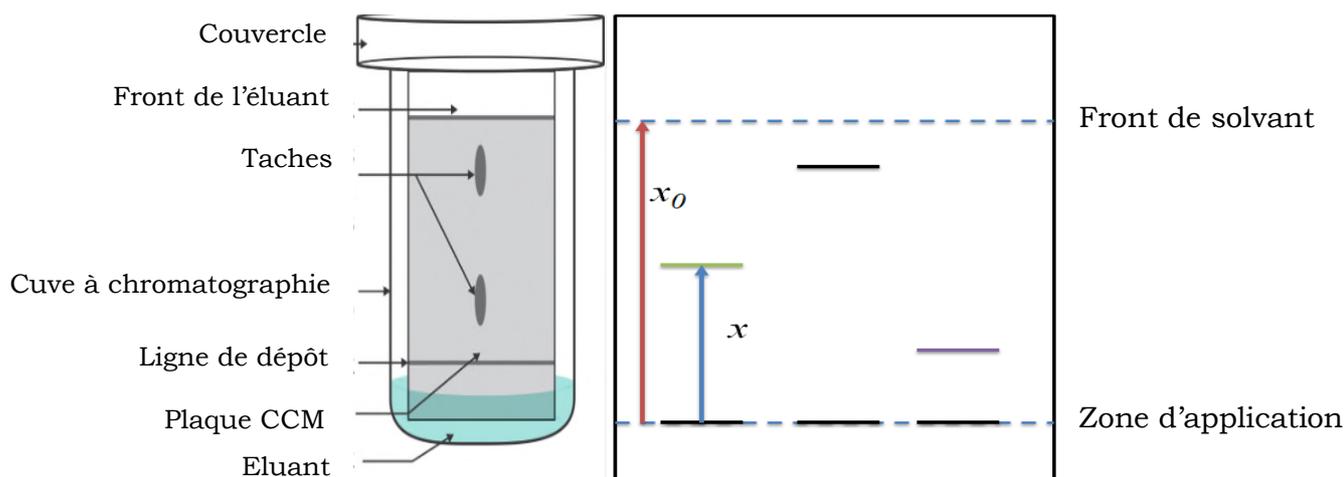
**Figure 62.** Exemple d'une plaque illuminée sous lumière blanche et sous lumière UV à 254 et 366 nm.

### □ Rapport frontal ( $R_f$ )

Le rapport frontal d'un composé organique en CCM est calculé à partir de la relation suivante:  $R_f = \text{distance parcourue par le composé} / \text{distance parcourue par le front du solvant}$  (Figure 63).

La comparaison des  $R_f$  entre les taches d'extrait avec des témoins connus permet l'identification de la nature des composés.

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation



**Figure 63.** Schéma d'une plaque développée.

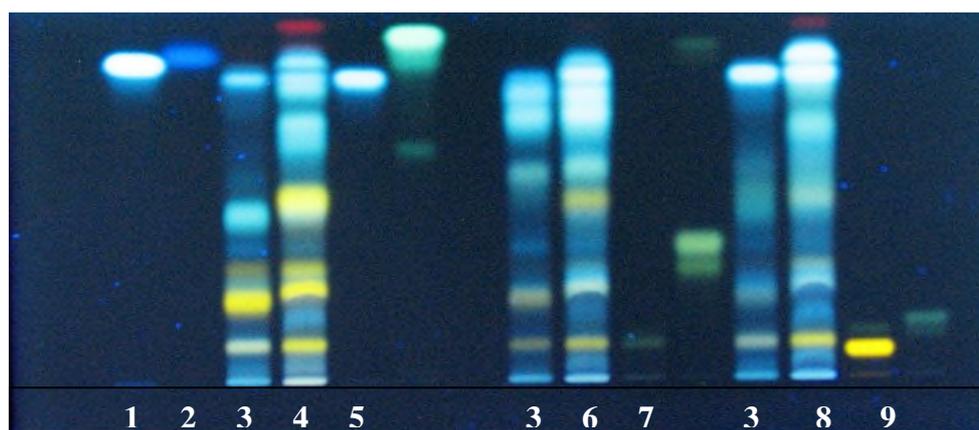
#### Remarque

Dans la chromatographie préparatrice, la bande qui contient le produit purifié est grattée, la silice est dissoute dans un solvant, puis filtré, le filtrat obtenu il est ainsi à l'état pur.

#### 🔧 Exemple pour l'identification des composés phénoliques

- **Conditions chromatographiques** : Phase stationnaire : Gel de Silice, 60F<sub>254</sub> sur plaque de verre de 20×10 cm et 0,5 mm d'épaisseur (Merck, Darmstadt, Germany). Phase mobile : Acétate d'éthyle (Ac OEt)-acide formique anhydre (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) -eau ultra pure (H<sub>2</sub>O) aux proportions de (90: 6: 6 ; v/v/v).

L'observation de la plaque développée sous UV/366 nm a révélé la présence de plusieurs types de composés phénoliques (Figure 64).



**Figure 64.** Profil chromatographique d'extraits hydrolysés et non hydrolysés des espèces du genre *Mentha* sur gel de silice 60 F<sub>254</sub>.

Révéléteur: diphénylborinate/PEG, sous UV à 365 nm. **(1)** Acide caféique ; **(2)** Acide férulique ; **(3)** Extrait de plante; **(4)** Acide rosmarinique ; **(5)** Kaempférol ; **(6)** Diosmine ; **(7)** Apigénine -7-glucoside ; **(8)** Rutine ; **(9)** Naringénine.

#### **III.2.2.8. Chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC)**

L'HPTLC (chromatographie sur couche mince à haute performance) est une forme sophistiquée de TLC (CCM), qui offre une efficacité de séparation supérieure. Le concept HPTLC comprend des méthodes validées d'analyse qualitative et quantitative et répond à toutes les exigences de qualité pour une utilisation dans des environnements entièrement réglementés.

Les étapes du processus de HPTLC sont identiques à celles de la CCM classique. La principale différence entre eux réside dans les caractéristiques de la plaque de séparation. Les plaques HPTLC sont basées sur du gel de silice 60 optimisé avec une taille de particules nettement plus petite que celle utilisée pour la CCM classique. Cela permet une densité de tassement plus élevée et une surface plus lisse. Par conséquent, la diffusion de l'échantillon est réduite, ce qui entraîne des bandes ou des taches compactes. De plus, la taille plus petite des particules et la couche plus fine augmentent considérablement la sensibilité de détection et la vitesse d'analyse (Tableau XIX).

**Tableau XIX.** Comparaison entre CCM et HPTLC.

<b>Caractéristiques de HPTLC par rapport à la CCM classique</b>	<b>HPTLC</b>	<b>CCM</b>
<b>taille moyenne des particules</b>	5 - 6 $\mu\text{m}$	10 - 12 $\mu\text{m}$
<b>Distribution de la taille des particules</b>	4 - 8 $\mu\text{m}$	5 - 20 $\mu\text{m}$
<b>Epaisseur de couche</b>	200 $\mu\text{m}$ (100 $\mu\text{m}$ )	250 $\mu\text{m}$
<b>Hauteur de la plaque</b>	12 $\mu\text{m}$	30 $\mu\text{m}$
<b>Distance de migration typique</b>	3 - 6 cm	10 - 15 cm
<b>Temps typique de séparation</b>	3 - 20 min	20 - 200 min
<b>Nombre d'échantillon par plaque</b>	< 36 (72)	< 10
<b>Volume de l'échantillon</b>	0.1 - 0.5 $\mu\text{L}$	1 - 5 $\mu\text{L}$
<b>Limites de détection: absorption</b>	100 - 500 pg	1 - 5 ng
<b>Limites de détection: fluorescence</b>	5 - 10 pg	50 - 100 pg

Les principales composantes de l'appareil sont illustrées dans la figure 65.



**Figure 65.** Différentes composantes de l'HPTLC.

📌 Exemple

- **Préparation des solutions étalons.**
- **Application des spots:** Un volume de 5  $\mu\text{L}$  de chaque solution (standard et extraits) est appliqué en triplicatas sur 2 plaques HPTLC F<sub>254</sub> 10 x 20 : 21 spots.
- **Développement:** Un mélange de chloroforme-acétone-acide formique aux proportions de 75:16,5: 8,5  $v/v/v$ ) est utilisé.
- **Lecture:** La mesure a été réalisée en UV à 365 nm et en fluorescence.

A l'aide d'un instrument équipé de composants optiques, la représentation d'un profil HPTLC sous forme d'un chromatogramme affichant une série de pics équivalent à celui obtenu en HPLC est possible (Figure 66 et 67).

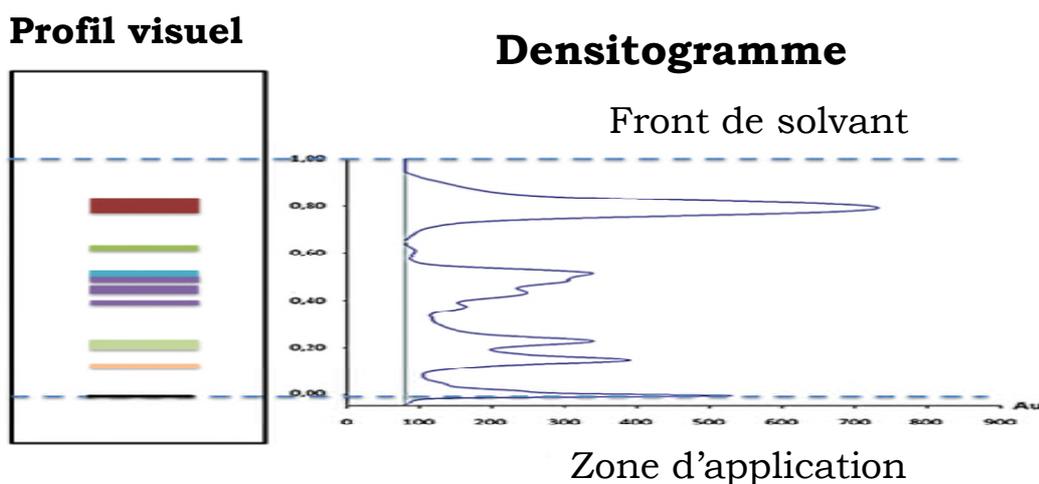
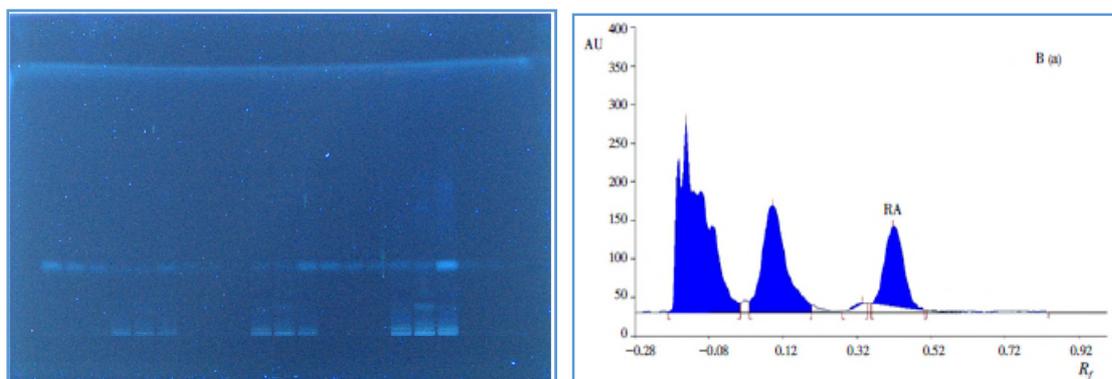


Figure 66. Densitogramme obtenu à partir d'un profil visuel.



**Figure 67.** Profils HPTLC d'extraits de menthes et de l'acide rosmarinique sous UV366 et 254 nm.

La phase mobile : un mélange chloroforme: acétone: acide formique (75:16,5:8,5, *v/v*).

### **III.2.2.9. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

C'est la méthode de chromatographie la plus sensible et la plus précise. C'est une chromatographie sous haute pression qui permet de déceler grâce à ses détecteurs ultrasensibles (UV - visible, en particulier), tous les composants d'un mélange, même ceux qui sont à l'état de trace.

Les performances en termes de sélectivité et de résolution, sont liées à l'utilisation de support de granulométrie très fine et de l'application d'une pression élevée. Les colonnes, constituées de la réunion de microparticules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 5  $\mu\text{m}$ , conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Il faut donc exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable.

#### **■ Principe**

La chromatographie liquide haute-performance (CLHP) est une puissante technique de séparation utilisée pour l'identification, la quantification et/ou la purification (chromatographie semi-préparative ou préparative) des composés dans un mélange. Ce dernier est mis en solution dans la phase mobile (solvant) puis est injecté sous haute pression en tête de la colonne (tube en acier inoxydable contenant la phase stationnaire).

Il existe plusieurs types de phases stationnaires mettant en jeu des mécanismes de rétention variés, les temps de rétention diminuent avec la polarité des analytes et peuvent être ajustés en utilisant un gradient d'élution combinant l'eau et un solvant organique (notamment le méthanol et l'acétonitrile) comme phase mobile.

La séparation des composés est due à la différence relative de leur vitesse d'élution et donc à la différence de vitesse d'échange entre la phase mobile et la phase stationnaire. Les vitesses d'élution dépendent des

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

coefficients de partage de la molécule entre les deux phases. Dans cette technique, deux types sont distingués :

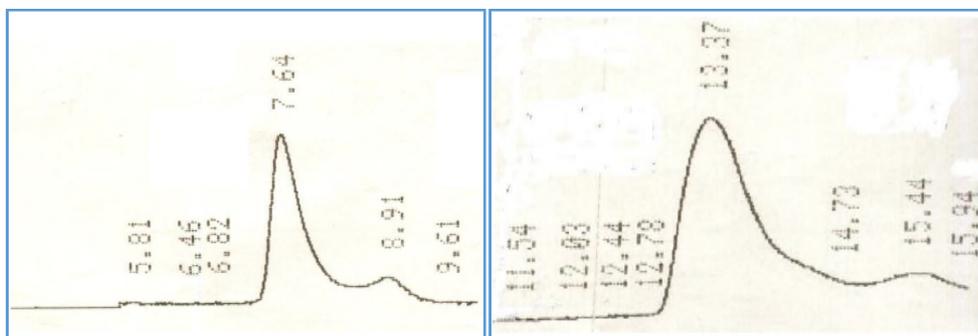
→La chromatographie en phase normale, dans laquelle la phase stationnaire est polaire et la phase mobile apolaire, les composés polaires étant les plus retenus.

→La chromatographie en phase inverse ou la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile polaire, en générale aqueuse. Dans ce cas les composés apolaires sont les plus retenus.

#### ■ Exemples d'identification des métabolites par HPLC

##### A) Identification des alcaloïdes

L'exemple donné concerne l'extrait des alcaloïdes totaux des graines de *datura stramonium* L. dont l'identification est réalisée par HPLC en se référant aux standards (l'atropine et la scopolamine). Les résultats sont illustrés dans la figure. Les chromatogrammes standards montrent que les temps de rétention pour l'atropine et la scopolamine (standard) sont respectivement 13.37min et 7.64 min (Figure 68).



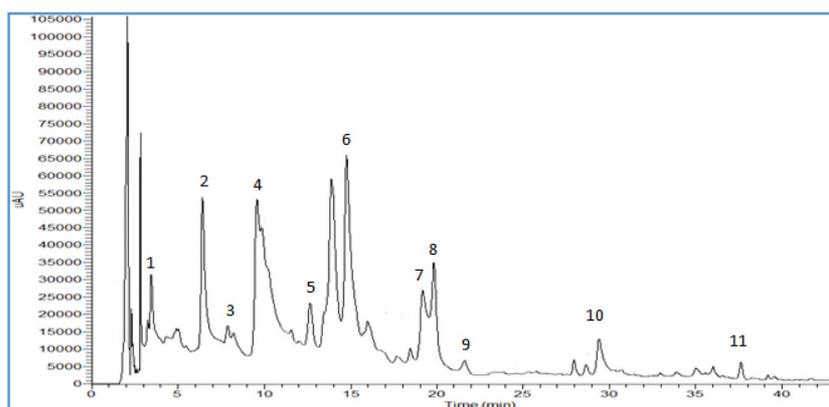
**Figure 68.** Chromatogramme en HPLC de scopolamine (tr= 7,64 min) et de l'atropine (tr = 13,37 min).

##### ✚ Exemple d'identification de composés phénoliques

**Appareils et colonne utilisés :** La colonne utilisée est de type phase inverse Altima LC-18 250 mm×4,6 mm avec une taille de particules de 5 µm à 40 °C. Le volume d'injection est de 10 µL. Les analyses des extraits sont effectuées avec un chromatographe liquide Spectra System (Sp Thermo Separation Products), équipé d'un détecteur spectrophotométrique DAD.

## Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

La phase mobile est un gradient linéaire de solvant A (acétonitrile: eau, 19:80, v/v avec acide formique à 1%) et B (acétonitrile: méthanol, 59:40, v/v avec acide formique à 1%) de 0 à 15 % de B, 0 à 15 minutes, de 15 à 60% de B, de 15 à 40 minutes et de 60 à 100% de B, de 40 à 45 minutes. Le débit est de 1,2 mL/minute. Les composés phénoliques ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention et les caractéristiques spectrales de leurs pics comparés à ceux des standards (Figure 69).



**Figure 69.** Profils HPLC d'une espèce du genre *Mentha*.

Les pics identifiés sont : (1) acide 4-OH benzoïque; (2) acide caféique; (3) rutine; (4) acide chlorogénique; (5) naringine; (6) acide rosmarinique; (7) diosmine; (8) luteoline; (9) naringénine; (10) apigénine; (11) diosmétine.

### ■ Discussion de résultats

La comparaison des RT entre les standards et l'extrait permet de confirmer que l'extrait de la plante renferme les composés recherchés. La quantification des composés identifiés est possible en se référant à des courbes d'étalonnage de composés séparés dans les mêmes conditions.

#### *Remarque*

L'HPLC est souvent couplée avec la spectrométrie UV-visible ou à la spectrométrie de masse pour effectuer l'identification.

### III.2.2.10. Chromatographie en phase gazeuse

#### ■ Principe

Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Dans la CPG la phase

### **Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation**

mobile est gazeuse. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée de la colonne. La phase stationnaire dans la colonne peut être solide ou liquide. Le mélange est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur).

Les différentes molécules du mélange se séparent et sortent de la colonne les unes après les autres après un certain intervalle de temps dépendant de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules. A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un élément essentiel qui est le détecteur. Il évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux et envoie un signal électronique vers un enregistreur.

#### *Remarques*

La CPG est utilisée dans la plupart des cas en couplage avec la spectroscopie de masse dans l'identification des composés organiques. Elle reste une technique de choix dans l'identification car elle ne nécessite pas une séparation préalable de l'extrait. Cependant, extraits polaires nécessitent un prétraitement, à savoir des dérivations (méthylation ou silylation).

La CPG peut aussi être couplée avec un détecteur UV dans le but d'analyser une famille de métabolites bien précise comme l'analyse de terpènes.

#### **🚧 Exemple d'identification de métabolite par GC/MS**

- Analyse d'une huile essentielle

Conditions opératoires :

**Gaz vecteur :** He débit de gaz vecteur, 1,62 mL/ min

**Température d'injecteur :** 240 °C

**Volume injecté :** 1 µL

**Mode d'injection :** Split

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

**Colonne capillaire :** SE 30 (longueur : 25 m ; diamètre interne 0.25 mm; épaisseur du film (0,25  $\mu\text{m}$ ).

**Température de la colonne :** 240 °C

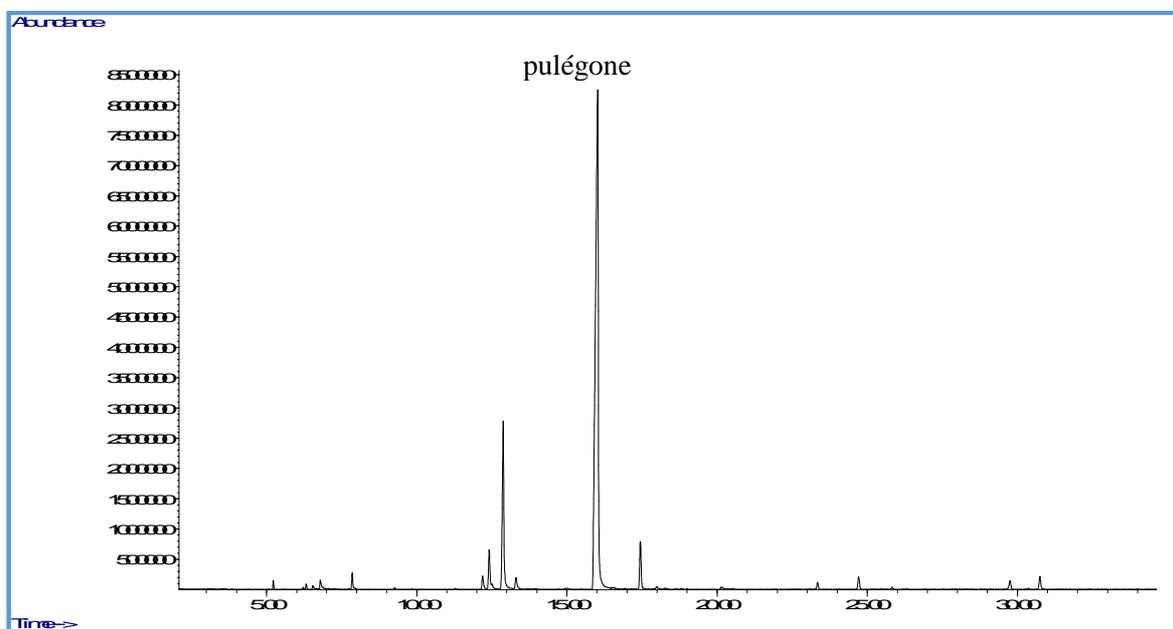
**Détecteur :** Spectromètre de masse

**Courant d'ionisation :** 70 eV

#### o Résultats

L'ordre d'éluion des composés des structures proches est déterminé par leur différence de température d'ébullition. En effet, la molécule ayant le plus faible point d'ébullition sera éluee en premier et inversement.

L'analyse quantitative consiste à utiliser un étalon interne qui subira le même processus d'extraction que l'échantillon, et devra permettre le calcul des pertes dues aux opérations préliminaires à l'analyse en CPG. Cet étalon doit posséder une structure voisin de celle du ou des composés à doser, le calcul du coefficient de réponse relatif du composé à l'étalon et la connaissance de la quantité d'étalon interne ajoutée à l'échantillon, permettent alors un dosage quantitatif précis.



**Figure 70.** Chromatogramme de l'huile essentielle d'une plante obtenue par GC-MS.

## Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

Les caractéristiques de certains composés identifiés sont données dans le tableau XX.

**Tableau XX.** Exemples de composés volatils identifiés par GC/MS dans une huile essentielle.

N°	RI <sup>a</sup>	Tr	Composé	%	Identification <sup>b</sup>
1	932	5,2	$\alpha$ -Pinène	0,4	MS, I <sub>R</sub>
2	972	6,2	Sabinène	0,1	MS, I <sub>R</sub>
3	976	6,3	$\beta$ -Pinène	0,2	MS, I <sub>R</sub>
4	985	6,5	3-Octanone	0,3	MS, I <sub>R</sub>
5	994	6,8	3-Octanol	0,7	MS, I <sub>R</sub>
6	1027	7,9	Limonène	0,9	MS, I <sub>R</sub>
7	1029	7,9	1,8-Cinèol	0,1	MS, I <sub>R</sub>

Note: <sup>a</sup> I<sub>R</sub> = Index de rétention linéaire; <sup>b</sup> Identification a été réalisée en comparant les spectres de masse (MS), Indices de rétention (I<sub>R</sub>).

### Remarque

Une fois qu'un produit est suffisamment purifié, il faut déterminer sa structure. Les méthodes spectroscopiques (Spectrométrie de masse, rayons X, Résonance magnétique Nucléaire (RMN), UV - visible, Infra - Rouge) permettent de recueillir des informations qui vont permettre de déterminer la structure moléculaire du principe actif. Cette étape est primordiale puisqu'elle permet de savoir si le principe actif isolé est nouveau.

## III. 3. Techniques d'identification spectrophotométriques des métabolites secondaires

### III.3.1. Spectrométrie UV/Visible

La spectroscopie UV (ultraviolet) visible est une technique de caractérisation de molécules. En effet, elle est basée sur la capacité des composés à absorber un faisceau lumineux.

A chaque fonction organique correspond une plage d'absorption de rayonnement lumineux dans le spectre UV-visible. L'intensité de l'absorption est aussi fonction de la nature de liaisons chimiques (liaison  $\sigma$  ou  $\pi$  ...) dans les molécules.

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

La spectroscopie UV-visible permet également de déterminer la concentration d'une famille de molécules dans un extrait tel que le dosage des anthocyanes, polyphénol totaux, flavonoïdes totaux.

La spectroscopie UV-Vis peut servir aussi d'outil pour établir la classe structurale des composés phénoliques. Des analyses spectrophotométriques couvrant la région de 190 à 600 nm sont particulièrement intéressantes pour balayer la région d'absorption des composés phénoliques.

La fraction phénolique confère une ou deux bandes d'absorption dans la région UV.

- ◆ La bande 305-390 nm (bande I ou B) provient de la partie cinnamoyle liée au cycle B dans le cas des flavonoïdes.
- ◆ La bande 230-300 nm (bande II ou A) est en corrélation avec le fragment benzène ou benzoyle de cycle A homologue aux flavonoïdes (Figure 71).

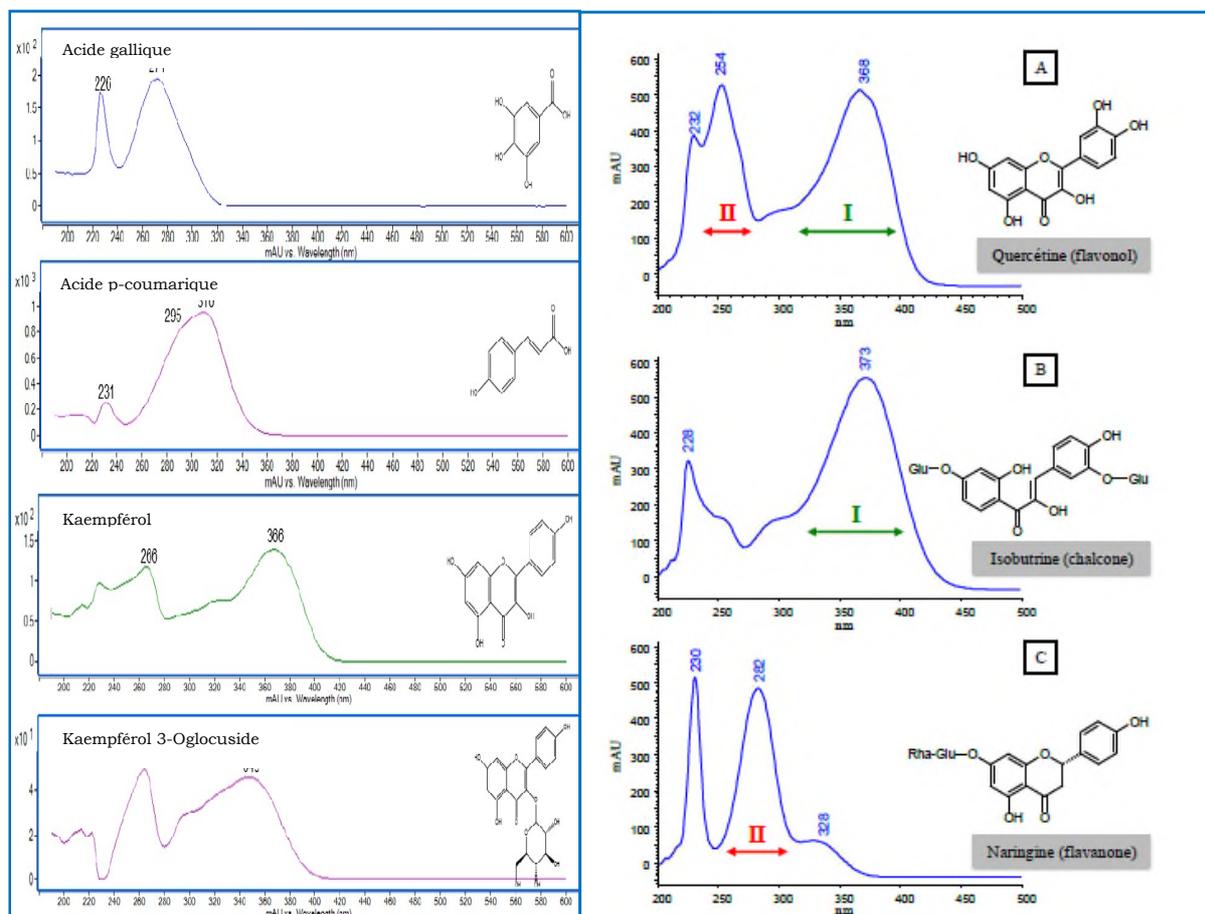
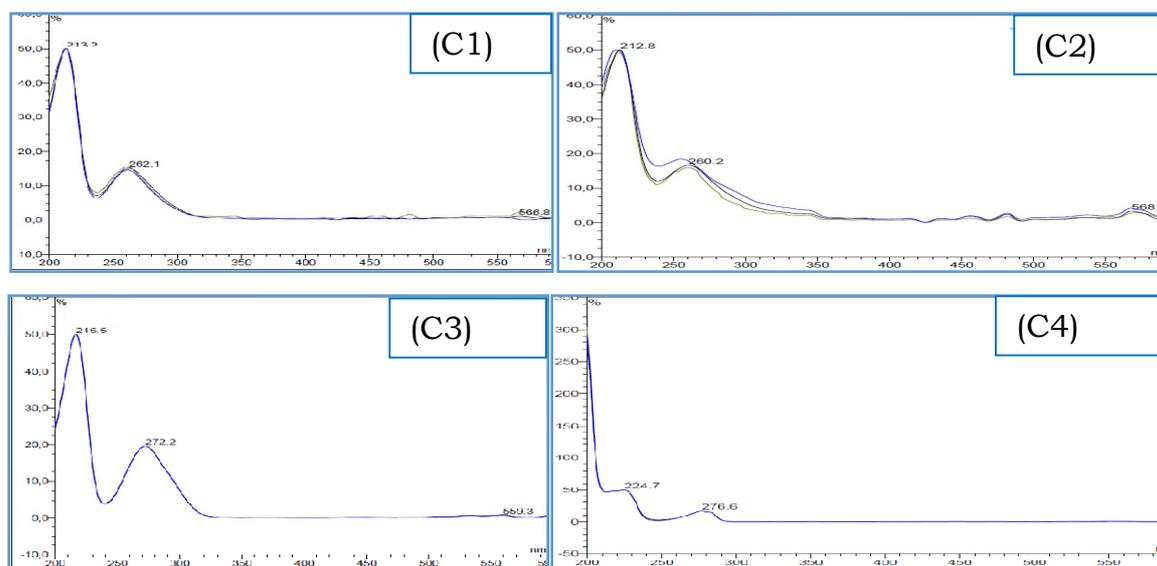


Figure 71. Spectre UV/Vis des composés phénoliques.

## Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

### Exemple

L'analyse d'une fraction issue de l'extrait hydroalcoolique des feuilles de *Alchornea cordifolia* a donné le spectre en spectroscopie Ultra-Violette illustré dans la figure suivante :



**Figure 72.** Spectres en spectroscopie Ultra-Violette de la fraction à l'acétate d'éthyle des feuilles de *Alchornea cordifolia*.

L'analyse des données spectrales a permis d'identifier les métabolites secondaires présents dans ces fractions (Tableau XXI).

**Tableau XXI.** Analyse des données de la spectroscopie UV des composés de la fraction.

Composé	$\lambda_{max}$	Flavonoïdes	Alcaloïdes	Stérols et terpènes
C1	213/262	-	-	+
C2	213/260	-	-	+
C3	217/272	-	+	+
C4	225/277	-	+	-

### III.3.2. Spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse consiste à séparer et à identifier des molécules selon leur masse et leur charge et de caractériser leur structure

### **Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation**

chimique, la séparation des molécules par cette technique est plus douce qu'avec les autres méthodes. Elle permet d'ioniser des molécules de grande taille, peu volatiles et sensibles à la chaleur sans les dégrader.

#### **■ Principe**

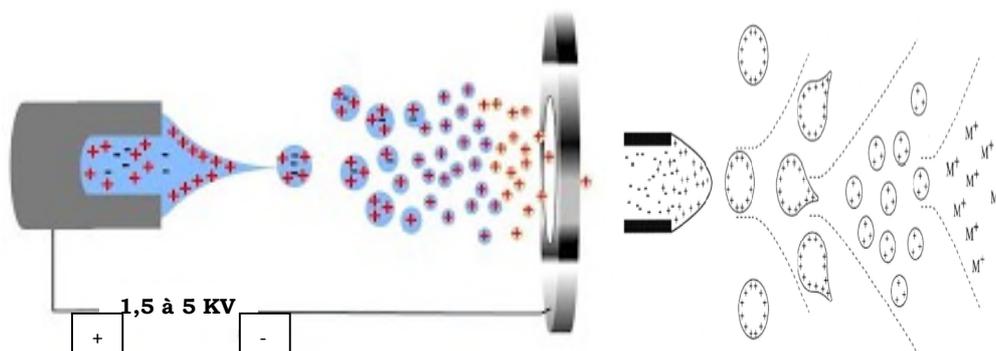
Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ).

La source d'ionisation consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser et peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Il existe plusieurs sources d'ionisation :

- L'ionisation électronique (EI).
- L'ionisation chimique (CI).
- Le bombardement par atomes rapides (FAB).
- Electrospray ionisation ESI ou l'électronébulisation.

L'ionisation d'une molécule la plus utilisée est la technique d'ionisation par ESIMS (Electro Spray Ionisation Mass Spectrometry) qui est une technique qui permet de désolvater et d'ioniser les molécules d'échantillons dissoutes dans un solvant sous l'influence d'un champ électrique. Elle a lieu dans une source à la pression atmosphérique (Figure 73). Le bombardement avec un faisceau d'électrons à haute énergie arrache l'électron ayant le plus petit potentiel d'ionisation dans la molécule pour donner l'ion moléculaire ou ion parent  $M^+$  en phase vapeur. L'ion moléculaire donne la masse moléculaire de l'échantillon car la masse de l'électron perdue de la molécule est négligeable.

En pratique, on utilise une énergie beaucoup plus élevée qui provoque une fragmentation supplémentaire de l'ion moléculaire résultant en un fragment d'autres ions filles.



**Figure 73.** Mécanisme de l'ionisation par electrospray.

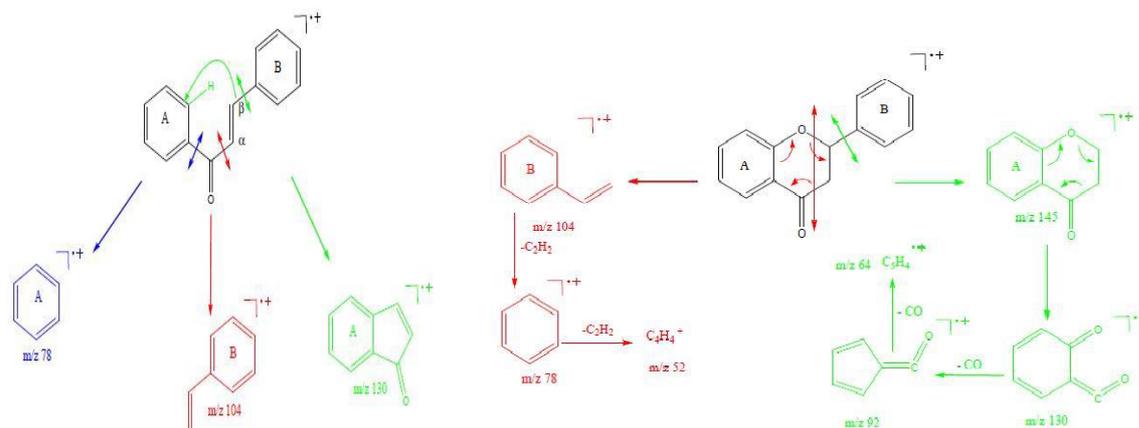
L'échantillon est placé sur une lame, le dépôt (ou spot) formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d'ioniser les molécules de l'échantillon. Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge.

Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite. Une fois l'ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et les résultats se présentent sous forme de spectres de masse qui sont enregistrés sous la forme de raies avec leurs abondances relatives.

La spectroscopie de masse est utile en analyses chimiques car elle peut :

- donner les masses moléculaires exactes ;
- montrer la présence de certaines unités structurales et leurs points d'attachement dans la molécule ;
- Donner une idée de la structure de la molécule.

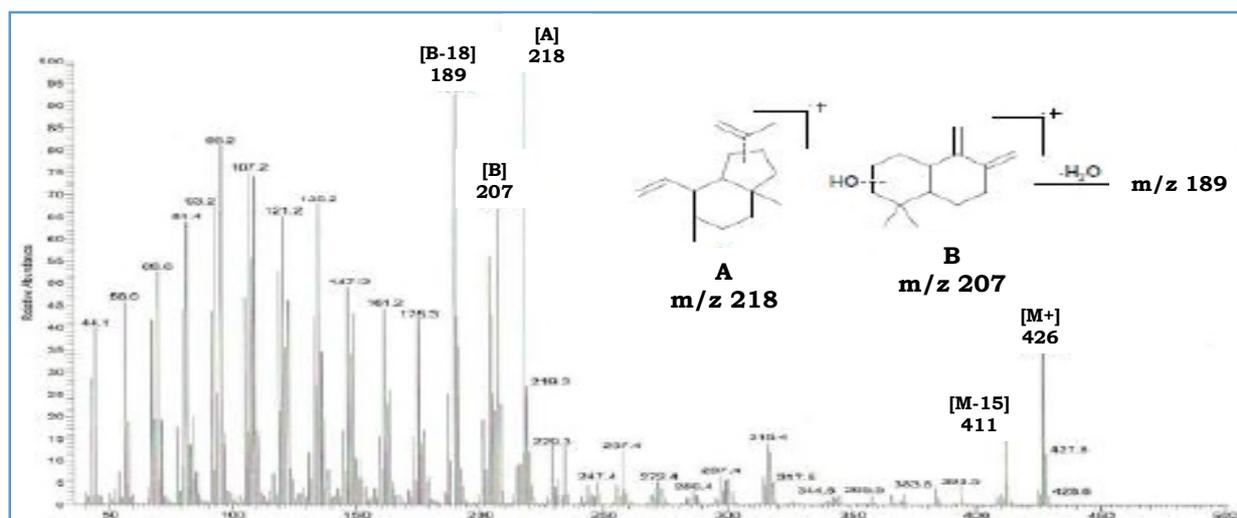
Les mécanismes de fragmentation des flavanones et des chalcones en montrant les liaisons les plus susceptibles de se rompre et les fragments susceptibles de se former sont illustrés dans la figure suivante.



**Figure 74.** Schéma de fragmentation des squelettes chalcone et flavanone par spectrométrie de masse.

### Exemples d'identification des métabolites par MS

La mesure du spectre de masse en ionisation impact électronique (EI) en mode positif des triterpènes des feuilles de *Agauriak polyphylla* montre un ion à  $m/z$  426 qui correspond à l'ion moléculaire  $M^+$ . Le spectre présente également des ions résultant de la fragmentation de la molécule et notamment l'ion B à  $m/z$  207 qui est caractéristique des cycles A et B d'un triterpène, la perte par cet ion d'une molécule d'eau indique que les cycles A et B portent un groupement hydroxyle, très probablement en position 3 pour des raisons biogénétiques (Figure 75).

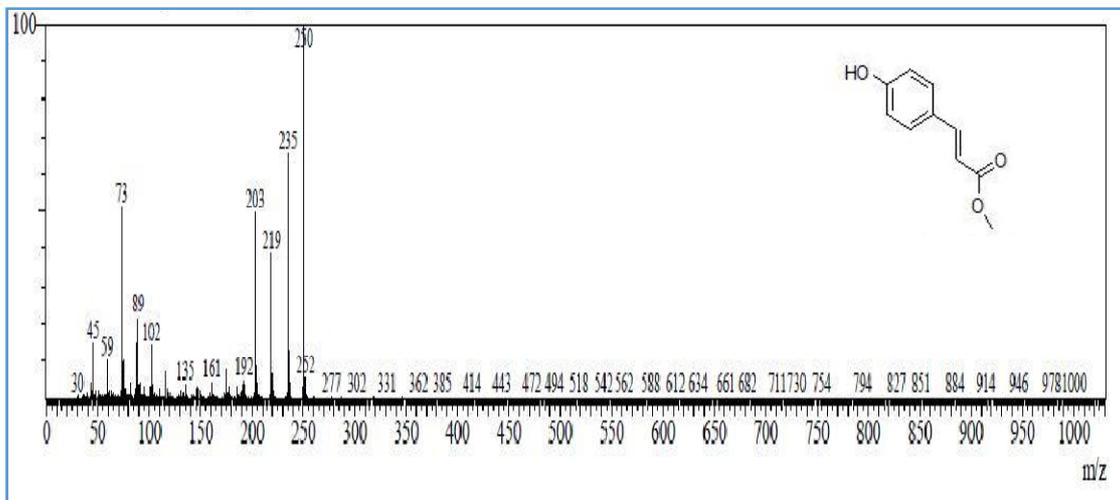


**Figure 75.** Spectre de masse EI de composée triterpénique des feuilles de *Agauriak Polyphylla*.

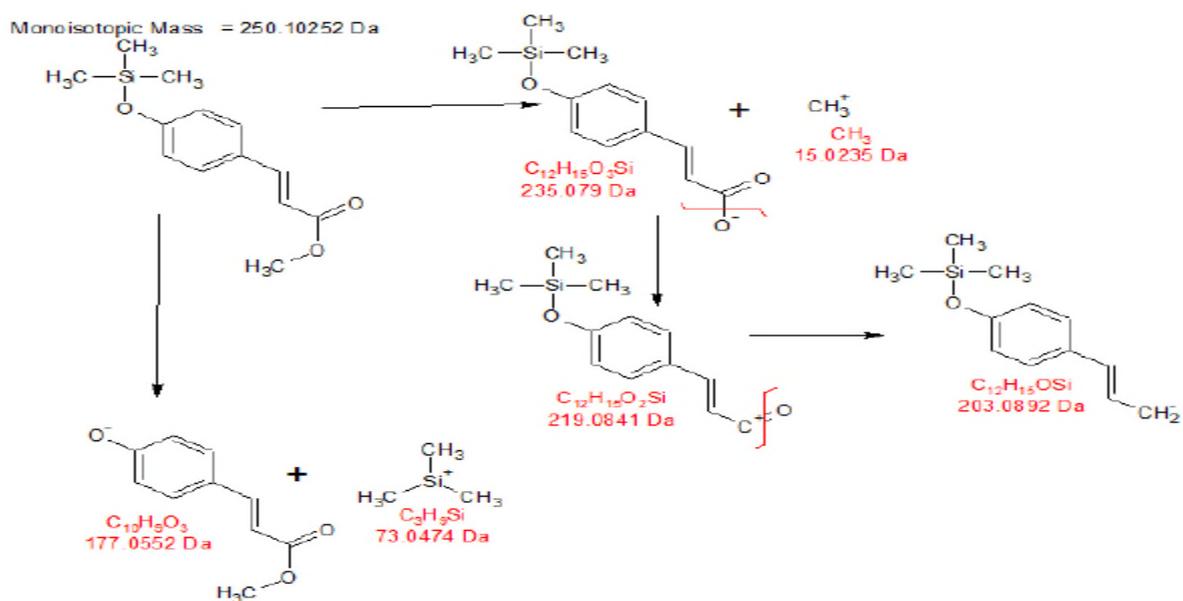
### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

L'analyse de la fraction à l'acétate d'éthyle issue de l'extrait hydro alcoolique des fleurs de *Tridax procumbens* :

Le spectre de masse d'ester méthylique de l'acide coumarique montre que le fragment le plus abondant est l'ion formé par la molécule entière avec pour masse 250 m/z suivi par le fragment de masse 235 m/z qui découle du départ d'un groupement méthyle (Figure 76). Le fragment de masse 219 m/z provient du départ d'un oxygène du fragment de masse 235 m/z ; la perte d'un autre oxygène conduit au fragment de masse 203 m/z. Le fragment de masse 73 m/z résulte du départ du groupement triméthylsilyl (Figure 77).



**Figure 76.** Spectre de masse d'ester méthylique de l'acide coumarique.



**Figure 77.** Décomposition de d'ester méthylique de l'acide coumarique.

### III.3.3. Spectrométrie d'infrarouge

#### ■ Principe

La spectrométrie infrarouge est une méthode utilisée pour identifier les différents groupes de métabolites secondaires des plantes. L'avantage de cette technologie est qu'elle peut être appliquée pour des analyses rapides et non destructives. La méthode est basée sur l'excitation des molécules par des radiations infrarouge.

L'absorption des rayonnements de nombres d'ondes comprises entre 4000 et 400  $\text{cm}^{-1}$  en tant qu'énergie de vibration moléculaire modifie à la fois les états de rotation et de vibration des molécules.

La spectrométrie d'IR est basée sur l'absorption ou la réflexion par l'échantillon des radiations électromagnétiques comprises entre 1 et 50  $\mu\text{m}$ . Dans le proche et moyen IR, l'absorption de la lumière par la matière a pour origine l'interaction entre les radiations de la source lumineuse et les liaisons chimiques (Figure 78). Un composé qui a la capacité d'absorber la lumière infrarouge enregistrera un spectre IR caractéristique pour sa discrimination.

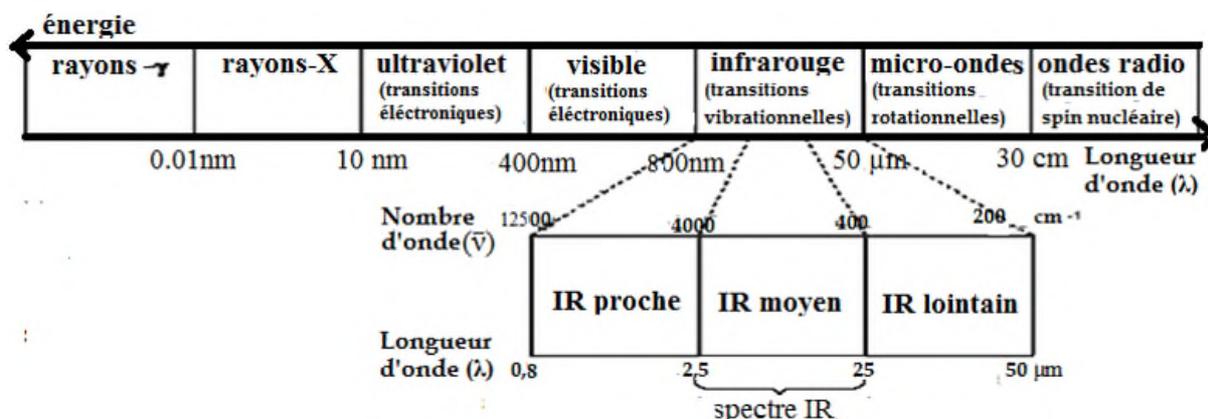
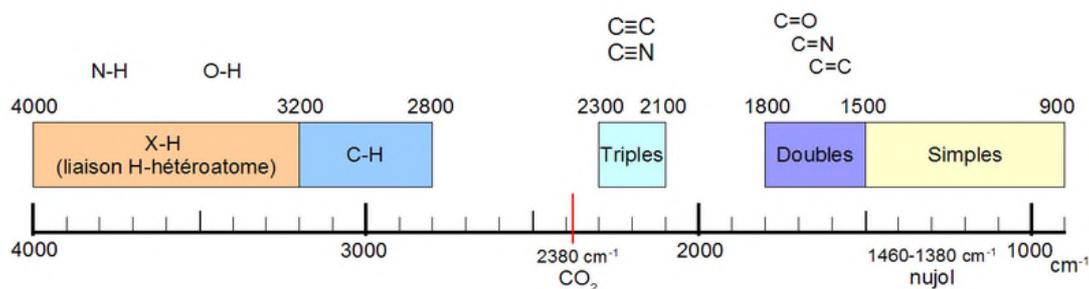


Figure 78. Spectre infrarouge.

Les atomes situés aux deux extrémités d'une liaison sont animés d'un mouvement de vibration l'un par rapport à l'autre et s'ils sont différents ils forment un dipôle électrique oscillant à cette même fréquence. Si on irradie à cette même fréquence, il y aura absorption (accord entre fréquence mécanique et électromagnétique).

## Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

Les différentes bandes observées dans un spectre IR correspondent à divers groupes fonctionnels et des liaisons présentes dans la molécule (Figure 79). Ainsi, la spectroscopie infrarouge est largement utilisée pour la détection de groupes fonctionnels et l'identification de composés organiques.



**Figure 79.** Caractéristiques d'un spectre infrarouge.

Le spectre infrarouge d'un composé est appelé son empreinte digitale. La région située au-dessous de  $1500 \text{ cm}^{-1}$  est appelée région d'empreinte digitale car chaque composé possède un motif d'absorption unique dans cette région. Cette région contient de nombreuses bandes d'absorption causées par des vibrations de flexion telles que les bandes d'absorption causées par les liaisons carbone-carbone, carbone-oxygène (C-C, C-O) comme dans les alcools, les éthers, les esters, et la liaison carbone-azote (C-N) comme dans les amines, les acides aminés, les amides.

### Exemple d'identification des métabolites par IR

► Le premier exemple donné est le spectre infrarouge du taxol : la bande à  $2362 \text{ cm}^{-1}$  ne provient pas du taxol, c'est une impureté présente dans le système FTIR employé. Le tableau XXII nous indique les bandes caractéristiques des principaux groupements fonctionnels de la molécule du taxol, retrouvées sur le spectre infrarouge. On remarque que les groupements cétonique et acétates de la molécule se retrouvent au même endroit à  $1735 \text{ cm}^{-1}$  (Figure 80).

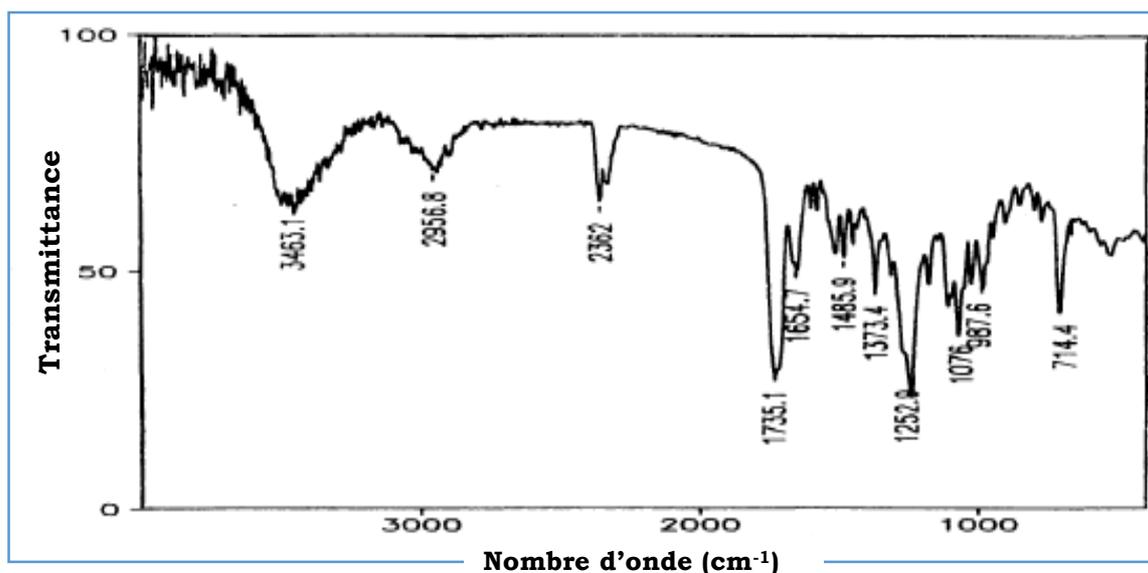


Figure 80. Spectre infrarouge du taxol.

Tableau XXII. Analyse du spectre infrarouge du taxol.

Bande (cm <sup>-1</sup> )	Groupement fonctionnel
3500-3300	O-H N-H
2957	C-H (CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> , CH)
1735	C=O (ester et cétone)
1655	C=C (alcène) C=C (aromatique)
1486	N-H (amide)
1373	C-H (méthyl)
1253	C-O (ester)
1076	C-O (alcool)
688	C-O (alcool)
714	C-N (benzène)

- Le deuxième exemple donné est le spectre IR de la fraction à l'hexane de d'*Alchornea cordifolia* (Figure 81).

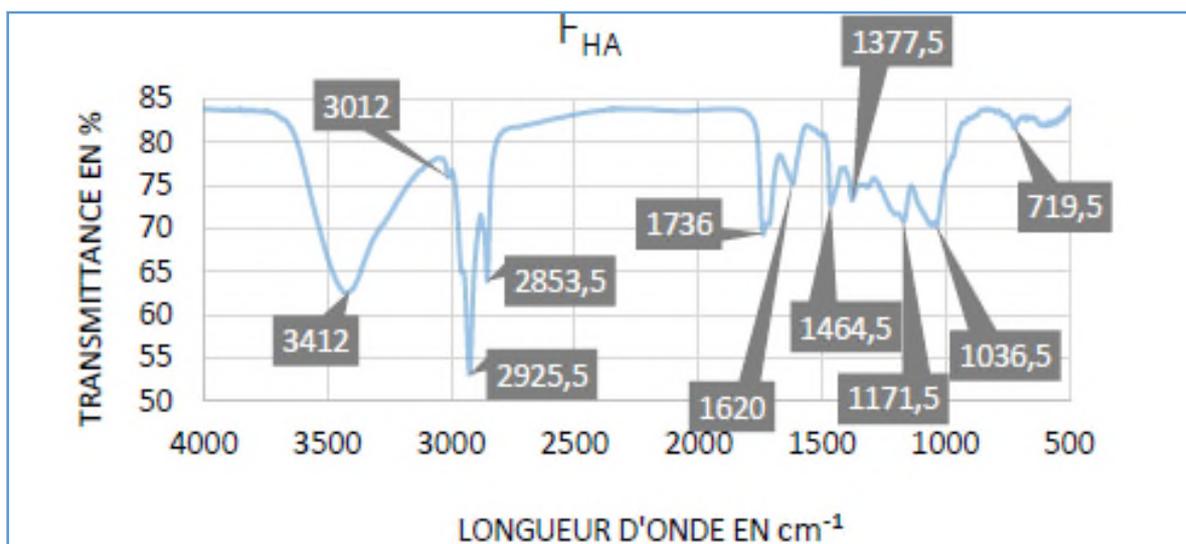


Figure 81. Spectres FTIR d'une fraction d'un extrait hexanique d'*Alchornea cordifolia*.

Le spectre de montre la présence de bandes à  $3412\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  **N-H**) ;  $3012$  ( $\nu$  **-C=C-H**),  $2925,5$  ( $\nu$  **-CH<sub>3</sub>**),  $2853,5$  ( $\nu$  **-CH<sub>2</sub>-**),  $1736$  ( $\nu$  **-(C=O)-OR**),  $1620$  ( $\nu$  **-(C=C)-**) ,  $1464,5$  ( $\delta$  **-C-H**),  $1377,5$  ( $\delta$  **-CH<sub>3</sub>**),  $1171,5$  ( $\omega$  **-CH<sub>2</sub>-**),  $1036,5$  ( $\nu$  **C-N**),  $719,5$  ( $\rho$  **-CH<sub>2</sub>-**).

L'ensemble de ces résultats montre la présence de groupement amine, de chaînes aliphatiques saturées et insaturées, de groupements carbonyles (ester). La différence entre la bande de l'amine et celle de l'alcool réside dans la taille de la bande. En effet, la bande correspondant à OH est large alors que celle de NH est moyenne.

La présence de la fonction amine traduite par deux bandes à  $3412$  ( $\nu$  **N-H**) et  $1036,5$  ( $\nu$  **C-N**) indiquant la présence d'alcaloïdes. Les autres bandes notamment celles à  $1377,5$  ( $\delta$  **-CH<sub>3</sub>**) et  $1620$  ( $\nu$  **-(C=C)-**) indiquent également la présence de terpènes. L'absence de bandes correspondant à des groupements aromatique et hydroxyle traduit l'absence de flavonoïdes. On peut noter que le spectre ne présente pas de bandes à  $815$ ,  $824$ ,  $872$  ou  $882\text{ cm}^{-1}$  qu'on attribue au groupe méthyle terminal des stérols d'où l'absence de cette famille dans la fraction à l'hexane.

### III.3.4. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

#### ■ Principe

La RMN tire des informations de l'interaction qui naît entre les noyaux des atomes de certains éléments présents dans l'échantillon et le champ magnétique intense et constant, produit par un aimant auquel on le soumet (signaux de résonance).

Le spectre RMN correspond à l'absorption, par certain atome de l'échantillon, de certaines des fréquences présentes dans la source électromagnétique. Cette technique fait appel au spin des noyaux qui permet d'expliquer le comportement des atomes dans un milieu où il règne une direction privilégiée (Figure 82).

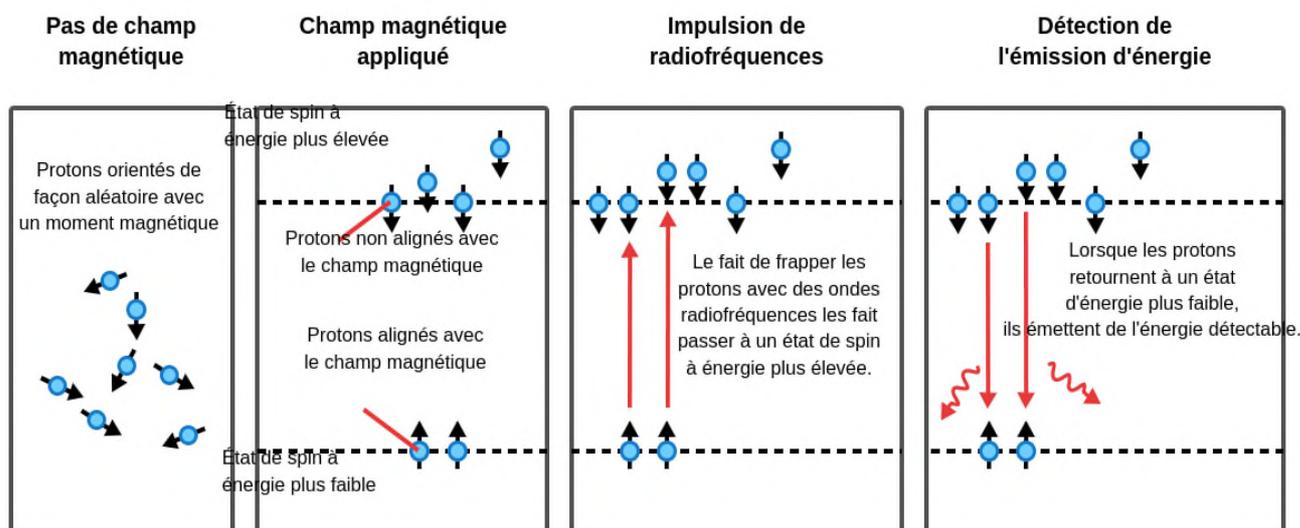


Figure 82. Principe de la spectroscopie de la RMN du proton.

#### Remarque

Il ne faut donc pas de spin nul pour étudier un atome en RMN, il ne faut donc pas que A (nucléon) et Z (proton) soient tous deux paires, sinon il n'y a pas de spin (donc pas de RMN).

La RMN est la méthode la plus efficace pour élucider la structure d'un composé. Elle renseigne sur la nature de la génine, la conformation et la configuration des sucres de même que les liaisons interglycosidiques et les points de fixation des sucres sur l'aglycone.

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

Les applications les plus importantes pour la chimie organique sont la RMN du proton du carbone 13.

Pour la RMN  $^1\text{H}$ , l'ensemble des protons des molécules courantes de la chimie organique a un déplacement compris entre 0 et 15 ppm (Figure 83).

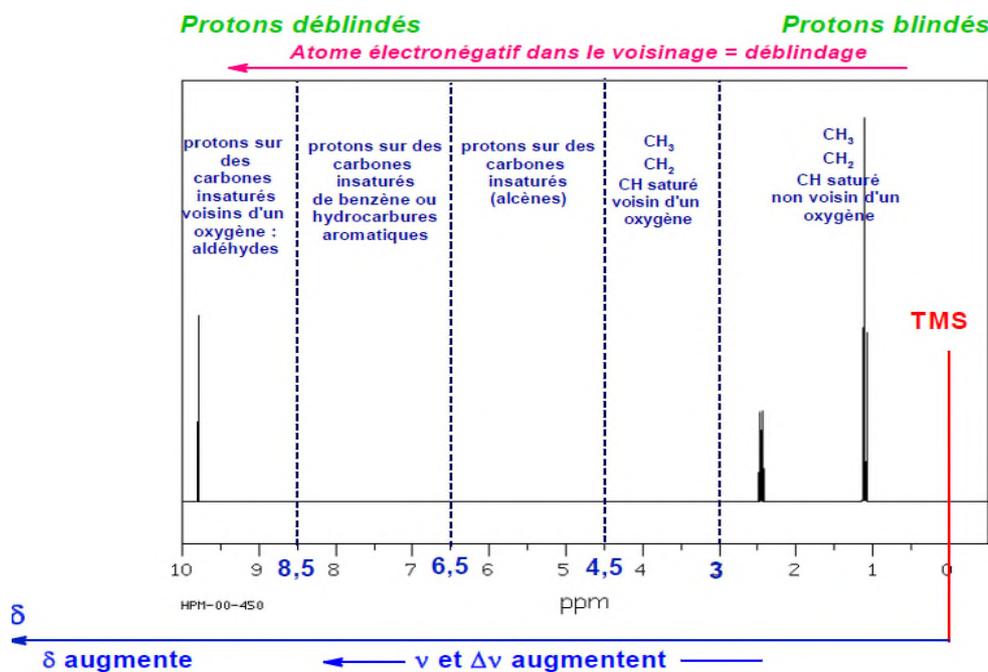


Figure 83. Zone du signal de différents protons.

Pour la RMN  $^{13}\text{C}$ , à première vue, les spectres du RMN  $^{13}\text{C}$  montrent des zones distinctes au niveau des déplacements chimiques correspondantes aux fonctions ester, aux aromatiques, aux sucres avec leurs anomères, et aux méthyles (Figure 84).

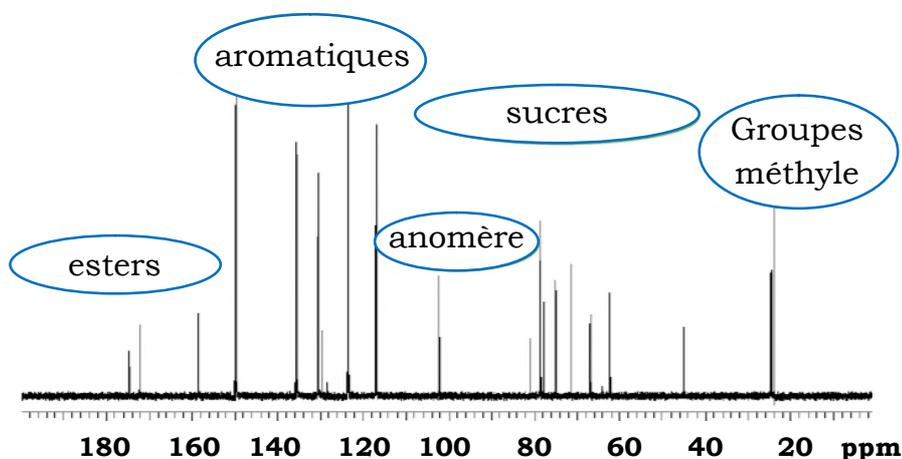


Figure 84. Spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  d'un composé.

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  fournit des informations sur la nature des carbones:

- de 10 à 60 ppm : les carbones de la génine,
- de 60 à 90 ppm : les carbones des fonctions alcooliques secondaires et primaires des sucres et de la génine,
- de 95 à 110 ppm : les carbones anomériques des sucres,
- de 120 à 150 ppm : les carbones éthyléniques et aromatiques,
- Au-delà de 170 : les carbones des aldéhydes, des esters, des acides et des cétones.

Le spectre de RMN  $^1\text{H}$  permet de distinguer trois zones de résonance :

- de 0,5 à 3 ppm : les protons de la génine,
- de 3 à 4,5 ppm : les protons osidiques,
- De 4,5 à 6 ppm : les protons osidiques anomériques, et les protons éthyléniques.

■ Pour identifier une structure à partir d'un spectre, trois critères sont à considérer (Figure 85):

- **Le déplacement chimique (en ppm):** lié à la fréquence des signaux (autant de fréquences absorbées qu'il y a de noyau ayant un environnement différent).
- **La courbe d'intégration:** liée au nombre de H concernés par un signal : La hauteur du palier est proportionnelle au nombre de protons du signal (la hauteur du palier est proportionnelle au nombre de protons du signal).
- **La multiplicité des signaux:** forme des pics (doublets, triplet....) (interaction avec le spin des noyaux voisins).

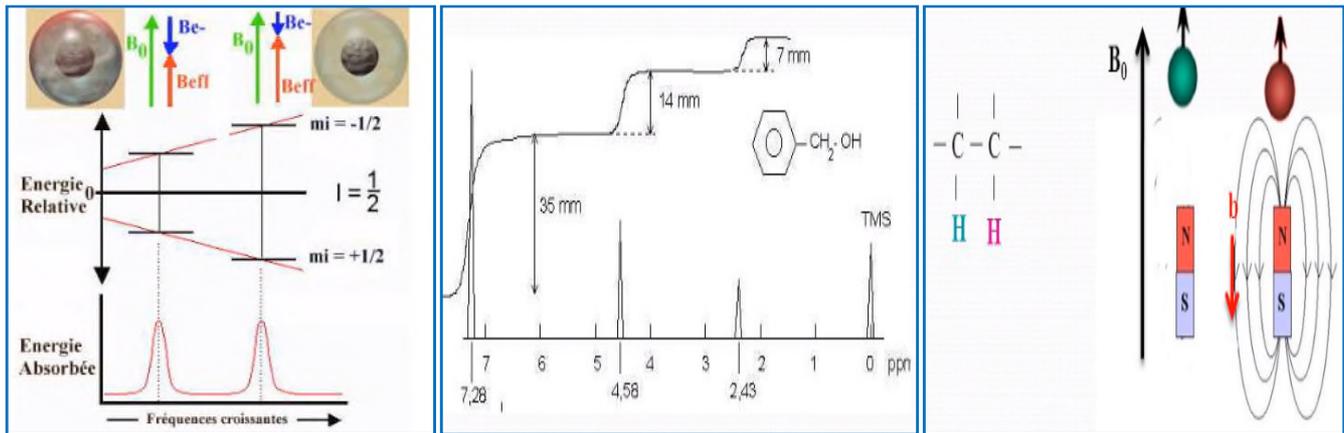


Figure 85. Paramètres influant l'identification d'une structure à partir d'un spectre

### ✚ Exemple d'identification des métabolites par RMN

#### ◆ Détermination de structure de squalène

La RMN est la technique permettant la meilleure confirmation de la structure d'un produit naturel comme le squalène. La figure 86 nous montre le spectre RMN du squalène.

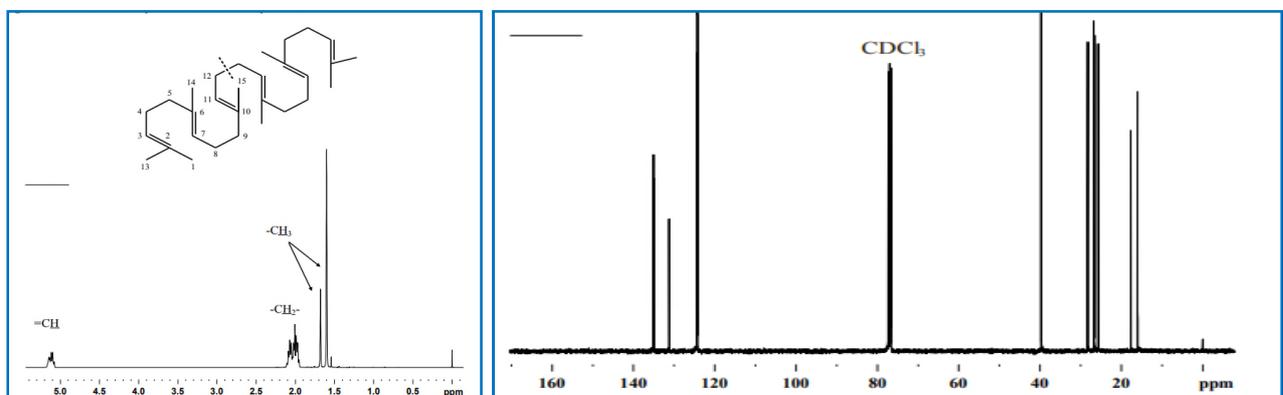


Figure 86. Spectre RMN du squalène.

D'après la figure pour le spectre RMN de  $^{13}\text{C}$ , nous avons :

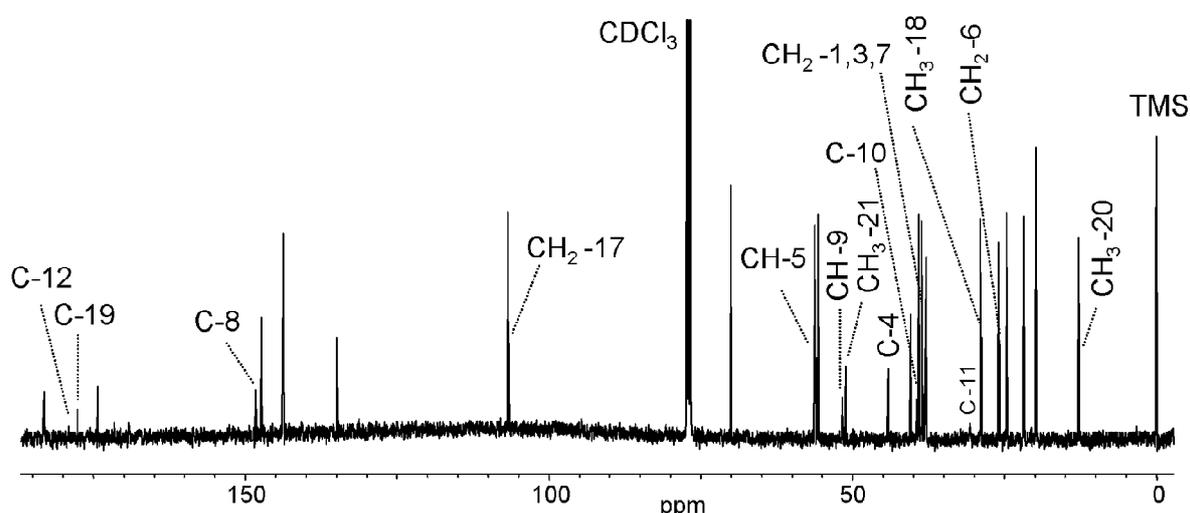
- ▶ 3 signaux appartenant à **des carbones quaternaires éthyléniques** : 135,11 ; 134,90 et 131,26 ppm.
- ▶ 3 signaux appartenant à **des carbones éthyléniques** : 124,42 ; 124,32 et 124,28 ppm.
- ▶ 5 signaux appartenant à **des carbones allyliques** : 39,77 ; 39,74 ppm d'une part, 28,29 ; 26,78 ; 26,67 ppm d'autre part :

### Chapitre III Méthodes d'analyse des substances bioactives: séparation et caractérisation

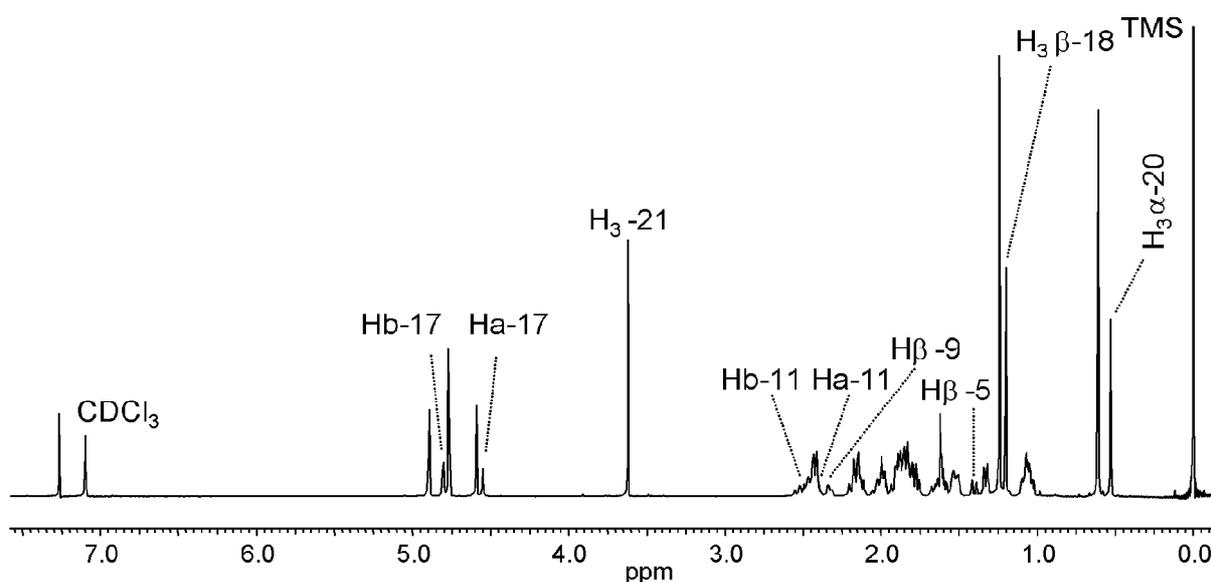
- ▶ 4 signaux appartenant à **des méthyles** : 25,71 ; 17,69 ; 16,05 et 16,01 ppm.

◆ Le spectre RMN d'un autre composé isolé d'une plante indique la présence de 17 atomes de carbone, dont 5 carbones quaternaires, 2 groupes CH, 7 méthylènes et 3 méthyles (Figure 87 et 88), avec les caractéristiques suivantes :

- La présence de deux fonctions carbonyles à  $\delta$  177,6 et 179,1 ppm.
- La présence d'un méthyl-ester à  $\delta$  51,2 ppm.



**Figure 87.** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d'un composé isolé d'une plante.



**Figure 88.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d'un composé isolé d'une plante.

## Références bibliographiques

- Andriamasinoro, N. A. (2018). *Purification et caractérisation des métabolites secondaires extraits de plantes de la famille des Asparagaceae et Caprifoliaceae, et évaluation de leurs activités biologiques* (Doctoral dissertation, Université Bourgogne Franche-Comté).
- Bastos, E. L., & Gonçalves, L. C. (2017). Microwave-assisted extraction of betalains. *Water extraction of bioactive compounds*, 245-268.
- Beloucifa, M., & Merabet, N. (2014). *Etude par GC-MS des huiles essentielles de: Nigella Sativa, Pistacia Lentiscus, et Punica Granatum* (Doctoral dissertation).
- Benaissi, K. (2013). Le CO<sub>2</sub> supercritique appliqué à l'extraction végétale. *Technique de l'Ingénieur*.
- Benguerba, A. (2008). Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espèce *Inula crithmoides* L.
- Brahmi, F., Madani, K., Stevigny, C., Chibane, M., & Duez, P. (2015). HPTLC method for quantitative determination of rosmarinic acid and evaluation of antioxidant capacity in the extracts of three Algerian mints.
- Brahmi, F., Hauchard, D., Guendouze, N., Madani, K., Martin, K., Léocadie, K., ... & Duez, P. (2015). Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian Mentha species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial crops and products*, 74, 722-730.
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8615-8627.
- Chemat, F., & Strube, J. (Eds.). (2015). *Green extraction of natural products: theory and practice*. John Wiley & Sons.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., & Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 248-263.
- Cheok, C. Y., Salman, H. A. K., & Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16-40.
- Condoret, J.-S., & Barth, D. (2010). Les fluides supercritiques, dans *Génie des Procédés Durables*, Dunod.

- da Silva, L. R., & Silva, B. (Eds.). (2016). *Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables as Health Promoters Part I*. Bentham Science Publishers.
- Del Valle, J. M., & Aguilera, J. M. (1988). An improved equation for predicting the solubility of vegetable oils in supercritical carbon dioxide. *Industrial & engineering chemistry research*, 27(8), 1551-1553.
- Do, T. K. T. (2016). *Évaluation des performances de la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) dans l'analyse (qualitative et quantitative) des métabolites secondaires dans les extraits naturels* (Doctoral dissertation, Université Côte d'Azur).
- Doughari, J. H. (2012). *Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents* (pp. 1-33). Rijeka, Croatia: INTECH Open Access Publisher.
- Fons, F., Gargadennec, A., & Rapior, S. (2008). Isolement et purification de substances naturelles par la Flash Chromatographie.
- Fried, B., & Sherma, J. (1996). *Practical thin-layer chromatography: a multidisciplinary approach*. CRC Press.
- Herzi, N. (2013). *Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique et des techniques conventionnelles* (Doctoral dissertation).
- Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*.(Ed.) De Boeck Université.
- Houël, E. (2011). *ETUDE DE SUBSTANCES BIOACTIVES ISSUES DE LA FLORE AMAZONIENNE Analyse de préparations phytothérapeutiques à base de Quassia amara L.(Simaroubaceae) et de Psidium acutangulum DC.(Myrtaceae) utilisées en Guyane française pour une indication antipaludique. Identification et analyse métabolomique d'huiles essentielles à activité antifongique* (Doctoral dissertation, Université des Antilles-Guyane).
- Hussain, E. A., Sadiq, Z., & Zia-Ul-Haq, M. (2018). *Betalains: biomolecular aspects*. London: Springer International Publishing.
- Gill, B. S., & Qiu, F. (2020). Technologies for extraction and production of bioactive compounds. In *Biotechnological Production of Bioactive Compounds* (pp. 1-36). Elsevier.
- Guignard, J-L. (2000). *Biochimie végétale*. Edition Dunod, Paris. 274p.
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol*, 2(7), 377-392.

- Koné, K. P. F. O. (2018). Applications des techniques de chromatographie et de spectroscopie dans l'identification des métabolites secondaires de trois plantes antidiabétiques et antihypertensives de la pharmacopée ivoirienne (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique Felix Houphoët Boigny-Yamoussoukro).
- Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS).
- Kukula-Koch, W. A., & Widelski, J. (2017). Alkaloids. In *Pharmacognosy* (pp. 163-198). Academic Press.
- Kurek, J. (Ed.). (2019). *Alkaloids: Their importance in Nature and Human life*. BoD-Books on Demand.
- Lama-Muñoz, A., & Contreras, M. D. M. (2022). Extraction Systems and Analytical Techniques for Food Phenolic Compounds: A Review. *Foods*, 11(22), 3671.
- Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., J.-P. Carde, J.-P. (1994). Biogénèse des monoterpènes. II - La chaîne isoprénique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 133, 79 - 99.
- Lagunez Rivera, L. (2006). *Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe* (Doctoral dissertation).
- Lattanzio, V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction 50. *Nat. Prod*, 1543-1580.
- Laura, A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 253-271). Woodhead Publishing.
- Ligor, M., Ratiu, I. A., Kielbasa, A., Al-Suod, H., & Buszewski, B. (2018). Extraction approaches used for the determination of biologically active compounds (cyclitols, polyphenols and saponins) isolated from plant material. *Electrophoresis*, 39(15), 1860-1874.
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M. I. (2017). Terpenoids. In *Pharmacognosy* (pp. 233-266). Academic Press.
- Lucchesi, M. E. (2005). *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles* (Doctoral dissertation, Université de la Réunion).

- Mahato, N., Sinha, M., Sharma, K., Koteswararao, R., & Cho, M. H. (2019). Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes. *Foods*, 8(11), 523.
- Michel, T. (2011). *Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophae rhamnoides)* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).
- Missaoui, R. (2018). Extraction verte et caractérisation des molécules bioactives dans les coproduits de la production d'asperge (*Asparagus officinalis* L.).
- Morin-Savy, S. (2005). Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés par des bactéries non photosynthétiques: des carotènes aux xanthophylles (Doctoral dissertation, Brest).
- Nabavi, S. M., Saeedi, M., Nabavi, S. F., & Silva, A. S. (Eds.). (2020). Recent advances in natural products analysis.
- Nam, A. M. (2014). *Contribution de la RMN 13C à l'analyse des huiles végétales, huiles essentielles et résines (Olea europaea, Pinus halepensis et Cedrus atlantica)* (Doctoral dissertation, Université Pascal Paoli).
- Nga, E. N., Soppo, L. V., Nokam, A. B. E., Ndongo, M. N., Ondoua, M. O., Benga, M. F., ... & Ndom, J. C. (2019). Identification des familles de composés bioactifs et métabolites secondaires de *Trichoscypha odonii* de Wild justifiant son usage en médecine traditionnelle. *Health Sciences and Disease*, 20(6).
- N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1).
- Patil, A. R., Ghagare, P. M., Deshmane, B. J., & Kondawar, M. S. (2020). Review on Chromatography Principal Types and it's Application. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*, 12(1), 27-32.
- Rahal, N. B. (2012). Extraction, identification et caractérisation des molécules bioactives de la graine et de l'huile de *Silybum marianum*. Étude de leurs activités antioxydante et antitumorale (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Richter, G. (1993). Métabolisme des végétaux : Physiologie et biochimie. Edition Presses Polytechniques et Universitaires Romandes : 318-338.

- Roger, K. G., Christelle, A. N. T., Akhanovna, M. B. J., & Yves-Alain, B. (2011). CCM d'extraits sélectifs de 10 plantes utilisées dans le traitement Traditionnel du Cancer du sein en Côte d'Ivoire. *Eur J Sci Res*, 63(4), 592-603.
- Roland J.C & F. (2001). Atlas de biologie végétale, T2 : *Organisation des plantes à fleurs*, Dunod, 8<sup>e</sup> édition.
- Rutz, A., Sorokina, M., Galgonek, J., Mietchen, D., Willighagen, E., Gaudry, A., ... & Allard, P. M. (2022). The LOTUS initiative for open knowledge management in natural products research. *Elife*, 11, e70780.
- Takeuchi, T. M., Pereira, C. G., Braga, M. E. M., Maróstica, M. R., Leal, P. F., & Meireles, M. A. A. (2009). Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. *Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications*, 140-142
- Wajsman, J., Lozano, Y., & Chemat, F. (2011). Extraction, séparation et purification: du végétal à l'éco-extrait.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.
- Waridel, P. (2003). *Investigation phytochimique des plantes aquatiques Potamogeton pectinatus L., P. lucens L., P. perfoliatus L. et P. crispus L. (Potamogetonaceae)* (Doctoral dissertation, Université de Lausanne, Faculté des sciences).

### Références électroniques

<http://biochimej.univangers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/2MetabolismeSecondaire/1MetabolismeSecondaire.htm>

[https://www.doc-developpement-durable.org/file/Agriculture-Lutte-Biologique/Allelopathie/Metabolisme\\_Secondaire.pdf](https://www.doc-developpement-durable.org/file/Agriculture-Lutte-Biologique/Allelopathie/Metabolisme_Secondaire.pdf)

<https://perso.univ-rennes1.fr/antoine.gravot/index.../Métabolites%20secondaires.doc>

