



HAL
open science

Contribution à l'étude phytochimique d'espèces végétales de la flore tunisienne (*Aristolochia longa* L. et *Bryonia dioïca* Jacq.) : évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne

Mouna Dhouioui

► **To cite this version:**

Mouna Dhouioui. Contribution à l'étude phytochimique d'espèces végétales de la flore tunisienne (*Aristolochia longa* L. et *Bryonia dioïca* Jacq.) : évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne. Chimie analytique. Université de Lyon; Université de Tunis El-Manar. Faculté des Sciences de Tunis (Tunisie), 2016. Français. NNT : 2016LYSE1212 . tel-03008819

HAL Id: tel-03008819

<https://theses.hal.science/tel-03008819>

Submitted on 17 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TUNIS EL MANAR

École doctorale

Mathématiques, Informatique, Sciences et Technologie de la Matière

ET DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Opérée au sein de

L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale ED 206

Chimie, Procédés, Environnement

Spécialité de doctorat : Chimie

Discipline : Chimie analytique

Soutenue publiquement le *16-11-2016* par :

Mouna DHOUIOUI

Contribution à l'étude phytochimique d'espèces végétales de la flore tunisienne (*Aristolochia longa* L. et *Bryonia dioïca* Jacq.): évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne

Devant le jury composé de :

Mr Najib BEN HAMIDA	Professeur Faculté des Sciences de Tunis	Président
Mr Felix TOMI	Professeur Faculté des Sciences et Techniques de Corse	Rapporteur
Mr Lotfi MONSER	Professeur Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis	Rapporteur
Mr Pierre LANTERI	Professeur Université Claude Bernard Lyon 1 Institut des Sciences Analytiques de Lyon	Examineur
Mme Mongia SAID ZINA	Professeur Faculté des Sciences de Tunis	Directrice de thèse
Mr Hervé CASABIANCA	HDR Institut des Sciences Analytiques de Lyon	Co-Directeur de thèse

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mon père et ma mère

A mon frère et mes sœurs

Qui m'ont tout donné, à fin d'être ce que je suis.

﴿ بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ ﴾

﴿ ١ ﴾ خَلَقَ الْإِنْسَانَ مِنْ عَلَقٍ ﴿ ٢ ﴾ أَقْرَأُ وَرَبُّكَ الْأَكْرَمُ ﴿ ٣ ﴾

﴿ ٤ ﴾ عَلَّمَ الْإِنْسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ ﴿ ٥ ﴾

سورة العلق الآيات : ١ - ٥

﴿ *Au de Dieu, le clément, le miséricordieux* ﴾

Lis, au nom de ton Seigneur qui a créé ﴿ 1 ﴾ *qui a créé l'homme d'une*
adhérence ﴿ 2 ﴾ *Lis, ton Seigneur est le très noble* ﴿ 3 ﴾ *qui a enseigné par la plume [le*
calame] ﴿ 4 ﴾ *a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas* ﴿ 5 ﴾

L'adhérence (Al-Alaq) : 1- 5

Remerciement

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire des Substances Naturelles (LSN) à l'Institut National de Recherche et d'Analyse Physicochimique (INRAP), sous la direction de **Mme. Mongia SAID ZINA** (ex-directrice de l'INRAP et professeur à la Faculté des Sciences de Tunis) et le laboratoire de Produits Naturels et Biosourcés de l'Institut des Sciences Analytique (ISA) de Lyon, sous la direction de **Mr. Hervé CASABIANCA**.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance et mes remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse **Mme. Mongia SAID ZINA**. Je tiens à la remercier pour la confiance qu'elle m'a témoignée et pour le temps qu'elle a consacré pour diriger ce travail.

J'adresse également mes vifs remerciements à **Mr. Hervé CASABIANCA** co-directeur de ce travail. Qui m'a permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions grâce à son expérience. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je remercie profondément **Mr. Najib BEN HAMIDA**, professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, qui m'a honoré en acceptant d'être président de jury de cette thèse.

Je suis également heureuse sensible à l'honneur que me font **Mr. Lotfi MONSER** (professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis) et **Mr. Felix TOMI** (professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Corse) en acceptant d'être des rapporteurs de ce travail. Je suis très heureuse de bénéficier de leurs recommandations.

Mes remerciements s'adressent également à **Mr. Pierre LANTERI**, professeur à l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail et d'être parmi le jury.

A tout le personnel de l'INRAP et de l'ISA, en témoignage de mon profond respect, de ma reconnaissance pour l'accueil qu'ils m'ont toujours réservé, qu'ils en soient vivement remerciés en particuliers :

- ◆ **Mr. Abed Nacer BOULILA**, maître assistant en biochimie à l'INRAP pour son soutien scientifique et sa disponibilité ;

◆ **Mme. Dany MAITRE**, ex-technicien supérieur en chimie analytique à l'ISA pour sa gentillesse et son aide à l'interprétation et l'identification des huiles essentielles ;

◆ **Mme. Claire BORDES**, maître de conférences à l'ISA pour sa gentillesse, son soutien scientifique pour l'élaboration et l'interprétation du plan d'expériences;

◆ **Mr. Karim HOSNI**, directeur du laboratoire LSN à l'INRAP ;

◆ **Mme. Anne BONHOMME**, ingénieur du laboratoire de spectroscopie infrarouge à l'ISA pour sa gentillesse et son aide à l'interprétation des spectres infrarouges ;

◆ **Mr. Imeddine HASSEN**, ex-maître assistant en chimie analytique à l'INRAP.

Mes remerciements s'adressent enfin à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de cette thèse, aux enseignants-chercheurs pour leurs soutiens et leurs encouragements, à mes chers amis qui n'ont jamais hésité à m'apporter de précieux conseils et aides ainsi qu'à tous les collègues et les doctorants.

Table des matières

Introduction générale -----	1
------------------------------------	---

Chapitre I: Présentation des espèces à étudier

1. Introduction -----	4
2. Présentation de la famille des aristolochiacées et d' <i>Aristolochia longa</i> L.-----	4
2.1. Présentation de la famille des aristolochiacées-----	4
2.2. Caractères botaniques et position taxonomique d' <i>Aristolochia longa</i> L.-----	4
2.3. Études phytochimiques antérieures d' <i>Aristolochia longa</i> L. -----	6
2.4. Intérêts de l'espèce <i>Aristolochia longa</i> L.-----	6
3. Présentation de la famille des cucurbitacées et de <i>Bryonia dioïca</i> Jacq. -----	7
3.1. Présentation de la famille des cucurbitacées-----	7
3.2. Caractères botaniques et position taxonomique de <i>Bryonia dioïca</i> Jacq. -----	8
3.3. Études phytochimiques antérieures de l'espèce <i>Bryonia dioïca</i> Jacq. -----	9
3.4. Intérêt de l'espèce <i>Bryonia dioïca</i> Jacq.-----	9
4. Conclusion -----	11
Références bibliographiques -----	12

Chapitre II: Méthodologies adoptées pour l'extraction des plantes

1. Introduction -----	15
2. Diversité chimique et biosynthèse de quelques métabolites -----	15
2.1. Composition chimique et biosynthèse des huiles essentielles-----	15
2.1.1. Les monoterpènes.....	16
2.1.2. Les sesquiterpènes.....	17
2.1.3. Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles.....	17
2.2. Composition chimique et biosynthèse des acides gras-----	18
2.2.1. Les acides gras saturés	18
2.2.2. Les acides gras insaturés	18
2.2.3. Biosynthèse des acides gras	19
3. Intérêt de recherche de ces métabolites -----	20
3.1. Les huiles essentielles -----	20
3.2. Les acides gras -----	20
4. Etapes préliminaires adoptées en phytochimie-----	21
4.2. L'étape de séchage -----	21
4.3. L'étape de conservation -----	22
5. Techniques d'extraction en phytochimie-----	22
5.1. Procédé d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau et hydrodistillation-----	22
5.2. Procédé d'extraction par Soxhlet -----	23
5.3. Prétraitement d'une fraction lipidique -----	24
6. Méthodologies d'analyse d'un mélange complexe-----	25
7. Techniques analytiques-----	26

7.1. Techniques chromatographiques-----	26
7.1.1. Chromatographie en phase gazeuse.....	26
7.1.1.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	26
7.1.1.2. Identification des constituants d'un mélange	29
7.1.2. Chromatographie en phase liquide	30
7.1.2.1. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse	30
7.1.2.2. Chromatographie d'extraction en phase solide (SPE).....	32
7.1.2.3. Identification des constituants d'un mélange	33
7.2. Techniques spectroscopiques-----	33
7.2.1. Spectroscopie infrarouge	33
7.2.1.1. Principe de la spectroscopie infrarouge.....	33
7.2.1.2. Principe de la technique ATR (Réflexion Totale Atténuée).....	34
7.2.1.3. Interprétation d'un spectre infrarouge.....	35
7.2.2. Spectroscopie UV-Visible	35
7.2.2.1. Principe de la spectroscopie UV-Visible.....	35
7.2.2.2. Loi de Beer-Lambert	36
7.2.2.3. Les facteurs influençant la réponse d'un spectrophotomètre UV-Visible.....	37
7.2.2.4. Qualification d'un spectrophotomètre UV-visible	37
7.2.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	38
7.2.3.1. Principe d'une expérience RMN	38
7.2.3.2. Exemple d'expériences RMN-2D	40
8. Conclusion -----	40
Références bibliographiques -----	41

Chapitre III : Méthodologie des plans d'expériences pour l'estimation de l'activité antioxydante

1. Introduction -----	44
2. Méthodologie des plans d'expériences-----	44
2.1. Définitions et terminologies des plans d'expériences-----	44
2.2. Démarche méthodologique du plan d'expériences -----	45
2.2.1. Démarche de la planification expérimentale	45
2.2.2. Digramme Ishikawa.....	46
2.2.3. Processus d'acquisition de connaissance.....	47
2.3. Plan de criblage -----	47
2.3.1. Construction du plan Plackett – Burman	48
2.3.2. Interprétation des résultats	48
3. Activité antioxydante par la méthode du radical DPPH-----	49
3.1. Principe de la méthode du DPPH-----	50
3.2. Paramètres de mesures de l'activité antioxydante -----	50
3.2.1. Approche de l'EC ₅₀	50
3.2.2. Approche cinétique.....	53
3.3. Facteurs influençant la stabilité du radical DPPH -----	54
3.3.1. Stabilité du radical DPPH.....	54
3.3.2. Cinétique de la décomposition du radical DPPH.....	54

3.4. Facteur influençant l'activité antioxydante -----	55
3.4.1. Temps d'incubation	55
3.4.2. Effet de solvant	56
3.4.3. Effet du pH.....	57
3.4.4. Effet de la structure	58
3.5. Mécanismes réactionnels-----	59
3.5.1. Mécanisme de type HAT -----	59
3.5.2. Mécanisme de type SPLET	60
3.5.3. Mécanisme de type PCET	60
3.5.4. Exemple d'étude : phénol / DPPH	60
4. Conclusion -----	61
Références bibliographiques -----	62

Chapitre IV : Présentation des divers protocoles expérimentaux

1. Introduction -----	67
2. Protocole expérimental d'analyse de l'huile essentielle-----	67
2.1. Matériel végétal -----	67
2.2. Processus d'extraction d'huile essentielle-----	67
2.3. Fractionnement de l'huile essentielle et réaction d'acylation -----	68
2.4. Méthodes d'analyses chimiques et biologique -----	68
2.4.1. Analyses GC-FID	68
2.4.2. Analyses GC-MS	69
2.4.3. Spectroscopie RMN.....	69
2.4.4. Évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion de disque.....	70
3. Protocole expérimental d'analyse des acides gras -----	70
3.1. Préparations des fractions lipidiques et des esters méthyliques des acides gras -----	70
3.1.1. Préparation des fractions lipidiques.....	70
3.1.2. Préparation des esters méthyliques des acides gras.....	70
3.2. Méthodes d'analyses chimiques et biologiques -----	71
3.2.1. Analyses GC-FID	71
3.2.2. Analyses GC-MS	71
3.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne -----	71
3.3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	72
3.3.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	73
4. Protocole expérimental d'isolement d'une molécule notée X3 -----	73
4.1. Préparation d'extrait végétal-----	73
4.1.1. Conditions opératoires de la chromatographie d'extraction en phase solide	74
4.1.2. Conditions opératoires de la chromatographie liquide.....	74
4.2. Conditions opératoires des techniques d'identification structurale-----	74
4.2.1. Spectroscopie IR	74
4.2.2. Spectrométrie de masse ESI-QTOF	75
4.2.3. Spectroscopie RMN.....	75

5. Condition opératoire du plan de criblage et de l'activité antioxydante -----	75
5.1. Condition opératoire du criblage préliminaire-----	75
5.2. Analyse par UV-Visible-----	75
5.3. Activité antioxydante -----	76
6. Conclusion -----	76
Références bibliographiques -----	77

Chapitre V: Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles et des acides gras

1. Introduction -----	78
2. La composition chimique de l'huile essentielle des racines d' <i>A. longa</i> -----	78
3. La composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes d' <i>A. longa</i> -----	83
3.1. Identification des composés X1 et X2 par RMN et spectrométrie de masse -----	86
3.1.1. Étude des spectres de masse de X1 et X2	86
3.1.2. Étude par spectroscopie RMN de X2 (C ₁₂ H ₁₈ O ₂)	87
3.1.3. Étude par spectroscopie RMN de X1 (C ₁₀ H ₁₆ O)	93
3.1.4. Étude comparative des données de spectroscopie RMN du α -pinène et du 8-acetoxy-pin-2-ène.....	99
3. Activité antimicrobienne d'huiles essentielles d' <i>A. longa</i> -----	100
4. Composition chimique en acides gras des racines et des parties aériennes d' <i>A. longa</i> et du <i>B. dioica</i> -----	103
5. Activité antimicrobienne des fractions lipidiques d' <i>A. longa</i> et de <i>B. dioica</i> -----	105
6. Conclusion -----	108
Références bibliographiques -----	109

Chapitre VI: Identification structurale d'une molécule de la fraction acétate d'éthyle d'*A. longa*

1. Introduction -----	113
2. Profil chromatographique et formule brute du composé X3 -----	113
3. Interprétation du spectre UV-Visible-----	114
4. Interprétation du spectre infrarouge -----	114
5. Interprétation des spectres RMN -----	115
5.1. Interprétation de spectre RMN- ¹ H-----	115
5.2. Interprétation de spectre RMN- ¹³ C et DEPT-135-----	117
5.3. Interprétation de cartes RMN-2 HSQC et HMBC ¹ H/ ¹³ C -----	119
5.4. Interprétation de cartes RMN-2D en mode COSY H-H et NOESY du composé X3 -----	121
6. Structure proposée-----	123
7. Conclusion -----	124

Chapitre VII: Application du plan de criblage et estimation de l'activité antioxydante de quelques extraits

1. Introduction -----	125
2. Formulation du problème et définition de l'objectif de l'étude -----	125
2.1. Formulation du problème de l'étude -----	125
2.2. Définition de l'objectif de l'étude -----	125
3. Plan de criblage -----	125
3.1. Expériences préliminaires -----	125
3.2. Choix des facteurs et du domaine expérimental -----	127
3.3. Construction de la matrice et plan d'expérimentations -----	128
4. Analyse et interprétation des résultats -----	129
4.1. Résultats -----	129
4.2. Effets moyens et méthodes de Lenth -----	130
4.3. Diagramme de Pareto -----	132
4.4. Analyse statistique -----	133
4.5. Modèle mathématique -----	135
4.6. Récapitulation -----	136
5. Activité antioxydante -----	137
6. Conclusion -----	142
Références bibliographiques -----	143
Conclusion générale -----	144

Introduction générale

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales (PAM) est associée à l'évolution des civilisations. En effet, la phytothérapie est rapportée dans les littératures antiques arabe, chinoise, égyptienne, hindoue, grecque et romaine. Le pouvoir thérapeutique des plantes a été transmis de nos ancêtres à nos parents de façon empirique sans avoir eu d'idées sur la composition chimique d'un tel remède. Ainsi, dans le continent africain, plus de 80% de la population a recours à la médecine traditionnelle et aux plantes médicinales pour ses soins. En Afrique, cet art de guérir exploite des savoirs transmis de génération en génération par les *tradipraticiens* et les *herboristes*. En effet, les plantes médicinales ainsi que les connaissances relatives de ces plantes constituent un riche patrimoine du continent.

En Tunisie, les plantes aromatiques et médicinales cachent encore leurs secrets. Pour apporter une justification scientifique à la phytothérapie traditionnelle et pour parvenir à des connaissances approfondies en composition chimique et pouvoir thérapeutique, plusieurs investigations phytochimiques et criblages chimiques bio guidés devraient être faits. La flore des PAM tunisiennes s'élève à 2160 espèces vasculaires, ce qui fait de la Tunisie « *un véritable réservoir phytogénétique* »¹. À cet effet, il préconise de mettre en place les technologies qui assurent le développement du secteur et assurer l'essor de la filière. C'est dans ce sens, un plan d'action s'étalant sur la période 2014-2018 a été présenté, il est axé sur :

- l'amélioration des connaissances spécifiques des PAM ;
- le développement de la production des PAM et l'organisation du secteur ;
- la biodiversité et la durabilité du secteur PAM.

Le monde végétal renferme une source importante de molécules biologiquement actives et l'industrie pharmaceutique s'inspire de ces modèles dans ses conceptions. Ainsi, les recherches scientifiques menées dans ce domaine déploient d'énormes efforts pour l'élaboration de nouvelles molécules à fortes potentialités thérapeutiques et économiques. En effet, le marché mondial des PMA, en expansion rapide, est estimé actuellement à 64 milliards de dollars par an environ².

¹ <http://www.webmanagercenter.com/actualite/economie/2013/06/24/136608/tunisie-la-filiere-des-plantes-aromatiques-et-medicinales-est-porteuse-selon-une-etude>

² <http://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/16517/126294/file/4.1%20-%20Marché%20des%20PAM.pdf>

L'un des objectifs de la phytothérapie est de découvrir de nouvelles substances au travers des utilisations traditionnelles et proposer des alternatives aux médicaments et traitements conventionnels par l'usage des plantes médicinales locales. Sachant que les plantes médicinales demeurent l'alternative de soin unique pour une grande partie de la population mondiale qui n'a toujours pas accès à la médecine moderne.

C'est dans ce contexte que le présent travail se situe. En effet, cette étude constitue une contribution à l'étude phytochimique de quelques espèces végétales de la flore tunisienne utilisées en médecine traditionnelle, et ce dans le but d'améliorer nos connaissances sur leurs compositions chimiques ainsi que leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes.

Ce sujet de thèse a été inclus dans le projet PHC-Utique, géré par le CMCU, intitulé « *Voies de valorisation des extraits bioactifs d'origine naturelle à travers l'identification des candidats médicament et actifs en cosmétiques* ». L'ensemble des travaux a été réalisé dans le laboratoire de substances naturelles à l'INRAP et au sein du laboratoire d'agroalimentaire et produits naturels à l'Institut des Sciences Analytiques (Lyon), dans le cadre d'une thèse en cotutelle entre l'Université de Tunis El Manar et l'Université de Claude Bernard Lyon 1.

Dans le premier chapitre, nous présentons les propriétés botaniques, un aperçu sur les études phytochimiques antérieures ainsi que les intérêts biologiques des deux espèces à étudier qui sont *Aristolochia longa* L. et *Bryonia dioïca* Jacq.

Dans le second chapitre, nous nous intéressons à l'élaboration d'une méthodologie générale en chimie extractive des plantes. Pour cela, nous décrivons tout d'abord la composition chimique des huiles essentielles et des acides gras ainsi que leurs voies de biosynthèses et leurs intérêts de recherche. Ensuite, nous présentons les voies analytiques possibles pour mettre en évidence la composition chimique d'un tel extrait de plantes. Ainsi, on distingue généralement deux voies analytiques : une première voie pour l'analyse des extraits complexes basée sur le couplage « en ligne » souvent par une technique de séparation (GC-MS, HPLC-MS, ...) une deuxième voie pour l'analyse des composés préalablement purifiés (RMN, IR,...).

Dans le troisième chapitre, nous exposons la terminologie des plans d'expériences en focalisant les idées sur le plan du criblage Plackett-Burman ainsi que les différentes approches pour l'estimation de l'activité antioxydante de quelques extraits par la méthode du radical DPPH.

Le choix des techniques et des méthodes d'extraction, d'analyse chimique (GC-MS, GC-FID, RMN...) et biologique (activité antimicrobienne par la méthode de diffusion de disque

et de microdilution, activité antioxydante par la méthode du radical DPPH [(2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)] fait l'objet de la mise au point des divers protocoles expérimentaux du chapitre quatre.

Les résultats et leurs discussions sont répartis en trois chapitres : le cinquième chapitre est consacré à la détermination du profil chimique des huiles essentielles obtenues des racines et des parties aériennes d'*A. longa* et des acides gras de *B. dioïca* et d'*A. longa* ainsi que leurs activités antimicrobiennes.

Le travail présenté dans le sixième chapitre résume l'étude structurale d'un composé isolé d'une fraction d'acétate d'éthyle issue du décocté après hydrodistillation des parties aériennes d'*A. longa*.

Le septième chapitre est consacré à l'estimation de l'activité antioxydante de quelques extraits par la méthode du radical DPPH dans les conditions optimales de sa stabilité dégagées du plan de criblage de type Plackett-Burman.

Enfin, nous terminons par une conclusion générale qui dégage les principaux résultats obtenus dans ce travail de thèse.

Chapitre I : Présentation des espèces à étudier

1. Introduction

La Tunisie dispose d'une flore spontanée, riche et diversifiée. Cette flore constitue une source importante de molécules diverses qui ont suscité un intérêt particulier pour leurs valorisations dans différents secteurs économiques. Dans cette optique, les études phytochimiques sont souvent orientées vers les plantes médicinales et aromatiques non toxiques et à usage condimentaire (romarin, thym, myrte, marjolaine, menthe poivrée, géranium...). Malgré que les plantes médicinales et aromatiques toxiques soient très peu documentées en tant qu'une excellente source thérapeutique, la phytothérapie traditionnelle tunisienne de ce type de plantes nous cache encore plusieurs secrets qui peuvent apporter d'excellents résultats. Dans ce travail, nous nous sommes orientés vers l'étude de deux espèces médicinale et toxique, en l'occurrence *Aristolochia longa* L. et *Bryonia dioïca* Jacq..

2. Présentation de la famille des aristolochiacées et d'*Aristolochia longa* L.

2.1. Présentation de la famille des aristolochiacées

La famille des aristolochiacées est une famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 500 espèces, réparties en 7 genres : *Aristolochia*, *Asarum*, *Apama*, *Holostylis*, *Saruma*, *Thottea* et *Euglypha*. Elle est distribuée en Asie, Afrique, nord et sud d'Amérique^{1,2}.

Les espèces du genre *Aristolochia* sont productrices de composés aromatiques³, des flavonoïdes^{4,5,6,7}, des alcaloïdes^{8,9}, des acides aristolochiques et leurs sels de sodium¹⁰. Diverses espèces du genre *Aristolochia* sont connues par leurs vertus thérapeutiques: anti-inflammatoire, analgésique, anticancéreuse et les maladies infectieuses¹¹. En dépit de leurs multiples vertus, les aristolochiacées contiennent une substance fortement toxique : l'acide aristolochique, qui induit des néphrotoxicités¹¹, entraînant l'interdiction de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) l'utilisation de tout remède naturel contenant cet acide¹².

2.2. Caractères botaniques et position taxonomique d'*Aristolochia longa* L.

Aristolochia longa L. (*A. longa*) relève du genre *Aristolochia*. En Tunisie, elle est représentée par la sous-espèce *Aristolochia longa* subsp. *Paucinervis*, qui est très peu distribuée dans le nord-ouest de la Tunisie (**Figure I. 1**).



Figure I. 1 : Différents organes de l'espèce *A. longa*.

C'est une plante vivace, non grimpante à tubercule cylindrique vertical portant des racines fines, tiges non volubiles, feuilles alternées à pétiole atteignant 5 à 10 mm de long,

cordé à la base, nervation palmée et à marges lisses. Les fleurs sont longues de 3 à 6 cm, solitaires axillaires, hermaphrodites, zygomorphes, périanthe simple, gamosépale, renflées à la base en utricule, de couleur jaune verdâtre, plus ou moins lavé ou strié de brun, parfois brun pourpre ou brun rouge au niveau de la gorge, prolongé par un tube poilu intérieurement et terminé en languette unilatérale, à marge non bilabée, tube droit ou peu courbé. Elle contient 6 étamines soudées avec le style en gynostème terminé par 3 à 6 lobes stigmatifères. Les graines sont planes albuminées et triangulaires¹³. La classification botanique d'*A. longa* est résumée dans le **Tableau I. 1**.

Tableau I. 1 : Classification botanique d'*A. longa*.

<i>Règne</i>	Végétal
<i>Famille</i>	Aristolochiacées
<i>Embranchement</i>	Phanérogames
<i>Sous embranchement</i>	Angiospermes
<i>Classe</i>	Dicotylédone
<i>Sous classe</i>	Archichlamydées
<i>Genre</i>	<i>Aristolochia</i>
<i>Espèce</i>	<i>Aristolochia longa</i>
<i>Sous-espèces</i>	<i>Aristolochia</i> Paucinervis

2.3. Études phytochimiques antérieures d'*Aristolochia longa* L.

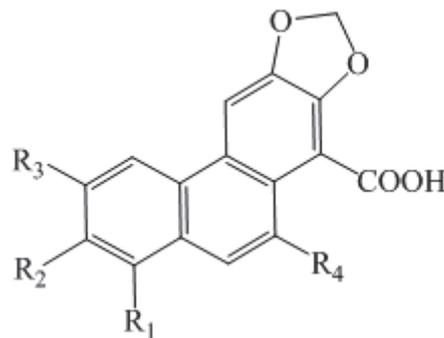
A. longa est très peu décrite dans la littérature. Les études phytochimiques précédentes de De Pascual Teresa et al.,^{14,15,16} se sont focalisées sur l'extraction d'huile essentielle des parties aériennes et souterraines, la composition en acides gras et l'étude structurale de l'acide aristolochique et ses dérivées (**Figure I. 2**). Le criblage phytochimique préliminaire de l'extrait aqueux des racines d'*A. Longa*¹⁷ a montré la présence des poly phénols et de flavonoïdes essentiellement.

2.4. Intérêts de l'espèce *Aristolochia longa* L.

A. Longa a souvent été utilisée en médecine traditionnelle dans la région du Maghreb. Au Maroc, les racines séchées d'*A. Longa* ont été utilisées pour le traitement des maladies cutanées,

des affections intestinales, de la constipation, des blessures et comme antidote contre certaines morsures de serpents¹⁸. En Tunisie, les habitants de la région du nord-ouest de la Tunisie l'utilisent avec précaution pour le traitement de la jaunisse.

Récemment, une étude ethnobotanique réalisée par des chercheurs algériens^{18, 19a} a montré que cette plante est un bon candidat médicamenteux pour le traitement du cancer. Elle a montré aussi que l'extrait aqueux est un excellent antifongique contre *Saccharomyces cerevisiae*. Un groupe de chercheurs marocains^{20, 21} a prouvé que la fraction chloroformique obtenue des racines inhibe la croissance de *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis*. Ils ont montré, également, que l'extrait au méthanol et celui à l'hexane exercent une activité « anti-*Helicobacter pylori* ».



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(1) Acide aristolochique C	H	H	OH	NO ₂
(2) 7-Hydroxy-acide aristolochique C	OCH ₃	OH	H	NO ₂
(3) Acide aristolochique D	OCH ₃	H	OH	NO ₂
(4) Acide aristolochique B	H	H	H	NO ₂
(5) Acide aristolochique A	OCH ₃	H	H	NO ₂
(6) Acide aristolochique	OCH ₃	H	H	H

Figure I. 2 : Structures communes de l'acide aristolochique et ses dérivés dans le genre *Aristolochia*⁸.

3. Présentation de la famille des cucurbitacées et de *Bryonia dioïca* Jacq.

3.1. Présentation de la famille des cucurbitacées

La famille des cucurbitacées est une famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 800 espèces réparties en 120 genres²².

Elle est largement répartie dans les régions tropicales et subtropicales. Plusieurs espèces de la famille cucurbitacée constituent une source importante pour l'alimentation humaine. Mais un nombre non négligeable d'espèces de cucurbitacées est à l'origine d'intoxication, tel que *Bryonia dioica* Jacq. (*B. dioica*). La toxicité de ces plantes est liée à des terpènes tétra cycliques et les cucurbitacines²³.

3.2. Caractères botaniques et position taxonomique de *Bryonia dioica* Jacq.

B. dioica est une plante vivace par sa racine charnue et volumineuse (**Figure I. 3**). Les tiges portent des feuilles palmatilobées. Elles sont grimpantes grâce à des vrilles opposées aux feuilles. Les fleurs verdâtres, dioïques, veinées, sont réunies en fascicules axillaires, les mâles plus longuement pédonculés sont plus grands. Le fruit est une petite baie globuleuse, lisse, rouge à la maturité, contenant 4 à 6 graines elliptiques. L'ensemble de la plante est hérissé de petits poils renflés à la base²⁴. Le **Tableau I. 2** résume la classification botanique de l'espèce à étudier.



Figure I. 3 : Différents organes de l'espèce *B. dioica*.

Tableau I. 2 : Classification botanique de *B. dioïca*.

<i>Règne</i>	Végétal
<i>Famille</i>	Cucurbitacée
<i>Sous embranchement</i>	Angiospermes
<i>Classe</i>	Magnoliopsida
<i>Sous classe</i>	Dilenidae
<i>Genre</i>	Bryonia
<i>Espèce</i>	<i>Bryonia dioïca</i>

3.3. Études phytochimiques antérieures de l'espèce *Bryonia dioïca* Jacq.

Les racines de *B. dioïca* renferment des composés tri et tétra-terpènes cycliques oxygénés²⁵ appelés cucurbitacines (**Figure I.4**). On y trouve aussi les triterpènes glycosidiques^{26,27,28} tels que les bryonosides A-G, cabenoside D, bryoamaride, dans l'extrait au méthanol des racines de *B. dioïca*. Les racines contiennent, également, des lipides, une glycoprotéine appelée bryodine²⁹, d'acide bryonolique³⁰, de phytostérols^{31,32} de bryonine et de la bryonicine qui sont respectivement une saponine et un alcaloïde amorphe et amer³³. Les parties aériennes de *B. dioïca* contiennent également des flavones C-glycosides^{34,35} tels que la vitexine, l'isovetexine, l'isoorientin, le saponarine, l'utonarin (**Figure I. 5**). De plus, la bryodifine³⁶ est une protéine toxique qui a été découverte dans les fruits du *B. dioïca*. En effet une injection intra péritonéale de 0,4 mg chez une souris BALB/c la tue en 18 min.

3.4. Intérêt de l'espèce *Bryonia dioïca* Jacq.

Toutes les parties de la plante sont toxiques, mais leurs compositions ne sont pas bien décrites mises à part celle des racines. En dépit de cette toxicité, des études pharmacologiques montrent que les triterpènes glycosidiques de la racine possèdent une propriété anti-inflammatoire²⁶, la bryodine présente une activité anti-VIH³⁷. Plusieurs activités biologiques ont été rapportées pour d'acide bryonolique (**Figure I. 6**), y compris les propriétés antiallergiques et anti-tumorales dans diverses lignées cellulaires de cancer³⁰.

En médecine traditionnelle tunisienne, l'utilisation de la formulation habituelle de *B. dioïca* demande à être maniée avec prudence. Le décocté des racines est utilisé comme purgative et

diurétique. Nos ancêtres précisent qu'à faible dose, la racine agit comme un purgatif drastique et dangereux mais à dose homéopathique, elle est utilisée contre les infections pulmonaires aiguës et les rhumatismes. Le suc frais est utilisé pour déterger les plaies contre la gale et la lèpre³⁸.

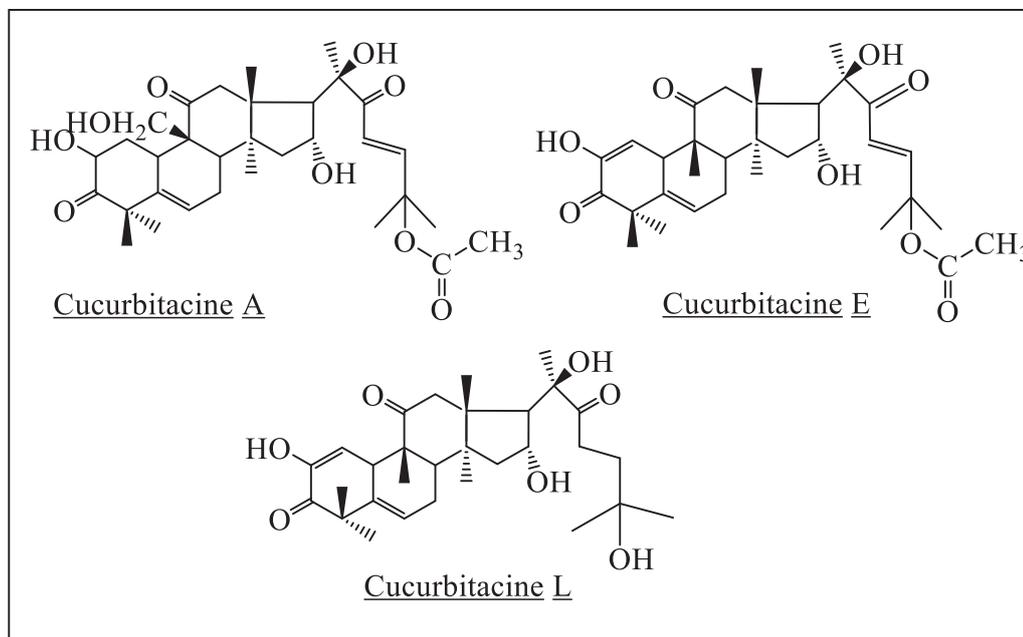


Figure I. 4 : Exemples de structures des cucurbitacines³⁰.

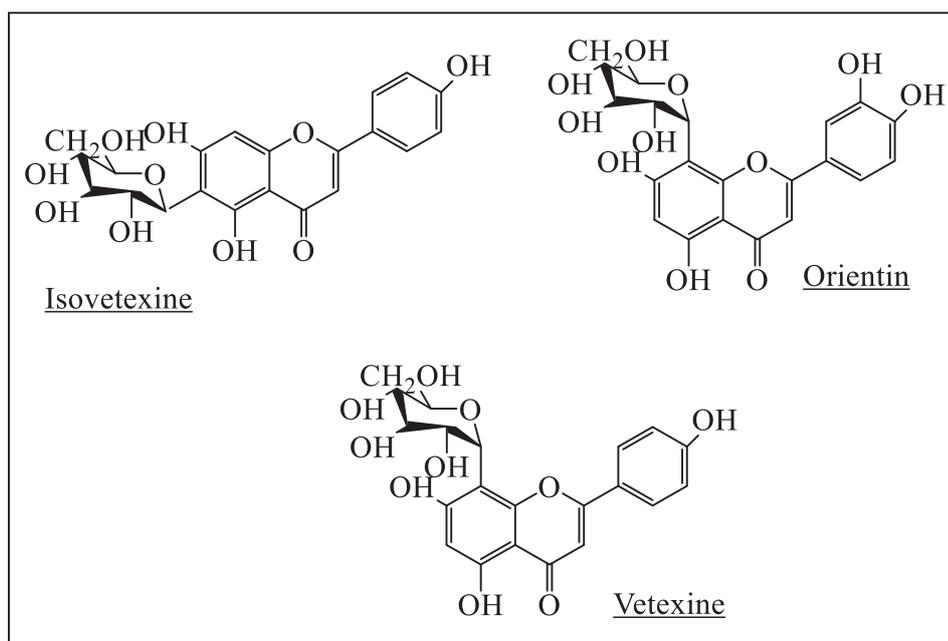


Figure I. 5 : Exemples de structures des flavones C-glycosides^{34,35}.

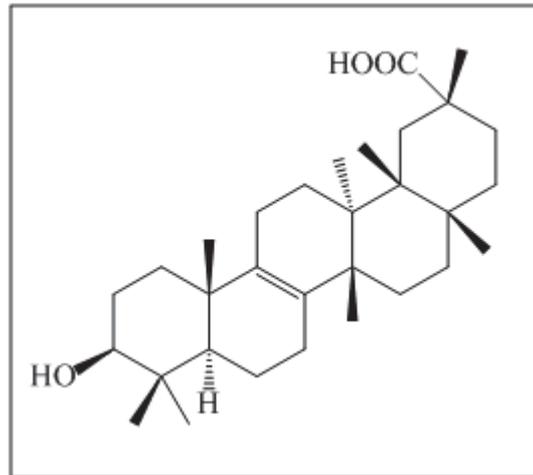


Figure I. 6 : Structure de l'acide bryonique³⁵.

4. Conclusion

La phytothérapie traditionnelle tunisienne utilise *A. longa* et *B. dioica*, parmi d'autres, en dose homéopathique pour diverses vertus thérapeutiques. L'essor dans cette filière n'est possible que grâce aux travaux phytochimiques, toxicologiques, pharmacologiques et cliniques.

Références bibliographiques

- [1] Polevova, S.V., 2015. Ultrastructure and development of sporoderm in *Aristolochia clematitis* (Aristolochiaceae). *Rev. Palaeobot Palyno.* **222**, 104-115.
- [2] Tian-Shung, W., Amooru G, D., Chung-Ren, S., Ping-Chung, K., 2005. Chemical constituents and pharmacology of *Aristolochia* species. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **32**, 855-1018.
- [3] Francisco, C.S., Messiano, G.B., Lopes, L.M.X., Tininis, A.G., De Oliveira, J.E., Capellari, Jr.L., 2008. Classification of *Aristolochia* species based on GC-MS and chemometric analyses of essential oils. *Phytochemistry* **69**, 168-175.
- [4] Carneiro, F.J.C., Boralle, N., Silva, D.H.S., Lopes, L.M.X., 2000. Bi and tetraflavo-noids from *Aristolochia ridicula*. *Phytochemistry* **55**, 823-832.
- [5] Machado, M.B., Lopes, L.M.X., 2005. Chalcone-flavone tetramer and biflavones from *Aristolochia ridicula*. *Phytochemistry* **66**, 669-674.
- [6] Iwashina, T., Marubashi, W., Suzuki, T., 2002. Chalcones and flavonols from the Chinese species, *Saruma henryi* (Aristolochiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **30**, 1101-1103.
- [7] Iwashina, T., Kitajima, J., Shiuchi, T., Itou, Y., 2005. Chalcones and other flavonoids from *Asarum sensu lato* (Aristolochiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **33**, 571-584.
- [8] Ferreira, M.L.R., de Pascoli, I.C., Nascimento, I.R., Zukerman-Schpector, J., Lopes, L.M.X., 2010. Aporphine and bisaporphine alkaloids from *Aristolochia lagesiana* var. *intermedia*. *Phytochemistry* **71**, 469-478.
- [9] Francisco, M.C., Nasser, A.L.M., Lopes, L.M.X., 2003. Tetrahydroisoquinoline alkaloids and 2-deoxyribonolactones from *Aristolochia arcuata*. *Phytochemistry* **62**, 1265-1270.
- [10] Houghton, P.J., Ogutveren, M., 1991. Aristolochic acids and aristolactams from *Aristolochia auricularia*. *Phytochemistry* **30**, 253-254.
- [11] Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., Simmonds, M. S. J., 2009. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2- A global assessment based on bibliographic sources. *J. Ethnopharmacol.* **125**, 108-144.
- [12] Jian Qing Y. Zhi Xiong Liao, Xiao Qiang Cai, Jia Chuan Lei, Guo Lin Zou., 2007. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. *Environ. Toxicol. Phar.* **23**, 162- 167.
- [13] Pottier-Alapetite, G. 1979-1981. Flore de la Tunisie : Angiospermes Dicotylédones: apétales-dialypétales-gamopétales. Première et deuxième partie. Ouvrage publié par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture, Tunisie.
- [14] De Pascual Teresa, J., Urones, J.G., Fernandez, A., 1983 a. An aristolochic acid derivative from *Aristolochia longa*. *Phytochemistry* **22**, 2745-2747.

- [15] De Pascual Teresa, J., Urones, J.G., Fernandez, A., 1983 b. Monoterpene derivatives from the essential oil of *Aristolochia longa*. *Phytochemistry* **22**, 2753-2754.
- [16] De Pascual Teresa, J., Urones, J.G., Fernandez, A., Alvarez, M.D.V., 1984. Lipid components of *Aristolochia longa*. *Phytochemistry* **23**, 461-462.
- [17] Benarba, B., Meddah, B., 2014. Ethnobotanical study, antifungal activity, phytochemical screening and total phenolic content of Algerian *Aristolochia longa*. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* **3**, 150-154.
- [18] Bellakhdar J., 1997. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Edition Le Fennec, Ibis Press.
- [19] Benarba, B., Meddah, B., Tir Touil, A., 2014. Response of bone resorption markers to *Aristolochia longa* intake by Algerian breast cancer postmenopausal women. *Adv. Pharmacol. Sci.* **30**, 1-4.
- [20] Gadhi, C. A., Benharref, A., Jana, M., Lozniewski, A., 2001. Anti-helicobacter pylori activity of *Aristolochia paucinervis pomel* extracts. *J. Ethnopharmacol.* **75**, 203-205.
- [21] Gadhi, C. A., Weber, M., Mory, F., Benharref, A., Lion, C., Jana, M., Lozniewski, A., 1999. Antibacterial activity of *Aristolochia paucinervis pomel*. *J. Ethnopharmacol.* **67**, 87-92.
- [22] Yasir, M., Sultana, B., Nigam, P.S., Owusu-Apenten, R., 2016. Antioxidant and genoprotective activity of selected *cucurbitaceae* seed extracts and LC-ESIMS/MS identification of phenolic components. *Food Chem.* **199**, 307-313.
- [23] Bruneton, J., 2005. Plantes toxiques: végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Paris, Editions TEC & DOC Lavoisier.
- [24] Boukef, M.K., 1986. Médecine traditionnelle et pharmacopée : les plantes dans la médecine traditionnelle Tunisienne. Agence de coopération culturelle et technique, Paris.
- [25] Hylands, P.J., Oskoui, T. M., 1979. 3 α -hydroxy-multiflora-7,9 (1 l)-dien-29a-oic acid, a new triterpene from *Bryonia dioïca*. *Phytochemistry* **18**, 1843-1845.
- [26] Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Toriumi, M., koike, K., Kimura, Y., Nikaido, T., Aoi, W., Nishino, H., Takido, M., 2002. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of cucurbitane glycosides from the roots of *Bryonia dioïca*. *J. Nat. Prod.* **65**, 179-83.
- [27] Hylands, P.J., Kosugi, J., 1982. Bryonoside and bruoside- New triterpene glycosides from *Bryonia dioïca*. *Phytochemistry* **21**, 1379-1384.
- [28] Kayoko, O., Kazuko, Y., Shigenobu, A., 1992. Structural revision of bryonoside and structure elucidation of minor saponins from *Bryonia dioïca*. *Phytochemistry* **31**, 943-946.

- [29] Fiorenzo, S., Luigi, Maria G., Anna, I., Ada, A., Enzo, L., William, A. S., 1986. Bryodin, a ribosome-inactivating protein from the roots of *Bryonia dioica* L. (white bryony). *Biochem. J.* **240**, 659-665.
- [30] Barker, E. C. , Gatbonton-Schwager, T. N. , Han, Y., Clay, J. E., Letterio, J. J., Tochtrop, G. P., 2010. Bryonolic Acid: A Large-Scale Isolation and Evaluation of Heme Oxygenase 1 Expression in Activated Macrophages. *J. Nat. Prod.* **73**, 1064–1068.
- [31] Cattel, L., Balliano, G., Caputo, O., Delprino, L., 1980. Biosynthesis of stigmasta-7,e-24(28)-dien-3p-ol and 24a-alkyl sterols in *Bryonia dioica*. *Phytochemistry* **19**, 465-466.
- [32] Cattel, L., Balliano, G., Caputo, O., 1979. Stigmasta-7,e-24(28)-dien-3fl-ol from *Bryonia dioica* roots. *Phytochemistry* **18**, 861-862.
- [33] Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales, 3ème édition, Paris, Editions TEC & DOC Lavoisier.
- [34] Krauze-Baranowska, M., Cisowski, W., 1994. High-performance liquid chromatographic determination of flavone C-glycosides in some species of the Cucurbitaceae family., *J. Chromatogr. A.* **675**, 240-243.
- [35] Krauze-Baranowska, M., Cisowski, W., 1995. Flavone C-glycosides from *Bryonia alba* and *Bryonia dioica*. *Phytochemistry* **39**, 727-729.
- [36] Munoz, S. M., Salvarelli, S. M., Saiz, M. I., Conde, F. P., 1992. A toxic protein from *Bryonia dioica* Jacq. fruits: the brydiofin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 1011-8.
- [37] Wachinger, M., Samtleben, R., Gerhauser, C., Wagner, H., Erfle, V., 1993. Bryodin, a single-chain ribosome-inactivating protein, selectively inhibits the growth of HIV-1-infected cells and reduces HIV-1 production. *Res. Exp. Med. (Berl)*. **193**, 1-12.
- [38] Le Floch, E., 1983. Contribution à une étude ethnobotanique de la flore Tunisienne, 2ème partie, Imprimerie Officielle de la République Tunisienne.

Chapitre II : Méthodologies adoptées pour l'extraction des plantes

1. Introduction

La nature et sa biodiversité offrent aux chercheurs une multitude de sujets de recherche dans divers secteurs. Cette biodiversité génère une diversité chimique et structurale complexe. Elle inspire le chimiste à isoler, identifier les molécules aux propriétés biologiques et à développer de nouvelles méthodes et techniques analytiques performantes. Avant d'aller à la structure de la molécule et aux tests biologiques, l'assurance qualité des produits finis débute dès le moment de la récolte jusqu'à l'extraction.

2. Diversité chimique et biosynthèse de quelques métabolites

Les plantes médicinales et aromatiques constituent des sources végétales renouvelables des métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires regroupent les molécules nécessaires à la survie des plantes (lipides, protéines, les glucides...). Alors que ceux du métabolisme secondaire renferment un ensemble de molécules de taille et de masse faibles comparées aux molécules du métabolisme primaire (flavonoïdes, alcaloïdes, huile essentielle...). Dans la présente étude, les idées seront focalisées essentiellement sur la composition chimique des huiles essentielles et des acides gras.

2.1. Composition chimique et biosynthèse des huiles essentielles

Une huile essentielle est la fraction odorante volatile extraite de plantes aromatiques et médicinales. L'Association Française de Normalisation (**AFNOR**) définit l'huile essentielle comme un produit obtenu à partir d'une matière première végétale par entraînement à la vapeur d'eau¹.

En outre, les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles (*Lauraceae* ou *Zingiberaceae*), dans des poils sécréteurs (*Lamiaceae*), dans des pochessécrétrices (*Myrtaceae* ou *Rutaceae*) ou dans des canaux sécréteurs (*Apiaceae* ou *Asteraceae*). Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs, les sommités fleuries, les feuilles, les racines, les rhizomes, les fruits, le bois ou les graines^{2,3}.

2.1.1. Les monoterpènes

Les monoterpènes sont des molécules de 10 atomes de carbones dérivant du géranyl diphosphate et qui sont réparties en monoterpènes hydrocarbonés et monoterpènes oxygénés (**Figure II. 1**).

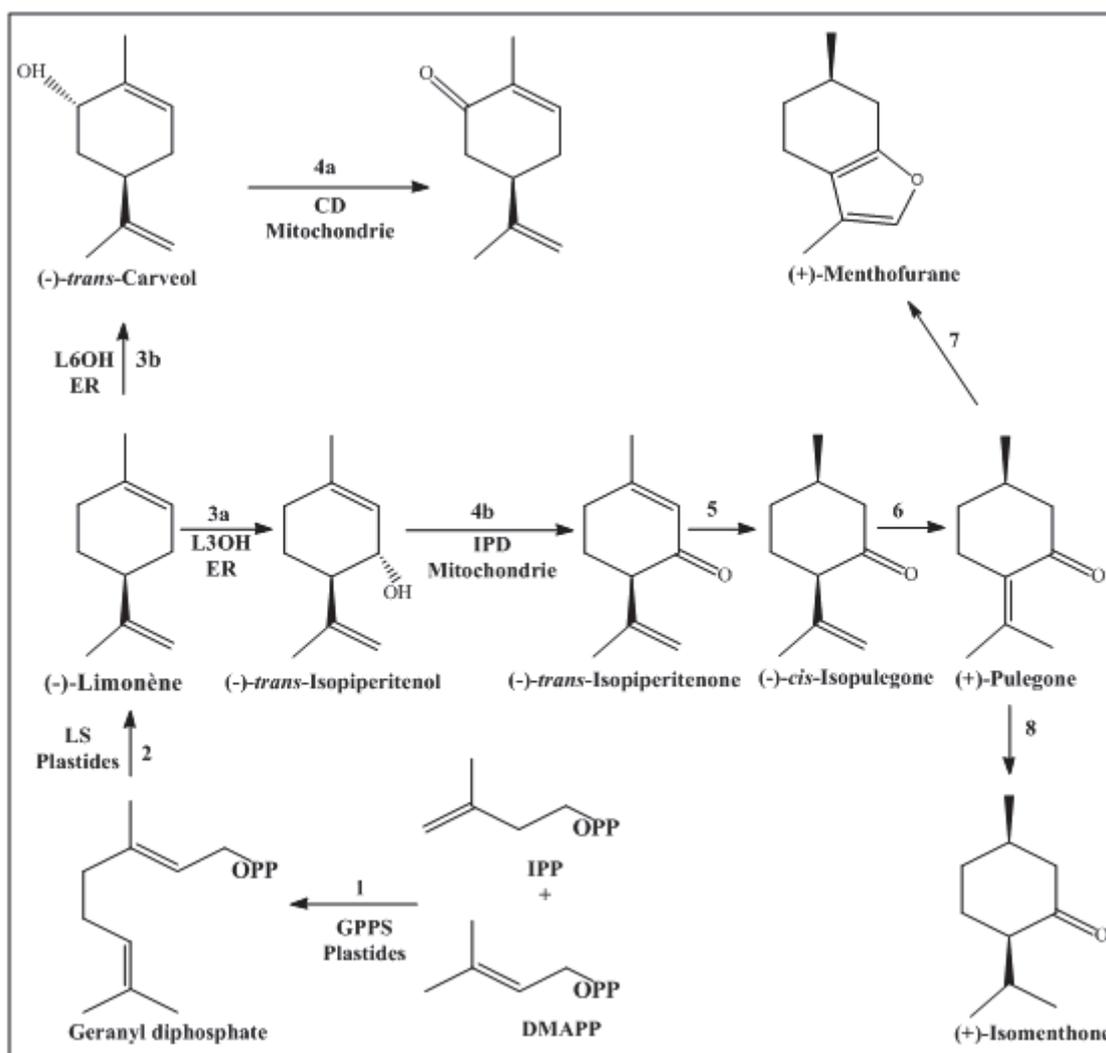


Figure II. 1 : Biosynthèse de monoterpènes à partir du géranyl diphosphate⁴.

Les étapes enzymatiques sont catalysées par : **(1)** : GPPS : géranyl diphosphatase ; **(2)** : LS : (-)-limonène synthase; **(3a)** : L3OH : (-)-limonène-3-hydroxylase; **(3b)** : L6OH : (-)-limonène-6-hydroxylase; **(4a)** : (-)-*trans*-CD; **(4b)** : IPD : (-)-*trans*-isopiperitenol déhydrogénase; **(5)** : (-)-isopiperitenone réductase; **(6)** : (+)-*cis*-isopulegone isomérase; **(7)** : (+)-menthofurane synthase ; **(8)** : (+)-pulegone réductase; IPP : isopentényl diphosphate; DMAPP : diméthylallyl diphosphate.

2.1.2. Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes hydrocarbonés ou oxygénés sont des molécules à 15 atomes de carbones constituées de trois unités isopréniques et dérivant du farnésyl diphosphate (**Figure II. 2**). Certaines molécules comme le farnésol ou le nérolidol ont également des propriétés aromatiques qui rentrent dans la composition des huiles essentielles mais il s'agit essentiellement de phytoalexines, molécules de défense synthétisées par les plantes en réponse à une agression comme une infection par des microorganismes^{4,5,6}.

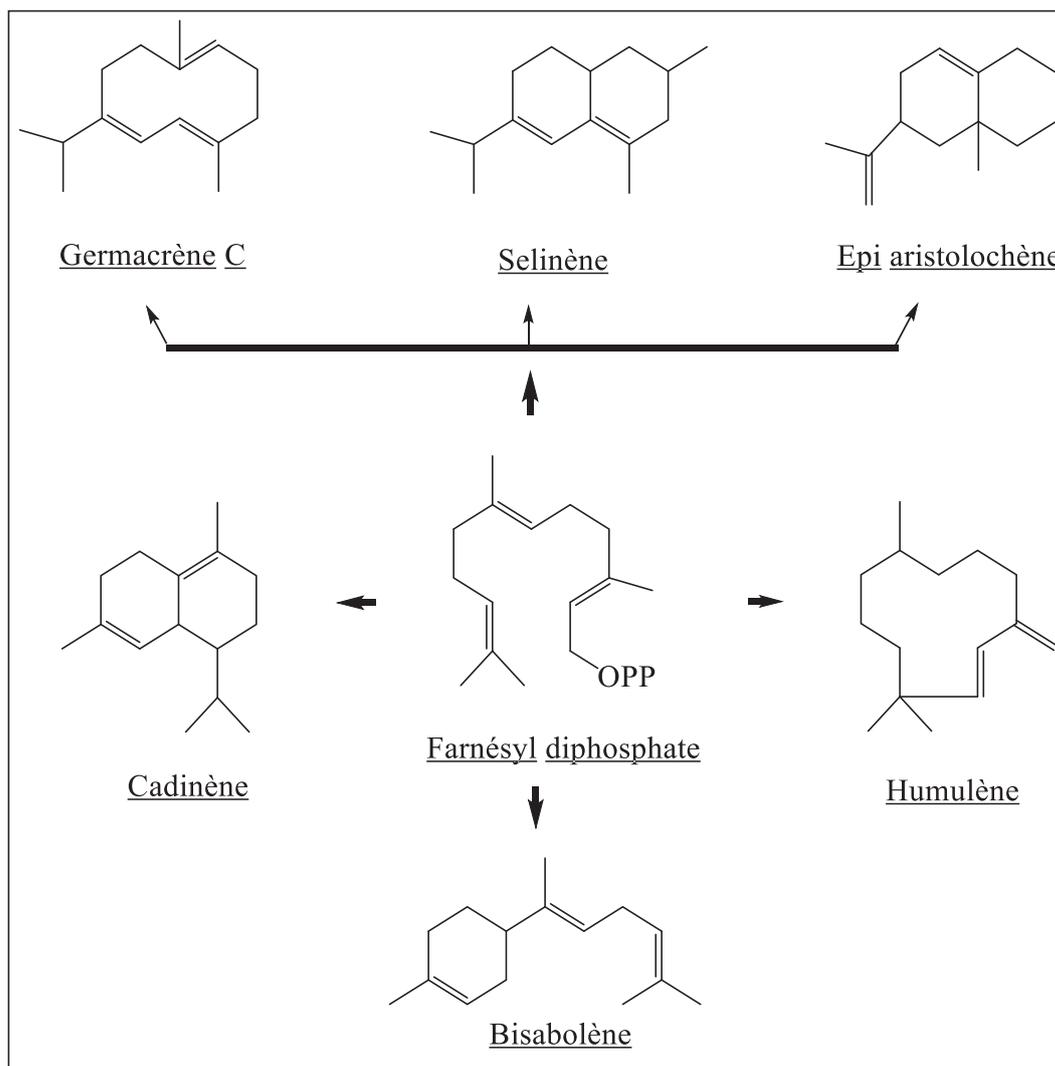


Figure II. 2 : Biosynthèse des sesquiterpènes à partir du farnésyl diphosphate^{5,6,7}.

2.1.3. Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles

La teneur et le profil chimique des huiles essentielles varient en fonction des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les premiers facteurs sont fortement liés à la biosynthèse de la

plante, de son profil génétique et de l'organe. Alors que les seconds sont liés aux conditions climatiques et environnementales : la température, la quantité de la lumière, la pluviométrie, le taux d'humidité et la nature du sol^{8,9,10,11,12,13,14}.

En outre, le procédé d'extraction influe également sur la composition des huiles essentielles¹⁵. En effet, au cours de l'hydrodistillation d'une plante à huile essentielle, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire des réactions chimiques d'altération (hydrolyse, élimination, cyclisation, réarrangement ...) sur les composés terpéniques thermosensibles de l'huile essentielle.

Cette variation chimique génère la notion de chémotype ou race chimique. La race chimique d'une l'huile essentielle est une forme de classification chimique au sein de la même espèce végétale, du même site géographique et indépendamment des changements climatiques, désignant le ou les composés dominants¹⁶.

2.2. Composition chimique et biosynthèse des acides gras

Les lipides végétaux se caractérisent par une grande diversité dans leur nature chimique : les acides gras simples ou homolipides, les lipides complexes ou hétérolipides (sphingolipides, phosphoglycérolipides) et les lipoïdes. Les acides gras font partie des métabolites primaires et qui existent souvent sous forme de triglycérides. Ils se composent d'une chaîne hydrocarbonée, qui confère à la molécule son caractère hydrophobe, comportant à une extrémité un groupement CH_3 et à l'autre extrémité un groupement carboxyle COOH . Ils se définissent par leur nombre de carbone, leur degré d'insaturation et la position de la double liaison¹⁷. Ils sont classés en acides gras saturés et insaturés.

2.2.1. Les acides gras saturés

Les acides gras saturés sont de formule chimique générale $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ tels que l'acide laurique ($\text{C}_{12} : 0$), l'acide myristique ($\text{C}_{14} : 0$), l'acide palmitique ($\text{C}_{16} : 0$) et l'acide stéarique ($\text{C}_{18} : 0$). Les acides gras saturés se trouvent dans les graisses animales mais aussi dans quelques graisses végétales comme l'huile de palme.

2.2.2. Les acides gras insaturés

Un acide gras insaturé (**Figure II. 3**) est un acide gras contenant une ou plusieurs insaturations. Il est mono insaturé s'il contient une seule double liaison et poly insaturé s'il contient deux ou plusieurs doubles liaisons et qui peuvent avoir une configuration *cis* ou *trans*¹⁸. Les acides gras mono insaturés sont de formule chimique générale :

$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_y-\text{COOH}$ tels que l'acide palmitoléique (C16 :1 (9) ou ω -7) et l'acide oléique (C18 :1 (9) ou ω -9). L'acide linoléique (C18 : 2 (9,12) ou séries ω -6) et l'acide linoléique (C18 : 3 (9, 12, 15) ou séries ω -3) sont des acides gras polyinsaturés.

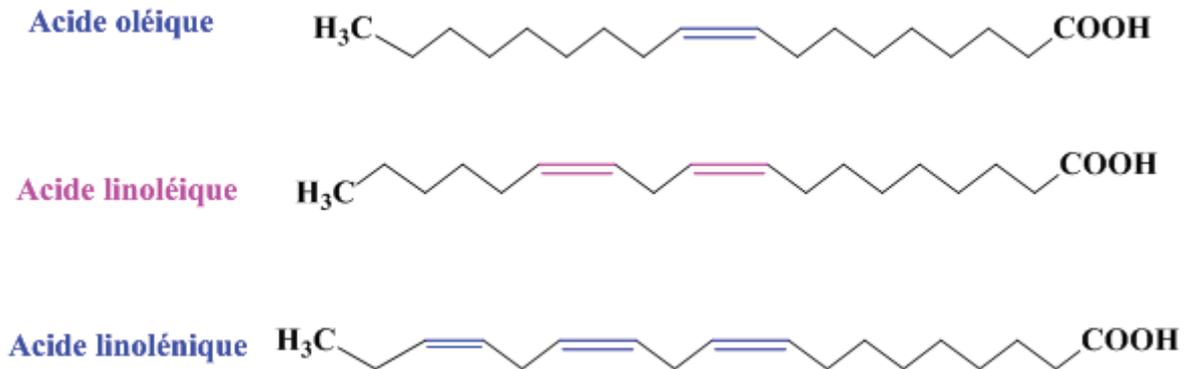


Figure II. 3 : Structure chimique de quelques acides gras insaturés.

2.2.3. Biosynthèse des acides gras

Les acides gras, composants indispensables de tous les lipides, sont synthétisés dans les chloroplastes grâce au complexe protéique appelé « Fatty Acid Synthetase » (FAS) (Figure II. 4).

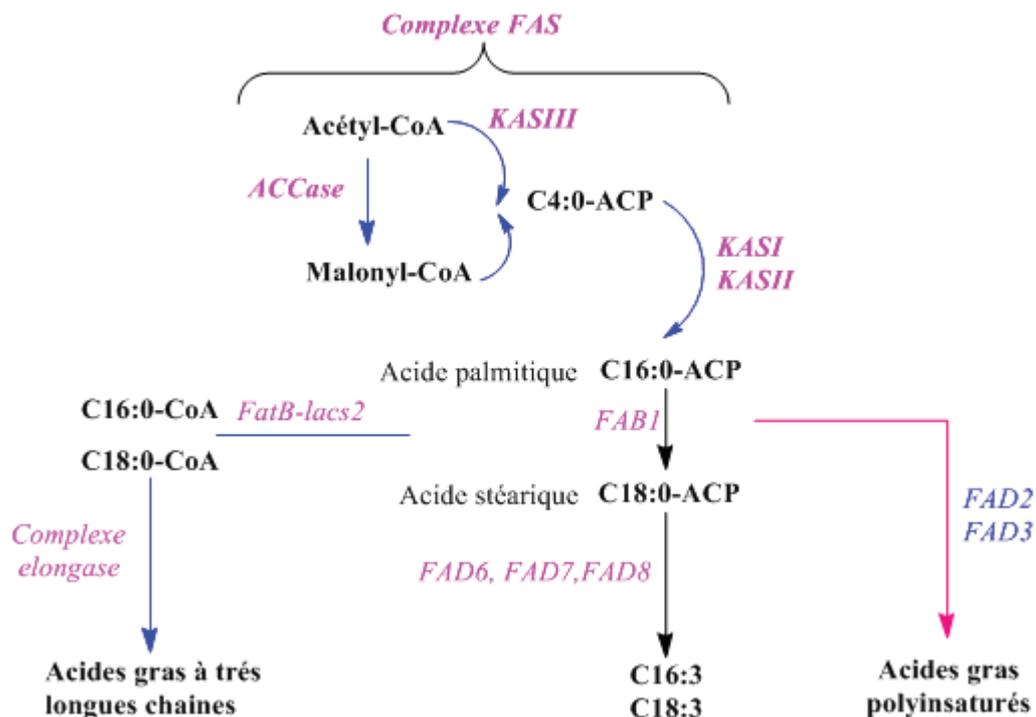


Figure II. 4 : Représentation simplifiée des voies de biosynthèse des acides gras chez les plantes.

Le cycle d'élongation par le complexe **FAS** se fait par des réactions enzymatiques successives. À partir de la formation de l'acide palmitique (C16 : 0), la chaîne carbonée est allongée par adjonction du coenzyme (malonyl-coA) pour donner de l'acide stéarique (C18 :0). Ces deux acides gras saturés peuvent subir des désaturations qui conduisent à la biosynthèse des acides gras polyinsaturés à très longues chaînes. Les différentes transformations enzymatiques se font par : **FAS** : "Fatty Acid Synthetase" ; **KAS** : "keto acyl-ACP synthetase" ; **FAD**: "Fatty acid desaturase" ; **FABI** : "Fatty acid biosynthesis 1"; **ACP** : "Acyl Carrier Protein" ; **Co-A** : Coenzyme A ; **FATB** : "Fatty Acid Thioesterase B".

3. Intérêt de recherche de ces métabolites

Les plantes représentent une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'Homme dans l'industrie des parfums, agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

3.1. Les huiles essentielles

L'association des connaissances traditionnelles des plantes aromatiques avec les études scientifiques actuelles prouve que les huiles essentielles ont de nombreuses activités biologiques : antifongique, antibactérienne, anti-inflammatoire, oestrogéniques, antidiabétique, hépato protectrice, gastro protectrice et antivirale^{19,20,21,22}. En outre, les huiles essentielles jouent un rôle écologique dans les interactions végétales et végétales-animales. En effet, elles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, jouent un rôle de pesticides verts en protégeant les végétaux, attirent les abeilles et des insectes responsables de la pollinisation^{23,24,25}.

3.2. Les acides gras

Les propriétés biologiques et nutritionnelles des acides gras ont été prouvées dans plusieurs travaux scientifiques. La valeur nutritionnelle en acides gras et leur impact sur la santé humaine sont évalués par deux rapports à savoir : l'indice de polyinsaturation (acide gras polyinsaturé /acide gras saturé) et l'indice des acides gras polyinsaturés (ω -6 / ω -3)²⁶. En effet, pour une alimentation saine, il a été recommandé que le premier indice doit être supérieur à 0,45 alors que le deuxième doit être inférieur à 4²⁷. Étant donné que les mammifères y compris l'homme ne produisent ni ω -3 ni ω -6, ces acides gras suscitent un grand intérêt et ce grâce à leurs effets sur la santé humaine. En effet, ils doivent être apportés par l'alimentation ou par les compléments nutritifs²⁸.

En outre, la consommation des acides gras saturés engendre l'augmentation de la cholestérolémie d'où le risque de maladie cardiovasculaire. De plus, le degré de gravité est

proportionnel à la longueur de la chaîne hydrocarbonée, plus elle est courte plus le risque s'accroît. Les acides gras sont également recherchés pour leurs propriétés antimicrobiennes et antifongiques^{29,30,31,32,33}.

4. Étapes préliminaires adoptées en phytochimie

Les propriétés médicinales et l'efficacité d'un principe actif dépendent de la période de la récolte et de la conservation de la plante³⁴.

4.1. L'étape de récolte

Au cours du temps, des saisons, des mois, voire des journées, des poussées de biosynthèses engendrent une accumulation plus au moins importante de certains constituants des chaînes métaboliques. Ce moment optimal de la récolte varie, évidemment, selon les espèces de plantes mais il dépend aussi de l'organe de la plante à récolter³⁵, qui doit être saine.

Les feuilles et les tiges se cueillent avant leur développement complet, au plus tard au moment de la formation des boutons floraux, c'est-à-dire quand le végétal est dans toute sa force (sauf pour les plantes dont on emploie soit les feuilles isolées, soit les sommités fleuries, comme les labiées : lavande...). Néanmoins, les racines se récoltent au printemps ou en automne : au printemps pour les plantes vivaces, en automne pour les plantes annuelles ou bisannuelles. Elles doivent être saines et flexibles. À l'exception de celles dont on n'utilise que l'écorce, on les récolte lorsque l'écorce a acquis une certaine épaisseur et se sépare facilement du corps³⁵.

4.2. L'étape de séchage

L'étape de séchage ou de dessiccation permet l'élimination d'eau de la matière végétale, bloquer l'activité enzymatique, éviter la dégradation (hydrolyse, oxydation polymérisations, racémisation) de certains constituants ainsi que la prolifération bactérienne. Les techniques de dessiccation sont diverses mais elles dépendent aussi de la partie de la plante à récolter^{1,2}.

Les racines doivent être séchées à l'air sec et conservées à l'abri de l'humidité, celles qui sont charnues seront coupées en tranches minces, disposées en chapelets et desséchées à l'étuve. Les racines mucilagineuses sont séchées au four. Les fleurs, les feuilles et les semences doivent être séchées à l'ombre dans un grenier ou une pièce à atmosphère sèche. On les étendra sur des claies ou on les suspendra en petits paquets isolés. Le matériel végétal doit être conservé dans des boîtes en bois, en carton ou dans des sachets de papier, dans un endroit sec.

4.3. L'étape de conservation

La composition chimique d'une plante peut évoluer au cours du temps, même si l'on a pris des précautions particulières au cours du stockage. Dans le but de conserver le maximum des principes actifs, il est essentiel de limiter les phénomènes d'oxydation, de photo altération et de développement de micro-organismes susceptibles de modifier la composition chimique de la plante. En effet, il importe de limiter de l'air, de la lumière et de l'humidité. Le stockage dans des boîtes en bois léger ou en carton épais est privilégié; par contre, l'usage des matières plastiques doit être proscrit, car elles adsorbent rapidement certaines substances volatiles, comme les huiles essentielles. Dans le cas des drogues aromatiques, l'usage de sacs en feuilles d'aluminium est conseillé².

5. Techniques d'extraction en phytochimie

La préparation des extraits de plantes pour phytothérapie a été connue depuis l'antiquité égyptienne, grecque et arabe. Dans ces écoles empiriques, l'homme a utilisé l'infusion, la décoction, la macération et la digestion comme procédés d'extraction solide-liquide pour transformer une plante en un extrait, qui peut être solide, liquide ou pâteux. Les progrès de la chimie des substances naturelles mettent en évidence plusieurs procédés d'extraction. Ces procédés sont : l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodistillation, l'enfleurage, l'expression, extraction par des solvants volatils, l'extraction par Soxhlet, l'extraction assistée par micro-ondes (Hydrodistillation par Micro-ondes sous Vide pulsé (VMHD)), l'extraction avec des fluides supercritiques. Dans ce qui suit, on se limite à décrire les procédés utilisés dans ce travail.

5.1. Procédé d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation

L'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation constituent les procédés d'extraction ou de séparation des huiles essentielles les plus anciens, apportés par les Arabes au IX^{ème} siècle. Cette opération s'accomplit traditionnellement dans un alambic². Actuellement, la pharmacopée européenne¹ exige l'entraînement à la vapeur et l'hydrodistillation de type Clevenger (**Figure II. 5**) pour l'extraction des huiles essentielles.

Ainsi, une verrerie adaptée a été mise en place permettant à la fois la circulation en circuit quasi fermé de l'eau sous forme aqueuse et gazeuse et la cohobation de l'huile essentielle. Le phénomène physique est identique à celui de l'alambic. Le chauffage permet, dans une première étape de l'hydrodistillation et de l'entraînement à la vapeur, de former de la vapeur d'eau qui détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus

volatiles en les séparant du substrat cellulosique. Le courant de vapeur ainsi créé permet l'entraînement d'un mélange hétérogène d'eau et de molécules organiques. Il s'agit plus précisément de la formation d'un azéotrope entre l'eau et chacun des constituants du mélange qui permet dans la majorité des cas une volatilisation de ces métabolites secondaires à une température d'ébullition inférieure à celle de chaque composé et à celle de l'eau.

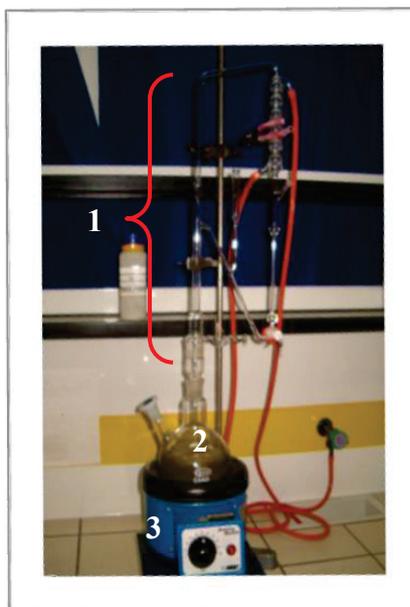


Figure II. 5 : Montage d'hydrodistillation de type Clevenger (1), (2) Ballon rodé (3) Chauffe ballon.

5.2. Procédé d'extraction par Soxhlet

L'extraction solide-liquide se définit comme une opération de séparation de constituants non volatils contenus dans un corps solide par solubilisation avec un solvant approprié. En phytochimie l'épuisement successif d'une plante est souvent accompagné par consommation intensive de solvants. Face à ce problème, les phytochimistes ont recours à l'extracteur de Soxhlet qui est une pièce de verrerie permettant à la fois l'évaporation en cycle du solvant et à extraire les molécules recherchées par dissolution dans un solvant chaud.

Un soxhlet (**Figure II. 6**) est composé d'un corps en verre (1) dans lequel on place une cartouche, papier-filtre épais et poreux, un tube siphon (2, 3) et un tube d'adduction. Dans un montage classique, le soxhlet est placé entre un ballon (4) contenant le solvant et un réfrigérant (5). Quand on chauffe le ballon, le solvant se vaporise, passe par le tube d'adduction et est condensé par le réfrigérant. Le solvant condensé tombe alors dans la cartouche. Lorsque le soxhlet est plein, le siphon joue son rôle et la solution retourne alors dans le ballon, le solvant s'est évaporé de nouveau et le cycle est repris jusqu'à épuisement complet de la plante.

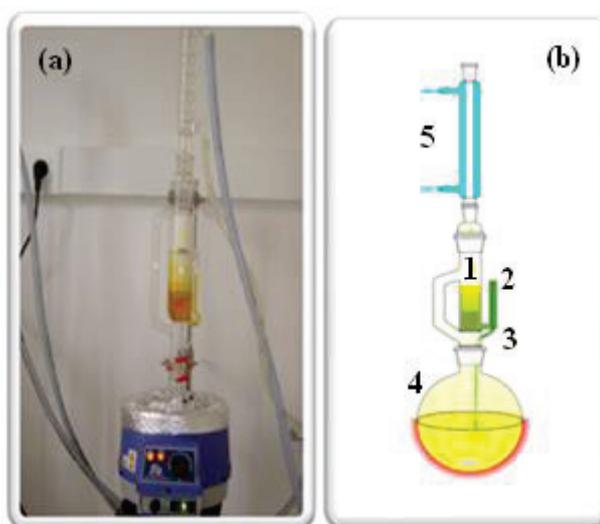


Figure II. 6 : Montage d'extraction par Soxhlet (a) et son schéma représentatif (b).

5.3. Prétraitement d'une fraction lipidique

Les acides gras, molécules peu abondantes sous forme libre, sont des constituants élémentaires des lipides, esters des acides gras. En effet, un prétraitement de la fraction lipidique est indispensable pour simplifier la matrice et rendre les acides gras libérés analysables par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Un tel prétraitement se fait principalement en deux étapes³⁶:

- Libération des acides gras par réaction de saponification en milieu basique;
- Dérivation des acides gras en méthyles esters (Figure II. 7) :

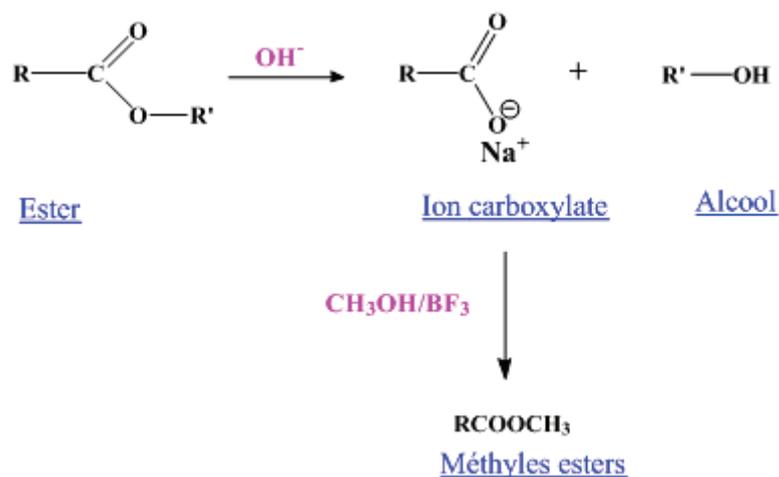


Figure II. 7 : Principe de dérivation des acides gras en méthyles esters.

6. Méthodologies d'analyse d'un mélange complexe

Les extraits de plantes se présentent généralement sous forme d'un mélange complexe. La caractérisation chimique d'un tel extrait est indispensable pour la valorisation de ces produits naturels quel que soit le domaine d'application. Ce travail délicat nécessite la définition d'une stratégie analytique performante en utilisant des techniques analytiques puissantes et complémentaires. Généralement, deux stratégies d'analyse (**Figure II. 8**) sont adoptées en phytochimie :

- Identification des composés en mélange sans étapes de prétraitement de la matrice ou analyse « en ligne » qui est souvent associée à un couplage entre une technique chromatographique et spectroscopique;
- Identification des constituants après étapes de prétraitement (fractionnement, purification, isolement de produits purs).

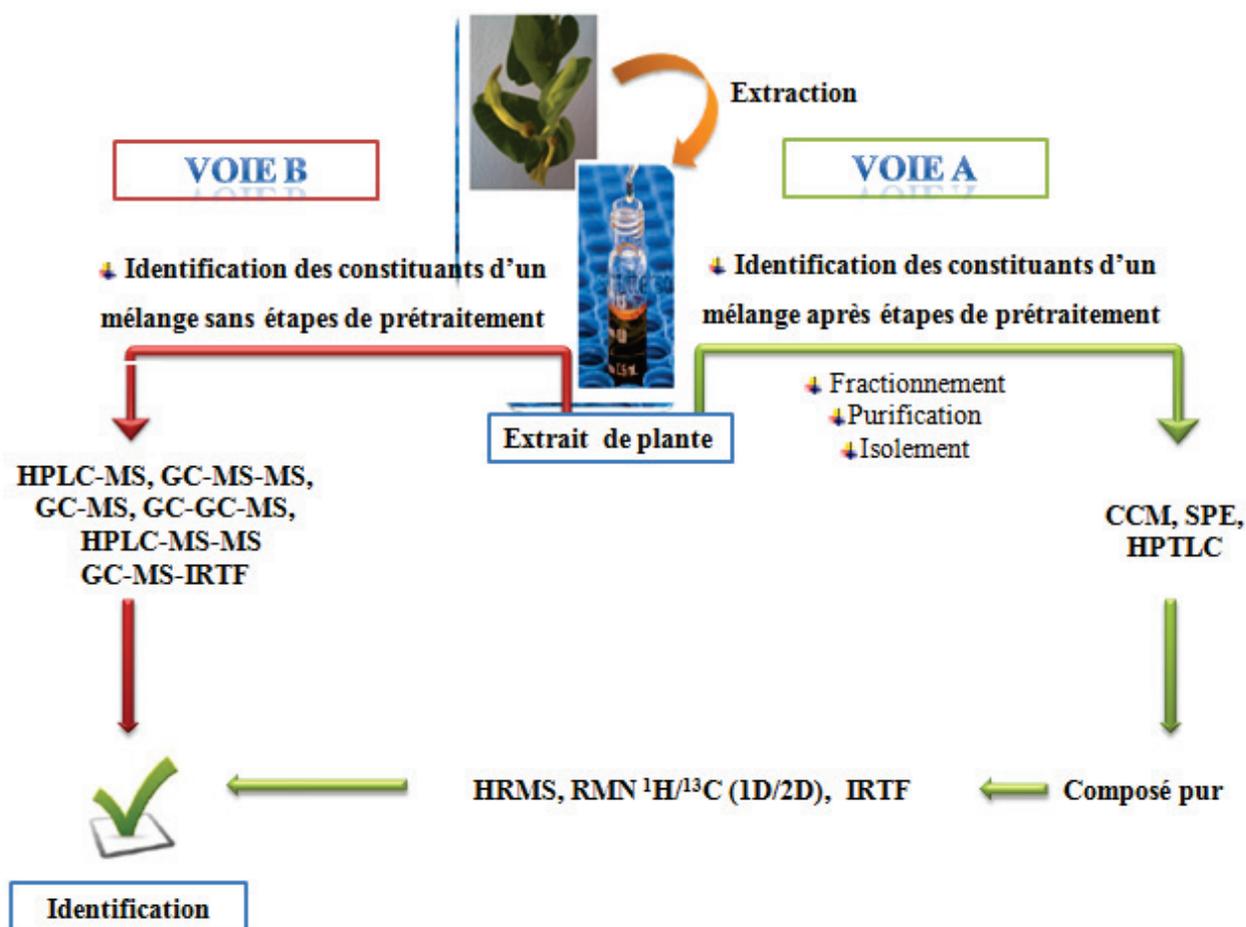


Figure II. 8 : Stratégies d'analyse d'un extrait de plante.

7. Techniques analytiques

Après l'étude phytochimique, le chimiste entame son travail délicat du choix des techniques analytiques, d'identification structurale et de quantification.

7.1. Techniques chromatographiques

La chromatographie est une technique d'analyse qui consiste à séparer les molécules contenues dans une matrice complexe par partage entre une phase mobile et une phase stationnaire. Chaque soluté injecté dans la colonne est soumis à deux effets antagonistes :

- Un effet d'entraînement par la phase mobile dans laquelle il est soluble;
- Un effet de rétention par la phase stationnaire avec laquelle il interagit.

La séparation et le temps de migration des composés à séparer dépendent des différences d'affinités de ces composés pour les phases mobile et stationnaire. Une bonne séparation chromatographique est fortement dépendante des conditions opératoires: la nature des phases mobiles et stationnaires, température, débit de la phase mobile et du type de colonne...

7.1.1. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer des mélanges de composés volatils ou susceptibles d'être vaporisés par suite d'équilibres successifs entre la phase mobile (gazeuse) et la phase stationnaire. Un chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois principales parties : l'injecteur, la colonne et le détecteur.

Le chromatographe en phase gazeuse muni d'un détecteur à ionisation de flamme (**GC-FID**) et celui couplé à un détecteur de spectrométrie de masse (**GC-MS**) constitue deux techniques analytiques complémentaires pour l'identification et la quantification des huiles essentielles et des huiles végétales (acides gras, de stérols...).

7.1.1.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

La **GC-MS** est une méthode d'analyse d'une très grande sélectivité. C'est une technique analytique qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation d'un mélange de composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge (**Figure II. 9**).

Cette technique permet l'identification et/ou la quantification de nombreuses substances présentes en très petites quantités. Son domaine d'application est très vaste, il est uniquement

limité par la volatilité des échantillons et non par des contraintes instrumentales. L'informatisation de cette technique a facilité sa mise en œuvre. En plus du chromatographe en phase gazeuse, le chromatographe GC-MS dispose :

- d'une source d'ions en phase gazeuse;
- d'un analyseur d'ions;
- d'un détecteur;
- d'un compartiment de traitement des données.

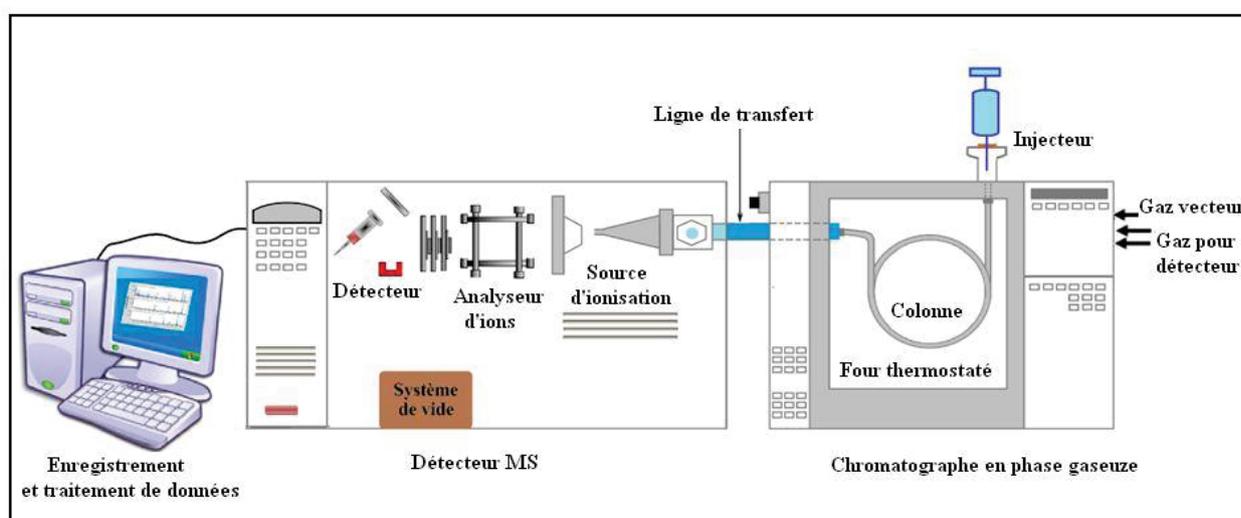


Figure II. 9 : Représentation schématique des différents modules d'un chromatographe GC-MS.

Ainsi, l'analyse d'un échantillon avec un spectromètre de masse suit une cascade d'étapes illustrées dans la **Figure II. 10**. Les sources d'ionisation se répartissent en source d'ions brutale telle que l'impact électronique (**IE**) et en sources d'ions douces comme désorption laser assistée par matrice (**MALDI**), électro nébulisation (**ESI**)... De plus, il existe plusieurs types d'analyseurs comme Temps de vol (**TOF**) ; Quadripolaire (**Q**), trappe d'ions et différentes combinaisons de couplages.

Pour l'analyse des huiles essentielles et méthyles esters des acides gras, le détecteur **MS** est souvent équipé d'une source d'ionisation brutale de type **IE** et d'un analyseur de type quadripolaire. L'analyseur à filtre quadripolaire est constitué par un assemblage de quatre électrodes (barres) parallèles de section hyperbolique (**Figure II. 11**). Les barres opposées sont connectées électriquement et une tension de même signe est appliquée à chaque couple. La tension appliquée entre chaque couple de barres possède une composante continue et une composante alternative (sinusoïdale). Il en résulte un champ électrique au centre (champ

quadripolaire). La sélection des ions traversant le filtre quadripolaire est obtenue par variation automatique à la fois de tensions continues et sinusoïdales suivant un balayage électrique continu et synchronisé. Le mouvement d'un ion dans un champ électrique est défini par les équations de Mathieu dont la résolution conduit à deux types de trajectoires :

- Une trajectoire *stable* pour un ion de m/z donné : *propagation dans l'axe* et arrivée au détecteur ;
- Une trajectoire *instable* pour les autres ions m/z , les ions frappent les barres ou sortent du filtre.

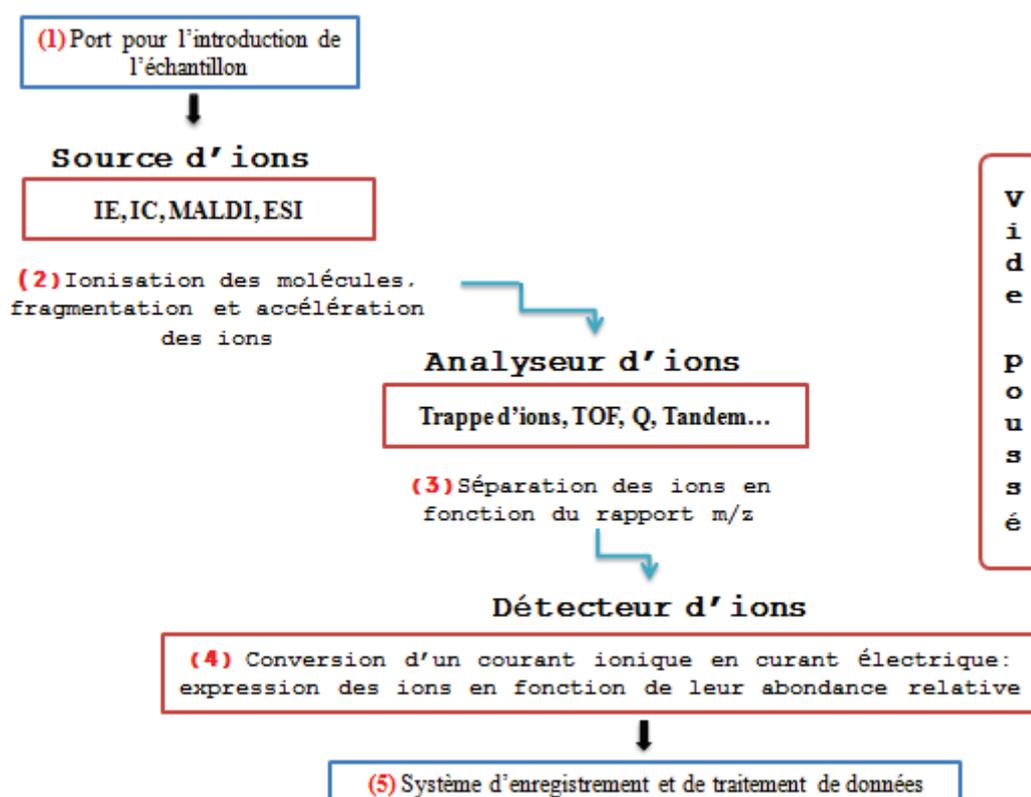


Figure II. 10 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse.

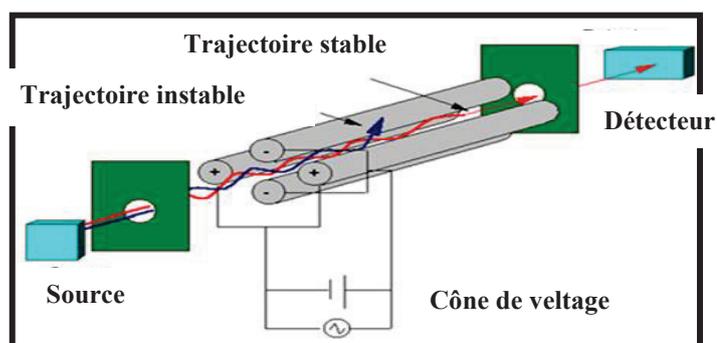


Figure II. 11 : Schéma de principe d'un filtre quadripolaire.

7.1.1.2. Identification des constituants d'un mélange

Dans le cas d'analyse des huiles essentielles (**Figure II. 12**), chaque constituant est caractérisé par deux indices de rétention (k_i) : indices de rétention polaire et apolaire, selon la polarité de la colonne capillaire. Ces indices sont calculés à partir d'une série de standards (alcanes), puis ils sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans des bibliothèques de références élaborées au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales ou répertoriés dans la littérature.

Le couplage avec la spectrométrie de masse en mode impact électronique associé à un analyseur à filtre quadripolaire a l'avantage d'obtenir des informations concernant la masse moléculaire et d'identifier une molécule en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques informatisées (**Voie A, Figure II. 8**). Cependant la **voie B (Figure II. 8)** peut être mise en œuvre lorsqu'un ou plusieurs constituants de l'huile essentielle sont non identifiés des bibliothèques de comparaison et qu'ils ne sont pas décrits dans la littérature.

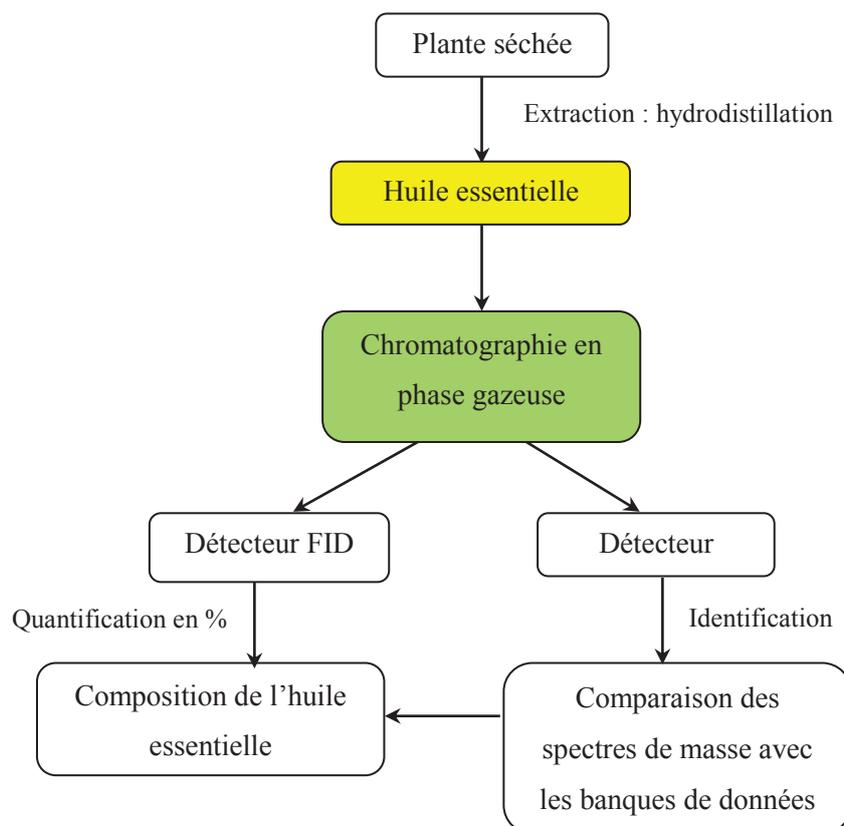


Figure II. 12 : Schéma des étapes d'analyse d'une huile essentielle.

7.1.2. Chromatographie en phase liquide

La chromatographie liquide haute performance (**HPLC**) est aussi une technique de séparation performante, qui permet également l'identification et la quantification des composés d'un mélange.

7.1.2.1. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

La détection a beaucoup évolué dans le domaine de l'**HPLC**, particulièrement le couplage avec la spectrométrie de masse qui nécessite de contourner certains problèmes dus aux conditions opératoires des deux techniques telles que le vide poussé, la phase gazeuse et la haute température pour la spectrométrie de masse et la haute pression et la phase liquide en **HPLC**. Un tel problème est résolu par l'innovation des interfaces de couplage qui permet le transfert des ions de la source opérant à pression atmosphérique à l'analyseur opérant à des pressions de l'ordre de 10^{-5} Torr, le but étant d'éliminer le maximum de molécules neutres avant d'arriver à l'analyseur. Ce filtrage est effectué soit par :

- *des interfaces à rideau de gaz* : un rideau de gaz (N_2) qui repousse les neutres non chargés circule entre la source et la zone de vide primaire. Les ions soumis à une différence de potentiel sont accélérés dans l'analyseur;

- *des interfaces à système de filtrage chauffant* : les ions en sortie de source atmosphérique traversent une zone chauffée sous vide primaire qui élimine la grande partie des neutres.

En outre, il existe plusieurs combinaisons de couplages avec les différents types d'analyseur. Dans ce qui suit, on décrira succinctement le couplage avec les analyseurs quadripolaires et temps de vol (**Qq-TOF**). Le principe de fonctionnement d'analyseur quadripolaire a été décrit précédemment, alors que celui d'analyseur à temps de vol repose sur la mesure du temps nécessaire pour parcourir la distance **L** entre la zone d'accélération (potentiel **Vs**) et le détecteur (**Figure II. 13**). Le phénomène physique de séparation obéit à certaines équations (**Équation II. 1**) qui décrivent l'action d'un champ électrique constant sur une particule chargée. L'énergie cinétique **E_c** acquise en fin d'accélération pour un ion à la sortie de la source, est égale à **qVs** :

$$E_c = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = q \cdot V_s = z \cdot e \cdot V_s \quad \text{Équation II. 1}$$

Avec :

m : masse de l'ion

v : vitesse de l'ion

q : charge de l'ion

V_s : potentiel d'accélération

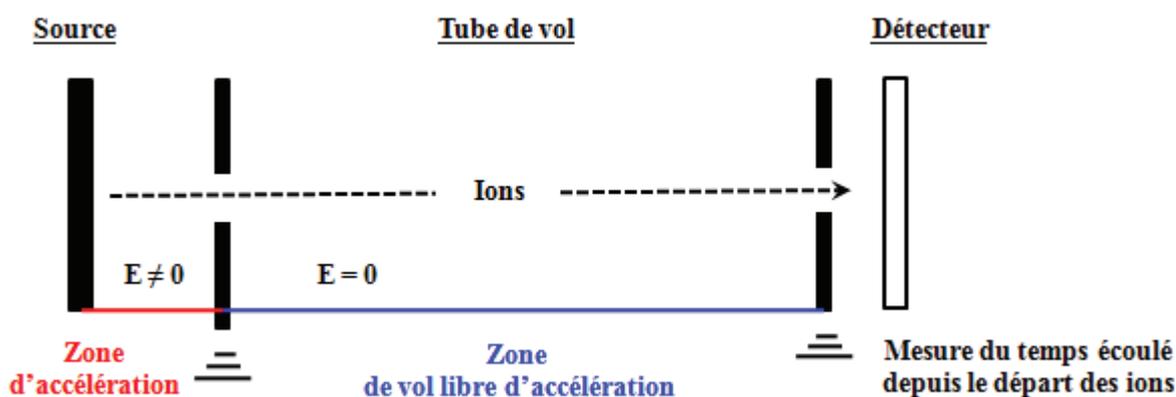


Figure II. 13 : Schéma de principe d'analyseur à temps de vol (TOF).

Le passage dans le tube de vol est accompagné par la séparation des ions selon leur vitesse v et selon leur masse (m) (Équation II. 2).

$$v^2 = \frac{2 \cdot z \cdot e \cdot V_s}{m} \quad \text{Équation II. 2}$$

Ainsi, le temps nécessaire pour parcourir la distance L est donné par l'Équation II. 3.

$$t = (2 x_s + L) \sqrt{\frac{m}{z \cdot 2e \cdot V_s}} \quad \text{Équation II. 3}$$

Tous les ions, quelle que soit leur masse, possèdent la même énergie cinétique E_c à la sortie du champ d'accélération V_s . À ce niveau, les ions arrivent dans une région libre de champ où ils ne sont plus soumis à aucune force et sont animés d'un mouvement rectiligne uniforme. Ces ions possédant des masses différentes et une énergie cinétique identique ont donc des vitesses différentes. En conséquence, les ions les plus légers ont une vitesse plus grande que les ions plus lourds. En réalisant, non pas un faisceau ionique continu, mais un faisceau « pulsé », il sera possible de séparer les ions dans le temps, à condition qu'ils partent tous en même temps de la fente d'entrée du système dispersif. Cet analyseur est connu depuis longtemps pour sa sensibilité, sa haute résolution et son excellente stabilité permettant la mesure exacte des masses. Ainsi avec les hybrides (**Qq-TOF**), on accède à la mesure exacte en mode tandem (**MS / MS**) et à des informations structurales intéressantes.

7.1.2.2. Chromatographie d'extraction en phase solide (SPE)

La chromatographie **SPE** est analogue à celle de la chromatographie de partage mais aussi à la chromatographie préparative. Elle consiste à traiter une quantité importante de charge et à collecter les solutés séparés, dont la pureté est contrôlée par chromatographie analytique. Elle se compose généralement de quatre étapes : étapes de conditionnement, de chargement, de lavage et d'élution (**Figure II. 14**).

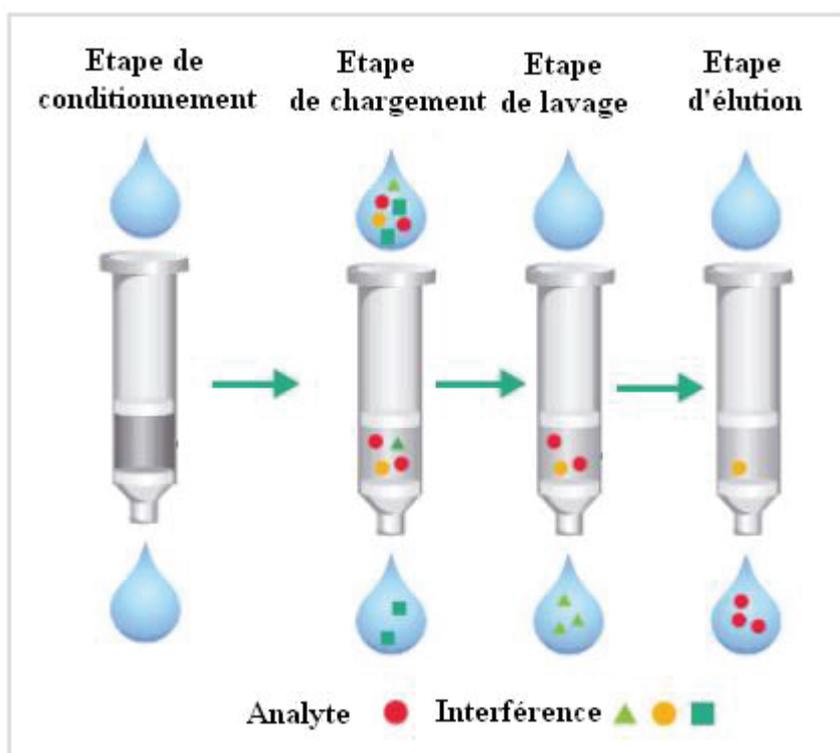


Figure II. 14 : Schéma du principe de la chromatographie SPE.

La première étape est le conditionnement de la phase stationnaire. Elle permet de la mouiller au moyen d'un solvant organique et d'activer les sites de rétention, siège des interactions moléculaires.

La seconde étape est le dépôt de l'échantillon. Le but est de provoquer une rétention quantitative des analytes sur la phase stationnaire qui peut être faite par percolation de l'échantillon sous pression. Pour un maximum d'efficacité, la vitesse d'écoulement de l'échantillon doit être modérée.

L'étape suivante est le lavage, elle n'est pas systématique, elle a pour but d'éliminer des interférents retenus. Il faut choisir des solvants de faible force éluante (exemple : mélange méthanol / eau) pour n'éluer que les interférents.

La dernière étape est celle de l'éluion. Il est préférable d'utiliser le solvant de la plus faible force éluante possible capable d'entraîner la totalité des molécules évitant ainsi l'éluion des interférents fortement retenus. Le choix du solvant est aussi guidé par sa facilité d'évaporation ou sa compatibilité avec la technique analytique suivante. La vitesse d'écoulement du solvant doit être lente pour favoriser l'éluion.

7.1.2.3. Identification des constituants d'un mélange

L'identification se fait, tout d'abord, par superposition de deux chromatogrammes : le profil chromatographique et l'empreinte masse des standards et celui de l'échantillon à analyser, obtenus dans les mêmes conditions chromatographiques. Puis, il est indispensable de comparer les spectres **UV-Visible** et celui de spectrométrie de masse des composés dont deux pics chromatographiques ont un temps de rétention proches ou identiques.

7.2. *Techniques spectroscopiques*

La spectroscopie d'absorption infrarouge (**IR**) et **UV-Visible** sont basées sur l'interaction de la lumière avec les nuages électroniques des liaisons chimiques et les électrons des groupements chromophores respectivement. En contrepartie, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (**RMN**) est basée sur l'action d'un champ magnétique sur les noyaux ayant des spins nucléaires différents de zéro. Ces techniques apportent des informations structurales complémentaires pour l'identification des structures des molécules des extraits de plantes. Ainsi, on présentera un bref rappel du principe de ces différentes techniques analytiques non destructives.

7.2.1. Spectroscopie infrarouge

7.2.1.1. Principe de la spectroscopie infrarouge

En spectroscopie **IR**, le domaine infrarouge du spectre électromagnétique peut être divisé en trois régions selon les longueurs d'onde : le lointain **IR** s'étend de 0,75 à 2,5 μm (10 - 400 cm^{-1}), le moyen **IR** s'étend de 2,5 à 25 μm (400 à 4000 cm^{-1}) et le proche **IR** s'étend de 25 à 1000 μm (4000 -13000 cm^{-1}). Chaque région de longueur d'onde est caractérisée par des transitions spécifiques (**Figure II. 15**). L'interaction du rayonnement du moyen **IR**, domaine d'étude structurale moléculaire, est accompagnée d'une variation du moment dipolaire des vibrateurs. À la résonance, les transitions permises traduisent la fréquence à laquelle est absorbé le rayonnement de l'onde excitatrice. Une bande d'absorption est donc observée sur le spectre à une énergie caractéristique de la liaison et du mouvement de vibration.

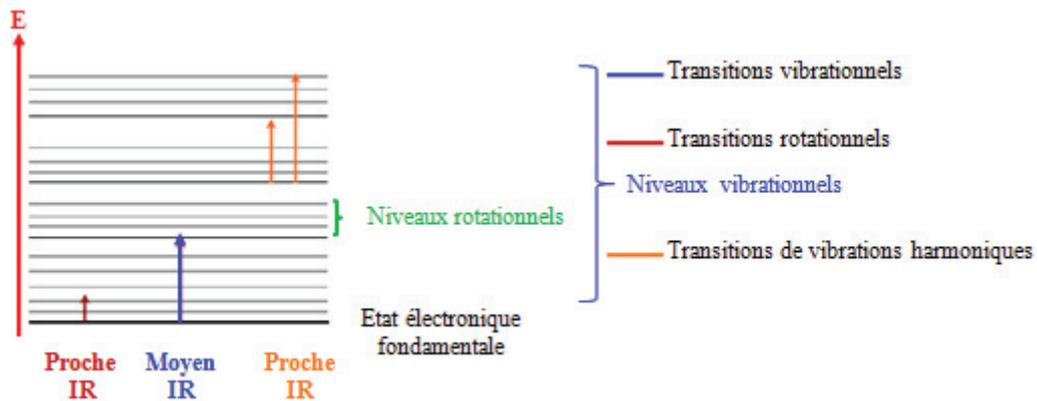


Figure II. 15 : Représentation schématique du diagramme d'énergie de différentes transitions possibles dans le domaine IR.

7.2.1.2. Principe de la technique ATR (Réflexion Totale Atténuée)

La spectroscopie d'absorption infrarouge peut exploiter deux interactions rayonnement matière différentes : la transmission et la réflexion. Le phénomène de la réflexion prend naissance, lorsqu'un faisceau lumineux arrive à l'interface d'un second milieu dont l'indice de réfraction est plus grand, il subit suivant l'angle d'incidence, soit une réflexion totale comme un miroir, soit une réflexion atténuée après avoir, en partie, pénétré dans ce milieu d'environ une demi-longueur d'onde (soit entre 2 et 10 μm pour le moyen IR). L'échantillon absorbe une partie de ces radiations. On distingue la réflexion spéculaire (RS), la réflexion totale atténuée (ATR) et la réflexion diffuse (RD). Un ensemble d'accessoires spécifiques a été conçu à chaque phénomène observé. Cependant, on a intérêt à décrire le principe de la technique ATR. Brièvement, le principe de cette technique se base sur la possibilité de générer à l'interface cristal / échantillon une onde dite évanescente (**Figure II. 16**).

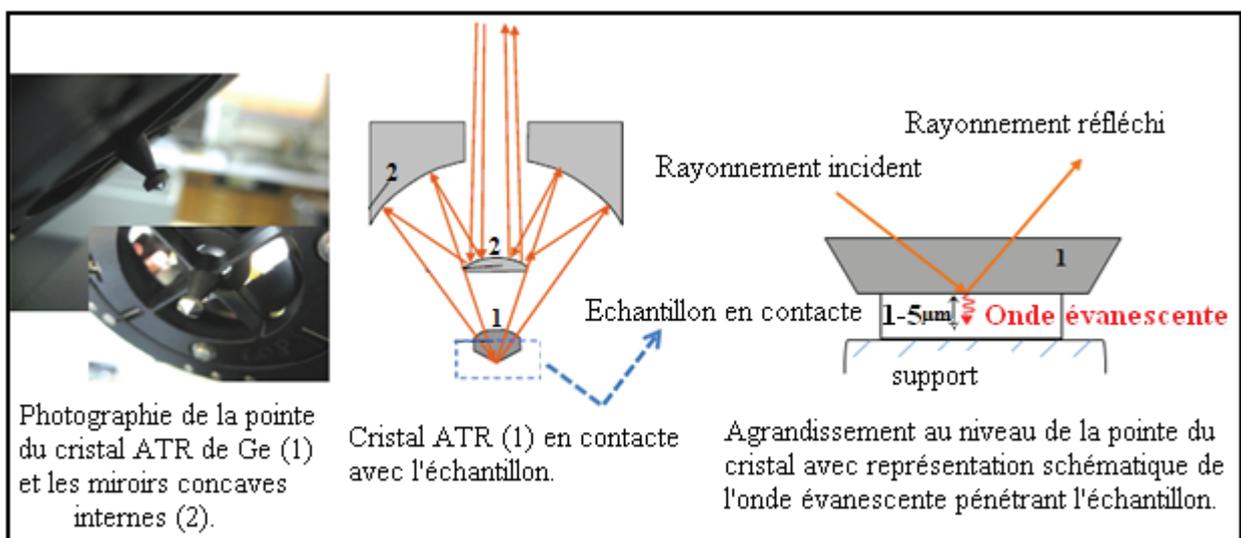


Figure II. 16 : Schéma représentatif du principe de la technique ATR en infrarouge.

7.2.1.3. Interprétation d'un spectre infrarouge

L'interprétation d'un spectre infrarouge (**IR**) se fait à partir de 3 facteurs : la position des bandes, les intensités relatives et leurs formes. Une bande d'absorption est repérée par sa position exprimée en nombre d'onde (cm^{-1}). L'intensité de la bande d'absorption, associée à un type de liaison est liée à la variation du moment dipolaire et à la concentration. Ainsi, dans un spectre **IR** on distingue généralement trois régions principales :

- La région 4000 - 1500 cm^{-1} : zone des fonctions, cette partie du spectre rassemble des bandes d'absorption de vibration de valence ou élongation ν de liaisons de la plupart des groupes fonctionnels (O-H, N-H, C-H, C=O, C=C) ;
- La région 1500 - 1000 cm^{-1} : empreinte digitale, il s'agit d'une région comportant de nombreuses bandes qui correspondent aux bandes de déformations $\delta(\text{C-H})$ ainsi que quelques vibrations d'élongation ;
- La région 1000 - 400 cm^{-1} : région de faible énergie et caractéristique de la molécule, on observe surtout des transitions vibrationnelles de déformation hors du plan des liaisons C-H des alcènes et des composés aromatiques (« respiration » des structures cycliques).

7.2.2. Spectroscopie UV-Visible

Les méthodes d'absorption moléculaire dans l'ultraviolet et le visible sont, sans doute, les techniques d'analyse quantitative les plus utilisées dans les laboratoires chimiques et cliniques, car elles sont simples à utiliser, à moindre coût et donnent des résultats fiables.

7.2.2.1. Principe de la spectroscopie UV-Visible

Le domaine spectral **UV-Visible** est divisé en deux plages : l'ultraviolet moyen s'étend de 185 à 400 nm (environ), et le visible s'étend de 400 à 800 nm (environ). L'absorption du rayonnement par les molécules organiques dans le domaine spectral **UV-Visible** résulte des interactions des photons avec les électrons des liaisons covalentes (orbitales liantes et anti-liantes) et les électrons non liants dits les électrons n des hétéroatomes (**O, S, N...**). Les transitions électroniques permises se font à partir de l'orbitale occupée la plus énergétique vers l'orbitale non occupée la moins énergétique (**Figure II. 17**).

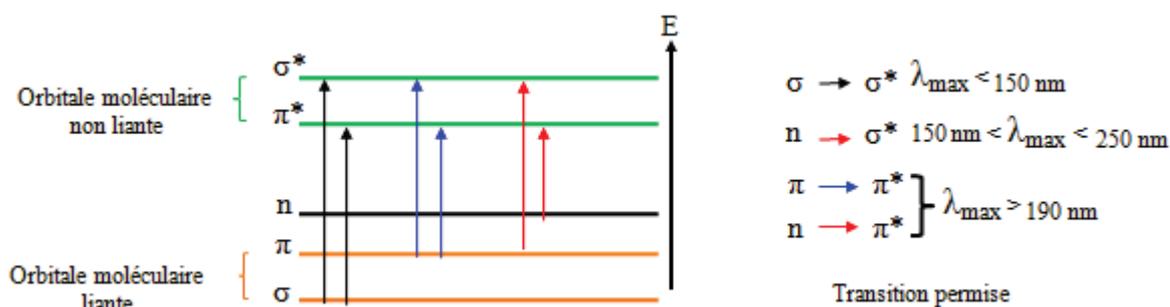


Figure II. 17 : Représentation schématique du diagramme d'énergie de différentes transitions possibles dans le domaine UV-Visible.

7.2.2.2. Loi de Beer-Lambert

Les mesures de la densité optique ou de l'absorbance d'une molécule reposent sur la loi de Beer-Lambert qui relie dans certaines conditions, l'absorbance à la concentration d'un composé en solution³⁷. La loi de Beer-Lambert a pour expression :

$$A = \varepsilon \cdot \ell \cdot C \quad \text{Équation II. 4}$$

Avec :

ε : coefficient d'extinction molaire ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) ;

ℓ : trajet optique ou la largeur de la cuve (cm) ;

C: concentration de l'analyte (mol L^{-1}).

La loi de Beer-Lambert n'est valide que si les conditions suivantes sont vérifiées :

- Rayonnement monochromatique ;
- Absence de la photodécomposition de l'analyte ;
- Solutions diluées et limpides pour éviter la diffusion de la lumière par les particules en suspension ;
- Absence des phénomènes de fluorescence et de réflexion de la lumière par les parois internes de la cellule ;
- La substance absorbante ne doit pas donner des associations variables avec le solvant.

7.2.2.3. Les facteurs influençant la réponse d'un spectrophotomètre UV-Visible

La fiabilité de mesure de la densité optique d'une solution est influencée par divers facteurs :

- **Le solvant** : un solvant utilisable en spectroscopie **UV-Visible** doit être transparent dans tout le domaine spectral et doit pouvoir dissoudre une quantité suffisante, ou mieux totalement l'échantillon pour donner des bandes bien apparentes ;
- **L'effet du pH** : modification du caractère acido-basique de l'analyte et sa structure électronique ;
- **L'effet de la largeur de fente** : il apparaît clairement que les pics deviennent plus rabotés, déformés et donc moins bien séparés quand la bande passante s'élargit ;
- **L'effet du rayonnement diffusé** aux longueurs d'onde extrêmes du spectrophotomètre **UV-Visible**.

7.2.2.4. Qualification d'un spectrophotomètre UV-visible

La qualité des résultats d'analyse, outre la formation et l'expérience des analystes, repose essentiellement sur la validité des méthodes d'analyse et la fiabilité de l'appareillage. Un spectrophotomètre **UV-Visible** est constitué de trois principales parties : la source de radiation, le monochromateur et le détecteur. Suivant l'arrangement des composantes optiques, on distingue deux types d'appareillages : les spectromètres à optique monofaisceau et les spectromètres à optique à double faisceau. En revanche, le processus de qualification d'un appareil est divisé en quatre étapes :

- Qualification de la conception ;
- Qualification de l'installation ;
- Qualification opérationnelle ;
- Qualification des performances.

Cependant, la fiabilité des résultats d'une méthode d'analyse par spectrophotométrie **UV-Visible** nécessite la vérification quotidienne de certains critères de la qualification opérationnelle, qui sont :

- Recherche du bruit de fond ;
- Vérification de la dérive de la ligne de base ;
- Vérification de la lumière parasite ou test de lumière diffuse ;
- Vérification du pouvoir de résolution ;
- Vérification de l'exactitude des absorbances ;
- Vérification de l'exactitude et de la reproductibilité de la longueur d'onde.

Dans notre laboratoire, la vérification de la lumière parasite (ou test de lumière diffuse), du pouvoir de résolution et de l'exactitude des absorbances est indispensable une fois par an. Néanmoins, la vérification des autres critères se fait obligatoirement avant chaque mise en marche de l'appareil.

7.2.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire est une technique spectroscopique extrêmement intéressante dans la plupart des domaines scientifiques (physique, chimie, biologie, médecine...).

7.2.3.1. Principe d'une expérience RMN

En l'absence de champ magnétique externe, les moments de spin des noyaux d'un échantillon sont orientés au hasard (ils pointent dans toutes les directions). Le moment magnétique total ou l'aimantation d'un échantillon est donc nul. Dans un champ magnétique statique, pour un noyau donné ayant un spin I non nul, il existe $2I+1$ orientations différentes du moment angulaire ou du dipôle magnétique. Ainsi, l'interaction entre le champ magnétique (B_0) et le spin donne lieu à l'effet **Zeeman**. La levée de dégénérescence des niveaux d'énergie se manifeste par la distribution de la population de spin ou de l'aimantation entre deux niveaux énergétiques notés α et β , distribution de **Boltzmann**.

Lors d'une expérience RMN, on perturbe cet équilibre par excitation des spins : on provoque ainsi des transitions nucléaires entre les niveaux d'énergie. Pour cela on applique une impulsion radiofréquence (**RF**) (champ B_1 intense perpendiculaire à B_0 et de fréquence ν_1) pendant un temps très court. Cette impulsion RF doit respecter la condition de résonance : $\nu_1 = \nu_0$ (ν_0 étant la fréquence propre de l'échantillon). Pour observer les transitions RMN dans un échantillon analytique, la façon la plus simple pour atteindre les conditions de résonance revient à varier la fréquence d'irradiation (ν_1) en maintenant la densité du flux magnétique constante (Frequency

Sweep Method) ou vice-versa (Field Sweep Method). Ces deux méthodes s'avèrent adéquates pour mesurer les spectres de noyaux sensibles tels que ^1H , ^{19}F et ^{31}P qui ont tous des spins de $1/2$ et des moments magnétiques élevés. Cette méthode fut remplacée par la méthode dite pulsée, elle consiste à irradier l'échantillon étudié à l'aide d'une série d'impulsions électromagnétiques de durée très courte (quelques microsecondes) qui contiennent la gamme de fréquences à étudier. On distingue de types d'expérience : expérience RMN-1D et expérience RMN-2D (Figure II. 18).

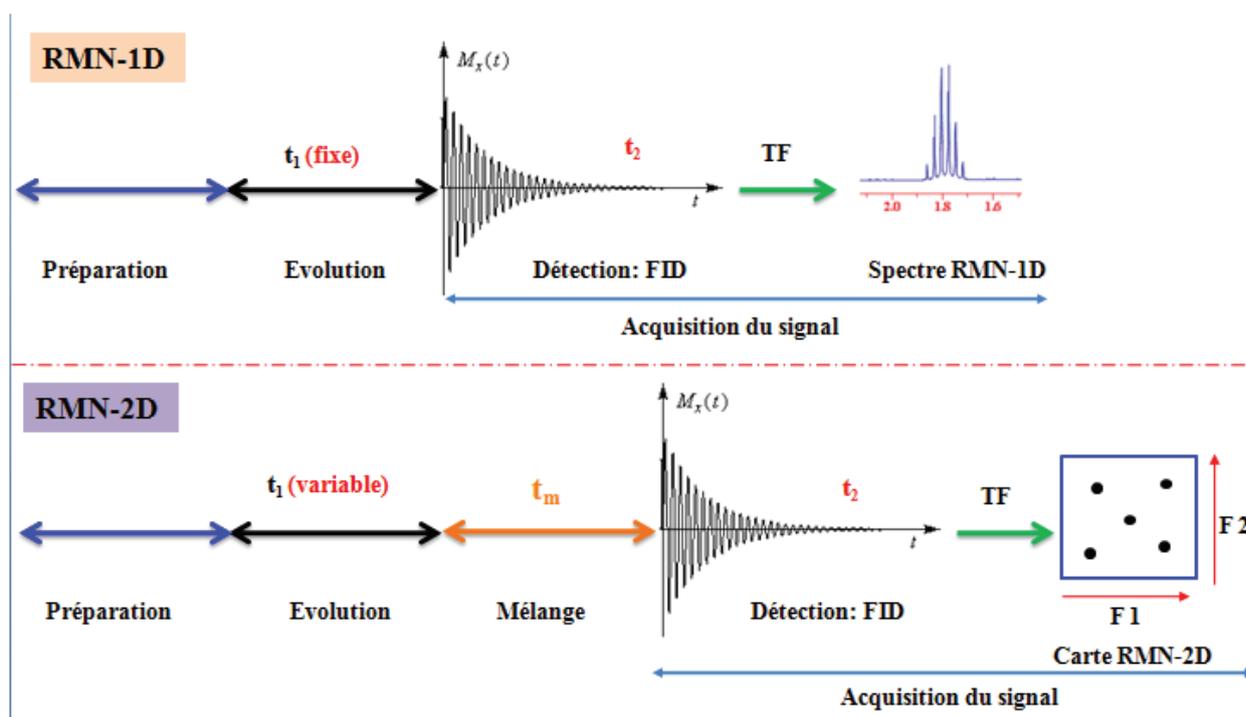


Figure II. 18 : Schéma de principe d'expériences RMN-1D et 2D.

Au cours d'une expérience RMN-1D, la première perturbation du système de spins via une ou plusieurs impulsions RF a lieu pendant la **période de préparation** qui est suivie d'une **période d'évolution**, caractérisée par le temps d'évolution t_1 fixe. Les spins évoluent en fonction de leur fréquence de résonance et enfin la **période d'acquisition** du signal t_2 , et traitement du signal **FID** (Free Induction Decay) par transformé de fourrier (**TF**).

Une expérience RMN-2D, se différencie de la précédente par l'incrémentation de t_2 qui est variable et d'un **temps de mélange** pendant lequel l'information d'une partie du système de spins est transférée aux autres parties (transferts de polarisation).

7.2.3.2. Exemple d'expériences RMN-2D

Il existe plusieurs séquences d'acquisition pour faciliter l'interprétation des spectres complexes de RMN- ^1H . Ainsi on définit brièvement quelques séquences les plus usuelles :

- La séquence **NOESY** (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) permet d'accéder au couplage dipolaire. En effet, les taches de corrélation hors diagonale traduisent soit une interaction dipolaire donc une certaine proximité spatiale entre les spins considérés, soit donc un échange chimique ;

- La séquence **HSQC** (Heteronuclear Single Quantum Correlation) permet d'accéder au couplage scalaire hétéronucléaire direct en ^1J ;

- La séquence **HMBC** (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) permet d'accéder au couplage scalaire hétéronucléaire à longue distance en ^nJ avec $n \geq 2$;

- La séquence de corrélation homonucléaire **COSY H-H** permet d'accéder au couplage scalaire homonucléaire en $^1>n\text{J}$. Sur la carte **COSY H-H**, le spectre RMN- ^1H sera représenté sur la diagonale sous forme de taches. Les taches de corrélation hors diagonale traduisent une interaction scalaire (**Figure II. 19**);

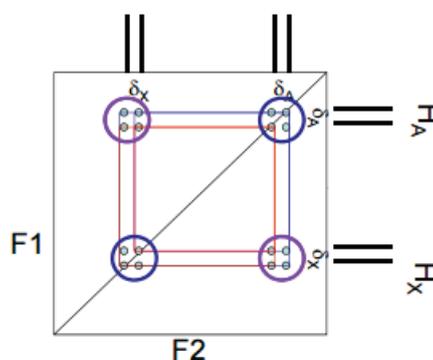


Figure II. 19 : Schéma de principe de corrélation COSY H-H.

- La séquence de corrélation homonucléaire **INADEQUATE** ^{13}C - ^{13}C permet d'accéder au squelette carboné d'une molécule par la détermination de la connectivité entre les carbones à partir du couplage scalaire direct en $^1\text{J}_{^{13}\text{C}-^{13}\text{C}}$

8. Conclusion

Une étude phytochimique nécessite la réunion de plusieurs compétences et connaissances en botanique, biochimie, chimie extractive, chimie analytique et chimie structurale.

Références bibliographiques

- [1] Association Française de Normalisation., 1999. Huile essentielle, recueil des normes Française, 3ème édition Paris.
- [2] Bruneton, J., 1993. Phytochimie : Plantes médicinales. Paris, Editions TEC & DOC Lavoisier.
- [3] Anton R., Lobstein A., 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris, Editions TEC & DOC Lavoisier.
- [4] Glenn, W., Turner, C., Rodney Croteau., 2004. Organization of Monoterpene Biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localization of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. *Plant physiol.* **136**, 4215-4227.
- [5] Oswald, M., 2006. Déterminisme génétique de la biosynthèse des terpenols aromatiques chez la vigne. Thèse de doctorat en Sciences du vivant : Aspect moléculaires et cellulaires de la biologie. Université de Louis Pasteur Strasbourg I.
- [6] Kaufman, P.B., Harris, J.L., Croteau, R., 1987. Metabolism of monoterpene: Demonstration of the hydroxylation of (+) sabinene to (+) cis sabinol by enzyme preparation from sage (*Salvia Officinalis*) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* **256**, 179-93.
- [7] Singh, N., Luthra, R., Sangwan, R.S., Thakur, R.S., 1989. Metabolism of monoterpenoids in aromatics plants. *Curr. Res. Med. Arom. Plants* **11**, 174-197.
- [8] Celiktas, O.Y., Kocabas, E.E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T., Baser, K.H.C., 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* **100**, 553-559.
- [9] Djouahri, A., Boualem, S., Boudarene, L., Baaliouamer, A., 2015. Geographic's variation impact on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils from wood and leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Ind. Crop. Prod.* **63**, 138-146.
- [10] Formisano, C., Delfino, S., Oliviero, F., Tenore, G.C., Rigano, D., Senatore, F., 2015. Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy). *Ind. Crop. Prod.* **63**, 256-263.
- [11] Ruberto, G., Baratta, M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* **69**, 167-174.
- [12] Verma, R. S., Padalia, R.C., Chauhan, A., 2013. Introduction of *Cymbopogon distans* (Nees ex Steud.) Wats to the sub-tropical India: Evaluation of essential-oil yield and chemical composition during annual growth. *Ind. Crop. Prod.* **49**, 858-863.

- [13] Verma, R. S., Padalia, R.C., Chauhan, A., 2014. Chemical composition variability of essential oil during ontogenesis of *Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffm.) Arcang. *Ind. Crop. Prod.* **52**, 809-814.
- [14] Zilda, C.G., Ana Carolina, L.A., Ana Maria, C.H., Claudia, M.R., Izalina, A.N., Gilberto, A.F., Diógenes, A.G.C., 2010. Seasonal Variation, Chemical Composition, and Analgesic and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from Leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. *Molecules* **15**, 5509-5524.
- [15] Silou, T., Malanda, M., Loubaki, L., 2004. Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce à un plan factoriel 23. *J. Food Eng.* **65**, 219-223.
- [16] Vaiciulyte.V., Loziene.K., 2015. Metabolomic analysis and effects of meteorological factors on phenolic and non phenolic chemotypes of *Thymus pulegioides* L. cultured in the same locality. *Ind. Crop. Prod.* **77**, 491-498.
- [17] Cuvelier, C., Cabaraux, J.F., Dufrasne, I., Hornick, J.L., Istasse, L., Acides gras : nomenclature et sources alimentaires., 2004. Acides gras: nomenclature et sources alimentaires, *Ann. Med. Vet.* **148**, 133-140.
- [18] Cuvelier C., C.J.F., Dufrasne I., Hornick J. L., Istasse L, 2004. Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. *Ann. Méd. Vét.* **148**, 133-140.
- [19] Rather, M.A., Dar, B.A., Sofi, S.N., Bhat, B.A., Qurishi, M.A., 2012. *Foeniculum vulgare*: a comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arab. J. Chem.* Available on line 30 April 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.04.011>.
- [20] Rhoades, J., Gialagkolidou, K., Gogou, M., Mavridou, O., Blatsiotis, N., Ritzoulis, C., Likotrafiti, E., 2013. Oregano essential oil as an antimicrobial additive to detergent for hand washing and food contact surface cleaning. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 987-994.
- [21] Kim, J., Lee, Y.S., Lee, S.G., Shin, S.C., Park, I.K., 2008. Fumigant antifungal activity of plant essential oils and components from West Indian bay (*Piment racemosa*) and thyme (*Thymus vulgaris*) oils against two phytopathogenic fungi. *Flavour Fragr. J.* **23**, 272-277.
- [22] Gilling, D.H., Kitajima, M., Torrey, J.R., Bright, K.R., 2014. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *J. Appl. Microbiol.* **116**, 1149-1163.
- [23] Abdollahi, A., Hassani, A., Ghosta, Y., Bernousi, I., Meshkatsadat, M.H., Shabani, R., Ziaee, S.M., 2012. Evaluation of essential oils for maintaining postharvest quality of Thompson seedless Table grape. *Nat. Prod. Res.* **26**, 77-83.
- [24] Rocha, D.K., Matos, O., Nóvoa, M.T., Figueiredo, A.C., Delgado, M., Moiteiro, C., 2015. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of *Foeniculum vulgare* essential oils from Portugal and Cape Verde. *Nat. Prod. Commun.* **10**, 677-682.

- [25] Roman Pavela, R., Zabka, M., Bednár, J., Triska, J., Vrchotová, N., 2016. New knowledge for yield, composition and insecticidal activity of essential oils obtained from the aerial parts or seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Indus. Crops. Prod.* **83**, 275–282.
- [26] Russo, G.L., 2009. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem. pharmacol* **77**, 937–946.
- [27] HMSO UK, 1994. Department of Health. Nutritional aspects of cardiovascular disease. London, *Report on Health and Social Subjects* **45**, 37-46.
- [28] Russo, G.L., 2009. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 937-946.
- [29] Kabara, J.J., D.M.S., Anthony, J., Conley, Truant, J. P., 1972. Fatty Acids and Derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents ch.* **2**, 23-28.
- [30] Yang, D., Pornpattananankul, D., Nakatsuji, T., Chan, M., Carson, D., Huang, C.M., Zhang, L., 2009. The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*. *Biomaterials* **30**, 6035-6040.
- [31] Nakatsuji, T., Kao, M.C., Fang, J.Y., Zouboulis, C.C., Zhang, L., Gallo, R.L., Huang, C.M., 2009. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *J Invest Dermatol.* **129**, 2480-2488.
- [32] McGaw, L.J., Jäger, A.K., van Staden, J., 2002. Isolation of antibacterial fatty acids from *Schotia brachypetala*. *Fitoterapia* **73**, 431-433.
- [33] Huang, C.B., George, B., Ebersole, J.L., 2010. Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Arch. Oral Biol.* **55**, 555-560.
- [34] Valnet, J., 2001. Phytothérapie. 6ème édition Vigot, Paris.
- [35] Schauemberg, P., 2010. Guide des plantes médicinales : analyse, description et utilisation de 400 plantes. Delachaux et Niestlé.
- [36] AOAC., 1998. Fatty acid in oils and fats preparation of methyl ester boron trifluorid method. *J. A .O. A .C.* **969**, 33.
- [37] Skoog, D.A., West.D.M., Holler.F.J., 1997. Chimie analytique. 7ème. Ed. Deboek.

Chapitre III : Méthodologie des plans d'expériences pour l'estimation de l'activité antioxydante

1. Introduction

L'étude d'un phénomène revient souvent à s'intéresser à une grandeur particulière. Cette grandeur dépend d'un grand nombre de variables. L'expérimentation classique consiste à tester, individuellement l'ensemble de variables, par des expériences répétées la validité d'une hypothèse. Cependant une nouvelle stratégie d'expérimentation a été fondée par l'intégration de l'outil statistique. Depuis des années, les statistiques ont évolué dans plusieurs secteurs, dont l'analyse des données et les plans d'expériences. La méthodologie des plans d'expériences permet une recherche planifiée. Dans cette optique, l'expérimentation doit fournir l'information désirée avec le minimum d'effort, du temps et des essais, mais avec un maximum de précision l'influence de multiples facteurs sur une ou plusieurs réponses¹. C'est une démarche qui aide l'expérimentateur à mieux structurer sa recherche, à valider ses hypothèses à mieux comprendre les phénomènes étudiés et à trouver les solutions à ses problèmes.

En revanche, l'étude du phénomène de l'activité antioxydante, définit la capacité d'une substance à piéger des radicaux libres, à bloquer ou à ralentir la formation de ces radicaux, de les transformer en composés non toxiques et, également, sa capacité à résister au phénomène d'oxydation. Cette démarche a été appliquée dans différentes méthodes du pouvoir réducteur de fer (**FRAP**), radical **ABTS** (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) et le radical **DPPH** (2,2'-diphényl-1-picrylhyrazyl) pour évaluer cette activité biologique *in vitro*. Ainsi, une mise au point bibliographique sera présentée sur la méthodologie des plans d'expériences et celle du phénomène d'oxydation par la méthode du radical DPPH *in vitro*, pour aborder ultérieurement l'application du plan d'expériences au phénomène d'oxydation par la méthode choisie.

2. Méthodologie des plans d'expériences

2.1. Définitions et terminologies des plans d'expériences

La construction des plans et l'interprétation des résultats sont associées en grande partie aux différentes interactions variables-réponse rencontrées dans un phénomène ou un processus. En effet, la grandeur d'intérêt, qui est généralement notée **Y**, porte le nom de **réponse**. Les

variables qui peuvent modifier la réponse sont appelées *facteurs*. On parle donc des facteurs qui influent sur une réponse². Il existe différents types de facteurs², ils sont classés en :

- *facteurs contrôlés* auxquels on peut imposer un état déterminé à l'avance ;
- *facteurs mesurables* auxquels on ne peut pas imposer un état donné, mais dont on peut connaître précisément le niveau ;
- *facteurs constants* qui sont maintenus dans un état fixe au long de toutes les expériences ;
- *facteurs de bruit*, dont l'effet supposé ou réel, ne s'exerce que sur la dispersion ou la qualité des résultats (vieillesse du matériel, fatigue de l'opérateur, etc.).

On qualifie de réponse Y la grandeur observée pour chaque expérience réalisée et correspond à une variable de sortie du système étudié. La réponse d'une étude doit être de nature quantitative, car le traitement et l'analyse statistique des résultats d'essais en appliquant la méthodologie des plans d'expériences s'appuient sur des données exclusivement quantitatives.

L'ensemble des conditions expérimentales imposées aux facteurs est appelé *plan d'expérimentations*. La structure mathématique formelle dont le plan d'expérimentation est une application dans le monde réel est appelée *matrice d'expériences*. Elle est élaborée en utilisant des variables *sans dimensions ou codée*.

2.2. Démarche méthodologique du plan d'expériences

2.2.1. Démarche de la planification expérimentale

La planification des expériences est fondée sur l'objectif qu'on veut atteindre en choisissant la stratégie adéquate, tout en connaissant l'objectif relatif à chaque plan d'expérience² :

- Élaboration de modèles prédictifs : méthodologies des surfaces de réponses (**MSR**) : plan composite, plan de Doehert, plan de Box-Behnken... ;
- Recherche des facteurs et leurs interactions : plan factoriels complets (**PFC**) et fractionnaire (**PFF**) ;
- Recherche des facteurs influant ou criblage : plan d'Hadamard ou de Plackett et Burman.

Cette démarche expérimentale aide l'expérimentateur à mieux comprendre les phénomènes étudiés et à résoudre les problèmes. Les principales étapes² à suivre sont :

- Formaliser le problème et les objectifs ;
- Sélectionner les facteurs et leurs niveaux ;
- Établir la matrice d'expérience et plan d'expérimentation ;
- Réaliser les essais et mesurer les réponses ;
- Analyser les résultats ;
- Confirmer les résultats et appliquer.

2.2.2. Diagramme Ishikawa

Les premiers diagrammes causes-effet ont été développés par le professeur *Kaoru Ishikawa* en 1943. Ce type de diagramme est de ce fait également appelé diagramme d'*Ishikawa*, ou diagramme en arrêtes de poisson en raison de sa forme (**Figure III. 1**).

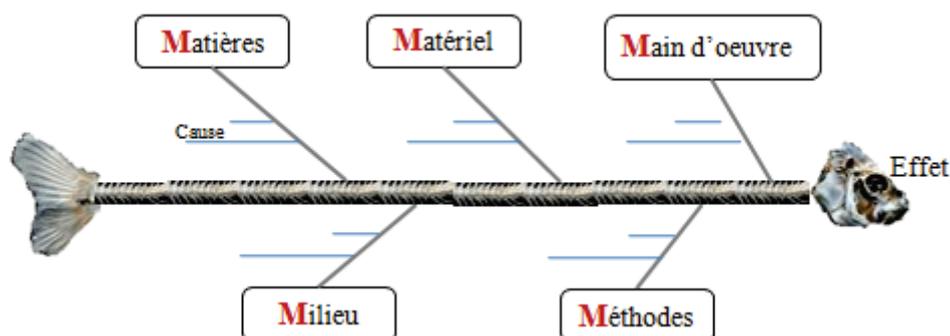


Figure III. 1 : Schéma du diagramme Ishikawa.

Ce diagramme est un outil puissant, il est utilisé pour identifier les causes d'un problème. Les familles de causes peuvent se définir autour des **5M** : **M**atières (matières premières, documents, données information, traçabilité...), **M**atériel (machine, outillage, maintenance, capacité...), **M**ain d'œuvre (qualification, formation, motivation, définition des missions...), **M**ilieu (infrastructure, espace, bruits, éclairage, prévention des risques...), **M**éthodes (règles de travail, procédures, protocoles, fiabilité des résultats...). Il est important de signaler que ce diagramme sera utilisé ultérieurement pour recenser l'ensemble des facteurs du phénomène à étudier.

2.2.3. Processus d'acquisition de connaissance

L'approche d'acquisition de connaissance suggérée par Goupy² conduit à la réalisation des buts dans les conditions optimales, tout en évitant la réalisation des expériences inutiles. L'acquisition progressive des connaissances évoque le processus de retour d'expériences (Figure III. 2).

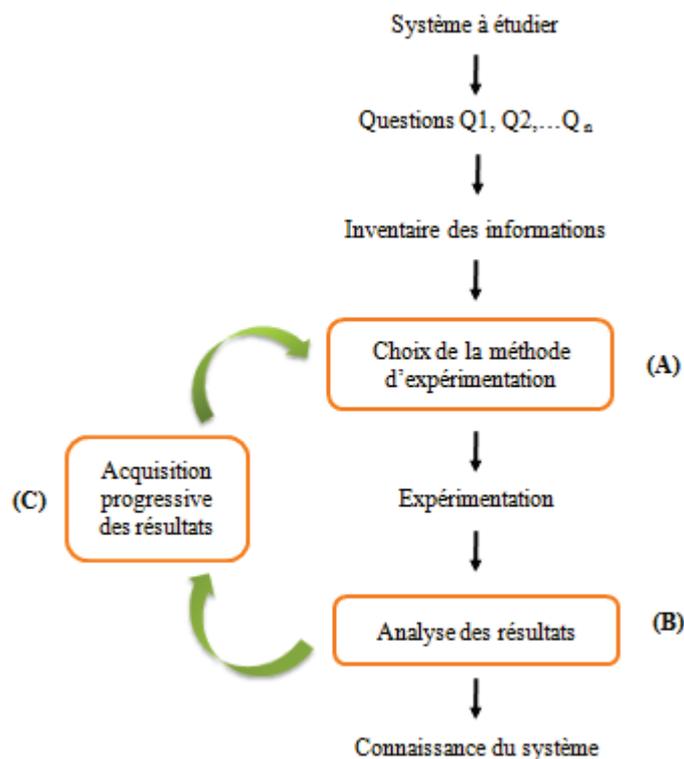


Figure III. 2 : Les plans d'expériences optimisent les trois parties (A), (B) et (C) du processus d'acquisition des connaissances².

Les trois aspects essentiels du processus d'acquisition des connaissances sont les suivants :

- le choix de la méthode d'expérimentation ;
- l'analyse des résultats ;
- l'acquisition progressive de la connaissance.

2.3. *Plan de criblage*

Les plans de criblages les plus connus sont les plans de Plackett et Burman. Les matrices de calcul de ces plans sont des matrices d'Hadamard. Ces matrices ne contiennent que des valeurs

codées -1 ou +1 et elles n'existent que pour N multiples de 4, c'est à dire des matrices ayant 4, 8, 16, 20...lignes³.

2.3.1. Construction du plan Plackett – Burman

Le principe de construction des plans de Plackett-Burman est basé sur la duplication de la ligne génératrice par simple permutation circulaire⁴. On trouve quatre permutations possibles : permutation par la gauche, permutation par la droite, permutation par le bas ou par le haut (Tableau III. 1).

Tableau III. 1 : Lignes génératrices des matrices du plan de Plackett-Burman.

k^*	N^*	Séquences de niveaux
≤ 3	4	+ + -
≤ 7	8	+ + + - + - -
≤ 11	12	+ + - + + + - - - + -
≤ 15	16	+ + + + - + - + + - - + - - -
≤ 19	20	+ + - - + + + + - + - + - - - - + + -
≤ 23	24	+ + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - -

* k : nombre de facteurs sélectionnés; N : nombre de facteurs à réaliser.

La méthode consiste à repérer la ligne génératrice de la matrice suivant le nombre de facteurs, ensuite on applique la permutation circulaire choisie pour générer l'ensemble des colonnes de la matrice d'expériences. Ainsi, pour obtenir le plan d'expérimentation : il suffit de remplacer les valeurs codées par leurs valeurs réelles. Avant l'expérimentation, une randomisation des essais est effectuée dont le but est de limiter d'éventuelles influences perturbatrices des facteurs non contrôlés.

2.3.2. Interprétation des résultats

Le principe de l'exploitation des résultats d'un plan de criblage repose sur l'analyse mathématique, l'analyse graphique et l'analyse statistique. L'analyse mathématique permet de calculer les coefficients du modèle mathématique, qui est un modèle polynomial de premier degré sans interactions⁵ est dit modèle additif (Équation III.1).

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i \quad \text{Équation III. 1}$$

La constante du modèle b_0 représente la valeur moyenne des observations, (Équation III. 2), et les coefficients b_i représentent les effets principaux⁶ (Équation III.3).

$$b_0 = \frac{\sum Y_i}{N} \quad \text{Équation III. 2}$$

$$b_i = \frac{\sum Y_i^+ - \sum Y_i^-}{N} \quad \text{Équation III. 3}$$

Tels que:

- $\sum Y_i^+$: somme des réponses de la variable X_i au niveau +1 ;
- $\sum Y_i^-$: somme des réponses de la variable X_i au niveau -1 ;

Ainsi, pour augmenter la réponse Y , il faut

- X_i au niveau +1 si $b_i > 0$;
- X_i au niveau -1 si $b_i < 0$.

L'analyse statistique se base sur les tests statistiques. Elle permet d'identifier les facteurs statistiquement significatifs à un seuil de signification α choisi, généralement 5%. L'analyse graphique des résultats facilite la restitution de l'information moyennant le tracé des effets moyens et le diagramme de Pareto qui seront générés par le logiciel du plan d'expériences Nemrodw⁷.

3. Activité antioxydante par la méthode du radical DPPH

Un radical libre est une molécule possédant un électron célibataire sur l'orbitale externe de ses atomes. Cette particularité lui confère une instabilité et une durée de vie très courte mais également une forte capacité à causer des dégâts oxydatifs cellulaires, ils sont en outre impliqués dans le vieillissement cellulaire, de l'apoptose et même au développement des processus pathologiques. L'estimation de l'activité antioxydante *in vitro* par la méthode du radical DPPH revient à Blois en 1958⁸. Le 2,2'-diphényl-1-picrylhyrazyl (DPPH) possède un électron célibataire sur un atome d'azote de la structure, il est soluble dans les solvants organiques. Du fait de cette délocalisation des électrons, les molécules du radical ne se polymérisent pas. Ainsi il reste toujours sous forme monomère⁹.

3.1. Principe de la méthode du DPPH

La méthode du DPPH par spectroscopie **UV-Visible** repose sur la mesure de la densité optique du radical DPPH libre, qui présente des groupements chromophores, dans le domaine spectral entre 515 et 520 nm, en obéissant à la loi de Beer-Lambert. Le radical DPPH présente en solution à l'état oxydé une couleur violacée foncée en solution. En présence d'un antioxydant, le 2,2'-diphényl-1-picrylhyrazyl (DPPH) se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH-H) (**Figure III. 3**) qui confère à la solution une coloration jaune, et par conséquent une diminution de l'absorbance. Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la forme libre en solution dépendent de la nature, de la concentration et de la puissance de la substance antioxydante^{9,10}. Il est important de signaler que la forme oxydée du radical DPPH en solution possède deux maxima d'absorption dans le domaine **UV-Visible** à environ 340 nm et 517 nm, mais sa forme réduite (DPPH-H) n'absorbe pas uniquement à 517 nm.

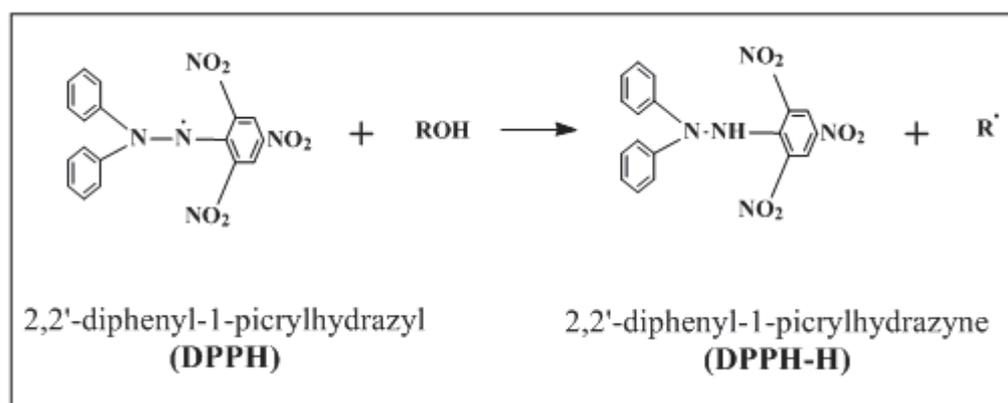


Figure III. 3 : Réaction symbolisant le principe de la méthode du DPPH.

3.2. Paramètres de mesures de l'activité antioxydante

Dans la littérature, on trouve deux approches pour estimer l'activité antioxydante par la méthode DPPH : l'approche cinétique et l'approche de l'EC₅₀.

3.2.1. Approche de l'EC₅₀

L'activité antioxydante est, généralement, exprimée par le terme EC₅₀, qui désigne la concentration efficace de l'antioxydant qui cause une réduction de 50% de la concentration initiale des radicaux. La valeur de l'EC₅₀ repose sur la détermination de l'indice de réduction de l'activité antioxydante (**RSA**), appelé également pourcentage d'inhibition.

Dans la littérature, ce paramètre est calculé par diverses équations (**Équation III : 4¹⁰ ; 5¹¹ ; 6^{12,13,14}**). L'interférence spectrale en spectroscopie **UV-Visible** est généralement définie par la superposition d'absorbance provenant des molécules (analyte / interférant). Dans la méthode du radical DPPH, elle est attribuée au couple radical DPPH / antioxydants. En effet, l'**Équation III. 4** est souvent utilisée dans le cas d'absence du phénomène d'interférence spectrale. Cependant, l'**Équation III. 5** fait intervenir l'absorbance de l'échantillon à tester donc elle est recommandée dans le cas d'interférence DPPH / antioxydants :

$$\%RSA = \frac{(A_0 - A_t)}{(A_0)} \times 100 \quad \text{Équation III. 4}$$

Avec:

A₀ : absorbance du radical DPPH avant l'ajout de l'antioxydant ;

A_t : absorbance du radical DPPH après ajout de l'antioxydant à l'instant **t**.

$$\%RSA = 100 - \left[\frac{(A_{\text{échantillon}} - A_{\text{blanc}}) \times 100}{(A_{\text{contrôle}})} \right] \quad \text{Équation III. 5}$$

Avec:

A_{échantillon} : absorbance de l'antioxydant ;

A_{blanc} : absorbance du blanc ;

A_{contrôle} : absorbance du radical DPPH avant l'ajout de l'antioxydant.

Le groupe de Yamamoto^{10,14,15} a défini l'indice de réduction de l'activité antioxydante en nombre de molécules du radical réduit par molécule d'antioxydant, **RSA(n)** appelé facteur stœchiométrique qui est donné par l'**Équation III. 6**. Ce paramètre tient compte de l'influence du rapport molaire^{12,15} radical / antioxydant sur l'activité antioxydante. En effet, cette activité est fortement dépendante de ce rapport :

$$RSA(n) = \frac{\Delta A_{120}}{A_0} \times \frac{[\text{Radical}]}{[\text{Antioxydant}]} \quad \text{Équation III. 6}$$

Avec :

A₀ : absorbance du radical DPPH avant l'ajout de l'antioxydant.

ΔA₁₂₀ : différence d'absorbance (**A₀ - A_t**) après 120 min de réaction ;

En outre, l'évaluation de la puissance antioxydante d'un tel extrait de plante constitue une alternative d'antioxydants de synthèse (**BHT** : butylhydroxytoluène, vitamine C...) dans divers secteurs (agroalimentaire, cosmologie...). Dans cette optique, l'approche la plus adoptée consiste à comparer les valeurs de l'**EC₅₀** ou de l'exprimer en équivalent de trolox ou d'acide gallique¹⁶ (**Équation III. 7**) :

$$\text{GEAC} = \frac{\text{EC}_{50}(\text{Antioxydant})}{\text{EC}_{50}(\text{acide gallique})} \quad \text{Équation III. 7}$$

Dans la littérature, on note une dispersion dans les valeurs de l'**EC₅₀** des standards, **BHT**, acide ascorbique, sésamol, α -tocophérol (**Tableau III. 2**).

Tableau III. 2 : Activité antioxydante **EC₅₀** du **BHT**, acide ascorbique, sésamol, α -tocophérol par le test **DPPH**.

Antioxydants standards	EC ₅₀ (μM)
Acide ascorbique	12 ; 284 ; 629
BHT	88 ; 193 ; 393
α -Tocophérol	63 ; 223
Sésamol	48 ; 168

Il apparait nettement que l'évaluation de la puissance d'un tel antioxydant n'est pas fiable par simple comparaison des valeurs de l'**EC₅₀**, tout en gardant à l'esprit la non-standardisation de la méthode d'analyse. Cependant, Scherer et Gody¹⁷ proposent un nouveau paramètre appelé indice de l'activité antioxydante (**AAI**) pour caractériser cette activité (**Équation III. 8**) :

$$\text{AAI} = \frac{\text{Concentration finale du DPPH}}{\text{EC}_{50}} \quad \text{Équation III. 8}$$

Ainsi, l'activité antioxydante est dite :

- **Faible** si : $\text{AAI} < 0,5$;
- **Moyenne** si : $0,5 < \text{AAI} < 0,1$;
- **Forte** si : $\text{AAI} > 2$.

Il est important de signaler que la relation entre la concentration de l'antioxydant et l'activité antioxydante ($[\text{antioxydant}] / \text{RSA} (\%)$) n'est pas linéaire pour toute la gamme de concentration de l'antioxydant. La linéarité est satisfaisante si la concentration maximale d'antioxydant donne **RSA (%)** inférieur ou égal à 70%^{18,19,20,21} ou si l'antioxydant obéit à une cinétique rapide²².

Néanmoins, toutes les situations expérimentales de la méthode du radical DPPH ne se traitent pas par une régression linéaire en utilisant la méthode de moindre carré (**MMC**) pour établir un modèle linéaire de type $y = a x + b$. Dans certains cas, il faut utiliser d'autres modèles pour décrire la relation existante entre x et y . Dans le même ordre d'idée, Monica et al.²³ traitent le problème par trois modèles statistiques à savoir « Probit-Logit, Probit-Angular » et « Logit-Angular ». Ainsi, la régression « Probit-Logit » donne une meilleure corrélation entre la concentration de l'antioxydant et l'activité antioxydante en comparaison avec les autres méthodes.

3.2.2. Approche cinétique

L'approche cinétique est définie par l'indice de l'efficacité anti radicalaire « **AE** »²⁴, en introduisant un paramètre cinétique noté $t_{EC_{50}}$. Ce paramètre définit le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre à la concentration de l'**EC₅₀** (**Équation III. 9**).

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \cdot t_{EC_{50}}} \quad \text{Équation III. 9}$$

A fin de bien caractériser la potentialité d'un tel antioxydant, ce groupe de chercheur ont introduit des critères d'évaluation. En effet, l'activité antioxydante est dite :

- **Faible** si : $AE \leq 10^{-3}$;
- **Moyenne** si : $10^{-3} < AE \leq 5 \cdot 10^{-5}$;
- **Forte** si : $5 \cdot 10^{-3} < AE \leq 10 \cdot 10^{-3}$;
- **Très forte** si : $AE > 10 \cdot 10^{-3}$.

Dans le même contexte, d'autres équipes^{25,26} caractérisent cette activité par le temps de demi-réaction $t_{\frac{1}{2}}$ et la constante de vitesse k . En effet, plus le temps de demi-réaction $t_{\frac{1}{2}}$ est petit et la valeur du k élevée, plus l'antioxydant est potentiellement bioactif.

3.3. Facteurs influençant la stabilité du radical DPPH

3.3.1. Stabilité du radical DPPH

En 1985, Blois⁸ mentionne que l'absorption dans le domaine **UV-Visible** du radical DPPH à la longueur d'onde $\lambda = 517$ nm dans l'éthanol est relativement stable dans le domaine du pH variant entre 5 et 6,5. Ce résultat est récemment confirmé par une autre équipe de recherche¹⁸ mais à $\lambda = 528$ nm dans un milieu micellaire. De plus, Blois⁸ indique que la conservation de la solution du DPPH doit être sous atmosphère d'azote et à l'abri de la lumière. Dans ces conditions, l'absorbance du radical DPPH peut être réduite de 2 à 4 % par semaine. Pour des raisons de stabilité, la solution de DPPH doit être préparée au moins une heure à l'avance, et elle ne se conserve pas plus de 4 à 5 jours à 5 °C et à l'obscurité²⁷. Cependant, Proll et Sutcliffe²⁸ ont mentionné que le radical DPPH est relativement stable dans les solvants organiques jusqu'à 80°C.

Ozcelik et al.²⁹ concluent que l'absorbance du radical DPPH à 517 nm est influencée par son exposition à la lumière, l'oxygène de l'atmosphère, le type du solvant et le **pH** du milieu. En effet en présence de l'énergie lumineuse, l'oxygène de l'atmosphère réagit directement avec le radical DPPH dissout dans le méthanol et entraîne une diminution de l'absorbance du DPPH. Mais, la lumière n'a pas d'effet significatif sur la stabilité du radical DPPH en milieu tamponné par comparaison au milieu non tamponné. Ces auteurs concluent que, le radical DPPH présente une meilleure stabilité en milieu tamponné et à l'obscurité. En conclusion, l'absorbance du radical DPPH est influencée par la lumière, le solvant, le **pH** et la température de conservation.

3.3.2. Cinétique de la décomposition du radical DPPH

Proll et Sutcliffe²⁸ notent que la vitesse de décomposition du DPPH dans l'éthanol, suit une cinétique du premier ordre sous atmosphère d'azote ou en présence de l'air. De plus, ces auteurs dégagent deux types d'interaction :

- Une interaction entre le solvant et le radical, DPPH / éthanol ;
- Une interaction DPPH/DPPH-H.

Les réactions dans l'éthanol avec le radical **DPPH** sont schématisées par les équations **Équation III. 10 ; 11 et 12.**



Avec :

A : DPPH ; **B** : EtOH ; **P**₁ = DPPH-H ; **P**₂ : C₂H₄OH ; K₁ et K₂ sont des constantes d'équilibres ; k₃ : constante de vitesse.

La forme intégrée de la loi cinétique selon Benson et al.³⁰ s'écrit :

$$\frac{1}{t} D_0 \cdot \ln \frac{D_0}{D_t} - \frac{(D_0 - D_t)}{t} = k \cdot \varepsilon \cdot \ell \quad \text{Équation III. 12}$$

Avec **D**₀ et **D**_t sont les absorbances de la molécule **A** à l'instant t = 0 et t respectivement, ε : coefficient d'extinction molaire, ℓ : trajet optique en cm et **k** est une constante de vitesse.

3.4. Facteur influençant l'activité antioxydante

3.4.1. Temps d'incubation

Le temps d'incubation est défini comme étant le temps nécessaire pour atteindre un état d'équilibre du système DPPH / antioxydant, il dépend de la nature et de la concentration de l'antioxydant à tester. On trouve trois types de comportement cinétique d'antioxydant :

- Antioxydant à comportement cinétique rapide ;
- Antioxydant à comportement cinétique intermédiaire ;
- Antioxydant à comportement cinétique lent.

Les groupes de chercheurs de Brand-Williams³¹ et Sanchez-Moreno²⁶ suggèrent deux critères d'évaluation du comportement cinétique des antioxydants : temps nécessaire pour atteindre l'état stable et **t**EC₅₀. Ces deux paramètres permettent d'établir une classification des molécules antioxydantes (**Figure III. 4**).

Le temps d'incubation varie de 5 à 120 min (5 min^{32,33}; 10 min³⁴; 20 min^{25,35,36}; 30 min^{37,38,39}; 60-120 min^{36,40}). Certains auteurs supposent que 30 min est suffisante pour atteindre l'état d'équilibre et calculer **EC**₅₀. En revanche, l'équipe de Brand-Williams³¹ conclut que la détermination de la valeur de l'**EC**₅₀ après 30 min est incorrecte pour les antioxydants à comportement cinétique lent, car la réaction est en cours d'évolution. La vitesse de la réaction

varie considérablement avec la structure de l'antioxydant. Cette constatation a été confirmée par d'autres travaux^{10,41,42}. De plus, les chercheurs Ingold¹⁷ et Cristina¹² trouvent que le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre diminue, en augmentant la concentration de l'antioxydant. En effet, l'activité antioxydante est fortement dépendante du rapport molaire (**Rm**) qui est égal au rapport de la concentration de l'antioxydant par celle du radical. A la lumière de ces travaux, on peut conclure que le temps d'incubation ne doit pas être plus long que le temps nécessaire pour que la réaction s'achève.

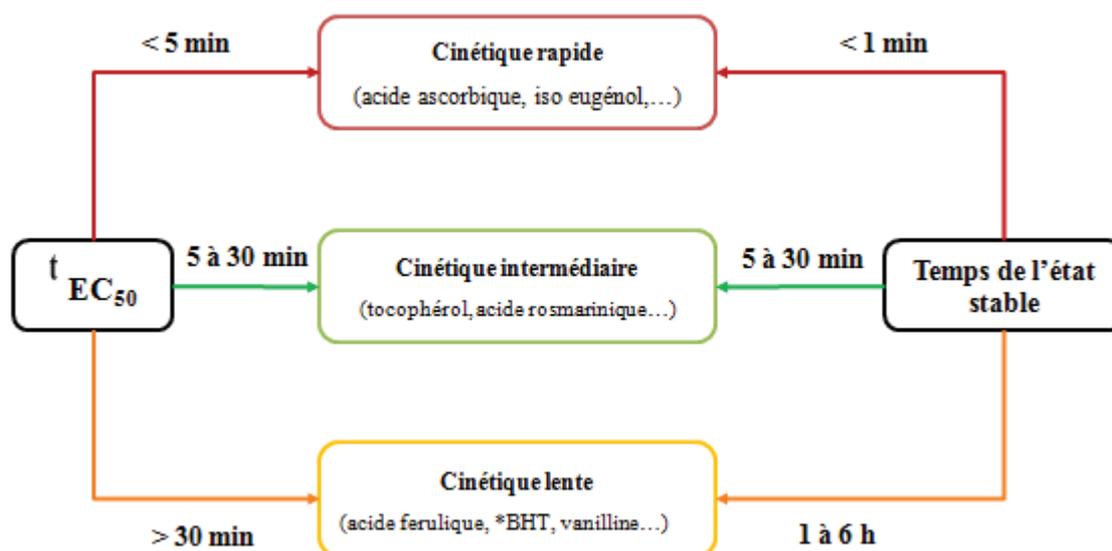


Figure III. 4 : Classification des antioxydants selon leur comportement cinétique, (*) : BHT : 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol

3.4.2. Effet de solvant

La nature du solvant influe sur la cinétique de la réaction DPPH / antioxydant. En effet, l'équipe d'Andrzej⁴² trouve que le chloroforme accélère la cinétique de la réaction DPPH / BHT, alors que l'acétate d'éthyle retarde la cinétique de cette réaction (**Figure III. 5**).

Sendra et al.⁴³ notent que le profil cinétique du DPPH / taxifoline dans les solvants alcooliques : méthanol, éthanol et propanol, est caractérisé par une étape rapide et une étape lente qui est absente dans l'acétonitrile. L'effet de solvant pourrait être expliqué par la différence de stabilisation de la charge du radical par formation de liaison hydrogène⁴⁴, ou attribué à la constante diélectrique du solvant⁴⁵, qui modifie les valeurs des constantes d'acidité (**pKa**). Cependant, le phénomène de l'effet cinétique du solvant au cours d'une réaction de

Chap. III : Méthodologie des plans d'expériences pour l'estimation de l'activité antioxydante
 neutralisation d'un radical (Y^{\bullet}) par un antioxydant (A) a été décrit par une équation empirique^{16,46,47} (Équation III. 13).

$$\log k_A^S = \log k_{A/Y^{\bullet}}^0 - 8,3 \alpha^H_2 \beta^H_2 \quad \text{Équation III. 13}$$

Avec :

k_A^S : constante de vitesse de la réaction de l'antioxydant (A) avec le solvant (S) ;

$k_{A/Y^{\bullet}}^0$: constante de vitesse de la réaction de l'antioxydant (A) avec le radical Y^{\bullet} ;

α^H_2 : caractérise la capacité relative *antioxydant* d'être *donneur* de liaison hydrogène ;

β^H_2 : caractérise la capacité relative *d'un solvant* d'être *accepteur* de liaison hydrogène.

Ce phénomène dépend de la valeur de β^H_2 du solvant et du solvant et non pas de la réactivité du radical.

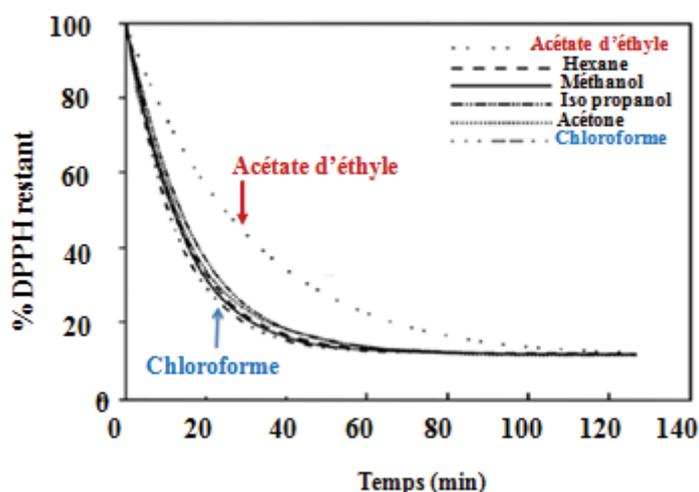


Figure III. 5 : Effet de certains solvants sur la cinétique de la réaction DPPH / BHT.

3.4.3. Effet du pH

Le **pH** du milieu affecte la valeur de l' EC_{50} , la cinétique de la réaction et l'état d'ionisation de la molécule antioxydante. En effet, la valeur d' EC_{50} de la réaction de l'acide ascorbique avec le DPPH (10^{-10} μ M) diminue en milieu tampon citrate (0,1 mM, 60% éthanol, 40% tampon, $EC_{50} = 3.3 \cdot 10^{-5}$ M) et à **pH** = 5, par comparaison en milieu non tamponné (100% éthanol, $EC_{50} = 4.8 \cdot 10^{-5}$ M). Cette diminution indique que l'activité antioxydante de l'acide ascorbique est meilleure en milieu tamponné. Par contre son dérivé « 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic

acid » réagit avec le DPPH en phénomène inverse (en milieu tamponné : $EC_{50} = 47 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; en milieu 100% éthanol : $EC_{50} = 4.4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$)⁴⁷. En variant la valeur du **pH** de 3 à 5 en milieu tampon citrate (10 mM) dans l'éthanol avec les proportions 60% éthanol, 40% tampon et à concentration du DPPH égale à 100 μM , les résultats montrent que l'activité antioxydante, exprimée par **RSA (n)**, de l'acide ascorbique n'est pas influencée par le **pH** alors que celle de ses dérivés est importante à **pH = 5**¹³.

Riccardo et al.⁴⁸ constatent que l'inhibition de la peroxydation par des acides phénoliques et des esters est mauvaise en milieu acide. En effet l'augmentation du **pH** est accompagnée par une amélioration de l'activité antioxydante qui devient comparable à celle du trolox ou meilleure. Cette augmentation de l'activité est observée aux valeurs de **pH** proche de la valeur des **pKa** de ces acides phénoliques (cas de l'ion phénolate).

D'après l'équipe de Noipa¹⁷, la cinétique de la réaction radical / antioxydant dépend de la concentration des ions **H⁺** donc du **pH**. Généralement l'augmentation de la concentration des ions **H⁺** provoque une diminution de la cinétique de la réaction DPPH / antioxydant par comparaison à celle de la réaction dans le méthanol. En plus, ils trouvent qu'en milieu micellaire, dans le but de déterminer l'activité antioxydante des molécules à caractère hydrophobe et hydrophile, l'élévation de la concentration du tampon acétate est accompagnée de l'augmentation de l'activité biologique. De plus, ils trouvent que l'augmentation de la concentration du tampon acétate en milieu micellaire provoque une élévation de l'activité antioxydante.

3.4.4. Effet de la structure

Il a été prouvé que la propriété antioxydante des poly phénols est reliée à leurs structures chimiques^{49,50}. En effet, l'activité antioxydante augmente avec le nombre de groupements hydroxyles^{51,52} et dépend aussi de la position du groupement **OH** de la structure de base des flavonoïdes (**Figure III. 6**). En effet, la présence du groupement **OH** en position 5 et 7 semble être sans effet, lorsqu'un hydroxyle en position 3 est lié à une double liaison **C=C** dans le cycle C élève l'activité antioxydante de la molécule, de la présence d'hydroxyle sur le cycle B et C favorise cette activité⁵³.

Récemment, l'équipe de Mishra⁵⁴ conclut que le nombre de groupements **OH** n'est pas le seul facteur déterminant de cette activité en termes de réactivité. Le sésamol est un monophénol qui réduit deux molécules de DPPH au bout de 5 à 10 min. L'acide gallique est un acide phénolique trihydroxylé qui peut réduire environ 7 molécules du radical DPPH au bout de 30 min. Par contre Goupy et al.²⁶ ont attribué la différence de réactivité des poly phénols étudiée

à l'effet de l'encombrement stérique sur la vitesse de transfert du proton, à la conformation structurale des unités de monomères et dimères et au rapport molaire antioxydant/DPPH.

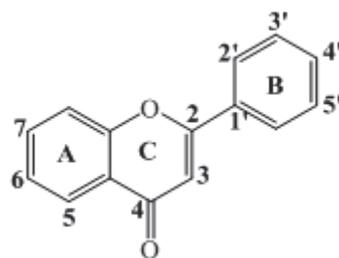


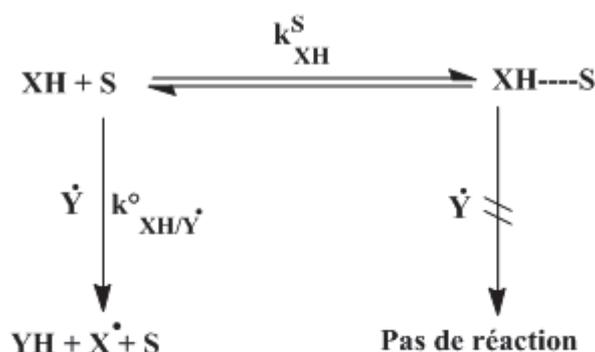
Figure III. 6 : Structure de base des flavonoïdes.

3.5. Mécanismes réactionnels

Il existe trois mécanismes réactionnels qui pourraient expliquer l'activité antioxydante, qui sont notés **HAT** pour « Hydrogen Atom Transfer », **SPLET** pour « Sequential Proton Loss Electron Transfer » et **PCET** « Proton coupled Electron Transfer »^{16,47,55,56}.

3.5.1. Mécanisme de type HAT

Le mécanisme HAT est un processus fondamental au phénomène d'oxydation, qui exige la présence d'un radical libre et d'un atome d'hydrogène labile. Le radical libre se neutralise en captant un atome d'hydrogène créant ainsi un nouveau site radicalaire^{16,47}.



k_{XH}^{S} : constante de vitesse de la réaction de l'antioxydant (XH) avec le solvant (S).

$k_{\text{XH/Y}}^{\circ}$: constante de vitesse de la réaction de l'antioxydant (XH) avec le radical ($\text{Y} \cdot$).

Figure III. 7 : Mécanisme réactionnel de type HAT⁴⁷.

3.5.2. Mécanisme de type SPLET

Le mécanisme SPLET a été mis en évidence par Foti et al.⁵⁵, ce mécanisme est une extension au mécanisme HAT (**Figure III. 7**). Au cours de ce processus, il se forme une liaison hydrogène entre l'antioxydant (**HX**) et le solvant (**S**). La rupture de cette liaison par le biais d'un transfert de proton (**TP**) conduit à une paire d'ions (HS^+ , X^-). Le radical X^\bullet résulte d'un transfert d'électron (**TE**) entre l'anion X^- et le radical $\text{Y}^\bullet \leftrightarrow \text{DPPH}^\bullet$. Cette séquence est achevée par un mécanisme HAT.

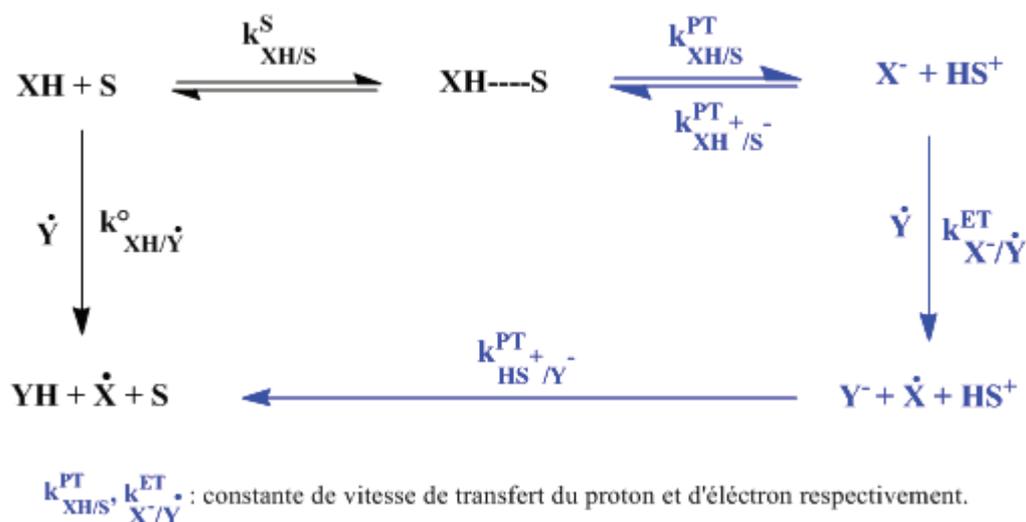


Figure III. 7 : Mécanismes réactionnels HAT et SPLET et effet de solvant^{47,56}.

3.5.3. Mécanisme de type PCET

Au cours de ce mécanisme, le transfert du proton et de l'électron se produit de deux sites différents, donneurs de charge, vers deux sites distingués, accepteurs de charges. Ce type de mécanisme est influencé par le **pH** du milieu, de la nature de solvant et de la température⁵⁶.

3.5.4. Exemple d'étude : phénol / DPPH

La représentation graphique $\log k_{\text{A}}^{\text{S}} = f(\beta^{\text{H}_2})$ ⁴⁷ de l'**Équation. 13** renseigne sur le mécanisme réactionnel. En effet, les deux mécanismes réactionnels HAT et SPLET^{56,47} ont été proposés pour expliquer la réaction phénol / DPPH. La contribution du mécanisme de type HAT ou de type SPLET (**Figure III. 7**), dépend à la fois de la nature du solvant et celle de l'antioxydant. Le mécanisme de type HAT domine le mécanisme SPLET dans les solvants à

faible constante diélectrique, à faible affinité électronique et celui qui favorise la formation d'ion phénolate dans le cas du système phénol / DPPH. En effet la vitesse de la réaction du système phénol / DPPH est influencée par :

- la formation de la liaison hydrogène ;
- l'affinité électronique et la réactivité du radical ;
- la solvataion de l'anion phénolate par le solvant.

4. Conclusion

Les plans d'expériences permettent une diminution du nombre d'essais et une interprétation rapide et sans équivoque en fournissant des résultats faciles à présenter. Cette méthodologie offre de plus les avantages suivants :

- possibilité d'étudier un grand nombre de facteurs ;
- détections des interactions éventuelles ;
- modélisation aisée des résultats ;
- déterminations des résultats avec bonne précision

L'objectif principal de la méthode de plan d'expériences peut être résumé par la devise : "obtenir un maximum d'information en un minimum d'expériences". La détermination de l'activité antioxydante par le test DPPH est évaluée par diverses méthodes analytiques. La non-standardisation de la méthode réside dans la représentation des résultats et les conditions opératoires, particulièrement celles relatives au milieu réactionnel dépourvu d'antioxydant. Ainsi, nous pensons à concevoir un protocole expérimental qui vise à standardiser la méthode de DPPH en adoptant la méthodologie de plan d'expériences, plan du criblage.

Références bibliographiques

- [1] Bieke Dejaegher, Y.V.H., 2011. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *J. Pharmaceut. Biomed.* **56**, 141-158.
- [2] Goupy, J., 2005. Introduction aux plans d'expériences. 5ème éditions, Dunod, Paris.
- [3] Plackett, R., Burman, J., 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* **33**, 305-325.
- [4] Quinlan, K.R., Lin, D.K.J., 2015. Run order considerations for Plackett and Burman designs. *J. Stat. Plan Infer.* **165**, 56-62.
- [5] Giordano, P.C., Beccaria, A.J., Goicoechea, H.C., 2011. Significant factors selection in the chemical and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues by a genetic algorithm analysis and comparison with the standard Plackett–Burman methodology. *Bioresource Technol.* **102**, 10602–10610.
- [6] El Ati-Hellal, M., Hellal, F., Hedhili, A., 2014. Application of Plackett–Burman and Doehlert designs for optimization of selenium analysis in plasma with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Clin. Biochem.* **47**, 95-100.
- [7] Mathieu, D., Nony, J., Phan-tan-Luu, R., 2000. New efficient methodology for research using optimal design (NEMRODW) software. Marseille: L.P.R.A.I.
- [8] Blois, M.S., 1959. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- [9] Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **26**, 211-219.
- [10] Cristina, P., Ilonka, S., Bartek, T., 2009. Évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Rev. Gen. Indus.* **4**, 25-39.
- [11] Vlassios, G., Ana Maria, G.C., Vassiliki, E., Ioannis, P.G., Antonio, S.C., Alberto, F.G., 2012. Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection. *Food Sci. Technol.* **46**, 104-109.
- [12] Jun, T., Akihiro, T., Yamamoto, I., 2002. Long-term radical scavenging activity of AA-2G and 6-Acyl-AA-2G against 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1503-1505.
- [13] Jun, T., Akihiro, T., Yamamoto, I., 2003. pH-dependent long-term radical scavenging activity of AA-2G and 6-Octa-AA-2G against 2,29-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1368-1370.
- [14] Jun, T., Akihiro, T., Eiichi, G., Yamamoto, I., 2006. Characterization of the radical-scavenging reaction of 2-O-substituted ascorbic acid derivatives, AA-2G, AA-2P, and AA-2S: a kinetic and stoichiometric study. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 766-771.

[15] Ingold, K.U., Grzegorz, L., 2005. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 3. Novel kinetics in sequential proton loss electron transfer chemistry. *J. Org. Chem.* **70**, 8982-8990.

[16] Noipa, T., Srijaranai, S., Tuntulani, T., Ngeontae, W., 2011. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micellar systems. *Food Res. Inter.* **44**, 798–806.

[17] Scherer, R., Godoy, T., 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.* **112**, 654-658.

[18] Eklund, P.C., Långvik, O.K., Wärnå, J.P., Salmi, T.O., Willför, S.M., Sjöholm, R. E., 2005. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging of lignans. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 3336-3347.

[19] Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 4290-4302.

[20] Villaño, D., Fernández-Pachó, M.S., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C., 2005. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Anal. Chim. Acta.* **538**, 391–398.

[21] Buenger, J., Ackermann, H., Jentzsch, A., Mehling, A., Pfitzner, I., Reiffen, K.A., 2006. An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials. *Inter. J. Cosmc Sc.* **28**, 135–146.

[22] Sendra, J.M., Enrique, S., Navarro, J.L., 2006. Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *Eur. Food Res. Technol.* **223**, 615–624.

[23] Monica, L., Roberto, G., Fabiano, T., Jean-Daniel, C., Maurizio, R., Marco, A., 2009. Study of the DPPH scavenging activity: development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chem.* **114**, 889- 897.

[24] Sanchez-Moreno, C., Jose, A.L., Fulgencio, S.C., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food. Agric.* **76**, 270-276

[25] Juan Carlos, E., Cristina, S.R., Harry, J.W., 2000. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 648-656.

[26] Goupy, P., Claire, D., Michele, L., Olivier. D., 2003. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 615-622.

[27] Popovici, C., Ilonka, S., Bartek, T., 2009. Évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Rev. Gen. Indus.* **4**, 25-39.

- [28] Proll, P.J., Sutclif, L.H., 1963. Kinetics of the decomposition of DPPH in some non-aqueous solvents. *RSC Publishing*.
- [29] Ozcelik, B., Lee, J.H., Min, D.B., 2003. Effects of Light, Oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Food Chem. Toxicol.* **68**, 487-490.
- [30] Benson, Sutcwe, Walkley, 1959. *J. Amer. Chem. SOC.* **81**, 4488.
- [31] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a Free Radical Method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wissu. Technol.* **28**, 25-30.
- [32] Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J.L., Duriez, P., Teissier, E., Cotelle, N., 2000. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radical Bio. Med.* **29**, 900-912.
- [33] Govindarajan, R., Rastogi, S., Vijayakumar, M., Shirwaikar, A., Rawat, A.K.S., Mehrotra, S., et al., 2003. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1424-1427.
- [34] Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L.R., Gardner, P.T., Heinonen, M.I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L.H., Tijburg, L., 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds, *Eur. Food Res. Technol.* **212**, 319-328.
- [35] Karioti, A., Hadjipavlou-Litina, D., Mensah, M.L., Fleischer, T.C., Skaltsa, H., 2004. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopiya aethiopica*(Dun) A. Rich. (*Annonaceae*) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 8094-8098.
- [36] Mimura, T., Yazaki, K., Sawaki, K., Ozawa, T., & Kawaguchi, M., 2005. Hydroxyl radical scavenging effects of guaiacol used in traditional dental pulp sedation: Reaction kinetic study. *Biomed. Res-Tokyo* **26**, 139-145.
- [37] Sharma, O.P., Bhat, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* **113**, 1202-1205.
- [38] Alma, M.H., Mavi, A., Yildirim, A., Digrak, M., Hirata, T., 2003. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 1725-1729.
- [39] Kim, H.J., Chen, F., Wu, C., Wang, X., Chung, H.Y., Jin, Z., 2004. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2849-2854.
- [40] Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., & Simin, N., 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*) essential oil. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2485-2489.

[41] Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C., 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Food Sci. Technol.* **30**, 609-615.

[42] Dawidowicz, A.L., Dorota, W., Małgorzata, O., 2012. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH-method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chem.* **131**, 1037–1043.

[43] Sendra, J.M., Enrique, S., Joseã, L.N., 2007. Kinetic model for the antiradical activity of the isolated p-catechol group in flavanone type structures using the free stable radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl as the antiradical probe. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 5512-5522.

[44] Valgimigli, L., Banks, J.T., Ingold, K.U., Lusztyk, J., 1995. Kinetic solvent effects on hydroxylic hydrogen atom abstractions are independent of the nature of the abstracting radical. two extreme tests using vitamin E and phenol. *J. Amer. Chem. Soc.* **117**, 9966-9971.

[45] Ingold, K.U., Litwinienko, G., 2003. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. the reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) in alcohols., *J. Org. Chem.* **68**, 3433-3438.

[46] Ingold, K.U., Litwinienko, G., 2007. Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals, *Acc. Chem. Res.* **40**, 222-230.

[47] Fujinami, Y., Tai, A., Yamamoto, I., 2001. Radical scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl of ascorbic acid 2-glucoside (AA-2G) and 6-acyl-AA-2G, *Chem. Pharm. Bull.* **49**, 642-644.

[48] Riccardo, A., Gian, F.P., Luciana, C., Laura, Z., Laura, L., 2006. Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2932-2937.

[49] Rice-evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res.* **22**, 375-383.

[50] Van Acker, S.A.B.E., Van Den, B.J., Tromp, M.L.N.J.L., Griffioen, D.S.E.H., Van Bennekom, W.P., Van Der Vijgh, W.J.F., Bast, A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Bio. Med.* **20**, 331-342.

[51] Torel, J., Cillard, J., Cillard, P., 1987. Antioxidant activity of flavonoides and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* **252**, 383-385.

[52] Hundon, B., Lewis, J.I., 1990. Polyhydroxy flavonoides antioxydants for edibles oils, structural criteria for activity. *Food Chem.* **10**, 47-55.

[53] Brasseur, T., Angenot, L., Princemai, J., Deby, C., 1986. Propriétés antioxydantes, antipopé oxydantes de flavonoides. *Bulletin de liaison du groupe polypénols* **13**, 557-559.

[54] Mishra, K., Himanshu, O., Nabo, K.C., 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: a critical review and results. *Food Chem.* **130**, 1036–1043.

[55] Foti, M.C., Daquino, C., Geraci, C., 2004. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.* **69**, 2309-2314.

[56] Huynh, M.H.V., Meyer, T.J., 2007. Proton-Coupled Electron Transfer. *Chem. Rev.* **107**, 5004-5064.

Chapitre IV : Présentation des divers protocoles expérimentaux

1. Introduction

Un protocole expérimental consiste à décrire de façon claire et précise tous les besoins nécessaires pour l'exécution de l'analyse quel que soit le domaine d'étude : chimie biologique, physique... Ainsi, la conception et le choix du protocole expérimental constituent des étapes clefs de l'investigation scientifique. Afin de garantir la fiabilité de résultats d'analyses, il est recommandé d'utiliser des méthodes analytiques selon des normes internationales ou validées.

Cependant, l'étude phytochimique se fait selon une cascade d'étapes successives (extraction, purification, isolement, caractérisations chimiques et tests biologiques). Dans ce chapitre, on résume l'ensemble des protocoles expérimentaux utilisés.

2. Protocole expérimental d'analyse de l'huile essentielle

Suivant les données bibliographiques, l'étude de l'huile essentielle sera limitée à l'espèce d'*A. longa*.

2.1. Matériel végétal

L'espèce d'*A. longa* a été récoltée dans le Parc National de El Feija (latitude : "36° 36' 55" (N); longitude "8° 25' 7" (E); altitude 400 m). Les échantillons collectés sont enregistrés aux dates de collecte comme suit : les racines sont notées R09 (aout 2009), R11 (septembre 2011), R12 (mars 2012) et R13 (avril 2013) et ceux des parties aériennes sont notés F12 (mars 2012) et F13 (avril 2013). Ils sont séchés dans un endroit aéré et à l'abri de la lumière. Puis, ils ont été stockés dans des boites en carton épais.

2.2. Processus d'extraction d'huile essentielle

L'huile essentielle est obtenue par hydrodistillation de type Clevenger (5 h). Dans un ballon rodé, on introduit de l'eau distillée (1 L) et de la matière végétale (50-100 g), finement broyée. Le mélange est porté à l'ébullition. Les principes volatils sont entraînés par la vapeur d'eau puis condensés à l'aide d'un réfrigérant. Les constituants volatils, étant moins denses que l'eau, seront récupérés, soit par décantation, soit par ajout d'un solvant volatil non miscible et moins dense que l'eau. La phase organique obtenue est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée puis concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif¹. Ces huiles sont conservées au

congélateur dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement à -20 °C et à l'ombre pour des analyses chimiques et biologiques ultérieures. Les échantillons d'huile essentielle issus des racines sont notés R09, R11, R12 et ceux des parties aériennes sont notés F12 et F13.

2.3. Fractionnement de l'huile essentielle et réaction d'acylation

Le fractionnement de l'huile essentielle (1,30 g) a été effectué sur colonne ouverte de silice en utilisant comme solvant un gradient pentane/éther diéthylique de polarité croissante. L'ensemble des fractions obtenues a été analysé par GC-MS dans les mêmes conditions opératoires décrites ultérieurement. L'analyse préliminaire des spectres de masses révèle la présence de deux molécules non identifiables **X1** et **X2** dans les fractions F2 et F5 respectivement. Ces fractions sont obtenues par un gradient de 90/10 et 75/25 (pentane / éther diéthylique).

Par hypothèse, on suppose que **X2** est l'ester correspondant du composé **X1**. En effet, on fait réagir l'alcool **X1** avec l'anhydride acétique (200 µL) en présence d'une amine tertiaire comme la pyridine (200 µL), pendant 24 h sous agitation à température ambiante. Ensuite, on ajoute de l'eau acidulée (pH = 1) puis on procède à des extractions multiples par l'éther (10 mL), un lavage par l'eau (pH = 7) et un séchage par le sulfate de sodium anhydre.

2.4. Méthodes d'analyses chimiques et biologiques

La composition chimique des huiles essentielles a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et la détermination quantitative a été effectuée sur un appareil équipé d'un détecteur à ionisation de flamme GC-FID. Mais, l'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion de disque.

2.4.1. Analyses GC-FID

Les analyses GC-FID ont été effectuées en utilisant un chromatographe de type HP-6890, Agilent Technologies. Les conditions opératoires sont :

- Colonnes capillaires : HP-1 (apolaire) ; 50 m x 0.32 mm x 0.5 µm et HP-Innowax (polaire) ; 60 m x 0,32 mm (id), épaisseur du film 0,5 µm ;
- Gaz vecteur : Hélium : débit de 1,5 mL min⁻¹ ;
- Température de l'injecteur et du détecteur : 250°C ;

- Programmation du four : 80°C pendant 8 min, 2°C/min jusqu'à 220°C, 10°C/min jusqu'à 295°C (palier 10 min), sur HP-1. Sur HP-Innowax : 60°C (2 min), 2°C/min jusqu'à 245°C (palier 35 min) ;

- Volume d'injection : 2 µL injecté en mode split (1:25).

La quantification a été acquise par le calcul des aires relatives obtenues par rapport à l'aire totale du chromatogramme à l'aide du logiciel "Chemstation Agilent Instrument".

2.4.2. Analyses GC-MS

Les analyses GC-MS ont été effectuées en utilisant un chromatographe de type HP-6890, Agilent Technologies, couplé à un spectromètre de masse HP-59-75, Agilent Technologies.

Les conditions opératoires sont :

- Colonnes capillaires : HP-1 ; 50 m x 0,32 mm (id), épaisseur du film 0,25 µm ;
- Gaz vecteur : hélium : un débit de 1,5 mL min⁻¹ ;
- Température de l'injecteur : 250°C ;
- Programmation du four : 50°C pendant 10 min, rampe de 5°C/min jusqu'à 315°C ;
- Volume d'injection : 2 µL injecté en mode split (1:25) ;
- Mode d'acquisition : Full scan (35-550 m/z) ;
- Énergie d'ionisation : 70 eV.

L'identification des composés a été réalisée par comparaison de leurs spectres de masse et de leurs indices de rétentions KI avec ceux des bases de données Adams, NIST² et celle établie par notre laboratoire.

2.4.3. Spectroscopie RMN

Les spectres RMN ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker 400 Avance (9,4 Tesla) équipé d'une sonde de 5 mm et dans des solvants deutérés. Les spectres RMN-¹H ont été enregistrés avec les paramètres suivants : angle d'impulsion 30°, délai de relaxation 1s, temps d'acquisition = 2,6 s correspondant à une acquisition de 32 K. Le nombre d'accumulations est compris entre 16 et 32 pour chaque enregistrement. Le temps nécessaire à l'enregistrement des

spectres est 2 min environ. Les cartes RMN-2D (**HSQC**, **HMBC**, **NOESY** et **COSY H-H**) ont été enregistrées par des séquences d'impulsion définies par les programmes Bruker (Top spin).

2.4.4. Évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion de disque

Les souches bactériennes à tester sont *Escherichia coli* ATCC 8739 Gram⁽⁻⁾, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 Gram⁽⁻⁾, *Enterococcus faecium* ATCC 19434 Gram⁽⁺⁾, Streptocoque B (*Streptococcus agalactiae*) Gram⁽⁺⁾, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 Gram⁽⁺⁾ et *Candida albicans* ATCC 10231. Elles sont reprises dans un milieu nutritif agar non inhibiteur afin d'obtenir des colonies isolées. Après incubation à 37°C pendant une nuit, 4 à 5 colonies bien isolées sont transférées dans une solution saline. La suspension bactérienne est ajustée en comparaison à un standard Mc Farland 0,5 (~10⁸ UFC/ml). Après l'ajustement, un écouvillonnage est réalisé et la surface bactérienne est séchée pendant au moins 30 min à l'air libre. Des disques de papier Wattman sont placés sur le tapis bactérien à l'aide d'une pince stérile en appliquant une légère pression sur l'agar, puis des prises de 15 µL des extraits à étudier sont déposées sur les disques. Le contrôle positif utilisé est un agent antimicrobien standard qui est l'ampicilline pour toutes les souches Gram⁽⁺⁾ et Gram⁽⁻⁾ et la nystatine pour *C. albicans*. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 h. Les résultats sont exprimés en mm (diamètre d'inhibition inclue le diamètre de disque).

3. Protocole expérimental d'analyse des acides gras

3.1. *Préparations des fractions lipidiques et des esters méthyliques des acides gras*

3.1.1. Préparation des fractions lipidiques

Aristolochia longa (A) et *Bryonia dioïca* (B) ont été récoltés au mois de mars (2012) L'extrait organique riche en lipides résulte de l'épuisement par l'hexane d'un broyât de plantes, racines (R) et parties aériennes dépourvues de fruits (F), séchées à l'air libre, à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après filtration et évaporation du solvant sous vide à 40°C, l'extrait récupéré est séché sous flux d'azote à température ambiante. Les échantillons obtenus sont indexés AR, AF, BR et BF et conservés à -20 °C pour des analyses chimiques et biologiques ultérieures.

3.1.2. Préparation des esters méthyliques des acides gras

Les esters méthyliques des acides gras sont préparés selon la méthode standard **AOAC**³. La méthode consiste à soumettre l'extrait lipidique obtenu précédemment à l'action de l'hydroxyde

de potassium méthanolique (0,5 M), sous reflux à 70°C pendant 10 min. Après refroidissement, une solution de BF₃ (10%) dans le méthanol a été ajoutée et le mélange a été remis de nouveau sous reflux pendant 5 min. Les esters méthyliques des acides gras libérés sont ainsi récupérés par l'hexane et enfin séchés avec Na₂SO₄ avant d'être analysés par **GC-FID** et **GC-EI-MS**.

3.2. Méthodes d'analyses chimiques et biologiques

3.2.1. Analyses GC-FID

Les analyses **GC-FID** ont été effectuées en utilisant un chromatographe en phase gazeuse de type "Agilent 6890". Les conditions opératoires sont :

- Colonnes capillaires : HP-Innowax; 60 m x 0,32 mm (id), épaisseur du film 0,5 µm ;
- Gaz vecteur : Hélium : débit de 1,3 mL min⁻¹ ;
- Température de l'injecteur et du détecteur : 250°C ;
- Programmation du four : 60°C pendant 2 min, monté de 2°C/min jusqu'à 250°C puis un palier 20 min ;
- Volume d'injection : 1 µL injecté en mode split (25 :1).

La quantification a été acquise par la détermination des aires relatives obtenues par rapport à l'aire totale du chromatogramme à l'aide du logiciel "Chemstation Agilent Instrument".

3.2.2. Analyses GC-MS

Les analyses **GC-EI-MS** ont été effectuées en utilisant un chromatographe gaz (HP-6890), couplé à un spectromètre de masse (HP-59-75, Agilent). Les conditions opératoires de la séparation chromatographique sont identiques à celles de la méthode précédente. Les spectres de masse ont été réalisés par impact électronique à 70 eV, la température de la source d'ionisation et celle de l'analyseur, type quadripôle, sont maintenues à 230°C et à 150°C respectivement. L'acquisition des spectres a été réalisée entre 35 - 550 Da. L'identification des acides gras a été réalisée par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de la base des données NIST².

3.3. Évaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des fractions lipidiques est évaluée par deux méthodes sur six souches *Escherichia coli* ATCC 8739 Gram⁽⁻⁾ et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 Gram⁽⁻⁾,

Enterococcus faecium ATCC 19434 Gram⁽⁺⁾, Streptocoque B (*Streptococcus agalactiae*) Gram⁽⁺⁾ et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 Gram⁽⁺⁾. Ces deux méthodes sont la méthode de diffusion de disque précédemment décrite dans le paragraphe 2.4.4 de ce chapitre, et la méthode de micro dilution de plaques (NCCLS 2001)⁴. La méthode de micro dilution consiste à faire une série de dilution de l'extrait dans une gamme de concentration dans lequel une suspension bactérienne est inoculée. Le but est de déterminer la concentration minimale inhibitrice (**CMI**) et la concentration minimale bactéricide (**CMB**).

3.3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Par définition la **CMI** correspond à la plus faible concentration d'un antibiotique ou d'un extrait naturel capable d'empêcher le développement d'un microorganisme particulier. La technique consiste à distribuer dans les cupules d'une plaque, dans un volume constant (100 µL), des concentrations décroissantes en extrait et d'antibiotique parallèlement. Puis, on ajoute dans chacune des cupules dans un même volume (5 µL) une culture de bactérie (10⁶ UFC/ml et 95 µL bouillon Mueller Hinton). Après agitation, l'ensemble des plaques inoculées est incubé à la température optimale de la croissance du germe (37°C) pendant 24 h. Après incubation, 10 µL de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium bromure (**MTT**) de concentration 5 mg/mL sont ajoutés dans chaque cupule (**Figure IV. 1**).

Le **MTT** donne à l'état oxydé une couleur jaune en solution. En présence de l'enzyme succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes, le **MTT** se réduit en **MTT-Formazan**, ainsi la réaction de réduction confère à la solution une coloration bleue. Par conséquent, l'observation de la gamme de concentration permet d'accéder à la **CMI** de l'extrait qui est la première cupule dépourvue de croissance bactérienne, est repérée par le virage de la coloration jaune en bleu de Formazan, (**Figure IV. 2**).

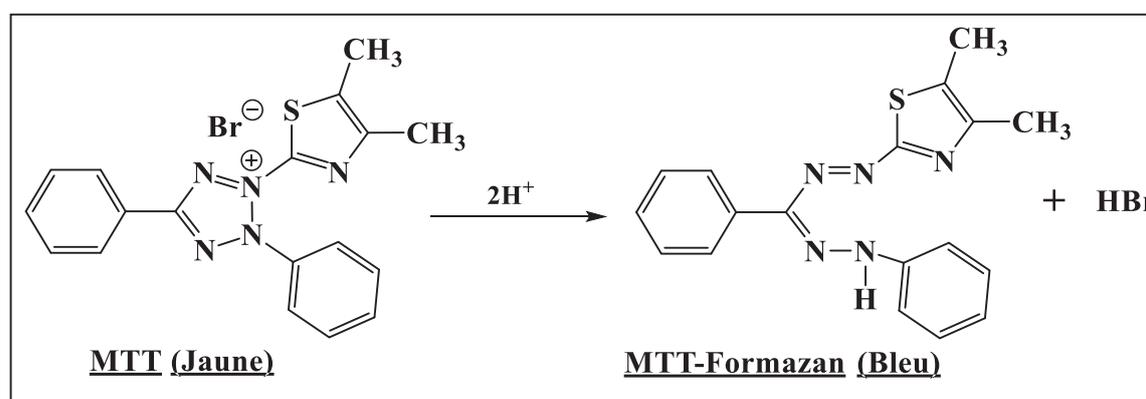


Figure IV. 1 : Réaction chimique de réduction de MTT en MTT-Formazan.

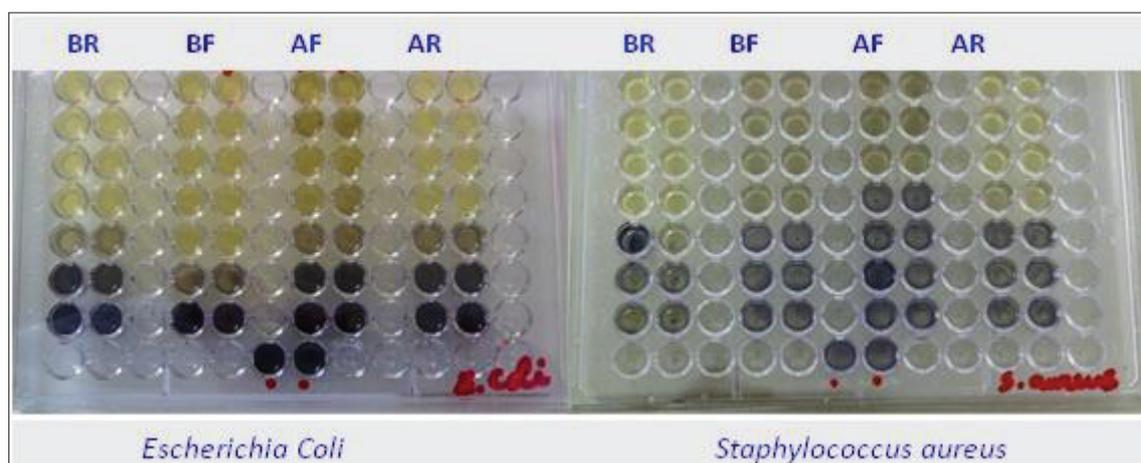


Figure IV. 2 : Exemples de plaques de la méthode de micro dilution de plaques.

3.3.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La **CMB** correspond à la plus faible concentration d'antibiotique ne laissant subsister au maximum que 0,01% de survie de l'inoculum initial après 24 h de culture à 37°C. Le test de la **CMB** succède directement au test de la **CMI**, et la même gamme de concentration est utilisée pour déterminer la **CMB** des extraits à tester.

La méthode consiste à faire des prélèvements de 100 µL des cultures n'ayant pas donné de développement bactérien (résultat du test de la **CMI**) sur gélose nutritive neuve. Puis, les géloses ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 h. Après incubation, la **CMB** est considérée comme étant la concentration minimale en extrait pour laquelle aucun développement bactérien n'est observé.

4. Protocole expérimental d'isolement d'une molécule notée X3

4.1. Préparation d'extrait végétal

Après extraction de l'huile essentielle des parties aériennes d'*A. longa*, le décocté obtenu a été traité par des solvants de polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle), le résidu aqueux a été lyophilisé. Après évaporation du solvant des quantités (30 mg ; 100 mg et 3 g) d'extrait brut ont été récupérés. Seule la fraction d'acétate d'éthyle sera ensuite analysée par chromatographie en phase liquide à haute performance, puis fractionnée par chromatographie d'extraction en phase solide (SPE) sur cartouches de silice C18.

4.1.1. Conditions opératoires de la chromatographie d'extraction en phase solide

Les colonnes prêtes à l'emploi sont de type Oasis[®] Waters, elles sont garnies de silice greffée C18. Ces cartouches, associées à une unité de filtration sous vide contrôlé, autorisent un réglage de débit précis à l'aide d'une molette et d'un manomètre. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice C18.

Avant de charger la cartouche, il est indispensable de la conditionner en mouillant la phase stationnaire par l'eau acidulée (50 mL, 1% H₃PO₄), puis par le méthanol (50 mL) et ensuite par l'eau acidulée (100 mL). Les systèmes d'élution utilisés sont des mélanges binaires (H₂O / MeOH) dans des proportions variables au cours de l'élution.

4.1.2. Conditions opératoires de la chromatographie liquide

La méthode suivante est appliquée pour contrôler la pureté des fractions issues de l'étape de fractionnement par **SPE**. Les analyses **HPLC-DAD** ont été effectuées à l'aide d'une chaîne **HPLC** Agilent munie d'une pompe binaire G1312B, d'un four G1316B et d'un détecteur UV-Visible à barrettes de diodes (**DAD**) G13515C pilotés par le logiciel Chemstation for LC Rev. B. 03. 01.

Les analyses ont été réalisées en chromatographie de partage à polarité de phases inversés avec une colonne de type XDB C18 (1,8 µm ; 4,6 x 100 mm). Les solvants utilisés sont de qualité **HPLC** et le débit est fixé à 1 mL/min. Le volume injecté a été fixé à 5 µL. La concentration de l'échantillon d'extrait brut est de 2 mg/mL.

Pour toutes les analyses, la phase mobile est constituée d'un mélange MeOH / H₂O, les analyses sont effectuées en gradient MeOH / H₂O comme suit : 0-2 min (5% MeOH), 10 min (30% MeOH), 12 min (58% MeOH), 20 min (100% MeOH) et 22 min retour aux conditions initiales. Ainsi, ces étapes de fractionnement et de purification conduisent à isoler un composé pratiquement pur noté **X3** lorsque le mélange d'élution binaire MeOH / H₂O a la proportion (60 / 40).

4.2. *Conditions opératoires des techniques d'identification structurale*

4.2.1. Spectroscopie IR

Le spectre **IR** du composé **X3** a été enregistré à l'aide d'un spectromètre FTIR Nexus 470 (Sté Thermoscientific) en mode Réflexion Totale Atténuée (**ATR**) sur cristal de Germanium, formant une pointe mise en contact avec l'échantillon, dans la gamme spectrale 4000-680 cm⁻¹,

128 scans, résolution de 4 cm^{-1} . Avant chaque série d'analyse, un spectre de référence (pour la ligne de base) a été enregistré en laissant la pointe du cristal à l'air.

4.2.2. Spectrométrie de masse ESI-QTOF

La détermination de la formule brute du composé **X3** par spectrométrie de masse **ESI-QTOF** a été réalisée en mode d'injection directe dans les conditions suivantes : ionisation de l'échantillon par électro nébulisation (**ESI**) en mode positive (pression : 0,6 bar ; température : 180°C ; débit du gaz de séchage : 4 L/min, voltage : 4500 et -500 V) et en mode négatif (pression : 0,4 bar ; température : 200°C ; débit du gaz de séchage : 4L/min ; voltage : 4500 et -500 V). L'acquisition des spectres a été réalisée entre 50 et 1500 Da.

4.2.3. Spectroscopie RMN

Les spectres RMN du composé **X3** ont été enregistrés dans les mêmes conditions que les composés **X1** et **X2** (paragraphe **IV. 2. 4. 3**)

5. Condition opératoire du plan de criblage et de l'activité antioxydante

5.1. Condition opératoire du criblage préliminaire

Pour examiner la transparence des solutions de DPPH de concentration 50 et $190\mu\text{M}$ en fonction du tampon des expériences préliminaires ont été effectuées. On prépare tout d'abord, les solutions tampons carbonate ($\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ ($\text{pK}_a = 10.25$); $\text{CO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} / \text{HCO}_3^-$ ($\text{pK}_a = 6.35$)), phosphate ($\text{HPO}_4^{2-} / \text{PO}_4^{3-}$ ($\text{pK}_a = 12.32$); $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ ($\text{pK}_a = 7.21$)), acétate ($\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COO}^-$ ($\text{pK}_a = 4.75$)) et citrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 / \text{C}_6\text{H}_7\text{O}^-$ ($\text{pK}_a = 2.94$); $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7^{2-} / \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ ($\text{pK}_a = 5.82$)) de valeur de pH (3 ; 6 et 10) et de concentration tampon (0,1 ; 0,05 M). Ensuite, on prépare pour chaque valeur du niveau de concentration du radical DPPH deux séries de tubes à essai contenant chacun 1 mL de solution du radical DPPH préparé in situ dans le méthanol et l'éthanol, dans des fioles brunes de 10 mL. Enfin, on ajoute dans chaque tube 500 μL de chaque solution tampon, sous agitation.

5.2. Analyse par UV-Visible

La qualification opérationnelle du spectrophotomètre UV-visible de type Cary 60 Agilent est indispensable avant chaque manipulation, pour vérifier sa fiabilité. Les paramètres à vérifier sont : l'exactitude et la reproductibilité de la longueur d'onde, recherche du bruit de fond et la vérification de la ligne de base. Les spectres de chaque expérience dans le domaine visible de 400 à 700 nm ont été enregistrés avec une vitesse d'acquisition 300 nm min^{-1} .

5.3. *Activité antioxydante*

Une étude cinétique de la réaction de réduction du radical DPPH a été menée aux combinaisons optimales du plan du criblage et les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour chaque extrait de l'**Équation III. 9** (Pourcentage d'inhibition, EC_{50} , le temps d'équilibre $t_{EC_{50}}$ et l'efficacité anti radicalaire EA). Les antioxydants testés sont : **acide ferulique**, **BRB** (extrait de butanol obtenu par Soxhlet des racines de *B. dioïca*) et **ARD** (décocté obtenu après extraction d'huile essentielle des parties aériennes d'*A. longa*).

Tous les essais ont été effectués en triple. Pour ce faire, chaque antioxydant a été testé à différentes concentrations dans un volume total du milieu réactionnel égal à 1mL. L'inhibition du radical libre en milieu non tamponné a été également analysée dans la même gamme de concentration d'antioxydant et aussi au milieu tamponné dont le but de procéder à une comparaison.

6. Conclusion

Nos protocoles expérimentaux comprennent divers moyens techniques de pointe pour l'analyse, l'identification et la quantification de substances chimiques. Les analyses chimiques et antimicrobiennes des huiles essentielles et des acides gras sont des essais quotidiens aux services d'analyses de nos laboratoires et ils sont réalisés par des chimistes et des biologistes expérimentés.

En outre, l'activité antioxydante a été évaluée à l'aide d'une application du plan du criblage de type Plackett-Burman. L'interprétation des résultats de diverses techniques analytiques constitue l'étape la plus délicate pour le chimiste dans une étude phytochimique.

Références bibliographiques

[1] Jabrame, A., 2007. Mémoire de mastère « Qualité alimentaire et bioprocédés », Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir.

[2] NIST, 2005. Standard Reference Database Series 1 a. The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database, Version 2.0d.

[3] AOAC., 1998. Fatty acid in oils and fats preparation of methyl ester boron trifluorid method. *J.A.O.A.C.* 969, 33.

[4] NCCLS, 2001. National Committee for Clinical Laboratory Standars, M 100-S 11.

Chapitre V : Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles et des acides gras

1. Introduction

À notre connaissance, aucune investigation phytochimique et (ou) antimicrobienne n'a été réalisée sur l'espèce *A. longa* (A) et *B. Dioïca* (B) en Tunisie. Dans le but de mettre en évidence une homogénéité ou une éventuelle variabilité chimique et biologique d'huile essentielle d'*A. longa* et des acides gras de différents organes (racines (R) et parties aériennes (F)) des deux espèces les analyses : GC-MS, GC-FID, méthode de disque et méthode du micro dilution ont été effectuées.

2. La composition chimique de l'huile essentielle des racines d'*A. longa*

L'analyse de l'huile essentielle des racines d'*A. longa* a permis d'identifier en total 103 composés (Tableau V. 1). L'échantillon collecté au mois d'avril (2013) constitue l'assemblage moléculaire le plus complexe avec 51 composés en comparaison avec les autres échantillons collectés au mois de septembre 2011 (35 composés), aout 2009 (37 composés) et mars 2012 (35 composés). Cette diversité moléculaire est répartie essentiellement en sesquiterpènes oxygénés (50,2 – 81,1%) suivis de monoterpènes oxygénés (5,9 – 28,0%), sesquiterpènes hydrocarbonés (0,7 – 18,4%) et monoterpènes hydrocarbonés (0,0 – 0,8%). La prédominance des composés oxygénés (mono et sesquiterpènes) pourrait être attribuée à l'exposition prolongée de la plante aux rayons solaires aux mois d'aout 2009 et septembre 2011 et également aux températures élevées^{1,2}. Les huiles essentielles investiguées sont caractérisées par la présence majoritaire du maaliol, à l'exception de l'échantillon R09.

En revanche, l'aromadendrene et ses dérivés oxygénés, aromadendrene oxyde-2 et allo-aromadendrene-oxyde-1, sont trouvés en faible concentration : il a ainsi été prouvé que ces derniers contribuent à la biosynthèse du maaliol³. De plus, on note également une variabilité régulière des autres composés, à l'exception du paciforgiol, tau-muurolol et varamol. En dépit de la conservation de la localité de la récolte, on constate que l'huile essentielle d'*A. longa* n'est pas une huile chémotypée, ceci est attribué à la variabilité quantitative en composés majoritaires : maaliol (23,3 ; 31,8%)/ eremophilone (13,7 ; 8,4%) au mois de septembre (2011) et mars (2012) respectivement, le second est un mélange de maaliol

(22,7 %)/ paciforgiol (7,4%) au mois d'avril (2013), et le troisième est un binaire d'aromadendrene oxyde-2 (14,0 %)/ varamol (11,0 %) au mois d'aout (2009).

Tableau V. 1 : Composition chimique des huiles essentielles obtenues des racines d'*A. longa*.

N°	KI ^a	KI ^b	Nom des composés	R09	R11	R12	R13
				%			
1	760	1094	2-hexanone	1,6	-	-	-
2	822	1246	E-2-hexanal	-	0,1	-	-
3	835	1397	Z-3-hexanol	0,1	-	-	-
4	843	1415	Z-2-hexanol	0,1	-	-	-
5	902	900	Nonane	0,1	-	-	-
6	926	1166	Propyl-2-valerate	-	6,3	-	-
7	929	1139	3,5-dimethylene-1, 4,4,4 trimethyl cyclopentene	-	-	0,1	-
8	934	1150	Butyl isobutyrate	-	8,0	-	-
9	946	1147	Verbenene	-	0,8	-	-
10	1009	1640	Phenyl actaldehyde	0,5	-	-	-
11	1013	1288	p-Cymene	0,3	-	-	-
12	1022	1226	1,8-cineole	1,2	0,3	0,5	0,2
13	1335	1626	Styrene oxide	-	0,3	-	-
14	1042	1370	Artemisia ketone	2,0	0,6	-	-
15	1082	1936	Phenyl ethyl alcohol	1,5	-	-	-
16	1083	1560	Linalool	-	1,0	-	-
17	1087	1467	α -Thujone	-	0,3	-	-
18	1102	1505	Chrysanthenone(1)	-	-	-	0,2
19	1105	1509	α -Campholene aldehyde	-	0,2	0,4	-
20	1122	1555	Camphor	2,2	-	1,8	1,0
21	1124	1680	E-Pinocarveol	1,4	0,7	1,7	-
22	1124	1673	Z-Verbenol	1,1	-	-	-
23	1128	1699	E-Verbenol	2,2	0,9	-	1,8
24	1130	1680	α -Phellandrene-8-ol (p-mentha-1,5-dien-8-ol)	-	-	0,3	-
25	1131	-	Z-Ocimenol	-	0,3	-	-
26	1139	1601	Pinocarvone	-	-	0,2	-
27	1145	1693	δ -Terpineol	-	0,9	-	-
28	1159	1701	E- 2-caren-4-ol	-	0,3	-	-
29	1159	1719	E-isocitral	0,5	0,4	0,3	-
30	1159	1874	p-Cymen-8-ol	0,7	0,3	0,7	-
31	1162	1622	Terpinen-4-ol	2,7	1,2	4,1	-
32	1169	1824	Z-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	-	-	0,3	-
33	1172	1718	α -Terpineol	1,5	0,6	-	-
34	1178	1739	Dihydro-carveol	-	0,3	-	-
35	1179	1821	Myrtenol	-	-	0,5	-

Tableau V. 1 (suite) :

N°	KI ^a	KI ^b	Nom des composés	R09	R11	R12	R13
				%			
36	1180	1750	Verbenone	2,1	-	1,8	0,9
37	1185	-	2,3-dihydro-benzofuran	7,8	5,6	-	-
38	1197	1852	E-Carveol	-	0,5	0,9	0,5
39	1215	1767	Carvone	-	-	-	0,1
40	1270	1611	Bornyl acetate	-	1,2	0,7	0,3
41	1274	1730	Methyl myrtenate	2,5	-	1,0	0,8
42	1282	2205	Varamol	11,0	8,0	2,8	0,4
43	1310	-	*	-	1,0	-	-
44	1337	1489	δ-Elemene	-	-	-	0,2
45	1353	1489	α-Longipinene	-	-	-	0,4
46	1370	1512	Cyclosativene	-	-	-	0,3
47	1381	1505	β-Patchoulene	-	-	-	0,3
48	1381	1544	Paciforgia-1(9),10-diène	-	-	-	1,3
49	1389	1613	β-Elemene	4,7	-	0,3	3,9
50	1409	1560	α-Gurjunene	-	-	-	0,1
51	1420	1629	E-β-Caryophyllène	-	4,4	-	0,1
52	1434	1618	α-Guaiene	-	-	0,3	3,3
53	1440	1636	Aromadendrene	-	-	-	0,1
54	1451	1656	Cadina-3,5-diene	-	0,4	-	-
55	1451	1656	Valerena 4,7(11)-diène	-	-	-	3,5
56	1458	1687	Allo-aromadendrene	-	-	-	1,3
57	1460	1995	(-)-Dehydroaromadendrene	-	-	-	0,6
58	1463	1947	trans-β-Ionone	-	-	-	0,3
59	1468	1712	4,5- di-epi-Aristolochene	-	-	-	0,1
60	1475	1783	Helmintogermacrene	-	-	-	0,7
61	1478	1743	Germacrene D	-	-	-	0,0
62	1484	1735	Eremophilene	-	0,2	-	-
63	1486	1726	10-epi-Zonarene	-	-	-	0,2
64	1488	1743	Bicyclosesquiphellandrene	-	1,5	-	-
65	1488	1746	Valencene	1,5	-	-	-
66	1489	1765	7-βH, β,10 α- selina,4(14),11-diene	-	-	-	0,4
67	1493	1973	E- α –Irone	0,6	-	-	-
68	1501	1750	β-Bisabolene	-	-	-	0,2
69	1506	2432	2,5-dimethy methyl benzoate	-	-	-	3,6
70	1508	2023	E-γ-Irone	-	0,2	-	-
71	1519	1746	Zonarene	-	-	-	0,3
72	1530	1808	γ-Selinene	-	-	-	0,9
73	1534	1987	Paciforgiol	-	3,2	4,2	7,4
74	1535	2106	α-Elemol	3,1	-	-	-
75	1550	2024	Epi-Globulol	10,0	-	-	-
76	1551	1924	Calarene oxyde	-	-	-	4,9
77	1559	2037	Maaliol	1,2	23,3	31,8	22,7

Tableau V. 1 (suite) :

N°	KI ^a	KI ^b	Nom des composés	R09	R11	R12	R13
				%			
78	1565	2156	Spathulenol	-	0,7	3,9	6,0
79	1571	2023	Caryophyllene-oxyde	-	4,6	0,9	-
80	1573	1980	Aristolene-oxyde	-	-	0,9	1,5
81	1576	2105	Globulol	-	-	0,8	1,0
82	1588	2020	β -Funebrene epoxyde	4,4	-	-	-
83	1589	2167	Cedrol	-	-	0,5	-
84	1594	2172	Widdrol	0,9	-	-	-
85	1600	2015	Aromadendrene oxyde-2	14,0	-	-	-
86	1601	2044	Z- β -Curcumen-12-ol	-	-	0,6	-
87	1611	2284	β -Atlantol	5,7	3,4	1,9	7,3
88	1621	2037	Allo-aromadendrene-oxyde-1	-	-	3,2	1,1
89	1622	2257	Isospathulenol	1,8	1,3	-	2,0
90	1629	2200	T-Cadinol	-	-	2,1	1,4
91	1929	2220	Agarospirol	1,6	-	-	-
92	1640	2265	Tau-Muurolol	1,5	2,9	5,0	5,3
93	1655	2405	Caryophyllene-14 hydroxy-9-epi	-	1,7	-	2,9
94	1665	2208	Bisabolone-oxyde A	-	-	2,9	-
95	1670	2395	Eudesma,4(15),7-dien,1- β -ol	-	-	-	1,3
96	1710	-	β -Elemene dioxyde-1	2,2	2,1	3,6	3,2
97	1717	-	β -Elemene dioxyde-2	-	-	0,7	0,9
98	1718	-	Eremophilone	-	8,4	13,7	-
99	1725	2352	α -Sinensal	-	-	-	0,4
100	1738	2422	Cyclocolorenone	3,6	-	-	-
101	1744	2431	14-oxy- α -muurolene	-	-	-	1,3
102	1746	2591	β -Costol	0,4	-	-	-
103	1813	2582	α -Vetivone	-	1,4	4,6	1,0
Total				99,9%	99,9%	99,9%	99,9%
Groupes chimiques				(%)			
Monoterpènes hydrocarbonés				0,3	0,8	0,1	-
Monoterpènes oxygénés				28,0	16,0	15,3	5,9
Sesquiterpènes hydrocarbonés				6,2	6,5	0,7	18,4
Sesquiterpènes oxygénés				50,2	52,7	81,1	75,1
Autres groupes							
Composés à 13 et 14 carbones				0,6	0,2	-	0,3
Alcanes				0,1	-	-	-
Alcool				12,6	8,0	2,8	0,4
Aldéhydes				0,5	0,1	-	-
Esters				-	14,4	-	-
Éthers				-	0,3	-	-
Cétones				1,6	-	-	-

** Abondances relatives à chaque m/z du composé inconnu : 43,10 (**95**); 77,10 (45); 79,10 (42); 91,10 (**88**); 92,10 (**92**); 93,10 (**77**); 105 (**49**); 119,1 (**100**); 134,1 (**60**); KI^a, KI^b : Indices de Kovats des séries de n-alcanes C5-C30 sur colonne HP-1 et HP-Innowax ; R09, R11, R12, et R13 : échantillons collectés en aout 2009, septembre 2011, mars 2012, et avril 2013, respectivement. L'ordre d'éluion est donné sur la colonne HP-1 (apolaire).

La différence de composition constatée sur les huiles essentielles investiguées est vraisemblablement à mettre en rapport avec des facteurs abiotiques essentiellement le climat spécifique à chaque saison, qui est accompagné par une synthèse préférentielle aux composés oxygénés. Ces différentes combinaisons sont observées pour la première fois dans la famille des aristolochiacées. (Tableau V. 2).

Tableau V. 2 : Différentes combinaisons en composés majoritaires de l'huile essentielle dans le genre *Aristolochia*.

Espèces	Localités	Date de récolte	Organe de la plante	Composés majoritaires
<i>A. arcuata</i> ⁴	Araraquara, Brazil	Février 2004	Racines	O-Cymene (38,6%) β-Gurjunene (15,8%)
			Feuilles	Argentilactone (89,1%) Argentilactone (57,5%)
<i>A. argentina</i> Gris ⁵	Agronomia, Argentina	Avril 2001	Tiges	β-Carophyllene (7,3%) Argentilactone (66,1%)
			Racines	Ishwarane (2,5%) Argentilactone (88,7 %)
<i>A. brevipes</i> Benth ⁶	Jiquilpan, Mexico		Racines	β-Pinene(20,6 % Camphor (18,5%)
<i>A. chamissonis</i> ⁷	Brazil	Février 2004	Racines	Camphor (10,3%) β-Cyclocitral (10,3%) 8,14-Cedranediol (14,5%)
			Descalvado, Argentina	Racines
<i>A. elegans</i> ⁷	Buenos Aires, Argentina	Octobre 1993	Feuilles	Isocaryophyllene (16,2%) β-Carophyllene (16,9%)
			Racines	E-Nerolidol (35,1%) Cubenol (3,8 %) α-Copaene (3,8 %)
		Juillet 1994	Feuilles	Bicyclogermacrene 32,4%) β-Carophyllene 27,8%)
			Tiges	E-Nerolidol (79,5%) β-Carophyllene (3,5%)

Tableau V. 1 (suite) :

Espèces	Localités	Date de récolte	Organe de la plante	Composés majoritaires
<i>A.esperanzae</i> ⁷	Ituiutaba, Brazil	Février 2004	Racines	Viridiflorene (42,2%) α -Aromadendrene (31,5%)
<i>A.galeata</i> ⁷	Descalvado, Argentina	Février 2004	Racines	Camphene (32,4%) Isobornyl acetate (23,8%)
		Mais 1994	Feuilles	Bicyclogermacrene (42,2%) Aristolactone (7,7%)
		Juin 1994	Feuilles	Bicyclogermacrene (38,1%) Aristolactone (9,9%)
<i>A.gibertii</i> <i>Hook</i> ⁵	Buenos Aires, Argentina	Juillet 1994	Tiges	Bicyclogermacrene (7,6%) Limonene (53,3%)
		Juillet 1996	Tiges	Bicyclogermacrene (16,5%) Limonene (38,5%)
		Juin 1997	Tiges	Bicyclogermacrene (10,7%) Limonene (56,8%)
<i>A.gigantea</i> ⁷	Araraquara, Brazil	Février 2004	Racines	β -Linalool (16,6%) α -Phellandrene (60,9%)

En outre, le profil chimique d'une huile essentielle renseigne implicitement sur la stéréochimie de cet extrait naturel. Il a ainsi été prouvé que les propriétés biologiques peuvent être très différentes d'un isomère à l'autre, plus particulièrement d'un énantiomère à l'autre. Dans cette optique, les études biologiques et toxicologiques d'un tel extrait naturel sont devenues une exigence d'assurance qualité pour la mise sur marché des produits naturels.

Il existe très peu de données dans la littérature concernant la composition chimique de l'huile essentielle d'*A. longa*, De Pascual Teresa et al. (1983)⁸ ont identifié uniquement trois composés (calarene, maaliol et aristolen-2-one) de l'huile essentielle des racines d'origine Espagnole. Ainsi, la méthode d'extraction, les techniques d'analyse utilisées et la diversité moléculaire constatée confèrent à la présente étude une certaine originalité.

3. La composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes d'*A. longa*

L'analyse du profil chimique de l'huile essentielle obtenue des parties aériennes d'*A. longa* a permis d'identifier en total 70 composés (Tableau V. 3).

Tableau V. 3 : Composition chimique des huiles essentielles extraites des parties aériennes d'*A. longa*.

N°	KI ^a	KI ^b	Nom des composés	AF 12	AF 13
1	932	1035	α -Pinene	0,5	0,2
2	945	1083	Camphene	0,2	0,1
3	979	1213	2,3-dehydro-1,8-cineole	0,4	0,2
4	1009	1640	Phenyl acetaldehyde	0,8	0,7
5	1011	1288	m-Cymene	-	0,4
6	1013	1288	p-Cymene	0,4	-
7	1022	1226	1,8-cineole	0,6	0,6
8	1036	1269	E- β -Ocimene	-	0,2
9	1072	1489	E-Linalool oxyde	-	0,1
10	1082	1308	Terpinolene	-	0,6
11	1083	1560	Linalool	1,3	1,3
12	1099	-	Myrcenol	-	0,1
13	1100	1475	β -Thujone	0,2	-
14	1105	1509	α -Campholene aldehyde	0,3	-
15	1105	1646	Z-p-2,8-menthadiene-1-ol	-	0,5
16	1108	1576	Z-p-menth-2-en-1-ol	0,3	0,2
17	1116	1693	E-p-2,8-menthadiene-1-ol	-	0,1
18	1122	1555	Camphor	0,4	0,3
19	1124	1680	E-pino-Carveol	1,3	1,5
20	1124	1717	E-Sabinol		1,1
21	1128	1699	E-Verbenol	1,7	2,2
22	1139	1601	pino-Carvone	4,3	5,8
23	1139	1701	Z-Isocitral	-	0,1
24	1153	1666	Nonanol	-	0,2
25	1155	1698	Cryptone	-	0,3
26	1159	1701	E-2-carene-4-ol	1,0	0,5
27	1159	1719	E-Isocitral	-	0,3
28	1159	1874	p-Cymene-8-ol	-	0,4
29	1162	1622	Terpinene-4-ol	5,2	6,0
30	1169	1824	E-p-mentha-1(7),8-diene-2-ol	0,6	-
31	1170	1666	Myrtenal	-	0,5
32	1172	1718	α -terpineol	1,1	0,7
33	1179	1821	Myrtenol	0,6	0,7
34	1180	1750	Verbenone	-	1,4
35	1185	-	2,3-dihydro-benzofurane	2,2	1,6
36	1188	-	X1	29,0	17,7
37	1206	1878	Z-Carveol	-	0,4
38	1215	1767	Carvone	-	0,4
39	1270	1611	Bornyl acetate	4,0	6,2
40	1282	2205	Varamol	3,2	2,2
41	1310	-	X2	15,0	25,6
42	1353	1489	α -Longipinene	-	0,8

Tableau V. 3 (suite) :

N°	KI ^a	KI ^b	Nom des composés	AF 12	AF 13
43	1372	1492	Isoledene	-	0,1
44	1377	1515	α -Copaene	-	0,1
45	1406	1601	Isocaryophyllene	4,2	6,2
46	1420	1629	E- β -Caryophyllene	3,0	1,5
47	1428	1875	Neryl acetone	-	0,3
48	1434	1618	α -Guaiene	-	0,3
49	1451	1656	Valerena 4,7(11)-diene	0,4	-
50	1452	1708	α -Humulene	0,6	0,9
51	1464	1947	β -Ionone	0,4	-
52	1475	1710	α -Amorphene	-	0,1
53	1478	1743	Germacrene D	-	0,7
54	1484	-	Dihydroactinidiolide	4,5	0,2
55	1505	1772	Sesquicineole	0,2	-
56	1508	2023	E- γ -Irene	-	0,9
57	1516	1783	δ -Cadinene	-	1,5
58	1519	1746	Zonarene	0,5	-
59	1533	1797	E- α -Bisabolene	-	0,3
60	1534	1987	Paciforgiol	0,5	-
61	1540	1917	α -Funebrene-epoxyde	4,0	-
62	1559	2037	Maaliol	2,0	-
63	1565	2156	Spathulenol	1,5	1,7
64	1569	2016	Epoxy-isocaryophyllene	0,6	-
65	1571	2023	Caryophyllene-oxyde	1,3	1,9
66	1597	2082	Epoxyde-humulene	0,5	-
67	1622	2257	Isospathulenol	-	0,5
68	1623	-	Aristolene-epoxyde	0,4	-
69	1628	2217	α -Cadinol	0,4	0,5
70	1655	2405	Caryophyllene-14-hydroxy-9-epi	0,3	-
Total				99,9%	99,9%
Groupes chimiques				%	
Monoterpènes hydrocarbonés				1,1	1,5
Monoterpènes oxygénés				50,5	44,7
Sesquiterpènes oxygénés				8,7	12,5
Sesquiterpènes hydrocarbonés				4,1	1,76
Autres groupes					
Alcool				3,2	2,4
Aldéhydes				0,8	0,7
Esters				23,5	32,0
Cétones				0,4	1,5

KI^a, KI^b : Indices de Kovats des séries de n-alcanes C5-C30 sur colonne HP-1 et HP-Innowax ; AF12, et AF13 : échantillons collectés en mars 2012, et avril 2013, respectivement. L'ordre d'éluion est donné sur la colonne HP-1.

Dans les huiles essentielles extraites des parties aériennes d'*A. longa*, nous avons identifié 37 molécules supplémentaires par rapport à celles déjà mises en évidence dans l'huile essentielle des racines. Parmi les composés discriminants on cite : isocaryophyllene (4,0%), α -humulene (0,6 – 0,9%), α -cadinol (0,4 – 0,5), Z-carveol (0,4%), dihydroactinidiolide (4,5 – 0,2%). Il est à noter que **X1** (29,0 ; 17,7%) et **X2** (15,0 ; 25,6%), deux composés d'indices de Kovats, respectivement, 1188/1310 sur une colonne HP-1 dont les spectres de masse n'ont pu être identifiés dans les bibliothèques des spectres de masse de référence, sont majoritaires et identifiés comme étant des monoterpènes oxygénés et son ester. L'identification de ces deux molécules sera détaillée dans la partie 3.1 de ce chapitre.

3.1. Identification des composés X1 et X2 par RMN et spectrométrie de masse

3.1.1. Étude des spectres de masse de X1 et X2

La lecture des spectres de masse en mode impact électronique (IE) révèle une ressemblance structurale entre les deux composés **X1** et **X2**, en plus des pics moléculaires $M^{+\bullet}$ à m/z égal à 194 (**X2**) et 152 (**X1**), (**Figure V. 1 et 2**). Après comparaison du spectre de masse de l'alcool acylé avec celui de **X2**, on trouve une similitude structurale d'où la validité de l'hypothèse postulée précédemment. Les formules brutes relatives à **X1** et **X2** sont respectivement $C_{10}H_{16}O$ et $C_{12}H_{18}O_2$.

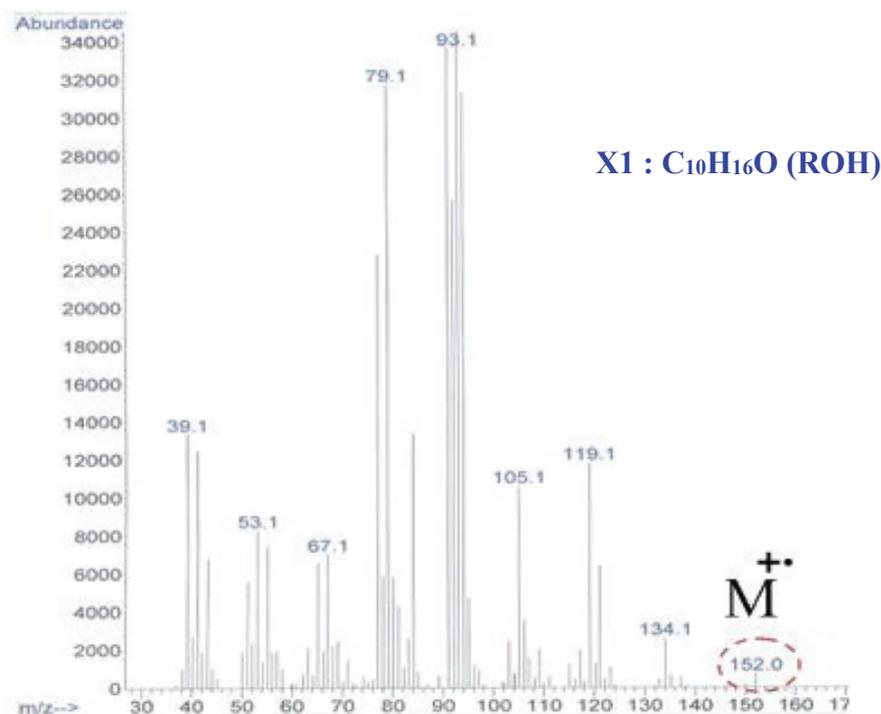


Figure V. 1 : Spectres de masse du composé **X1** obtenu par GC-MS en mode IE.

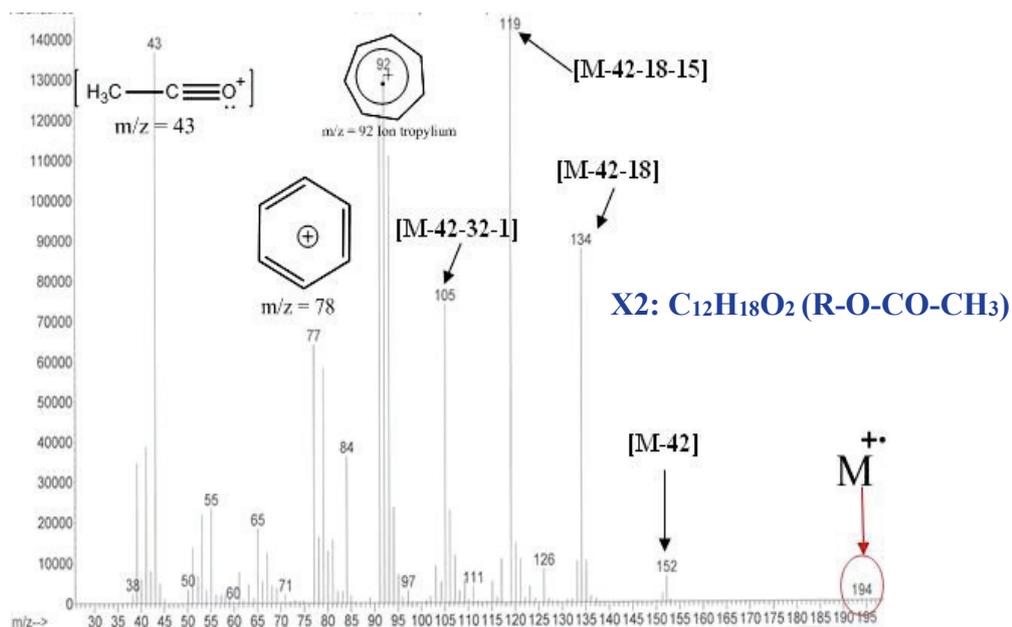


Figure V. 2 : Spectres de masse du composé X2 obtenu par GC-MS en mode IE.

3.1.2. Étude par spectroscopie RMN de X2 (C₁₂H₁₈O₂)

Le dénombrement des signaux observés sur le spectre RMN-¹³C (Figure V. 3) avec découplage total du proton a permis de noter l'existence de 12 atomes de carbones. On remarque la présence de plusieurs signaux de faibles intensités qui doivent correspondre aux signaux des solvants utilisés pour l'extraction lors de l'étape de purification et qui n'ont pas pu être totalement évaporés.

La superposition du spectre RMN-¹³C en découplage total de proton avec celui RMN-¹³C en mode DEPT-135° (Figure V. 3), a permis de montrer la disparition de trois signaux et l'inversion de trois autres, indiquant que la molécule renferme trois types de carbones quaternaires et trois autres secondaires. En conclusion, l'examen des déplacements chimiques des différents atomes de carbones nous a permis d'attribuer :

- Deux carbones quaternaires hybridés en sp² qui résonnent respectivement à 171,83 et 143,62 ppm ;
- Un carbone de type CH hybridé en sp² qui résonne à 117,12 ppm ;
- Trois carbones de type CH₂ hybridés en sp³ qui résonnent à 71,05 ; 31,64 et à 30,86 ppm ;
- Un carbone quaternaire hybridé en sp³ qui résonne à 41,92 ppm.

- Deux carbones de types CH hybridés en sp^3 qui résonnent à 43,20 et à 36,95 ppm.
- Trois carbones de type CH_3 qui résonnent à 23,06 ; 21,20 ; 16,40 ppm.

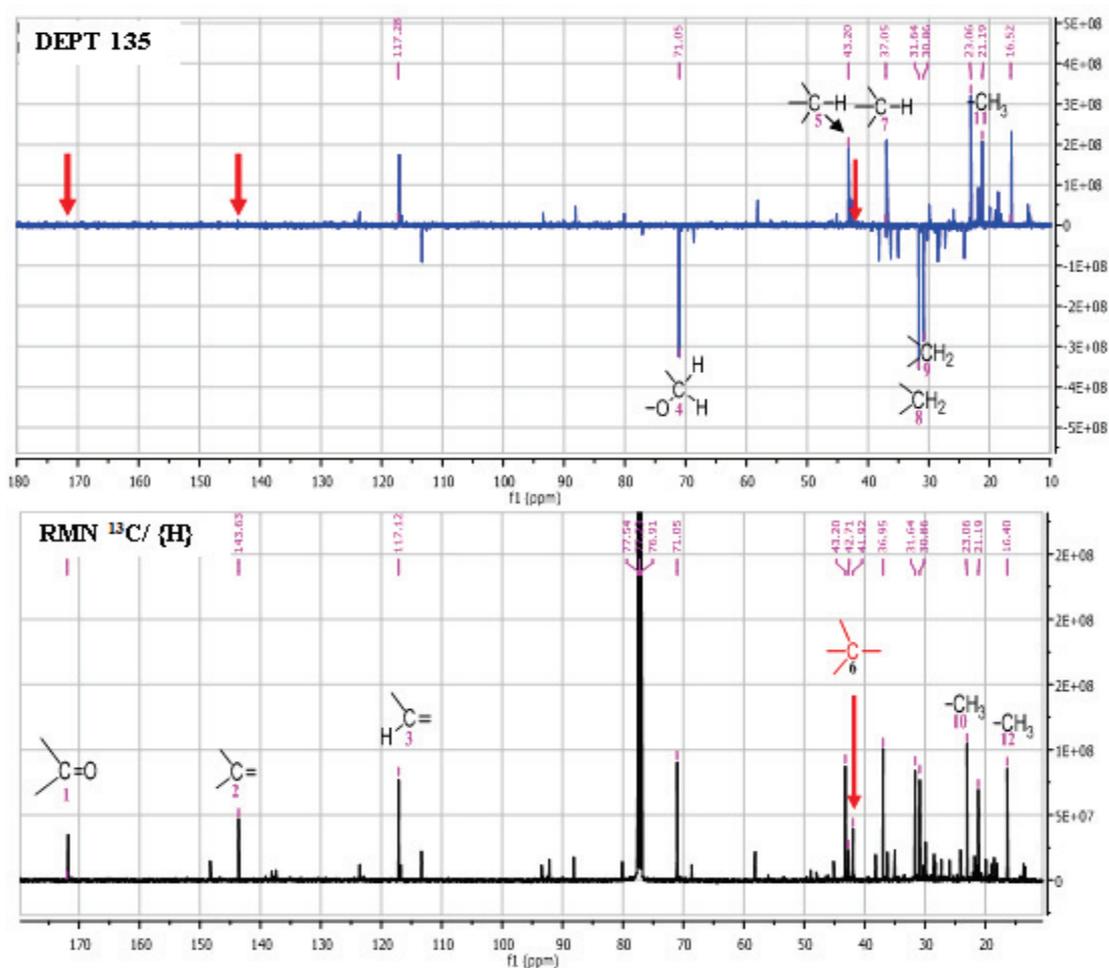


Figure V. 3 : Spectres $RMN-^{13}C$ avec découplage total $RMN^{13}C-\{H\}$ et en mode $DEPT-135^\circ$ du composé X2.

En outre, l'analyse préliminaire du spectre $RMN-^1H$ (Figure V. 4) a permis de repérer :

- Un multiplet d'intégration 1 à 5,24 ppm attribué à un proton éthylénique ;
- Un doublet dédoublé d'intégration 2 porté par un carbone oxygéné d'un système de spin de type AB qui résonne à 4,21 et 4,28 ppm avec une constante de couplage de 10,96 Hz ;
- Un ensemble de signaux d'intégration 4 dans la zone allant 2,31 à 2,16 ppm ;
- Deux singulets d'intégration trois et quatre chacun à 2,06 et 0,89 ppm ;

- Un doublet multiplet d'intégration 3 à 1,66 ppm qui pourrait être attribué à des protons allyliques en position *trans* à un proton éthylénique.

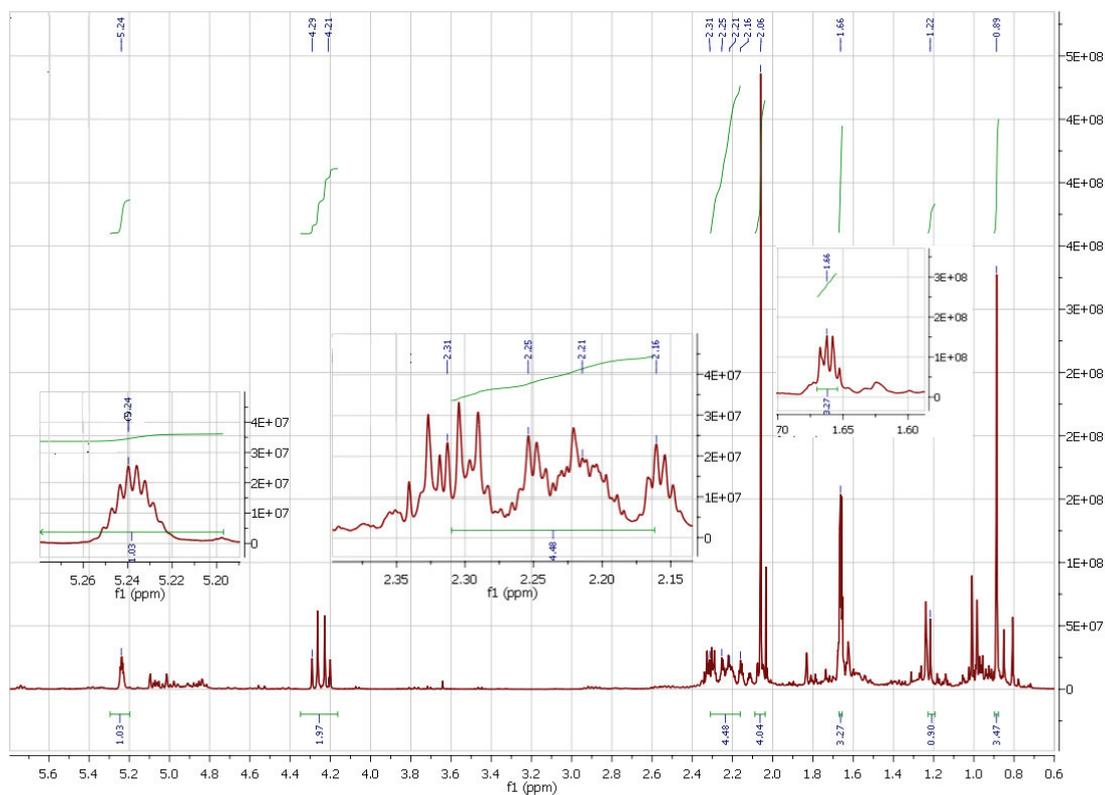


Figure V. 4 : Spectre RMN- ^1H du composé X2.

Afin d'identifier la structure de l'ester, plusieurs spectres de corrélation en RMN-2D ^1H et (ou) ^{13}C ont été effectués. Les expériences **HSQC**, **HMBC** ^1H - ^{13}C donnent accès aux corrélations ^1H - ^{13}C . En effet, en **HSQC**, l'étude des corrélations de couplage $^1\text{J}_{\text{H}-^{13}\text{C}}$ permet de repérer les différents carbones non quaternaires et les protons qu'ils portent. En particulier, on repère les protons et les carbones donnant lieu aux taches de corrélation hétéronucléaire confirmant chaque type de carbone portant un ou plusieurs ^1H qui constituent les groupements CH et CH_3 ainsi que les protons magnétiquement non équivalents des groupements CH_2 , (Figure V. 5 (a et b)).

Ces corrélations entre protons et carbones déterminées en **HSQC** permettent ensuite d'interpréter les spectres **HMBC** ^1H - ^{13}C (Figure V. 6). Avec cette séquence RMN, les carbones corrélient avec les protons portés par les carbones directement voisins, caractérisés par des constantes de couplage $^2\text{J}_{\text{H-C}}$ et $^3\text{J}_{\text{H-C}}$. Pour faciliter l'interprétation de la carte **HMBC** ^1H - ^{13}C , nous nous avons indexé les taches de corrélation (C_i/H_j : C_i indique le signal où $n \geq 2$ du ^{13}C sur l'axe F1 et H_j indique le proton porté par le carbone voisin sur l'axe F2).

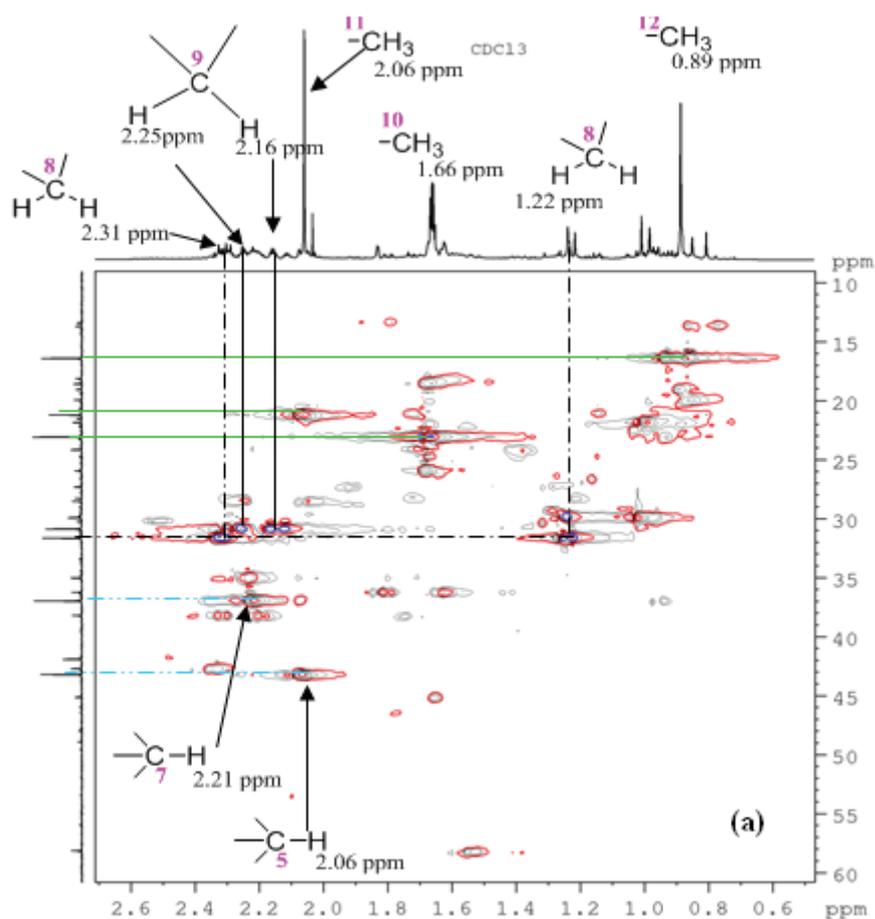


Figure V. 5 (a) : Carte de corrélation hétéronucléaire MRN- ^{13}C en mode HSQC ^1H - ^{13}C .

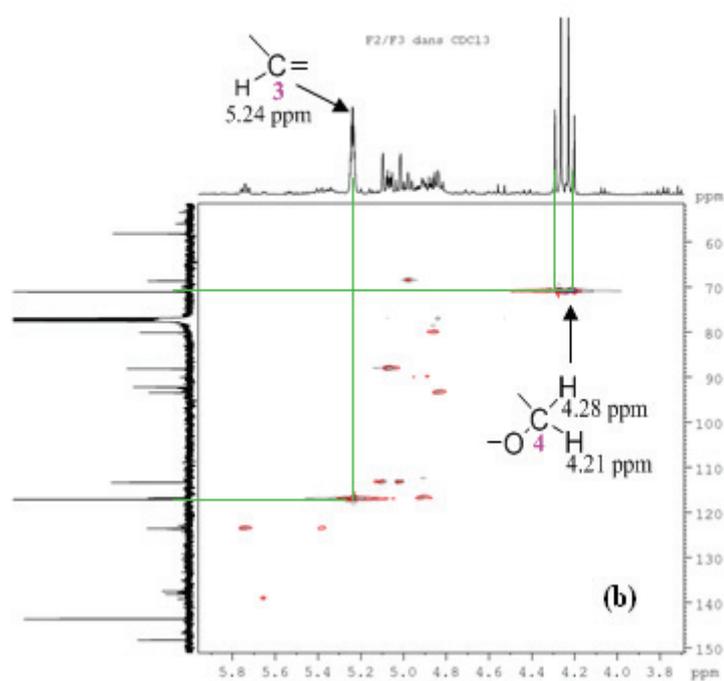


Figure V. 5 (b) : Carte de corrélation hétéronucléaire MRN- ^{13}C en mode HSQC ^1H - ^{13}C .

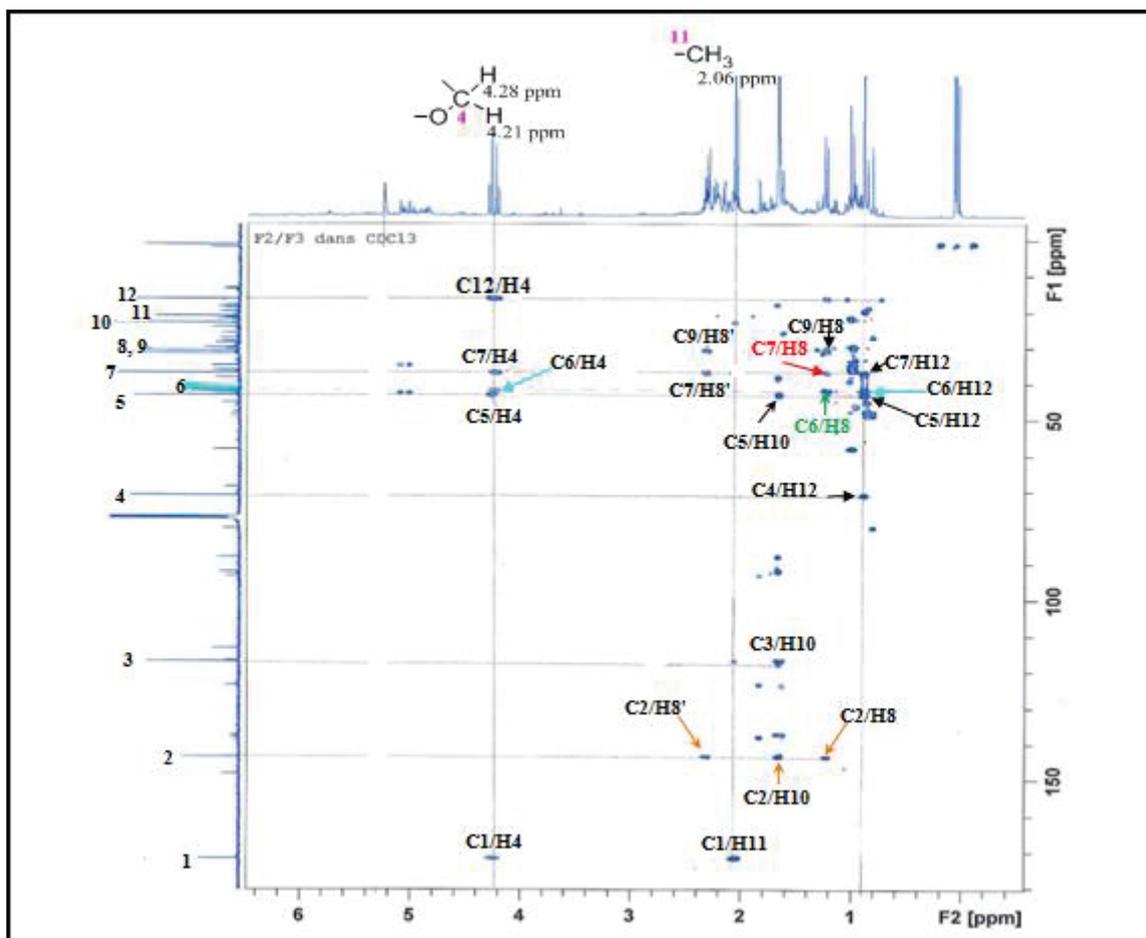


Figure V. 6 : Carte de corrélation hétéronucléaire MRN-¹³C en mode HMBC.

L'interprétation de l'ensemble de ces données RMN a permis de déterminer l'enchaînement hydrocarboné complet de la molécule (Figure V. 7).

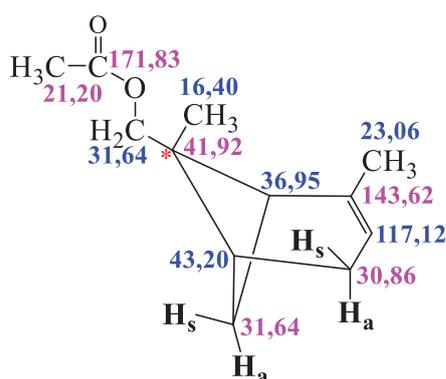


Figure V. 7 : Structure identifiée de l'ester.

La structure proposée de l'ester est confirmée par l'interprétation de différents fragments du spectre de masse en mode impact électronique, en respectant les différentes règles de mécanisme réactionnel de la spectrométrie de masse, Figure V. 8.

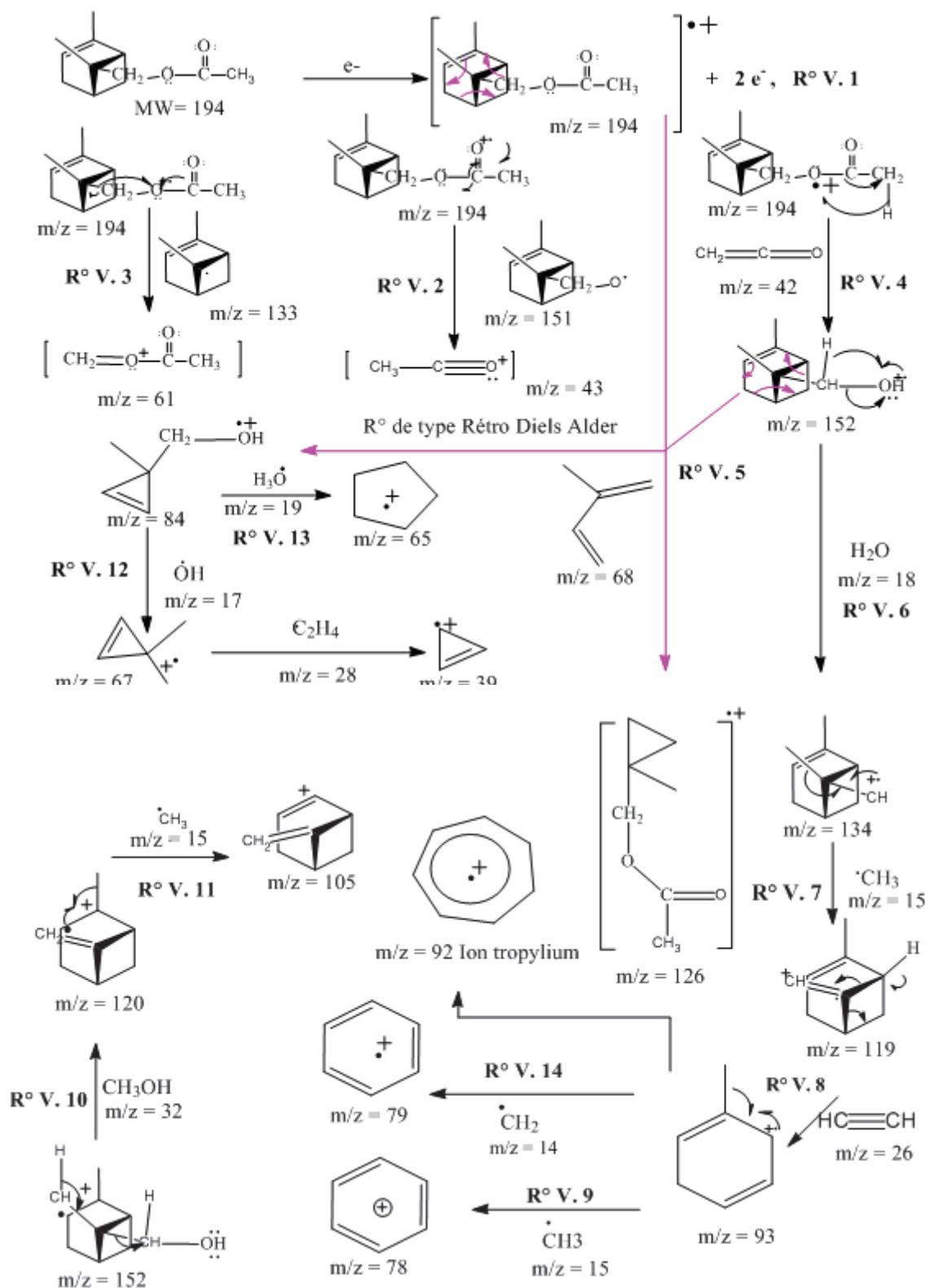


Figure V. 8 : Mécanisme réactionnel de fragmentation de l'ester déterminé par spectrométrie de masse en mode impact électronique (R° : réaction).

La notation $M^{+\bullet}$ signifie qu'il s'agit de la molécule entière après la perte d'un électron en donnant naissance à un radical cationique dit ion moléculaire (**R° V. 1**). La réaction de fragmentation de l'ion moléculaire peut se faire selon plusieurs voies différentes et compétitives :

- Fragmentation par rupture simple (**R° V. 12**) ;
- Fragmentation par rupture α ou β d'un hétéroatome (**R° V. 2,3**) ;
- Fragmentation par rupture simple et formation d'une nouvelle liaison **R° V. 7, 8, 11** ;
- Fragmentation par réarrangement tel que le réarrangement de type rétro Diels-Alder, (**R° V. 5**), réarrangement d'un atome d'hydrogène (**R° V. 4, 6**) ou d'un groupement alkyle, (**R° V. 13, 14**).

Dans le cas de la rupture simple, le cation radical se dissocie en un radical neutre et un ion ayant un nombre pair d'électrons. Dans le cas du réarrangement, le radical neutre perdu est une molécule et le fragment formé reste un cation radical (**R° V. 3, 4**). On peut reconnaître les pics de réarrangement en considérant la valeur de m/z des fragments ioniques et des ions moléculaires correspondants :

- un clivage simple (sans réarrangement) d'un ion moléculaire de masse paire donne un fragment ionique de masse impaire ;
- Un clivage par réarrangement d'un ion moléculaire de masse paire donne un fragment ionique de masse paire.

3.1.3. Étude par spectroscopie RMN de X1 (C₁₀H₁₆O)

Le spectre **RMN-¹³C** avec découplage total du proton représente des signaux d'intensité importante dans la zone du champ fort (20 - 50 ppm) qui pourrait être relatif aux résidus des solvants d'extraction. La superposition de ce spectre avec celui de l'ester précédemment illustré a permis d'identifier 10 atomes de carbones relatifs à l'alcool recherché. La superposition du spectre **RMN-¹³C** en découplage total de proton avec celui **RMN-¹³C** en mode **DEPT-135°** (**Figure V. 9**), a permis de montrer la disparition de deux signaux et l'inversion de trois autres indiquant que la molécule renferme trois carbones quaternaires et trois autres secondaires. En conclusion, l'examen des déplacements chimiques des différents carbones nous a permis d'attribuer :

Chap. V : Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles et acides gras

- Un carbone quaternaire hybridé en sp^2 qui résonne respectivement à 144,33 ppm.
- Un carbone de type CH hybridé en sp^2 qui résonne à 117,08 ppm.
- Trois carbones de type CH_2 hybridé en sp^3 qui résonnent à 69,61 ; 31,78 et 31,02 ppm ;
- Un carbone quaternaire hybridé en sp^3 qui résonne à 43,70 ppm ;
- Deux carbones de types CH hybridés en sp^3 qui résonnent à 42,90 et 36,60 ppm ;
- Deux carbones de type CH_3 qui résonnent à 23,10 et 15,99 ppm.

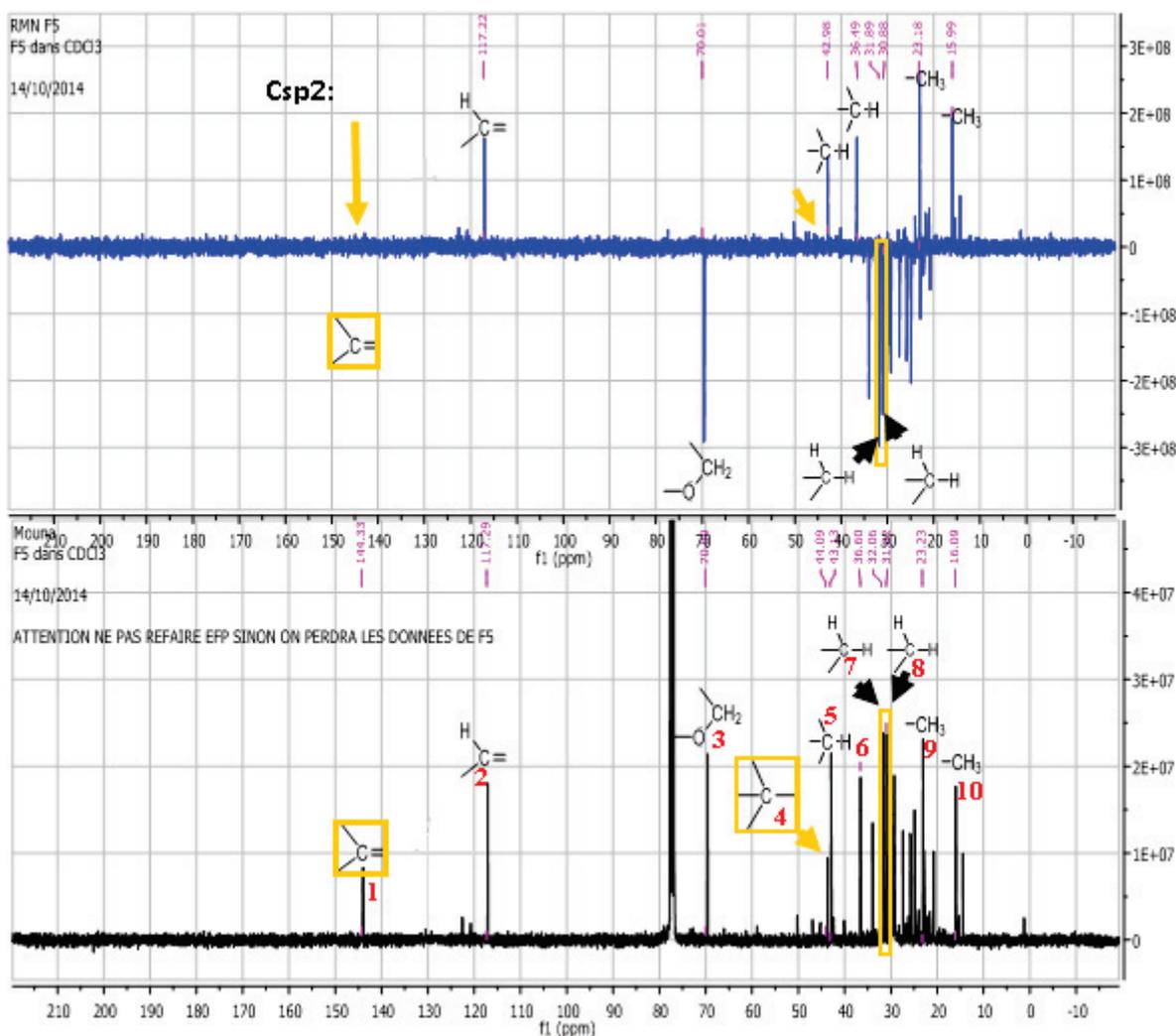


Figure V. 9 : Spectres $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ avec découplage total de proton $\text{RMN }^{13}\text{C-}\{^1\text{H}\}$ et en mode $\text{DEPT-}135^\circ$ du composé X1.

L'analyse préliminaire du spectre $\text{RMN-}^1\text{H}$ enregistré également à 400 MHz dans une solution CDCl_3 (**Figure V. 10**) a permis de repérer :

- Un multiplet d'intégration 1 à 5,23 ppm attribué à un proton éthylénique ;
- Un doublet dédoublé d'intégration 2 porté par un carbone oxygéné d'un système de spin de type AB qui résonne à 3,75 et 3,80 ppm avec une constante de couplage de 10,99 Hz ;
- Un ensemble de signaux d'intégration 4 dans la zone allant 2.31 à 2.16 ppm ;
- Un singulet d'intégration 3 à 0,91 ppm ;
- Un multiplet d'intégration 3 à 1,66 ppm, qui pourrait être attribué à des protons allyliques en positions *trans* à un proton éthylénique.

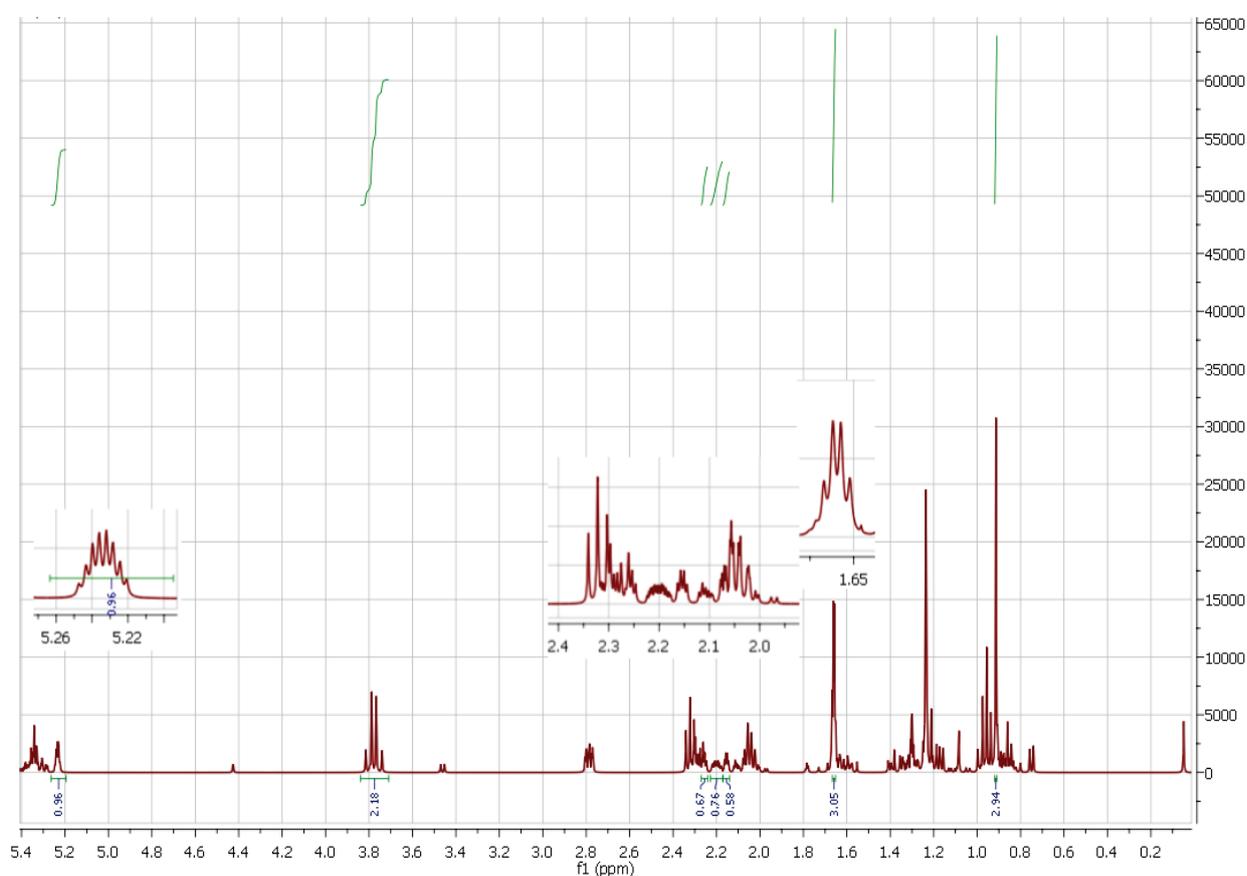


Figure V. 10 : Spectre RMN ^1H à 400 MHz dans CDCl_3 du composé X1.

Autre que les expériences des corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C , HSQC (Figure V. 11), HMBC (Figure V. 12), l'expérience de corrélation homonucléaire COSY H-H (Figure V. 13) a permis de déterminer essentiellement les corrélations (H_i / H_j) de constante de couplage $^3\text{J}_{\text{H-H}}$ et également $^4\text{J}_{\text{H-H}}$.

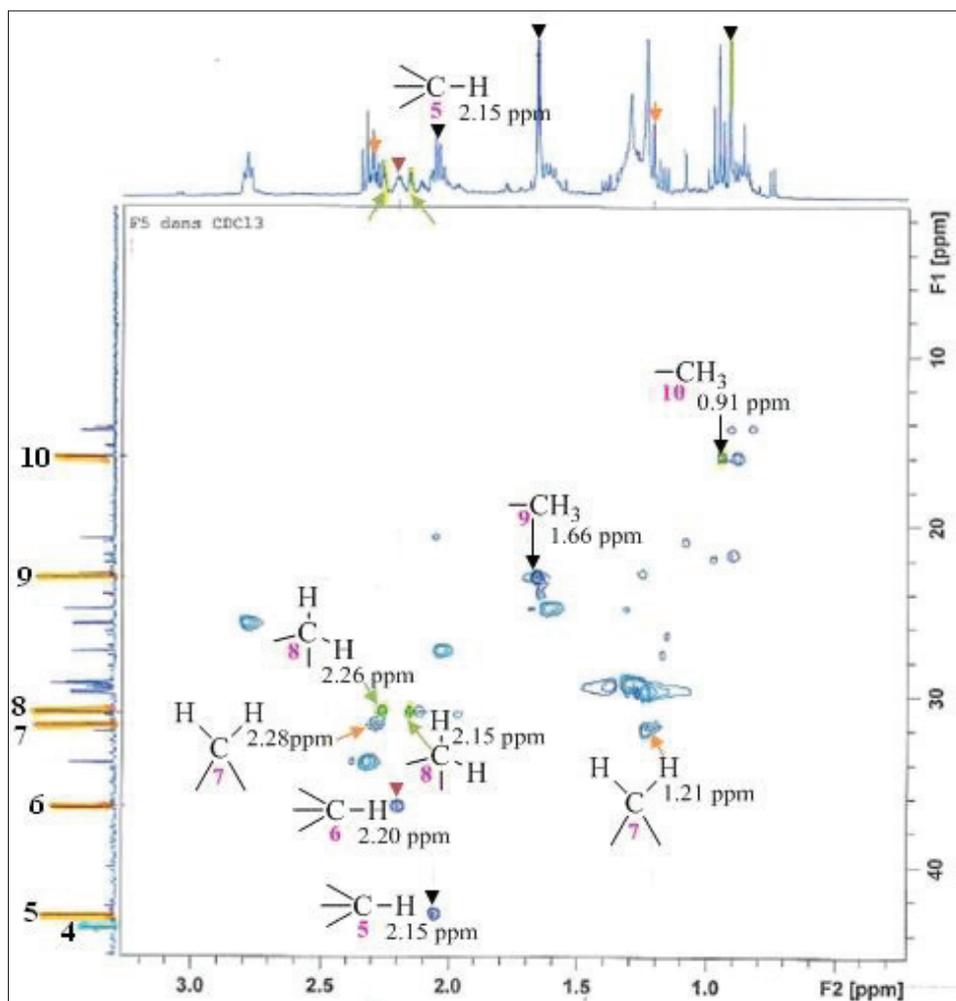


Figure V. 11 (a) : Carte de corrélation hétéronucléaire MRN ^{13}C en mode HSQC ^1H - ^{13}C .

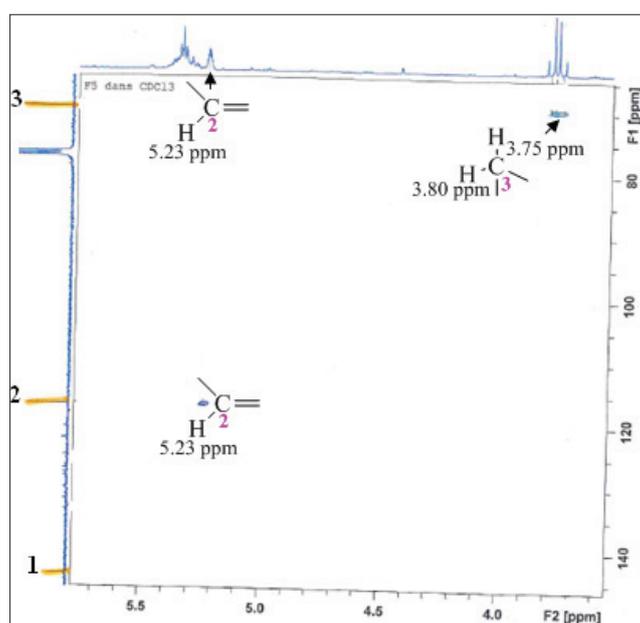


Figure V. 11 (b) : Carte de corrélation hétéronucléaire MRN ^{13}C en mode HSQC ^1H - ^{13}C .

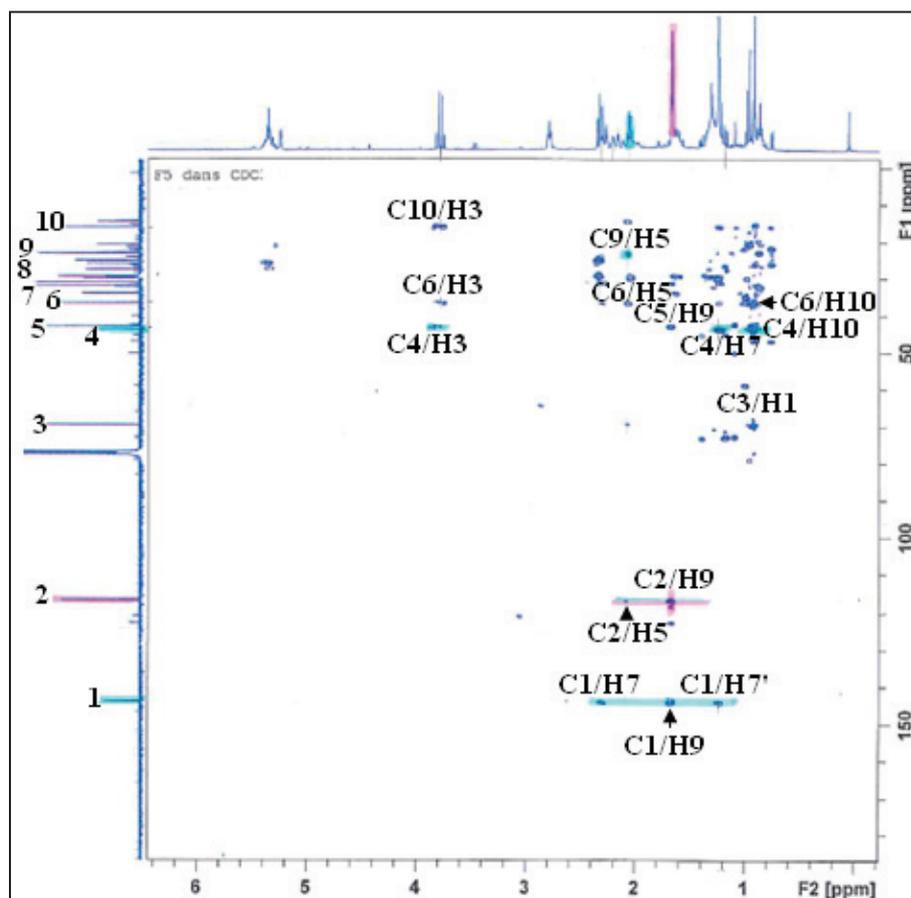


Figure V. 12 : Carte de corrélation hétéronucléaire MRN ^{13}C en mode HMBC.

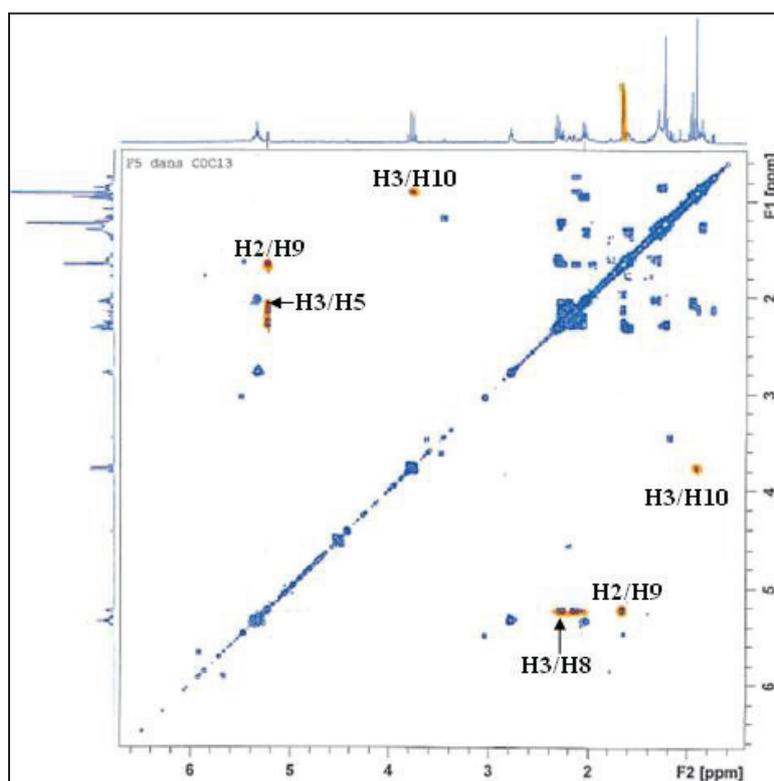


Figure V. 13 : Carte de corrélation homonucléaire COSY H-H.

L'interprétation de l'ensemble de ces données RMN a permis de déterminer la structure de l'alcool (**Figure V. 14**).

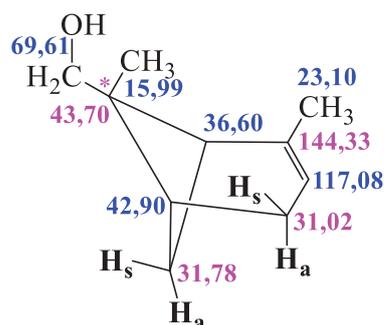


Figure V. 14 : Structure proposée de l'alcool X1.

La structure proposée de l'alcool correspondant à l'ester est confirmée par l'interprétation, de différents fragments du spectre de masse en mode impact électronique (**Figure V. 15**). En comparant les différentes voies de fragmentation des **Figures V. 8 et 15**. On trouve une similitude intégrale entre les deux structures et également avec celles de la littérature⁷.

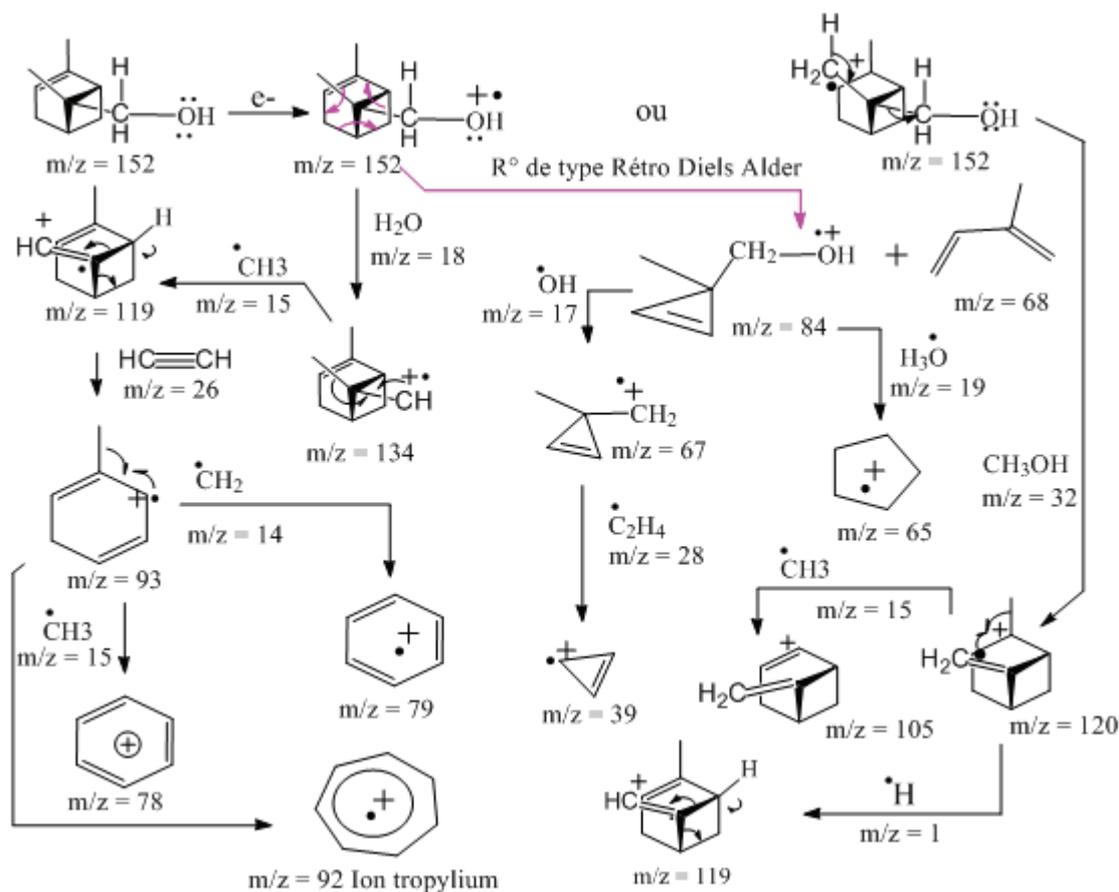


Figure V. 15 : Mécanisme réactionnel de fragmentation de l'alcool en spectrométrie de masse en mode impact électronique (R°: réaction).

En conclusion, les deux molécules identifiées sont deux dérivés de la molécule de pinène et elles ont été rapportées pour la première fois par De Pascual Teresa et al. (1983)⁸. L'alcool et son ester correspondant sont nommés, respectivement, **pin-2-en-8-ol** et **8-acétoxy-pin-2-ène**. De plus, l'étude structurale de ces auteurs par spectroscopie RMN est fondée uniquement sur l'interprétation du spectre RMN ¹H (60 Hz) : en présentant le déplacement chimique (**δ, ppm**), les constantes de couplages (**J, Hz**) et la multiplicité que pour cinq types de protons. Cependant, la présente étude a apporté aux travaux antérieurs une étude structurale approfondie par RMN-1D et 2D ainsi que l'illustration détaillée des spectres de masses. De plus, des auteurs⁸ ont identifié uniquement 4 molécules (β -caryophyllène, caryophyllène oxyde, linalool, bornyle acetate) autres que l'ester et l'alcool.

3.1.4. Étude comparative des données de spectroscopie RMN du α -pinène et du 8-acétoxy-pin-2-ène

Le **Tableau V. 4** résume des données RMN du **α -pinène**⁹ et ceux de l'ester **8-acétoxy-pin-2-ène**. Les données RMN (déplacement chimique (**δ, ppm**) et les constantes de couplages (**J, Hz**) du **α -pinène** ont été enregistrées à 500 MHz. Elles ont été déterminées par les acquisitions **RMN 2D** suivantes : **COSY H-H (45)**, **COSY H-H à longue distance COSY H-H (LR)** qui permet de déterminer les constantes de couplage **H-H** en **nJ ($n > 3$)**, **INADEQUATE** qui permet d'accéder aux constantes de couplages **^{13}C - ^{13}C** en **1J** . De plus, les constantes de couplages **H-H** ont été déterminées par calcul quantique moyennant la méthode de découplage de spin⁹. Les numéros des carbones sont indiqués dans la **Figure V. 16** qui représente la structure des deux molécules identifiées.

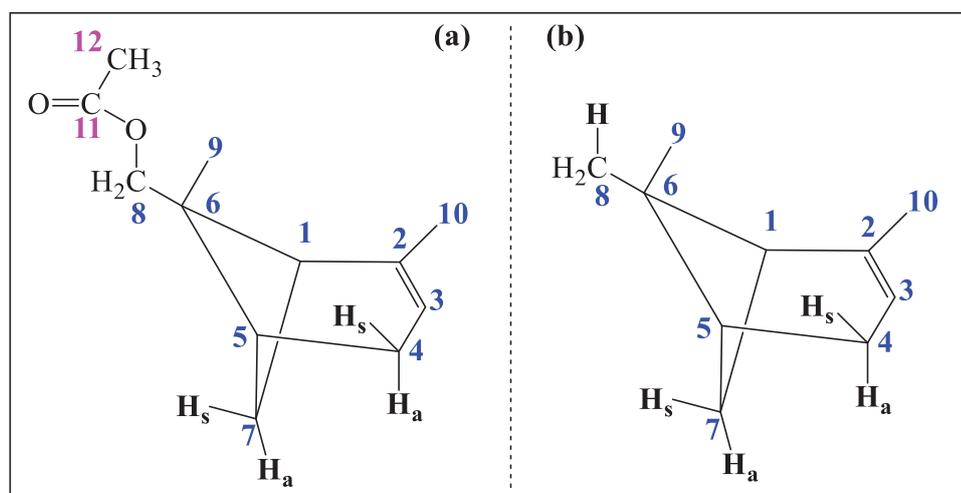


Figure V. 16 : Structure de α -pinène (b) et son dérivé 8-acétoxy-pin-2-ène (a).

L'examen des données RMN montre que les protons du groupement CH₃ en position **10** du **α -pinène** sont en couplage en ⁴J_{H-H} avec le proton allylique en position **3** et en ⁵J_{H-H} avec deux autres protons dont l'un est en position axiale (**a**) et l'autre en équatorial (**e**). Ces couplages à longue distance ont été expliqués par l'arrangement coplanaire⁹. Ceci explique clairement la multiplicité du groupement CH₃, également, en position **10** du **8-acétoxy-pin-2-ène** et justifie la configuration *trans*.

Tableau V.4 : Données RMN du **α -pinène**⁹ et du **8-acétoxy-pin-2-ène**.

α-pinène⁹				8-acétoxy-pin-2-ène		
<i>N° de C</i>	¹³ C (δ ,ppm)	¹ H (δ ,ppm)	J _{H-H} (Hz)	<i>N° de C</i>	¹³ C (δ ,ppm)	¹ H (δ ,ppm)
1	46,99	1,93	J (1,3) = 1,4 J (1,5) = 5,6 J (1,7e) = 5,6	1	36,95	2,21
2	144,54	-		2	143,62	-
3	116,01	5,18	J (3,4a) = 3,0 J (3,4e) = 2,8 J (3,5) = 1,3 J (3,10) = 2,0	3	117,12	5,24
4	31,25	a : 2,23 s : 2,15	J (4a,4e) = 17,2 J (4a,5) = 3,0 J (4a,10) = 2,2 J (4e,5) = 2,8 J (4e,10) = 2,2	4	30,86	a : 2,25 b : 2,16
5	40,69	2,06	J (5,7e) = 5,6	5	43,20	2,06
6	37,97	-	-	6	41,92	-
7	31,45	a : 1,15 s : 2,33	J (7e,7a) = 8,4	7	31,64	a' : 1,15 b' : 2,33
8	26,35	1,26	-CH ₃	8	71,05	-O-CH ₂ : a' : 4,28 b' : 4,21
9	20,80	0,83		9	16,40	0,89
10	23,01	1,65		10	23,06	1,66
				11	171,83	-
				12	21,20	2,06

3. Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*A. longa*

Les huiles essentielles sont reconnues par leurs activités antimicrobiennes. La méthode de disque a permis de déterminer qualitativement l'action des huiles essentielles de la plante sur les

Chap. V : Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles et acides gras

différentes souches Gram⁽⁺⁾, Gram⁽⁻⁾ et un champignon (*C. albicans*). Celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait (Tableau V.5), (Figure V. 17).

Tableau V. 5 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles obtenues des racines (R) et des parties aériennes (F) d'*A. longa*.

Souches Gram ⁽⁻⁾	Ampicilline	R09	R11	R12	R13	F12	F13
ZI (mm)							
<i>E. coli</i>	12,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	10,2 ± 0,3	13,0 ± 0,0
<i>S. typhimurium</i>	16,3 ± 0,6	12,0 ± 0,5	8,2 ± 0,8	8,3 ± 0,6	9,0 ± 1,0	9,7 ± 0,3	11,7 ± 0,6
Souches Gram⁽⁺⁾							
<i>E. fecium</i>	45,7 ± 0,6	28,7 ± 1,5	49,0 ± 1,0	34,7 ± 1,5	31,2 ± 0,8	22,2 ± 0,8	30,0 ± 0,5
<i>S. agalactiae</i>	37,0 ± 1,0	40,2 ± 0,8	55,0 ± 1,0	40,8 ± 1,9	31,3 ± 1,5	25,2 ± 0,3	29,3 ± 0,8
<i>S. aureus</i>	38,5 ± 0,5	14,3 ± 1,1	13,8 ± 0,8	11,5 ± 0,9	13,0 ± 1,0	10,5 ± 0,5	21,9 ± 0,3
Champignon							
Nystatine							
<i>C. albicans</i>	36,3 ± 0,6	11,3 ± 0,5	12,5 ± 1,3	12,3 ± 0,6	12,2 ± 0,2	11,9 ± 0,3	12,2 ± 0,3

Moyenne ± SD de trois essais ; R09, R11, R12, R13, F12 et F13 : échantillons collectés aux mois août 2009, septembre 2011, mars 2012 et avril 2013, respectivement ; ZI : diamètre de la zone d'inhibition en mm.

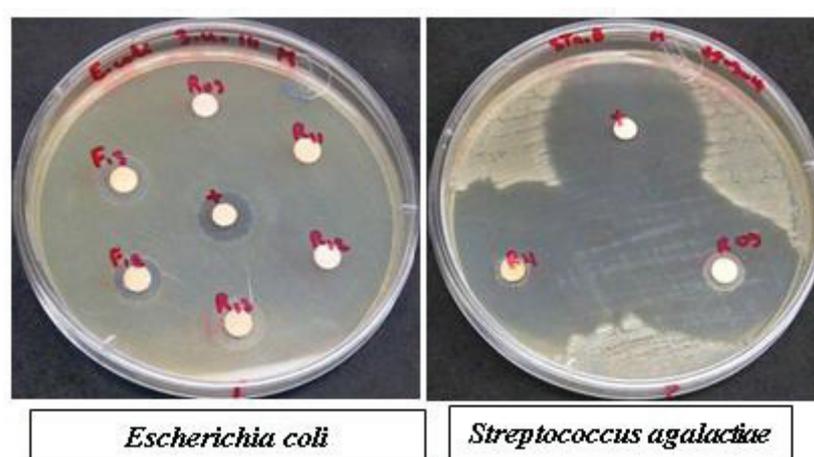


Figure V. 17 : Exemple de test d'activité antimicrobienne.

Ces résultats montrent que les différents types de souches réagissent différemment aux antibiotiques étudiés (Ampicilline et Nystatine) ainsi qu'aux huiles essentielles. On constate que les souches de Gram⁽⁺⁾ sont plus sensibles aux différentes huiles que les souches de Gram⁽⁻⁾ et le seul champignon testé (*C. albicans*). En effet, l'échantillon R11 manifeste une activité puissante (49,0 – 55,0 mm) essentiellement sur les souches *E. fecium* Gram⁽⁺⁾ et *S. agalactiae* Gram⁽⁺⁾. Cependant, *E. coli* Gram⁽⁻⁾ montre une résistance absolue contre les huiles obtenues des racines, mais cette souche est non résistante aux huiles essentielles extraites des parties aériennes d'*A. longa*. Quant à l'activité antifongique, elle est considérée comme faible en comparaison avec la nystatine.

Ces résultats concordent partiellement avec la littérature¹⁰ dans la mesure où les souches Gram⁽⁺⁾ sont plus sensibles aux huiles essentielles que les souches Gram⁽⁻⁾. La différence de sensibilité entre les deux types de bactéries est attribuée à leur structure membranaire. En effet, la présence des lipopolysaccharides au niveau des membranes des bactéries Gram⁽⁻⁾ leur confère une bonne résistance aux agents antibiotiques¹⁰.

Comparées aux études antérieures d'autres espèces du genre *Aristolochia*, les résultats de notre étude semblent être comparables à ceux de Yu et al. (2007)¹¹ qui ont montré que les souches les plus sensibles aux huiles essentielles des racines d'*A. mollissima* sont *S. Aureus* Gram⁽⁺⁾ et *S. saprophyticus* Gram⁽⁺⁾. Néanmoins, les huiles essentielles obtenues des parties aériennes d'*A. indica* manifeste une activité puissante sur *E. coli* Gram⁽⁻⁾, *Salmonella typhimurium* Gram⁽⁻⁾, mais une très faible activité sur *S. aureus* Gram⁽⁺⁾^{12,13}.

La variation de l'activité antimicrobienne des extraits s'explique par les variations de leurs compositions chimiques¹⁴. Plusieurs auteurs^{15,16,17} ont montré que les huiles essentielles riches en composés oxygénés particulièrement les mono et les sesquiterpènes oxygénés possèdent une forte activité antimicrobienne. Ainsi dans la présente étude, il semble que l'extrait le plus puissant des racines est l'extrait R11, qui est caractérisé par la plus faible teneur de mono et sesquiterpènes oxygénés (58,7%). De même, l'inhibition de la croissance d'*E. coli* par les huiles essentielles des parties aériennes pourrait être attribuée à la présence du **pin-2-en-8-ol** et du **8-acetoxy-pin-2-ène**.

En outre, la stéréochimie influence l'activité antimicrobienne. Il a été rapporté que les α -isomères et les *cis*-isomères sont moins actifs relativement aux β -isomères et aux *trans*-isomères¹⁸. En complément à cela, on peut attribuer la différence d'activité des huiles aux deux organes de la plante (racines et parties aériennes), particulièrement sur les souches *E. fecium* Gram⁽⁺⁾ et *S. agalactiae* Gram⁽⁺⁾, à la forte teneur des huiles des racines en β -isomères β -atlantol

(1,9 – 7,3%), β -elemene dioxyde 1, β -funebrene epoxyde (4,4%), Z- β -caryophyllene (4,4%). Cette activité antimicrobienne des huiles essentielles pourrait être expliquée par l'interaction moléculaire des groupements fonctionnels des composants de ces huiles avec la paroi des bactéries ce qui provoque de profondes lésions. On peut donc conclure que cette activité pourrait être le résultat d'un effet synergique ou antagoniste entre les composés majoritaires et minoritaires de ces huiles^{19,20,21}.

4. Composition chimique en acides gras des racines et des parties aériennes d'*A. longa* et du *B. dioica*

L'interprétation des résultats des analyses par **GC-FID** et **GC-MS** des fractions esters méthyliques des acides gras, a permis d'identifier et de quantifier 13 acides gras (**AG**). La composition en **AG** des fractions lipidiques des racines (**R**) et des parties aériennes (**F**) d'*A. longa* (**A**) et du *B. dioica* (**B**) est résumée dans le **Tableau V. 6**.

L'ensemble des **AG** identifiés dans les différents organes (racine et parties aériennes) d'*A. longa* et du *B. dioica* sont classés en acides gras polyinsaturés (**AGPI**) variant de 20,1 à 45,4 %, en acides gras mono insaturés (**AGMI**) variant de 10,1 à 41,2%, et en acides gras saturés (**AGS**) variant de 26,7 à 52,2%.

Les parties aériennes des deux espèces sont composées majoritairement d'**AGPI** et d'**AGS**. Ceci est attribué à la teneur élevée de l'acide linoléique (C18:3, ω -3) de 26,1% (**AF**) et 36,9% (**BF**), de l'acide stéarique (C18:0) de 17,2% (**AF**) et de l'acide palmitique (C16:0) de 23,4% (**BF**). Alors que ceux des racines sont constitués principalement de l'acide oléique (C18:1 ω -9) de 25,0% (**AR**) et de 39,5% (**BR**), de l'acide linoléique (C18:2 ω -6) de 20,0% (**AR**) et de 32,0% (**BR**).

Généralement la production en métabolites primaires chez les plantes est différente d'une famille botanique à une autre, d'une espèce à une autre même entre les différents organes de la même espèce²². Une telle répartition différentielle a été attribuée au rôle structural et fonctionnel de ces acides gras essentiels : (ω -6) et (ω -3). En effet, l'acide linoléique est le constituant dominant des membranes glycérolipides dans les tissus photosynthétiques, par conséquent son abondance dans les parties aériennes des deux espèces est évidente. En revanche, il ne se trouve pas dans les tissus non photosynthétiques, comme les racines, ce qui pourrait expliquer l'abondance de l'acide linoléique dans les racines²³.

Tableau V. 6 : Composition en acides gras des fractions lipidiques d'*A. longa* et du *B. dioïca*.

N°	Acide gras	<i>A. longa</i>		<i>B. dioïca</i>		
		AF (%)	AR (%)	BF (%)	BR (%)	
1	C10:0	Acide caprique	1,5	-	-	-
2	C12:0	Acide laurique	2,9	0,2	0,6	0,1
3	C14:0	Acide myristique	2,2	1,1	1,8	0,1
4	C16:0	Acide palmitique	14,9	32,2	23,4	23,6
5	C16:1 ω -7	Acide palmitoléique	5,7	2,7	7,2	1,5
6	C17:0	Acide margarique	-	1,1	0,7	1,2
7	C18:0	Acide stéarique	17,2	12,5	7,9	1,2
8	C18:1 ω -9	Acide oléique	7,3	25,0	2,6	39,5
9	C18:2 ω -6	Acide linoléique	19,3	20,0	11,2	32,0
10	C18 : 3 ω -3	Acide linoléique	26,1	0,1	36,9	0,1
11	C20:0	Acide arachidique	2,9	2,0	-	0,4
12	C20:1	Acide gadoléique	-	-	,	0,2
13	C22:0	Acide b��n��ique	-	2,9	3,0	0,1
ΣAGPI			45,4	20,1	48,1	32,1
ΣAGMI			13,6	27,7	10,1	41,2
ΣAGS			41,5	52,2	41,8	26,7
(AGPI)/(AGS)			1,1	0,4	1,1	1,2
(ω-6)/(ω-3)			0,7	200,4	0,3	493,1

(AGPI) : acides gras polyinsaturés, (AGMI) : acides gras mono insaturés, (AGS) : acides gras saturés

L'analyse de la composition chimique des fractions lipidiques de ces mêmes plantes rapportées par des études pr  c  dentes^{24,25,26} met en évidence l'existence de différences quantitatives et qualitatives dans ses composants. De ce fait, ces différences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs : l'origine, l'espèce, la période de récolte, le climat, la durée de séchage et les techniques d'extraction et d'analyses^{27,28}.

Dans ce contexte, De Pascual et al. (1984)²⁴ ont trouvé que l'acide palmitique (44,0%), l'acide linoléique (22,0%), l'acide linolénique (19,0%) et l'acide oléique (10,0%) constituent les AG majoritaires des parties aériennes d'*A. longa*, alors que les racines sont caractérisées par l'acide linoléique (40,0%), l'acide oléique (13,0%), l'acide palmitique (22,0%) et l'acide linolénique (13,0%).

Récemment, Morales et al. (2012)²⁹ ont trouvé que les composants majeurs en AG des feuilles de *B. dioïca* provenant d'Espagne sont l'acide linolénique (67,8%), l'acide palmitique (17,0%) et l'acide linoléique (6,5%). En complément à cela, le profil chimique en AG des parties

aériennes de l'espèce *B. cretica*³⁰ est caractérisé par les **AGS** (32,8%), **AGMI** (59,3%) et les **AGPI** (8,0%). Ces auteurs ont trouvé des résultats similaires à ceux de *B. dioïca* provenant d'Espagne en termes d'**AG** majoritaires (C18:3 > C16:0 > C18:2).

En outre, une meilleure connaissance de la composition chimique de ces espèces suscite un intérêt aussi bien pour évaluer leurs valeurs nutritionnelles que pour leurs potentialités médicinales. Il a été mentionné que les rapports **(ω -6) / (ω -3)** et **(AGPI) / (AGS)** définissent deux critères nutritionnels³¹. Il ressort de ces profils chimiques en **AG** que les rapports **(ω -6) / (ω -3)** varient de 0,7 à 200,4 dans les racines et les parties aériennes d'*A. longa*, respectivement. Concernant l'espèce *B. dioïca*, on a trouvé une valeur de rapport faible (0,3) dans les parties aériennes, mais une valeur beaucoup plus élevée dans les racines (493,1). De plus, on observe une variation du rapport **(AGPI) / (AGS)** de 0,4 à 1,1 dans les racines et les parties aériennes d'*A. longa*, respectivement. De même dans les racines et les parties aériennes de *B. dioïca*, ce rapport varie de 1,1 à 1,2, respectivement.

Comparées aux études antécédentes^{29,30}, les valeurs de deux rapports **(AGPI) / (AGS)** et **(ω -6) / (ω -3)** dans les parties aériennes des deux espèces étaient généralement de même ordre de grandeur que d'autres espèces comestibles. Par conséquent, les parties aériennes des deux espèces peuvent être considérées comme une source importante et saine d'**AG** essentiels. Ces acides sont indispensables pour le corps humain, car il ne les secrète pas, et doivent donc être apportés par l'alimentation. En effet, ils interviennent dans la régulation de la pression artérielle et les réponses inflammatoires. Ces **AG** confèrent une protection contre les maladies cardiaques et exercent un effet anti-inflammatoire qui pourrait être important dans les maladies cardiovasculaires et aussi dans d'autres pathologies. De même, ils ont un effet préventif contre le diabète et certains types de cancer^{29,30,32}.

5. Activité antimicrobienne des fractions lipidiques d'*A. longa* et de *B. dioïca*

Le pouvoir antimicrobien des fractions lipidiques d'*A. longa* et de *B. dioïca* est évalué, pour la première fois, par la détermination de diamètre de zones d'inhibition (**Tableau V. 7**) et par les valeurs de **CMI** et de **CMB** (**Tableau V. 8**).

On remarque que, les fractions lipidiques testées ont manifesté des effets inhibiteurs distincts. En effet, les fractions lipidiques des racines (AR, BR) des deux plantes exercent des effets inhibiteurs importants, essentiellement sur les souches de bactéries Gram⁽⁺⁾. La résistance des Gram⁽⁻⁾ est attribuée à leur membrane externe hydrophile qui peut bloquer la pénétration de composés hydrophobes dans la membrane cellulaire cible^{33,34}.

Dans la présente étude, les résultats des **CMI** et des **CMB** montrent que les souches de bactéries testées présentent une sensibilité distincte aux différentes fractions lipidiques. Salvat et al.³⁵ ont qualifié la puissance des extraits lipidiques avec des valeurs de **CMI** ≤ 500 $\mu\text{g/mL}$. En conséquence, les fractions lipidiques des racines (AR, BR) des deux plantes sont plus puissantes avec des valeurs de **CMI** variant de 125 à 250 $\mu\text{g/mL}$. Cette observation est cohérente avec les résultats de la méthode de diffusion de disque : l'*E. faecium* Gram⁽⁺⁾ est la souche la plus sensible (18,2 – 20,8 mm). La souche de bactéries Gram⁽⁻⁾ *S. typhimurium* a montré une résistance aux différents extraits.

Tableau V. 7 : Activité antimicrobienne des fractions lipidiques d'*A. longa* et de *B. dioica* déterminée par la méthode de *diffusion de disque*.

Souches de bactéries	Antibiotique		Fractions lipidiques		
	<i>Ampicilline</i>	<i>AR</i>	<i>AF</i>	<i>BF</i>	<i>BR</i>
	Diamètres de zones d'inhibition (mm)				
<i>E. coli</i> Gram ⁽⁻⁾	12,0 \pm 1,0	8,5 \pm 0,5	9,5 \pm 1,0	0,0 \pm 0,0	9,2 \pm 0,3
<i>S. typhimurium</i> Gram ⁽⁻⁾	21,0 \pm 1,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	7,5 \pm 0,5
<i>E. faecium</i> Gram ⁽⁺⁾	43,0 \pm 1,0	18,2 \pm 0,8	16,2 \pm 0,8	9,2 \pm 0,3	20,8 \pm 0,8
<i>S. agalactiae</i> Gram ⁽⁺⁾	26,7 \pm 0,5	8,5 \pm 0,3	8,2 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0	11,7 \pm 0,5
<i>S. aureus</i> Gram ⁽⁺⁾	42,7 \pm 0,5	9,8 \pm 0,8	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	10,2 \pm 0,3

Tableau V. 8 : Activité antimicrobienne des fractions lipidiques d'*A. longa* et de *B. dioica* déterminée par la méthode de *micro dilution de plaques*.

Souches de bactéries	Antibiotique		Fractions lipidiques							
	<i>Ampicilline</i>		<i>BR</i>		<i>BF</i>		<i>AR</i>		<i>AF</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
	($\mu\text{g/mL}$)									
<i>E. coli</i>	31,2	62,5	1000	1000	800	800	1000	1500	1000	1500
<i>S. typhimurium</i>	15,6	31,2	1000	>2000	1000	>2000	1000	>2000	1000	>2000
<i>E. faecium</i>	0,4	1,9	125	>250	500	>1000	125	>250	250	>500
<i>S. agalactiae</i>	3,8	7,8	250	500	500	1000	125	250	250	500
<i>S. aureus</i>	0,5	1,9	1000	1000	1000	1000	1000	1500	1500	1000

De plus, les **CMI** et les **CMB** déterminées sont caractéristiques d'un extrait pour une souche donnée, en précisant sa modalité d'action. Ainsi, l'action d'un extrait est considérée comme bactéricide si le rapport (**CMB**) / (**CMI**) est inférieur ou égal à 2. L'action est dite bactériostatique si le rapport (**CMB**) / (**CMI**) est supérieur à 2^{36,37} (**Tableau V. 9**). Il a été rapporté que l'acide laurique possède un effet bactéricide sur les souches *E. coli* ATCC12795 et *S. aureus* ATCC 29213³⁸.

Tableau V. 9 : Rapport **CMB** / **CMI** de différentes fractions lipidiques.

Souches de bactéries	Antibiotique	Fractions lipidiques				Interprétation
	<i>Ampicilline</i>	<i>BR</i>	<i>BF</i>	<i>AR</i>	<i>AF</i>	
CMB/CMI						
<i>E. coli</i>	2,0	1,0	1,0	1,5	1,5	Bactéricide ^a
<i>S. typhimurium</i>	2,0 ^a	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0	Bactériostatique ^b
<i>E. feacium</i>	4,7	> 2,0	> 2,0	> 2,0	> 2,0	Bactériostatique
<i>S. agalactiae</i>	2,1 ^b	2,0	2,0	2,0	2,0	Bactéricide
<i>S. aureus</i>	4,7 ^b	1,0	1,0	1,5	1,5	Bactéricide

En outre, l'activité antimicrobienne des acides gras ainsi que celle des esters méthyliques des acides gras ont été rapportées^{38,39,40,41,42,43,44}. Aligianis et al. (2001)⁴⁵ ont suggéré des critères pour classer le pouvoir inhibiteur des extraits de plantes en se basant sur les valeurs des **CMI** :

- Pouvoir inhibiteur fort si **CMI** < 500 µg/mL
- Pouvoir inhibiteur intermédiaire si 600 < **CMI** < 1500 µg/mL
- Pouvoir inhibiteur faible si **CMI** > 1600 µg/mL.

Par conséquent, l'acide linoléique a un pouvoir inhibiteur faible sur l'*E. coli* (3130 µg/mL)⁴¹ mais un pouvoir intermédiaire sur *S. aureus* 25922 (1250 µg/mL)⁴³, alors que son ester méthylique est non actif. C'est le même résultat trouvé avec l'acide oléique (1250 µg/mL), l'acide linoléique (625 µg/mL) et leurs esters méthyliques⁴³. L'effet inhibiteur de l'acide linoléique^{41,43} sur la souche Gram⁽⁺⁾ du *S. aureus* est non seulement expliqué par la

longueur de la chaîne aliphatique, mais aussi au nombre d'insaturations et à leur structure spatiale. De plus, il a été rapporté que l'effet inhibiteur des **AGPI** est beaucoup plus important que celui des **AGMI**⁴⁶. Compte tenu des données bibliographiques, l'activité pourrait être attribuée à la teneur élevée en **AGPI** et particulièrement celle de l'acide linoléique et oléique.

6. Conclusion

Cette étude a montré que le profil chimique des huiles essentielles et des acides gras d'*A. longa* et de *B. dioica* présente une variabilité quantitative et qualitative. L'analyse des huiles essentielles des racines et des parties aériennes d'*A. longa* a permis d'identifier en total 103 et 70 composés, respectivement. La diversité moléculaire des racines est répartie essentiellement en sesquiterpènes oxygénés (50,2 - 81,1%) suivis de monoterpènes oxygénés (5,9 - 28,0%), sesquiterpènes hydrocarbonés (0,7 - 18,4%) et monoterpènes hydrocarbonés (0,0 - 0,8%). Dans les parties aériennes, les composés discriminants sont essentiellement le pin-2-en-8-ol (29,0 - 17,7%) et le 8-acetoxy-pin-2-ène (15,0 - 25,6%). En effet, il en résulte des propriétés antimicrobiennes différentes. Pour des applications industrielles, si une composition chimique ou une activité biologique exclusive recherchée, le facteur saison devrait être tenu en considération. En outre, les acides gras identifiés dans les différents organes d'*A. longa* et de *B. dioica* ont été classés **AGPI** variant de 20,1 à 45,4%, en **AGMI** variant de 10,1 à 41,2%, et en **AGS** variant de 26,7 à 52,2%. La présente étude prouve que *A. longa* et *B. dioica* constituent des sources potentielles des acides gras essentiels (ω -6 et ω -3) et des agents antimicrobiens.

Références bibliographiques

- [1] Tholl, D., 2006. Terpene synthases and the regulation diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 297-304.
- [2] Kakaraparthi, P.S., Srinivas, K.V.N.S., Kotes, K.J., Kumar, A.N., Rajput, D.K., Anubala, S., 2015. Changes in the essential oil content and composition of palmarosa (*Cymbopogon martini*) harvested at different stages and short intervals in two different seasons. *Ind. Crop. Prod.* **69**, 348-354.
- [3] Gijzen, H.J.M., Wijnberg, J.B.P.A., Ranvenswaay, C.V., De Groot, A., 1994. Rearrangement reactions of aromadendrene derivatives. The synthesis of (+)-maaliol, starting from natural (+)-aromadendrene-IV. *Tetrahedron* **50**, 4733-4744.
- [4] Francisco, C.S., Messiano, Lopes, L.M.X., Tininis, A.G., De Oliveira, J.E., Capellari Jr, L., 2008. Classification of *Aristolochia* species based on GC-MS and chemometric analyses of essential oils. *Phytochemistry* **69**, 168-175.
- [5] Priestap, H.A., Van Baren, C.M., Lira, P.D., Coussio, J.D., Bandoni, A.L., 2003. Volatile constituents of *Aristolochia argentina*. *Phytochemistry* **63**, 221-225.
- [6] Sagrero-Nieves, L., Bartley, J.P., Espinosa, B.G., Dominguez, X. A., Verde, S. J., 1997. Essential oil composition of *Aristolochia brevipes* Benth. *Flavor Fragr. J.* **17**, 69-71.
- [7] Vila, R., Mundina, M., Muschiatti, L., Priestap, H. A., Bandoni, A. L., Adzet, T., Cañigueral, S., 1997. Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elegans*. *Phytochemistry* **46**, 1127-1129.
- [8] De Pascual Teresa, J., Urones, J.G., Fernandez, A., 1983. Monoterpene derivatives from the essential oil of *Aristolochia longa*. *Phytochemistry* **22**, 2753-2754.
- [9] Lee, S.G., 2002. Spectral assignment and reference data: α -pinène and myrtenol, complete 1H NMR assignment. *Magn. Reson. Chem.* **40**, 311-312.
- [10] Jang, S., Cho, H.H., Cho, Y.B., Park, J.S., Jeong, H.S. 2010. Research article Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biology.* **11**, 1471-2121.
- [11] Yu, J.Q., Liao, Z.X., Cai, X.Q., Lei, J.C., Zou, G.L., 2007. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*, *Environ. Toxicol. Phar.* **3**, 162-167.
- [12] Shafi, P. M., Rosamma, M. K., Jamil, K., Reddy, P. S., 2002. Antibacterial activity of the essential oil from *Atistolochia indica*. *Fitoterapia* **73**, 439-441.
- [13] Li, Z.J., Njateng, G.S.S., He, W.J., Zhang, H.X., Gu, J.L., Chen, S.N., Du, Z.Z., 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the edible aromatic plant *Aristolochia delavayi*. *Chem. Biodivers.* **10**, 2032-2041.

- [14] Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L., 2012. European pennyroyal (*Menthapulegium*) from Portugal: chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Ind. Crop. Prod.* **36**, 81-87.
- [15] Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**, 223-253.
- [16] Carson, C.F., Riley, T.V., 1995. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 264-269.
- [17] Cavar, S., Maksimovic, M., Solic, M.E., Jerkovic-Mujkic, A., Besta, R., 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two Satureja essential oils. *Food Chem.* **111**, 648-653.
- [18] Dorman, H.J.D., Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 308-316.
- [19] Ferreira, M.L.R., De Pascoli, I.C., Nascimento, I.R., Zukerman-Schpector, J., Lopes, L.M.X., 2010. Aporphine and bisaporphine alkaloids from *Aristolochia lagesianavar.intermedia*. *Phytochemistry* **71**, 469-478.
- [20] Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R., Conchello, P., 2012. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from morocco. *Food Res. Int.* **45**, 313-319.
- [21] Felice, S., Francesco, N., Nelly, A.A., Maurezio, B., Werner, H., 2004. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcata* L. *Flav. Fragr. J.* **20**, 291-294.
- [22] Ghazghazi, H., Aouadhi, C., Hasnaoui, B., 2013. Activité antimicrobienne d'huile essentielle et d'extraits des feuilles de *Rosa canina*. *Revue F. S. B.* **XI**, 179-188.
- [23] Somerville, C., 2000. The twentieth century trajectory of plant biology. *Cell* **100**, 13-25.
- [24] De Pascual Teresa, J., Urones, J.G., Fernandez, A., Alvarez, M.D.V., 1984. Lipid components of *Aristolochia longa*. *Phytochemistry* **23**, 461-462.
- [25] Morales, P., Ferreira, I.C., Carvalho, A.M., Sacher-Mata, M.C., Camara, M.; Tardio, J., 2012. Fatty acids profiles of some Spanish wild vegetables. *Food Sci. Technol. Int.* **18**, 281-290.
- [26] Vardavas, C.I., Majchrzak, D., Wagner, K.H., Elmadfa, I., Kafatos, A., 2006. Lipid concentrations of wild edible greens in Crete. *Food Chem.* **99**, 822-834.
- [27] Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P., Carnacini, A., 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link)): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3741-3746.

[28] Curado, M.A., Oliveira, C.B.C., Jesus, J.B., Santos, S.C., Seraphin, J.C., Ferri, P.H., 2006. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytotherapy* **67**, 2363- 2369.

[29] Simopoulos, A.P., 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* **56**, 365-379.

[30] Mirmiran, P., Hosseinpour-Niazi, S., Naderi, Z., Bahadoran, Z., Sadeghi, M., Azizi, F., 2012. Association between interaction and ratio of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid and the metabolic syndrome in adults. *Nutrition* **28**, 856-63.

[31] HMSO UK, 1994. Department of Health. Nutritional aspects of cardiovascular disease. London, *Report on Health and Social Subjects* **45**, 37-46.

[32] Koren, N., Simsa-Maziel, S., Shahar, R., Schwartz, B., Monsonigo-Ornan, E., 2014. Exposure to omega-3 fatty acids at early age accelerate bone growth and improve bone quality. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 623-633.

[33] Vaara, M., 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* **56**, 395-411.

[34] Marzouk, B., Ben Hadj, Ferid M., Chraief, I., Mastouri, M., Boukef, K., Marzouk Z., 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. *J Food Agric. Environ.* **6**, 78–82.

[35] Salvat, A., Antonnacci, L., Fottunato, R.H., Ssuarez, E.Y., Godoy, H.M., 2001. Screening of some plants from northern Argentina for their antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**, 293-297.

[36] Fauchere, L.L., Avril, J.L., 2002. Bactériologie Générale et Médicale. Editions Ellipses: Paris.

[37] Kouadio, N. J., Guessennd, N.K., Kone, M.W., Moussa, B., Koffi, Y.M., Guede, K.B., Yao, K., Bakayoko, A., Trabi, H.F., Dosso. M., 2015. Évaluation de l'activité des feuilles de *Mallotus oppositifolius* (Geisel.) Müll.-Arg (Euphorbiaceae) sur des bactéries multirésistantes et criblage phytochimique. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **9**, 1252-1262.

[38] Zheng, C.J., Yoo, J. S., Lee, T.G., Cho, H.Y., Kim, Y. H., Kim, W.G., 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters* **579**, 5157-5162.

[39] Fischer, C.L., Drake, D.R.; Dawson, D.V., Blanchette, R., Kim, A., Brogden, K.A., Wertza, P.W., 2012. Antibacterial Activity of Sphingoid Bases and Fatty Acids against Gram positive and Gram negative Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1157–1161.

[40] Batovska, D.I., Todorava, I.T., Tsvetkova, I.V., Najdenski, H.M., 2009. Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships. *Pol. J. Microbiol.* **58**, 43-47.

[41] Mc Gaw, L.J., Jager, A.K., Van Staden, J., 2002. Isolation of antibacterial fatty acids from *Schotia brachypetala*. *Fitoterapia* **73**, 431- 433.

[42] Dilika, F., Bremner, P.D., Meyer, J.J.M., 2000. Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia* **71**, 450-452.

[43] Kalhapure, R.S., Mocktar, C., Sikwal, D.R., Sonawane, S.J., Kathiravan, M.K., Skelton, A., Govender, T., 2014. Ion pairing with linoleic acid simultaneously enhances encapsulation efficiency and antibacterial activity of vancomycin in solid lipid nanoparticles. *Colloid. Surface B* **117**, 303-311.

[44] Kabara, J.J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J., Truant, J.P., 1972. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**, 23-28.

[45] Aligiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 4168-4170.

[46] Golebiowski, M., Urbanek, A., Oleszczak, A., Dawgul, M., Kamysz, W., Bogus, M.I., Stepnowski, P., 2014. The antifungal activity of fatty acids of all stages of *Sarcophaga carnaria* L. (Diptera: Sarcophagidae). *Microbiol. Res.* **169**, 279-286.

Chapitre VI : Identification structurale d'une molécule de la fraction acétate d'éthyle d'*A. longa*

1. Introduction

Le décocté obtenu après hydrodistillation est souvent considéré comme un déchet non valorisable. Pendant les dernières années, les producteurs d'huiles essentielles ont focalisé leurs efforts sur l'innovation et la valorisation de ces déchets. Dans cette optique, on a extrait la fraction d'acétate d'éthyle issue du décocté après hydrodistillation des parties aériennes d'*A. longa*. Il en résulte des étapes de fractionnement, de purification et d'isolement d'un composé qu'on a noté **X3**. Dans le présent chapitre, on présente une étude structurale complète par UV-Visible, IR, RMN du composé **X3**.

2. Profil chromatographique et formule brute du composé X3

Le profil chromatographique du composé **X3** obtenu par HPLC est représenté dans la **Figure VI. 1**. En dépit de la présence des impuretés mineures, on peut considérer que le composé **X3** est quasiment pur.

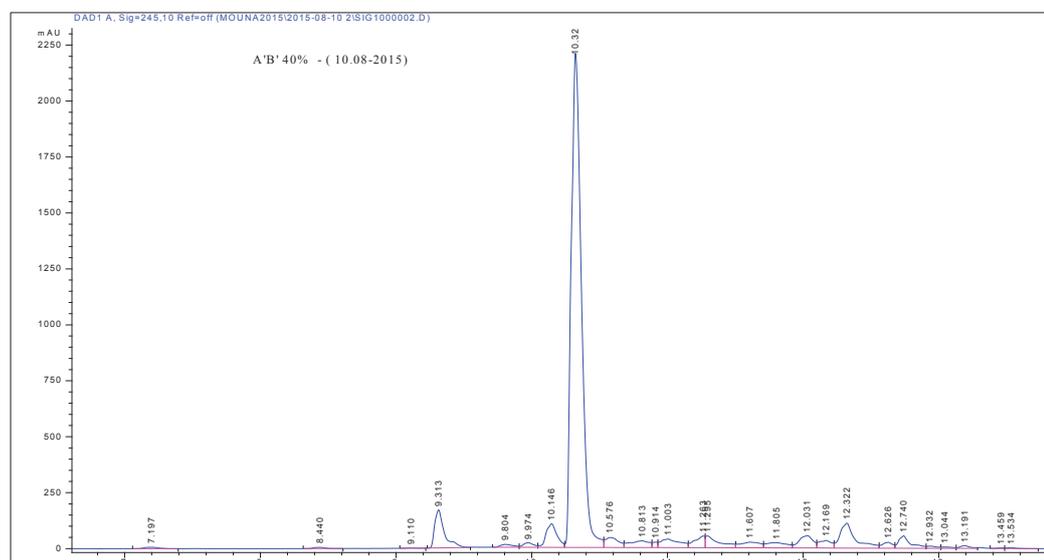


Figure VI. 1 : Chromatogramme du composé **X3**.

L'identification de la formule brute relative au composé **X3** est déterminée par spectrométrie de masse haute résolution (ESI-Qq-TOF). Ainsi, cette molécule est de formule brute $C_{23}H_{18}N_4O_8$ et de masse moléculaire précise 478.1052 g/mol.

3. Interprétation du spectre UV-Visible

La courbe donnant l'absorbance en fonction de la longueur d'onde λ constitue le spectre UV-Visible du composé **X3** (Figure VI. 2). Le spectre montre trois maxima d'absorption à 205 nm (intense), 252 nm (intensité moyenne) qui correspondent aux composés aromatiques, attribués aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$, et à 355 nm (intensité moyenne) qui pourrait être attribué au groupement chromophore (C=N).

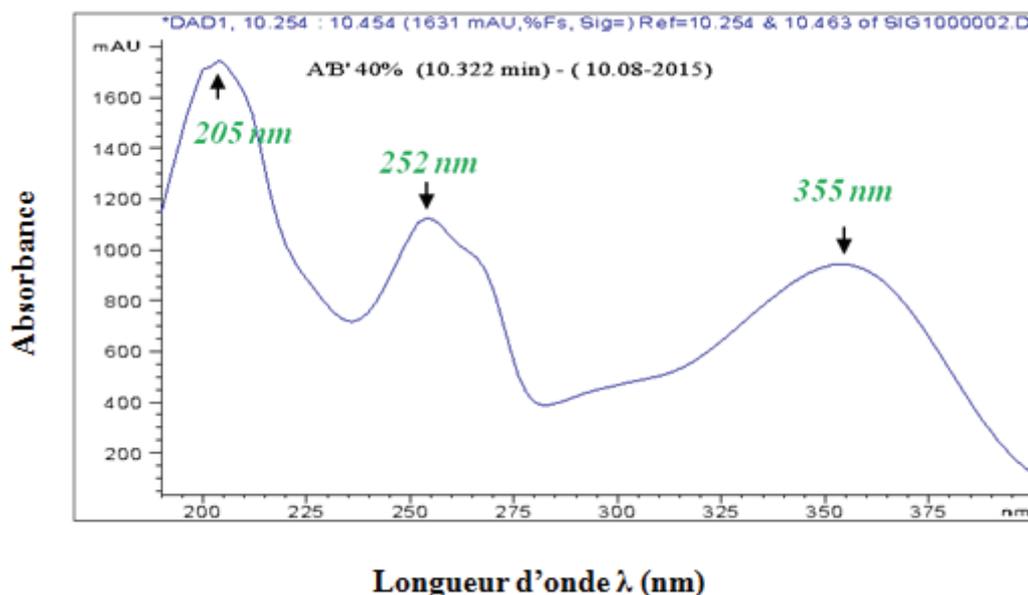


Figure VI. 2 : Spectre d'absorption UV-Visible du composé **X3**.

4. Interprétation du spectre infrarouge

Le spectre IR du composé **X3** (Figure VI. 3) représente des bandes caractéristiques des vibreurs de la fonction amide : des bandes d'élongation ν_{N-H} à 3477 cm^{-1} (moyenne), $\nu_{C=O}$ à 1641 cm^{-1} (intense), deux bandes d'intensité moyenne ν_{C-N} à 1208 cm^{-1} ; 1182 cm^{-1} , et une bande d'intensité moyenne à 1513 cm^{-1} attribuée simultanément à ν_{N-H} et à δ_{N-H} .

De plus, on note deux bandes de faible intensité relatives aux vibrations de déformation angulaire hors du plan des liaisons N-H : 831 cm^{-1} et 818 cm^{-1} . Le spectre montre également la présence du noyau aromatique : bande d'absorption des liaisons C-H aromatiques vers 3021 cm^{-1} et des bandes d'élongation $\nu_{C=C}$ (intense) à 1594 et 1496 cm^{-1} .

En absence des bandes harmoniques dans la zone $2000-1650\text{ cm}^{-1}$, l'analyse de l'empreinte digitale (entre environ 850 cm^{-1} et 600 cm^{-1}) s'avère fort intéressante ; les bandes d'absorption

représentent les vibrations des déformations angulaires hors du plan des liaisons C-H. En fait, la présence de deux bandes des déformations δ_{C-H} à 796cm^{-1} et 721cm^{-1} indiquent que le noyau aromatique est méta-disubstitué.

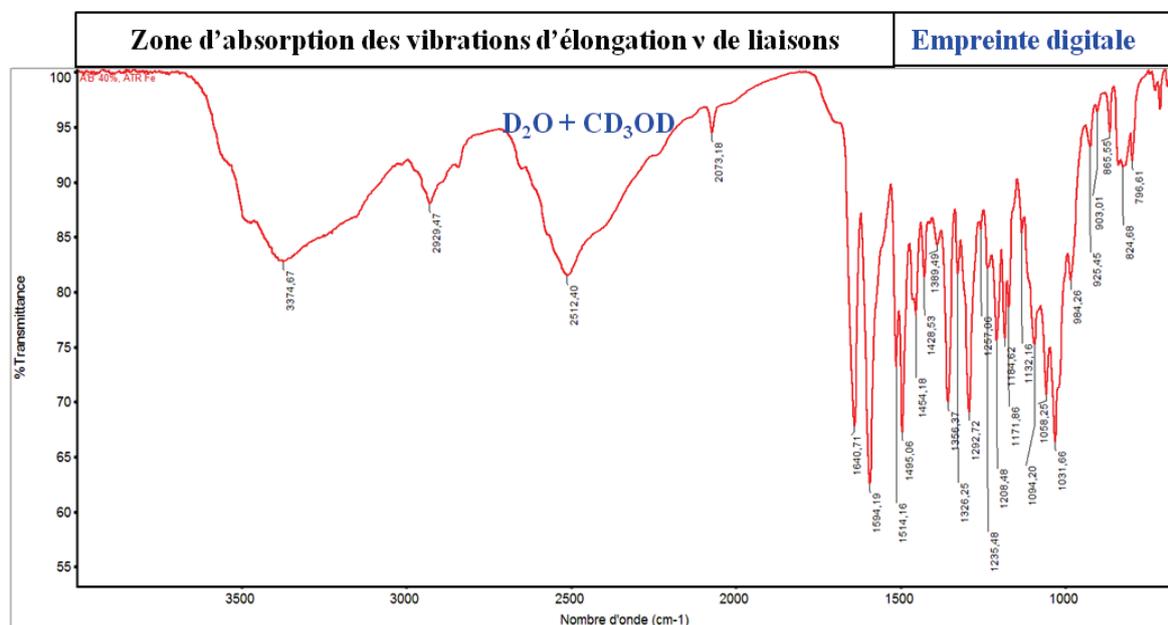


Figure VI. 3 : Spectre infrarouge du composé X3.

Le spectre montre également des bandes d'élongation symétriques et asymétriques des groupements $-CH_3$ ($\nu_s = 2930\text{cm}^{-1}$, $\nu_a = 2975\text{cm}^{-1}$) et $-CH_2$ ($\nu_s = 2845\text{cm}^{-1}$, $\nu_a = 2929\text{cm}^{-1}$).

La présence des bandes d'élongation du groupement $-OH$ respectivement de type phénol à 3388cm^{-1} (large) et 1031cm^{-1} (intense) associés aux vibreurs ν_{O-H} et ν_{C-O} .

Les bandes d'élongation situées à 1641cm^{-1} ($\nu_{C=N}$) et 1357cm^{-1} (ν_{C-N}) sont attribuées aux vibreurs du groupement imine ($-C=N-C=$) aromatique.

Les bandes à 1429cm^{-1} ; 1455cm^{-1} sont relatives au vibreur N-O, et celles vers 1292cm^{-1} et 1031cm^{-1} sont attribuées au vibreur C-O d'éther cyclique.

5. Interprétation des spectres RMN

5.1. Interprétation de spectre RMN-¹H

Le spectre RMN-¹H du composé X3 (Figure VI. 4) montre des protons aromatiques dans la zone entre 6 - 8 ppm (Figure VI. 5).

Le doublet à 7,90 ppm avec $J_{H-H} = 2,1$ Hz indique que ce proton (**X**) n'a au voisinage qu'un proton en position méta à 7,58 ppm. Ce dernier (**B**) est formé d'un doublet de doublets avec $J_{H-H} = 2,1$; 8,6 Hz : il est couplé simultanément avec deux protons en position méta (7,90 ppm) et ortho (6,92 ppm), mais celui à 6,92 ppm (**A**) est couplé uniquement avec le proton voisin en ortho avec $J_{H-H} = 8.6$ Hz. Ces trois noyaux forment ainsi un système de spin de type **ABX** ($J_{A-B} \neq 0$, $J_{B-X} \neq 0$, $J_{A-X} = 0$). Le couplage spin-spin ($J_{H-H} = 2,1$ Hz) entre deux protons à 6,38 ppm (doublet) et à 6,21 ppm (doublet) forme un système de spin de **AX**.

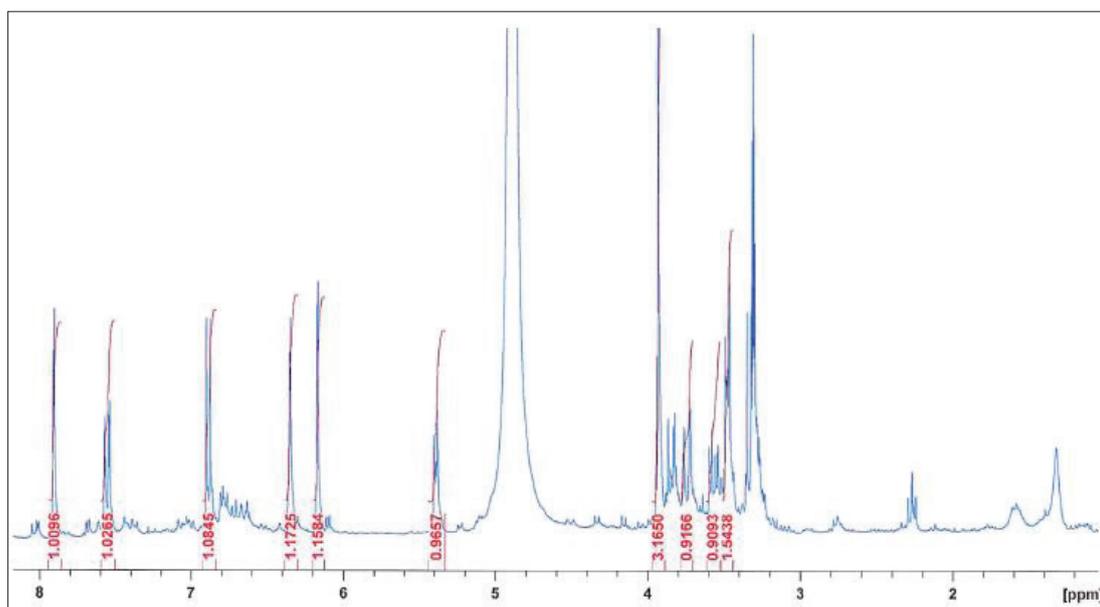


Figure VI. 4 : Spectre RMN-¹H du composé X3.

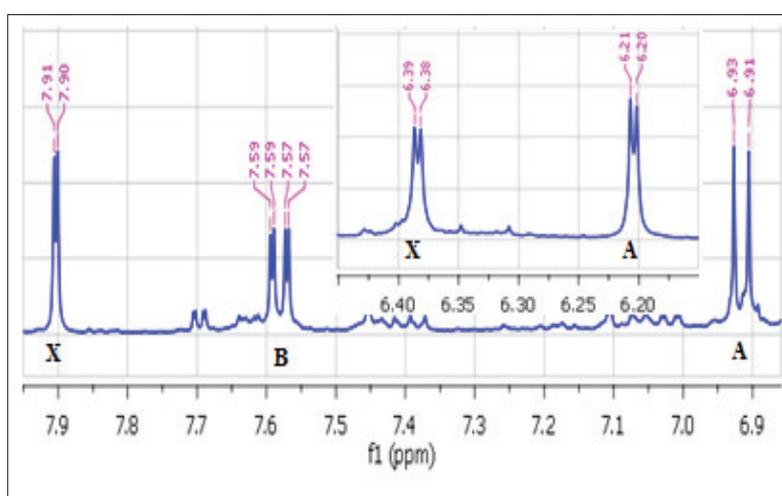


Figure VI. 5 : Spectre RMN-¹H du composé X3 : systèmes de spins des protons aromatiques.

Dans la zone de déplacement chimique entre 5,40 et 3 ppm (**Figure VI. 6**), l'interprétation est difficile, les trois protons à 3,74 ppm (**A**), 3,58 ppm (**B**) et 3,28 ppm (**X**) se couplent entre eux suivant un système de spin de type **ABX**.

Le singulet d'intégration 3 à 3,94 ppm, déblindé, est attribué au groupement méthoxy (-CH₃-O-). Le multiplet (mal résolu) d'intégration 1 à 5,36 ppm, fortement déblindé, pourrait être attribué au groupement (-O-CH-O-).

La multiplicité des protons situés à 3,50 ; 3,49 et 3,36 ppm n'est pas bien résolue ce qui rend la détermination du système de spin assez difficile.

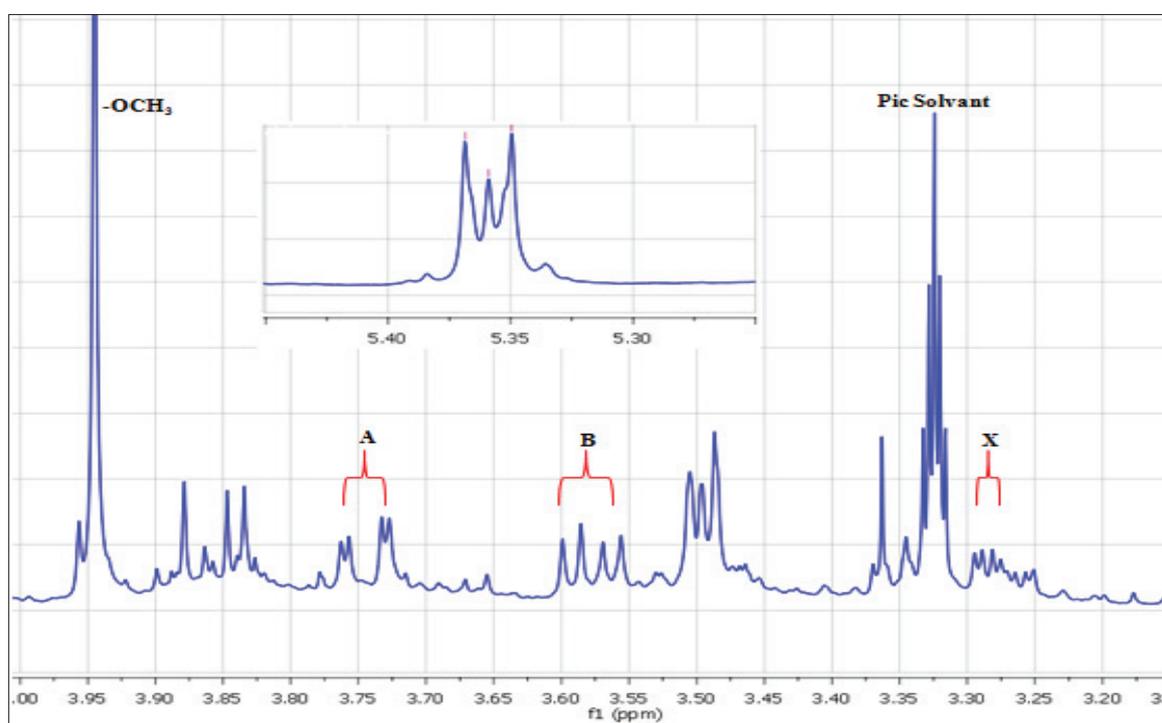


Figure VI. 6 : Spectre RMN-¹H du composé X3 entre 5,40 et 3 ppm et système de spin.

5.2. Interprétation de spectre RMN-¹³C et DEPT-135

Le spectre RMN-¹³C avec découplage total du proton à 300 MHz dans le CD₃OD représente des signaux de faible intensité qui pourraient être relatifs à des composés minoritaires, considérés comme des impuretés. Le dénombrement des signaux observés sur le spectre RMN-¹³C avec découplage total du proton a permis de noter l'existence de 22 atomes de carbone, alors que la formule brute indique 23 atomes de carbones. Ceci est expliqué par l'existence de deux atomes de carbone équivalents.

La superposition du spectre RMN- ^{13}C en découplage total de proton avec celui RMN- ^{13}C en mode DEPT-135° (Figure VI. 7) a permis de montrer la disparition de plusieurs signaux, particulièrement ceux situés entre 180 - 135 ppm et l'inversion d'un seul signal indiquant que la molécule renferme plusieurs carbones quaternaires hybridés en sp^2 , à l'exception des deux signaux à 179,40 ppm (C=O amide) et à 162,92 ppm (C=N imine), et un carbone secondaire hybridé en sp^3 du groupement $-\text{CH}_2$ (62,59 ppm).

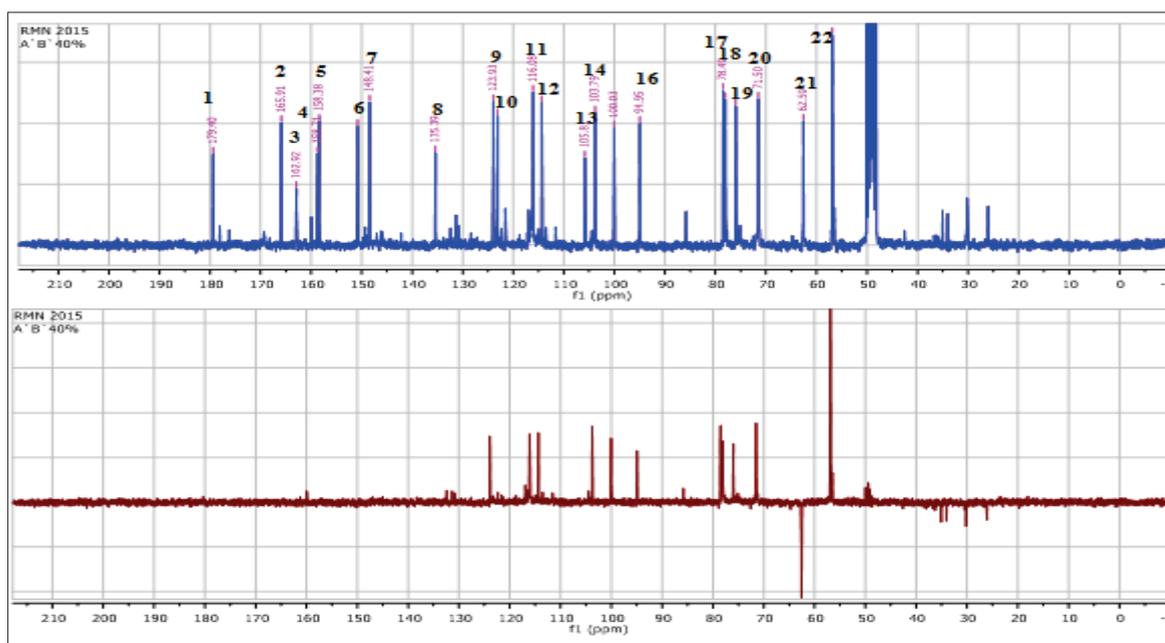


Figure VI. 6 : Spectres RMN- ^{13}C avec découplage total RMN $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$ et en mode DEPT-135°.

En conclusion, l'examen des déplacements chimiques des différents carbones nous a permis d'attribuer :

- Deux autres carbones quaternaires hybridés en sp^2 qui résonnent à 123,93 et 105,81 ppm respectivement;
- Cinq carbones de type CH hybridés en sp^2 qui résonnent à 123,93 ; 114,50 ; 116,08 ; 100,03 ; 94,95 ppm ;
- Cinq carbones de types CH hybridés en sp^3 qui résonnent à 103,79 (fortement déblindés 78,49 ; 78,05 ; 71,50 ppm ;
- Un carbone de type CH_3 qui résonne à 57,87 ppm.

5.3. Interprétation de cartes RMN-2D HSQC et HMBC¹H/¹³C

Les Figures VI. 8 et 9 représentent les cartes RMN-2D en mode HSQC et HMBC. Nous avons indiqué sur ces cartes les différentes corrélations hétéronucléaires ¹H et ¹³C trouvées.

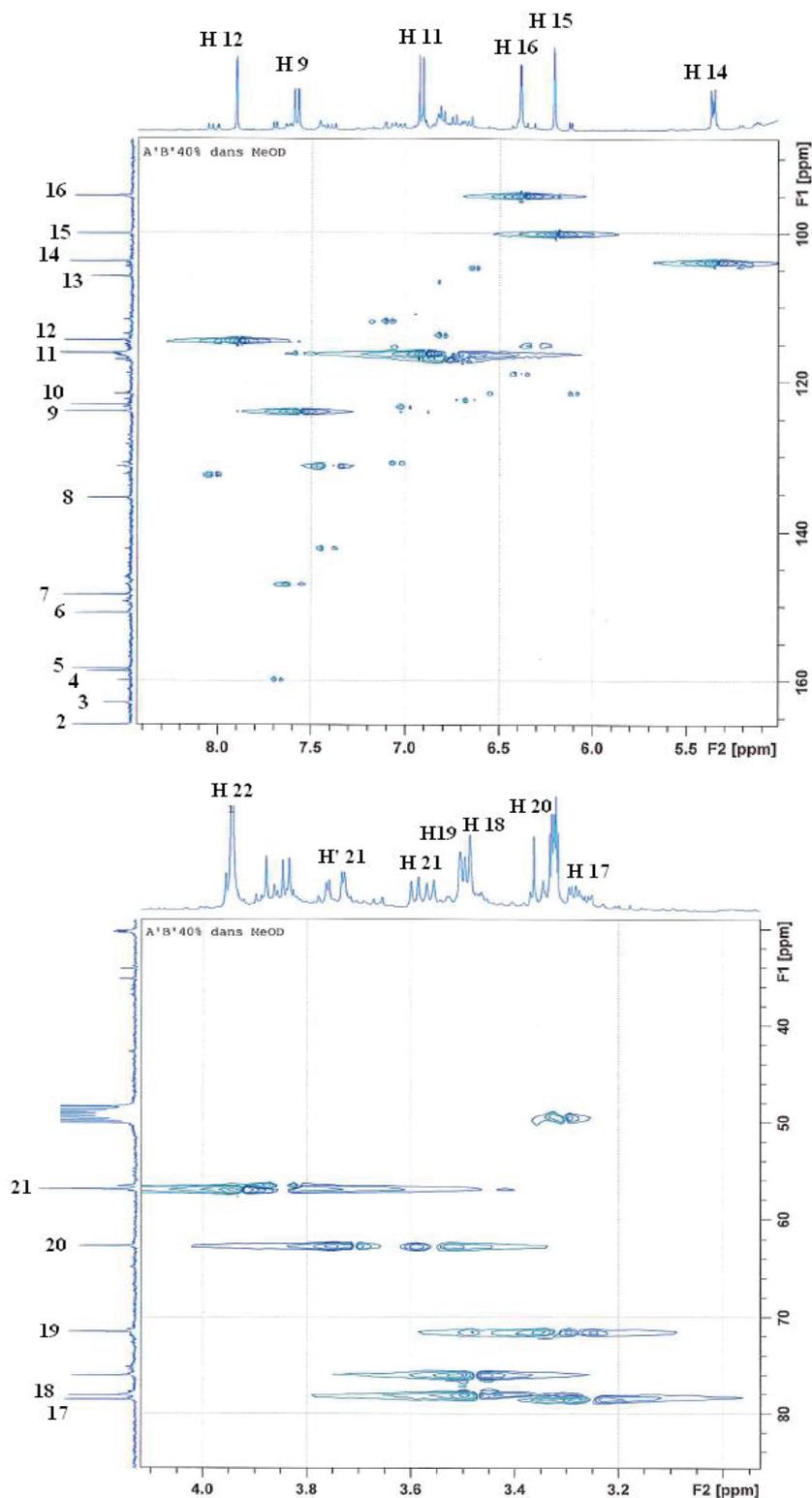


Figure VI. 8 : Cartes RMN-2D en mode HSQC ¹H/¹³C du composé X3.

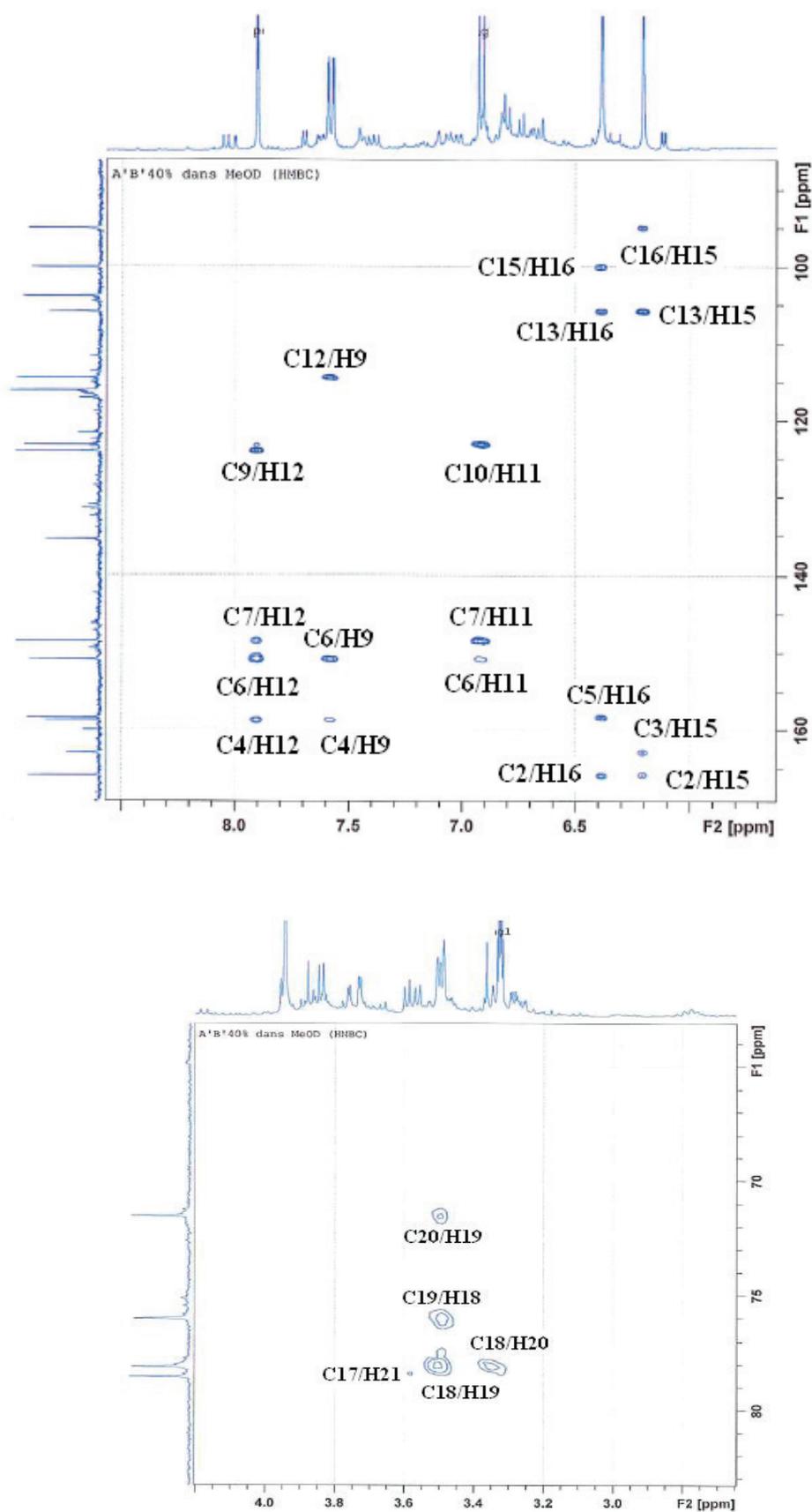


Figure VI. 9 : Cartes RMN-2D en mode HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ du composé X3.

En tenant compte des données RMN-1D, l'interprétation de ces cartes RMN-2D en mode HSQC et HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ conduit à la déduction de ces fragments de structures (**Figure VI. 10**) :

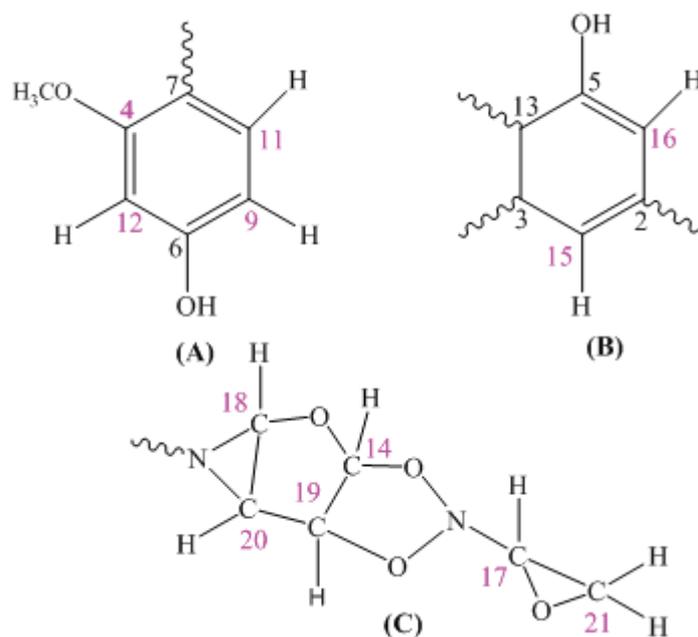


Figure VI. 10 : Fragments de structures relatifs au composé X3.

5.4. Interprétation de cartes RMN-2D en mode COSY H-H et NOESY du composé X3

Les fragments de structures sont prouvés également par le couplage dipolaire et scalaire (**Figure VI. 11**), après interprétation des cartes COSY H-H et NOESY (**Figure VI. 12 ; 13**).

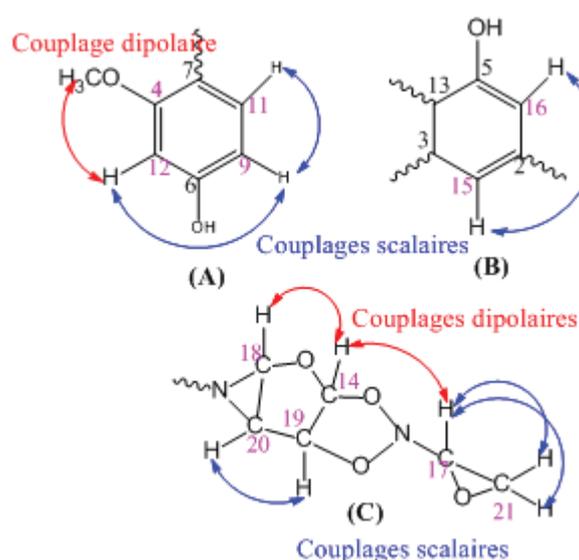


Figure VI. 11 : Couplages scalaires et dipolaires relatifs au composé X3.

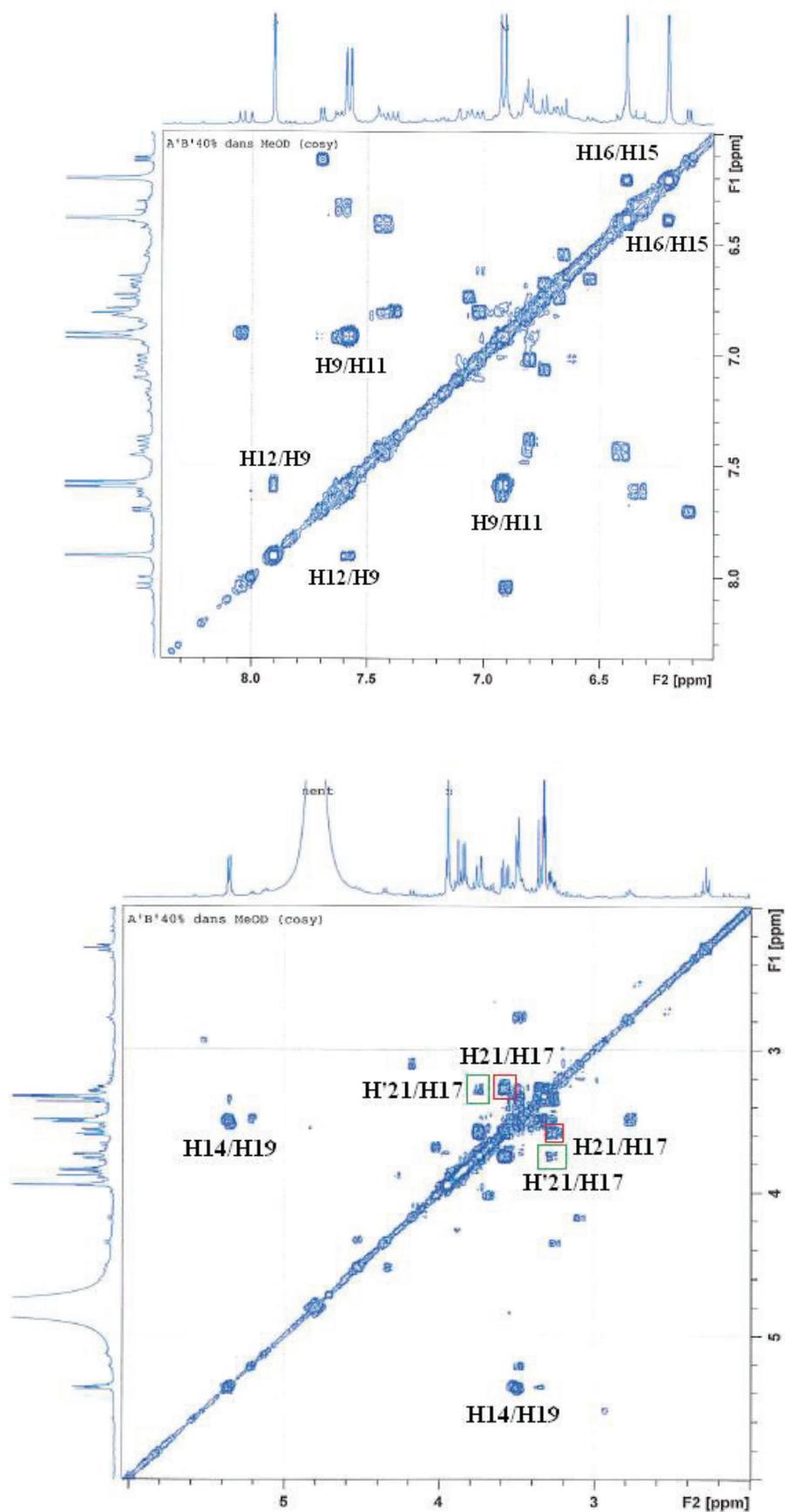


Figure VI. 12 : Carte RMN-2D en mode COSY H-H relatif au composé X3.

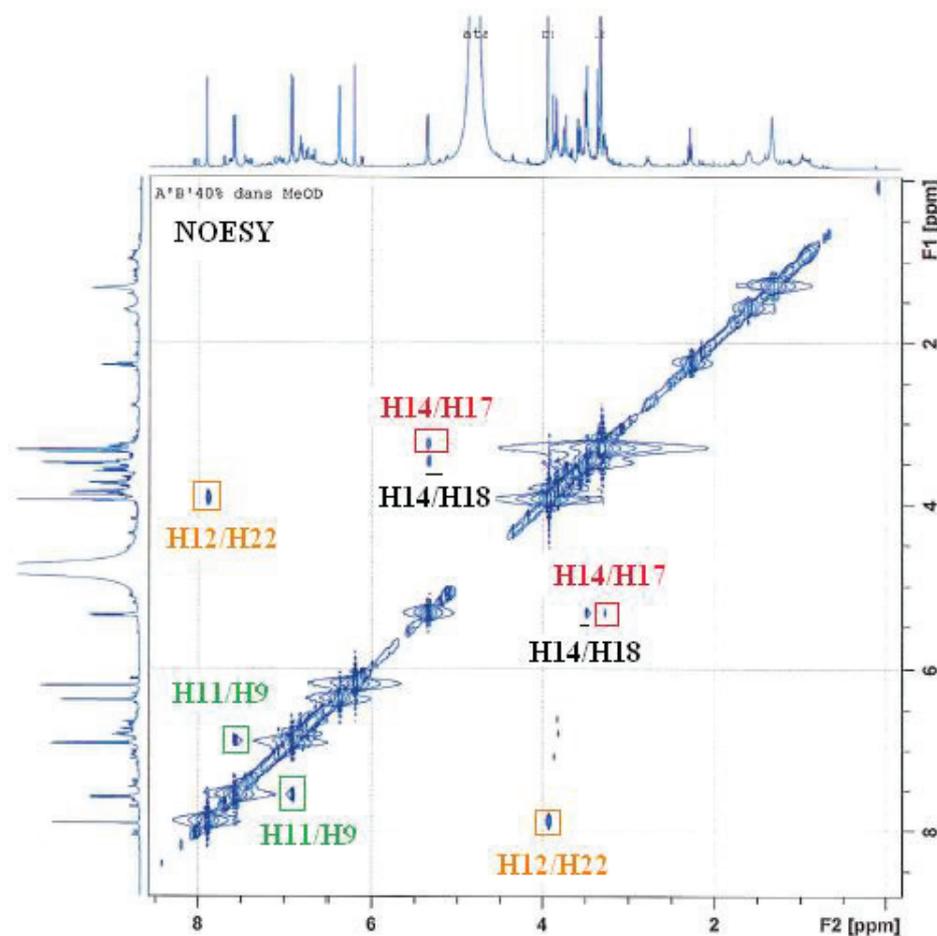


Figure VI. 13 : Carte RMN-2D en mode NOESY relatif au composé X3.

6. Structure proposée

L'interprétation de ces données RMN a permis la détermination de la structure représentée à la Figure VI. 14.

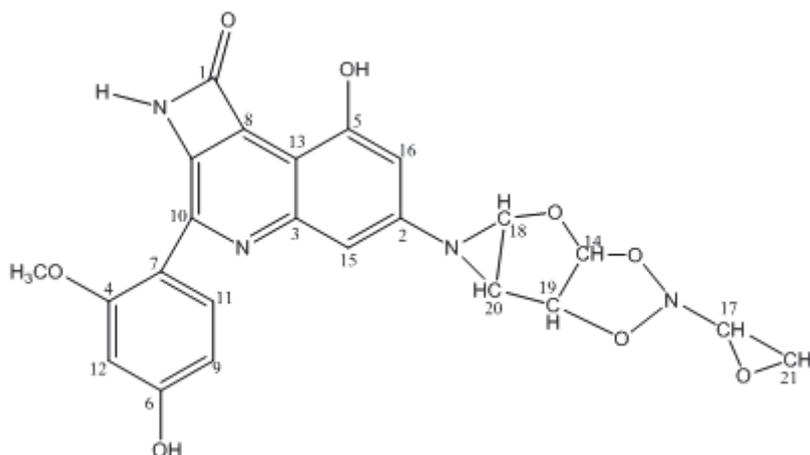


Figure VI. 14 : Structure identifiée du composé X3.

7. Conclusion

D'après nos connaissances, le fractionnement de la fraction d'acétate d'éthyle du décocté issu d'hydrodistillation de l'espèce *A. longa* a été étudié pour la première fois dans ce présent travail. Malgré la pertinence de l'ensemble de ces données spectroscopiques, il est important de les confirmer par spectrométrie de masse. De plus pour s'assurer de la connectivité entre les carbones quaternaires l'enregistrement de la carte RMN-2D en mode INADEQUATE est indispensable. La résolution du spectre RMN- ^1H dans la zone de 3,2 à 3,4 ppm pourrait être améliorée en irradiant le signal du solvant, séquence d'impulsion de suppression de solvant. Ainsi, pour éprouver l'intérêt du traitement des résidus issus de l'hydrodistillation, il est recommandé de tester biologiquement cette molécule dans l'espoir de découvrir une substance médicamenteuse.

Chapitre VII : Application du plan de criblage et estimation de l'activité antioxydante de quelques extraits

1. Introduction

Au cours de l'étude d'un phénomène ou d'un processus, on souhaite que les résultats soient fiables et valides. L'outil statistique constitue une pierre angulaire pour vérifier ces critères. L'étude de l'activité antioxydante par la méthode du radical DPPH en adoptant la méthodologie du plan de criblage n'est qu'une tentative de standardisation de cette méthode à fin d'assurer la fiabilité des résultats.

2. Formulation du problème et définition de l'objectif de l'étude

2.1. Formulation du problème de l'étude

La substitution d'un antioxydant de synthèse par un autre d'origine naturel est considérée comme un point d'intérêt dans divers secteurs (agroalimentaire, cosmologie...). Une telle altération devrait être fondée sur des arguments tangibles. Notre étude bibliographique de l'activité antioxydante par le test du radical DPPH révèle l'existence de diverses méthodes analytiques non valides. Il en découle un véritable problème pour établir une comparaison significative entre deux antioxydants d'origines différentes.

2.2. Définition de l'objectif de l'étude

Compte tenu du problème posé, nous avons tenté de standardiser la méthode du DPPH en appliquant un plan de criblage au milieu réactionnel dépourvu d'antioxydant.

3. Plan de criblage

3.1. Expériences préliminaires

Le choix du nombre et de l'emplacement des points d'expériences est une étape fondamentale des plans d'expériences. En se référant aux études précédentes, la stabilité du radical DPPH en solution repéré par la mesure de son absorbance est dépendante de son environnement. Le recensement de l'ensemble des facteurs est facilité par la représentation du diagramme causes effets ou diagramme d'Ishikawa (**Figure VII. 1**).

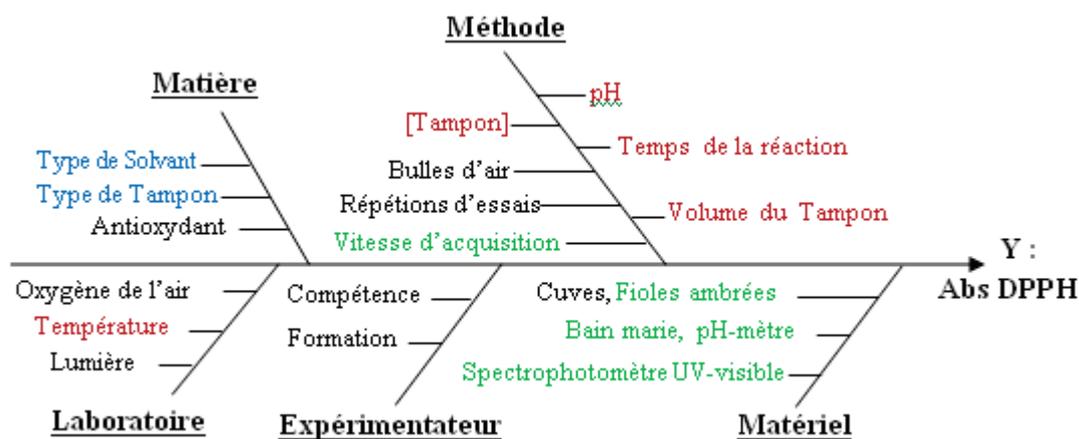


Figure VII. 1 : Diagramme d'Ishikawa.

Après avoir compilé le diagramme d'Ishikawa, les facteurs susceptibles d'affecter l'absorbance du radical DPPH en solution se divisent en deux catégories :

- Facteurs quantitatifs : concentration de la solution tampon [Tampon], pH, la température, le rapport du tampon et le temps de la réaction ;
- Facteurs qualitatifs : Type de tampon et de solvant ;

Cependant, il est indispensable de préciser les facteurs constants. Par analogie à la validation analytique, ces derniers définissent les conditions de répétabilité. En effet, l'expérimentateur doit opérer avec le même spectrophotomètre UV-Visible, bain-marie, pH-mètre, le thermomètre, fioles jaugées ambrées, vitesse d'acquisition et le type de cuves.

En tenant compte des limites de la validité de la loi de Beer-Lambert et de l'exactitude de mesure du spectrophotomètre UV-visible¹, la fourchette de concentration du radical DPPH est définie entre 25 et 200 μM^{2-3} . Ainsi, on a défini deux fourchettes de concentration du radical DPPH :

- Domaine de basse concentration : 40, 50 et 60 μM ;
- Domaine de concentration élevée : 180, 190 et 200 μM .

Pour examiner la transparence des solutions de DPPH en fonction du tampon des expériences préliminaires ont été effectuées. On prépare tout d'abord, les solutions tampon de carbonate, phosphate, acétate et citrate de valeur de pH (3, 6, 10) et de concentration tampon

(0,10 ; 0,05 M). Ensuite, on prépare pour chaque valeur du niveau de concentration du radical DPPH deux séries de tubes à essai contenant chacun 1 mL de solution du radical DPPH préparé in situ dans le méthanol et l'éthanol, dans des fioles brunes de 10 mL. Enfin, on ajoute dans chaque tube 500 μ L de chaque solution tampon, sous agitation. Les résultats de ces expériences sont résumés dans le (Tableau VII. 1).

Tableau VII. 1 : Criblage préliminaire.

pH	Tampon	Aspect du milieu réactionnel
3	Acétate	Solution limpide
	Citrate	
6	Carbonate	Solution limpide
	Phosphate	Solution légèrement turbide
	Acétate	Solution limpide
	Citrate	
10	Carbonate	Observation du précipité
	Phosphate	

La présence de la turbidité et de précipité en solution engendre le phénomène d'effet Tyndall⁴ au cours de la mesure de l'absorbance par un spectrophotomètre UV-visible, ce qui engendre une instabilité du radical DPPH non seulement au milieu basique, mais aussi à pH = 6 avec le tampon phosphate uniquement. Ces résultats sont en contradiction avec les travaux précédents^{5,6}, qui montrent une stabilité du radical DPPH dans le méthanol à pH = 10 et au tampon phosphate⁵ et dans le domaine de pH de 5 à 6,5⁶, sans indiquer la concentration et le tampon^{5,6} ni le type de tampon⁶. Ainsi, on s'est limité aux tampons acétate et citrate aux valeurs du pH = 3 et 6 au cours de cette étude.

3.2. Choix des facteurs et du domaine expérimental

En se référant aux données bibliographiques et aux expériences préliminaires, on attribue à chaque facteur deux niveaux de variation que nous noterons **-1** et **+1** par convention. L'ensemble de combinaisons des niveaux et des modalités associés à chaque facteur (**i**) constitue le domaine expérimental (Tableau VII. 2).

Tableau VII. 2 : Domaine expérimental.

Facteurs	Variable associée	Unité	Niveau (-1)	Niveau (+1)
Type de tampon	X ₁	-	Acétate	Citrate
Concentration du tampon	X ₂	M	0,05	0,1
pH	X ₃	-	3	6
Température	X ₄	°C	25	40
Rapport du tampon	X ₅	-	0,1	0,3
Type du solvant	X ₆	-	MeOH	EtOH
Temps de réaction	X ₇	min	30	120

3.3. Construction de la matrice et plan d'expérimentations

Dans le présent travail, on a sept facteurs à étudier simultanément, par conséquent le plan d'expérience est une matrice de huit expériences, générée par permutation circulaire par la droite (Tableau VII. 3).

Tableau VII. 3 : Matrice d'expériences pour 7 facteurs à deux niveaux.

$k \leq 7, N = 8$: + + + - + --: ligne génératrice							
N° Exp	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
1	1	1	1	-1	1	-1	-1
2	-1	1	1	1	-1	1	-1
3	-1	-1	1	1	1	-1	1
4	1	-1	-1	1	1	1	-1
5	-1	1	-1	-1	1	1	1
6	1	-1	1	-1	-1	-1	1
7	1	1	-1	1	-1	-1	1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Pour construire le plan d'expérimentations, il suffit de remplacer les valeurs codées de la matrice par leurs valeurs réelles du domaine expérimental (Tableau VIII. 4). Avant l'expérimentation, une randomisation des essais est effectuée pour limiter l'éventuelle influence perturbatrice de facteurs non contrôlés. Durant cette étude, nous avons utilisé le logiciel de conception et de traitement des plans d'expériences Nemrodw⁷.

Tableau VII. 4 : Plan d'expérimentations.

N° Exp	(*)	Type de tampon	[Tampon] (M)	pH	Température (°C)	Rapport du tampon	Type de solvant	Temps de réaction (min)
1	1	Citrate	0,1	6	25	0,3	MeOH	30
2	3	Acétate	0,1	6	40	0,1	EtOH	30
3	4	Acétate	0,05	6	40	0,3	MeOH	120
4	7	Citrate	0,05	3	40	0,3	EtOH	30
5	2	Acétate	0,1	3	25	0,3	EtOH	120
6	5	Citrate	0,05	6	25	0,1	EtOH	120
7	8	Citrate	0,1	3	40	0,1	MeOH	120
8	6	Acétate	0,05	3	25	0,1	MeOH	30

(*) : Ordre de randomisation

4. Analyse et interprétation des résultats

4.1. Résultats

Dans le but d'examiner ultérieurement le comportement cinétique et la puissance d'un tel antioxydant, on applique le plan de criblage précédemment défini à deux niveaux de concentration différente du radical DPPH : soit 50 μM pour le niveau inférieur (**Y1**) et 190 μM pour le niveau supérieur (**Y2**). Les valeurs de réponses obtenues avec les différentes combinaisons des sept variables étudiées sont répertoriées dans les **Tableaux VII. 5** et **6**.

Tableau VII. 5 : Résultats du plan d'expériences : Y1.

N° Exp	1	2	3	4	5	6	7	8
λ_{max} (nm)	521	518	520	522	522	520	517	517
N° Essai	Abs, [DPPH] = 50 μM							
1	0,55	0,53	0,53	0,49	0,51	0,46	0,38	0,53
2	0,51	0,53	0,51	0,50	0,49	0,43	0,41	0,53
3	0,58	0,53	0,52	0,49	0,50	0,48	0,41	0,57
4	0,52	0,50	0,52	0,46	0,49	0,47	0,39	0,55
5	0,55	0,54	0,49	0,51	0,50	0,48	0,41	0,56
Abs. Moyenne	0,54	0,53	0,51	0,49	0,50	0,46	0,40	0,55

Tableau VII. 6 : Résultats du plan d'expériences: **Y2**.

N° Exp	1	2	3	4	5	6	7	8
λ_{\max} moyenne (nm)	522	520	520	522	522	520	518	517
N° Essai	Abs, [DPPH] = 190 (μ M)							
1	2,02	2,05	1,89	1,88	1,95	1,08	1,44	2,04
2	2,02	2,02	1,89	1,95	1,96	1,06	1,43	2,06
3	2,02	2,04	1,90	1,96	1,96	1,04	1,45	2,03
4	2,01	2,04	1,90	1,96	1,97	1,06	1,44	2,05
5	2,02	2,01	1,89	1,93	1,95	1,04	1,45	2,06
Abs. Moyenne	2,02	2,03	1,90	1,93	1,96	1,06	1,44	2,05

4.2. Effets moyens et méthodes de Lenth

Le tracé des effets moyens est représenté sous forme de diagramme en bâtons. La surface de chaque bâtonnet est proportionnelle à la valeur de l'effet de ce facteur sur la variation de la réponse. En effet plus le bâtonnet est grand, plus l'effet du facteur est important sur la réponse étudiée.

De plus, la méthode de Lenth est traduite par le tracé des limites de signification $\alpha = 5\%$ sur le diagramme du tracé des effets moyens. D'une manière générale, les coefficients "**bi**", dont les valeurs estimées sont situées à l'extérieur des limites correspondent à des effets significatifs. Inversement, les coefficients "**bi**", dont les valeurs estimées sont situées à l'intérieur des limites correspondent à des effets non actifs. Les **Figures VII. 2 (a et b)** représentent les tracés des effets moyens sur l'absorbance du radical DPPH aux concentrations 50 et 190 μ M.

Le diagramme représenté ici la **Figure VII. 2 (a)** met en évidence l'influence prépondérante de trois facteurs : le temps de réaction (X_7), le type de tampon (X_1) et la température (X_4) sur l'absorbance du radical DPPH à la concentration 50 μ M. Les facteurs pH (X_3) et le rapport du tampon (X_5) sont en tangente avec le trait du seuil de significativité. Cependant, pour bien juger l'effet de chacun, il est indispensable d'envisager un test statistique. Les facteurs concentration du tampon (X_2) et le type de solvant (X_6) n'ont pratiquement pas d'effet.

Le diagramme de la **Figure VII. 2 (b)** met en évidence l'effet prépondérant de trois facteurs : le temps de réaction (X_7), le type de tampon (X_1) et le rapport du tampon (X_5) sur l'absorbance du radical DPPH à la concentration 190 μ M. Les facteurs : le type de solvant (X_6),

le pH (X_3) et la concentration du tampon (X_2) ont tous les trois pratiquement le même effet. Quant à la température (X_4) elle n'a pratiquement pas d'effet, en dépit que le bâtonnet correspondant dépasse le trait du seuil de significativité.

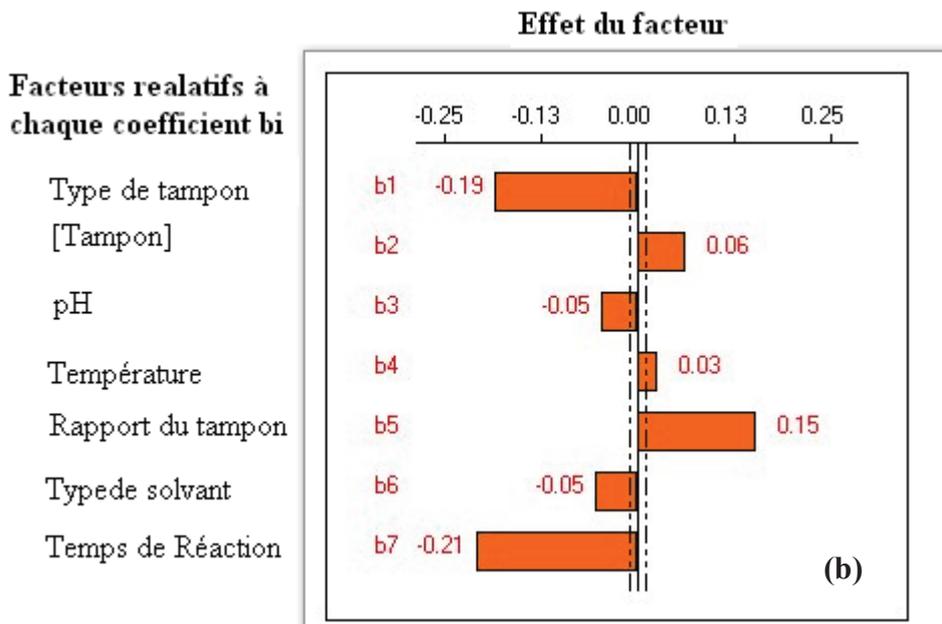
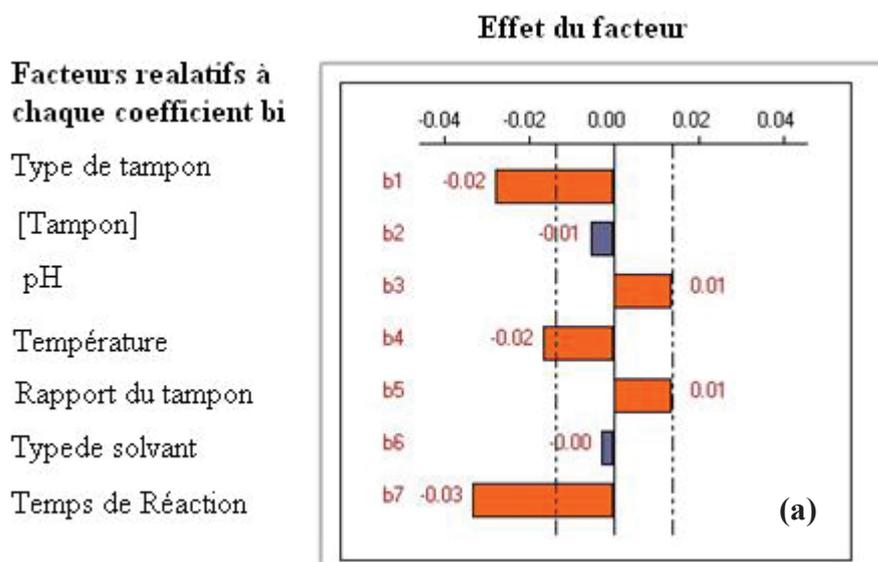


Figure VII. 2 (a ; b) : Tracés des effets moyens pour les concentrations du radical DPPH de 50 μM (a) et 190 μM (b).

4.3. Diagramme de Pareto

Le diagramme de Pareto est représenté sous forme d'un histogramme dans la **Figure VII. 3**. C'est un moyen simple pour classer les facteurs par ordre d'importance. Les diagrammes d'effet Pareto individuels visualisent la prédominance, essentiellement, de l'effet du temps de réaction (X_7) et celui du type du tampon (X_1) : qui contribuent pour 41,00% et 30,45% dans la variabilité des deux réponses Y_1 et Y_2 , respectivement. Ainsi, la pertinence des effets peut être jugée par le biais d'une analyse statistique.

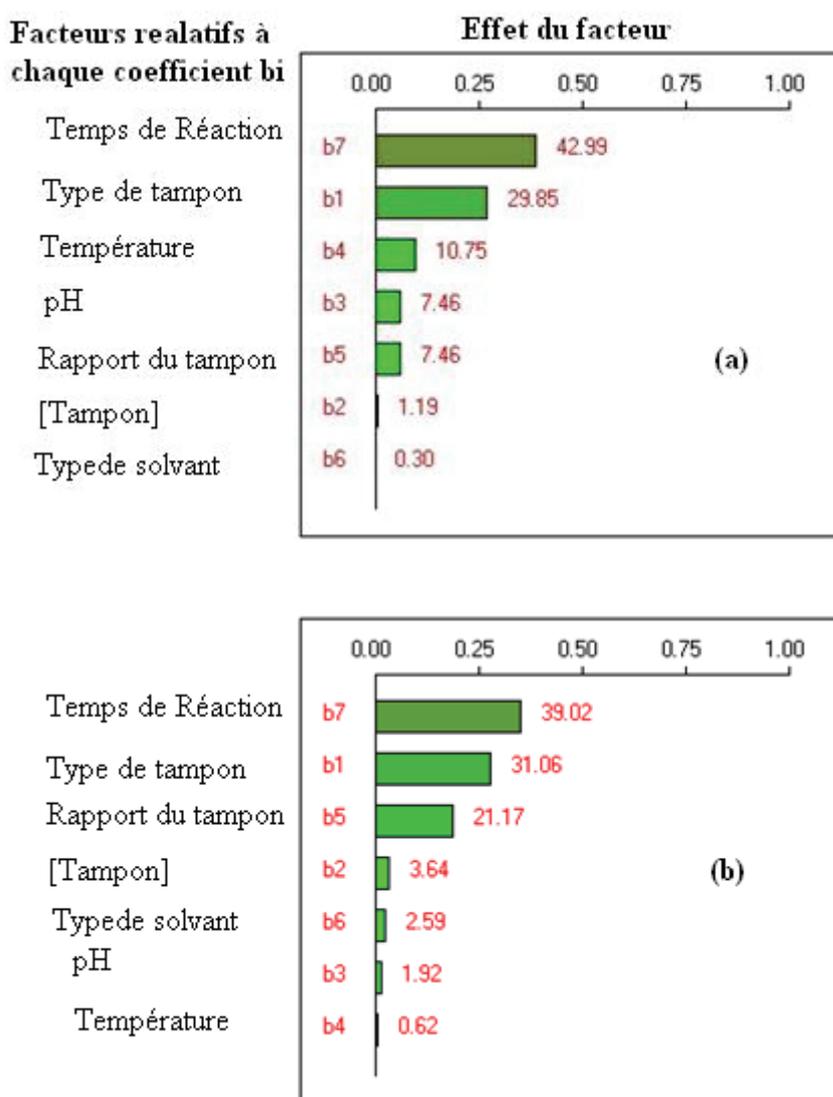


Figure VII. 3 : Effet Pareto individuel pour les concentrations du radical DPPH de 50 µM (a) et 190 µM (b).

4.4. Analyse statistique

Dans un test statistique, la "valeur p" (ou **p-value**) est interprétée comme étant le plus petit seuil de significativité pour lequel l'hypothèse nulle est acceptée. Chaque coefficient est associé aux valeurs de "t" est élevé et p-value. En général, plus la grandeur de "t" est élevée, plus p-value est petit, et plus le terme correspondant de coefficient est significatifs⁸, **Tableau VII. 7**. Le signe négatif montre que le passage du niveau **-1** au niveau **+1** entraîne une baisse de l'absorbance.

Tableau VII. 7 : Significativité des coefficients pour les concentrations en radical DPPH de 50 μM (a) et 190 μM (b).

(a)

[DPPH] = 50 μM, $\sigma_{\text{exp}} = 0.006$			
b_i	Coefficient	t.exp.	Signif. %
b₀	0,497	81,24	***
b₁	-0,025	-4,08	***
b₂	-0,005	-0,82	42,50%
b₃	0,012	2,04	*
b₄	-0,015	-2,45	*
b₅	0,012	2,04	*
b₆	-0,003	-0,41	68,80%
b₇	-0,030	-4,90	***

(b)

[DPPH] = 190 μM, $\sigma_{\text{exp}} = 0.005$			
b_i	Coefficient	t.exp.	Signif. %
b₀	1,799	351,08	***
b₁	-0,186	-36,35	***
b₂	0,064	12,44	***
b₃	-0,046	-9,03	***
b₄	0,026	5,12	***
b₅	0,154	30,01	***
b₆	-0,054	-10,49	***
b₇	-0,209	-40,74	***

t.exp : valeur expérimentale de Student, * ; *** : significatif respectivement au niveau de confiance 95,0%, 99,9%.

Au niveau de la concentration en DPPH égale à 190 μM , le test de Student pour les coefficients de la réponse **Y2** (**Tableau VII. 7(b)**) confirme les premiers résultats. Ainsi, pour augmenter la réponse **Y2** du radical libre DPPH, les choix des différents facteurs doivent se faire comme suit:

- **X₁** au niveau -1, car $b_1 < 0$: le type de tampon est l'acétate ;
- **X₂** au niveau +1, car $b_2 > 0$: [Tampon] = 0,10 M ;
- **X₃** au niveau -1, car $b_3 < 0$: pH = 3 ;
- **X₄** au niveau +1, car $b_4 > 0$: température = 40 °C ;
- **X₅** au niveau +1, car $b_5 > 0$: rapport de tampon = 0,3 ;
- **X₆** au niveau -1, car $b_6 < 0$: type de solvant : éthanol ;
- **X₇** au niveau -1, car $b_7 < 0$: temps de réaction = 30 min ;

Au niveau de la concentration en DPPH de 50 μM , les coefficients **b₃** et **b₅** qui traduisent l'effet du pH et du rapport du tampon sur la réponse **Y1** sont considérés non significatifs (**Figures VII. 2**).

En revanche, **b₃** et **b₅** sont statistiquement significatifs sur la réponse au niveau de confiance 95% (**Tableau VII. 7 (a)**). Ainsi pour augmenter la réponse **Y1**, il faut que :

- ◆ **X₁** au niveau -1, car $b_1 < 0$: type de tampon est l'acétate ;
- ◆ **X₃** au niveau +1, car $b_3 > 0$: pH = 6 ;
- ◆ **X₄** au niveau -1, car $b_4 < 0$: température = 25 °C ;
- ◆ **X₅** au niveau +1, car $b_5 > 0$: Rapport de tampon = 0,30 ;
- ◆ **X₇** au niveau -1, car $b_7 < 0$: Temps de réaction = 30 min ;

Le test de Student pour les coefficients **b₂** et **b₆**, qui traduisent l'effet des facteurs **X₂** et **X₆**, ne présente pas d'effet sur la réponse **Y1** (**Tableau VII. 7 (a)**). Ces derniers peuvent être fixés à

une modalité choisie par l'expérimentateur. En tenant compte de la toxicité du méthanol, on a sélectionné l'éthanol comme solvant.

Pour résoudre le problème du choix de la concentration du tampon, on a étudié l'effet des ions Na^+ sur l'absorbance du radical DPPH à $50 \mu\text{M}$ dans l'éthanol (**Figure VII. 4**). On note une diminution importante de l'absorbance du radical libre de DPPH, qui est pratiquement identique pour les différentes concentrations des ions Na^+ (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-4} ; 10^{-6} et $10^{-8} \mu\text{M}$) par comparaison à la solution témoin ($[\text{Na}^+] = 0 \mu\text{M}$). Par analogie à l'effet des ions métalliques au système Phénol / DPPH⁹, cette diminution pourrait être expliquée par le processus d'échange d'électron entre les ions Na^+ et le radical DPPH par complexation. Par conséquent, on a intérêt à travailler en utilisant une faible concentration de tampon par exemple $0,05 \text{ M}$.

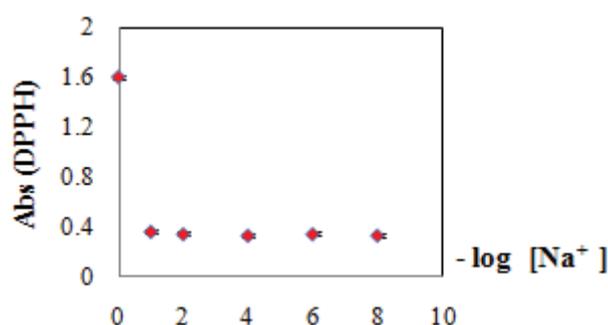


Figure VII. 4 : Effet de la concentration en ions Na^+ ($[\text{Na}^+]$ en μM) sur l'absorbance (Abs) de DPPH.

4.5. Modèle mathématique

Le plan de criblage se traduit par un modèle polynomial de premier degré sans interactions. En tenant compte de la significativité des coefficients, les effets des coefficients des modèles mathématiques qui relient les réponses **Y1** et **Y2** aux variables les plus influentes s'écrivent :

$$Y1 = 0,497 - 0,025 X_1 + 0,012 X_3 - 0,015 X_4 + 0,012 X_5 - 0,03 X_7$$

$$Y2 = 1,799 - 0,186 X_1 + 0,064 X_2 - 0,046 X_3 + 0,026 X_4 + 0,154 X_5 - 0,054 X_6 - 0,209 X_7$$

L'analyse de variance des modèles illustre que les modèles **Y1** et **Y2** (**Tableau VII. 8(a) ; (b)**) sont statistiquement significatifs, $p\text{-value} < 0,05$. Le coefficient de détermination R^2 mesure la fraction de la variation totale de la réponse. Étant donné que les

valeurs de R^2 sont égales à 1 alors ces modèles linéaires **Y1** et **Y2** pourraient expliquer à **99,99%** la variabilité de ces réponses.

Tableau VII. 8 : ANOVA du modèle de la réponse Y1 (a) et Y2 (b).

Source de variation	Somme des carrés	dl	Carré moyen	F	Signif
Régression	0,8935	7	0,1276	607,8146	***
Résidus	0,0067	32	0,0002		
Total	0,9002	39			

(b)

Source de variation	Somme des carrés	dl	Carré moyen	F	Signif
Régression	0,0168	7	0,0024	7,9762	***
Résidus	0,0096	32	0,0003		
Total	0,0264	39			

*** : significatif respectivement au niveau de confiance 99,99%.

4.6. Récapitulation

Dans cette étude, on a pu évaluer l'effet des conditions opératoires simultanément en utilisant la méthodologie de plan d'expériences sur l'absorbance du radical libre DPPH dépourvu d'antioxydant, de les classer selon la contribution de chacun et d'éliminer ceux qui semblent être moins significatifs (**Tableau VII. 9**).

Tableau VII. 9 : Classification des facteurs selon leur poids aux réponses Y1 et Y2.

	Réponse Y1 [DPPH] = 50 μ M	Réponse Y2 [DPPH] = 190 μ M
Effet à poids lourd	Temps de réaction	Temps de réaction
Effet à poids moyens	Type de tampon	Type de tampon : Acétate Rapport du tampon
Effet à poids légers	Température, pH, , rapport du tampon	Température Type de solvant, pH, [Tampon]
Ne présentent pas d'effet	[Tampon], Type de solvant	

Les combinaisons optimales dégagées du plan de criblage, seront appliquées pour estimer l'activité antioxydante de deux extraits de plantes et l'acide férulique (**Tableau VII. 10**).

Tableau VII. 10 : Combinaison optimale du plan de criblage.

Facteurs	[DPPH]	
	50 μ M	190 μ M
Type de tampon	Acétate	
Concentration du tampon	0,05 M	0,1 M
pH	6	3
Température	25°C	40°C
Rapport du tampon	0,3	
Type du solvant	Éthanol	
Temps de réaction	30 min	
λ_{\max} (nm)	522 nm	
Abs (n = 5)	0.55 \pm 0,01	2.15 \pm 0,01

(n) : nombre de répétitions des essais

5. Activité antioxydante

L'activité antioxydante a été estimée par l'efficacité anti radicalaire qui combine les deux paramètres (EC_{50} et $t_{EC_{50}}$) afin de caractériser facilement le comportement d'une substance en tant qu'antioxydant. La cinétique de réduction du radical libre DPPH obtenue pour chaque antioxydant à sa propre valeur de l' EC_{50} est indiquée dans les **Figures VII. 5 (a, b) ; 6 (a, b) ; 7 (a, b)**.

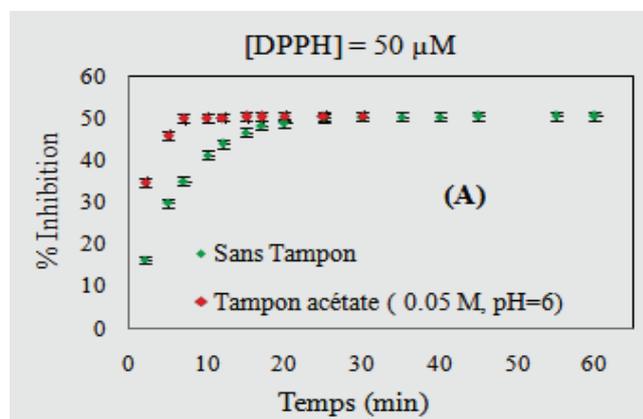


Figure VII. 5 (a) : % Inhibition = f(Temps) pour la concentration en DPPH de 50 μ M (A) : cas de l'acide férulique.

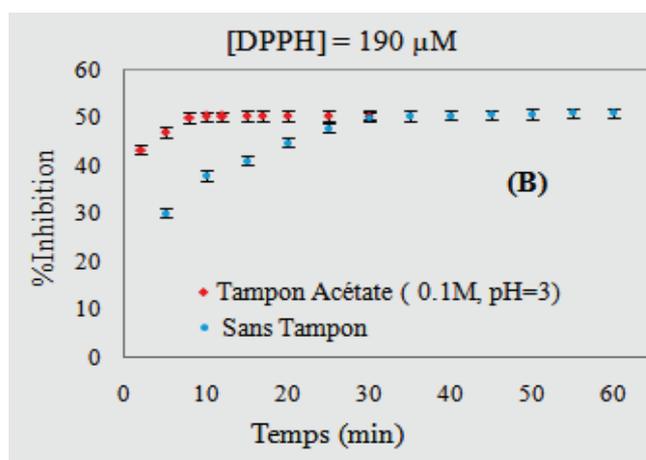


Figure VII. 5 (b) : % Inhibition = f(Temps) pour la concentration en DPPH de 190 μ M (B) : cas de l'acide férulique.

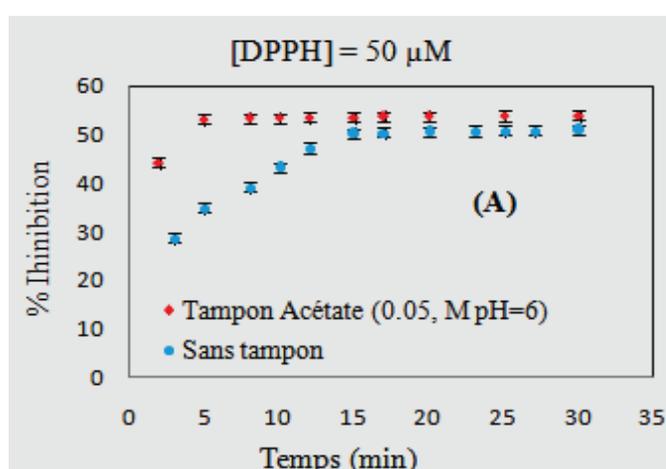


Figure VII. 6 (a) : % Inhibition = f(Temps) pour la concentration en DPPH de 50 μ M (A) : cas de l'extrait BRB.

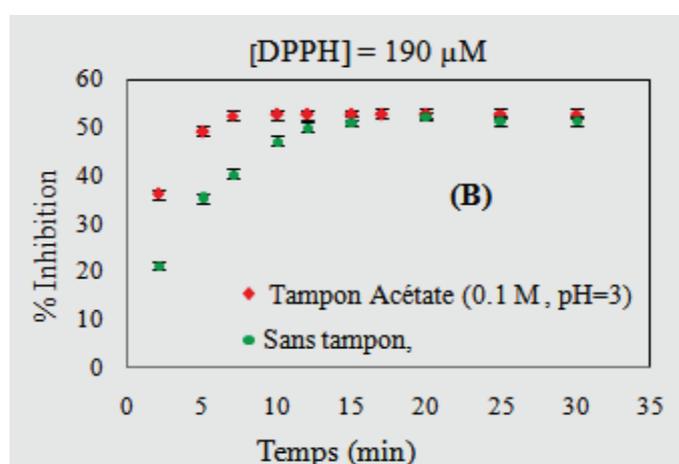


Figure VII. 6 (b) : % Inhibition = f(Temps) pour la concentration en DPPH de 190 μ M (B) : cas de l'extrait BRB.

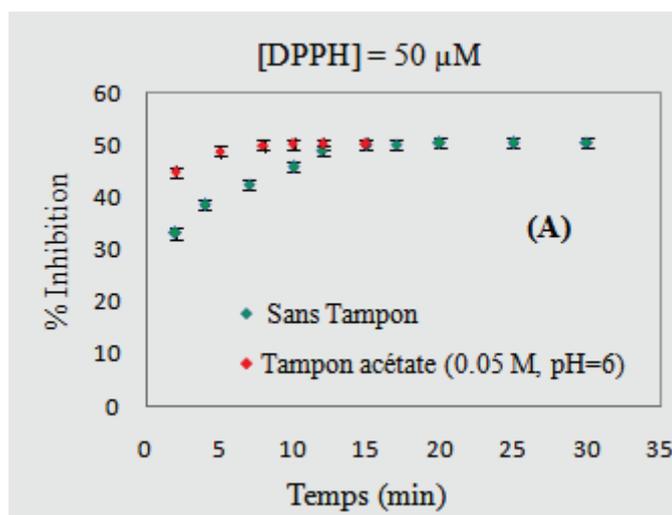


Figure VII. 7 (a) : % Inhibition = f (Temps) pour la concentration en DPPH de 50 μ M (A) : cas de l'extrait ARD.

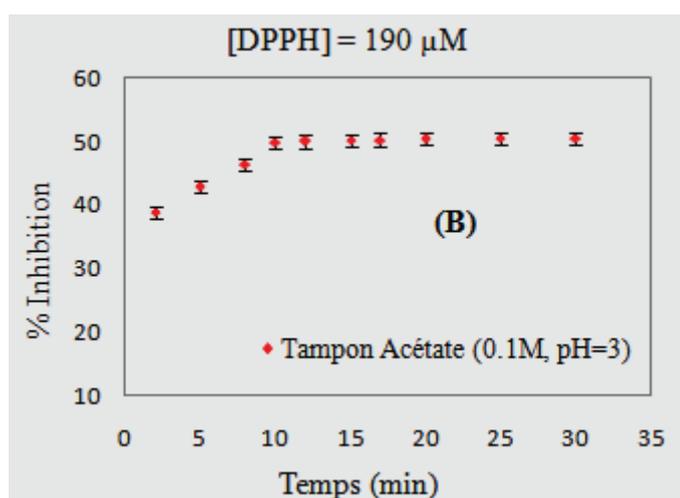


Figure VII. 7 (b) : % Inhibition = f (Temps) pour la concentration en DPPH de 190 μ M (B): cas de l'extrait ARD.

Pour tous les antioxydants examinés, on distingue deux zones : une zone à cinétique rapide de piégeage des radicaux libres DPPH observée au bout de quelques minutes de réaction et une deuxième zone à cinétique lente de piégeage des radicaux libres DPPH ou zone de tendance vers l'équilibre. Pour la même gamme de concentration d'antioxydant, on constate également que la cinétique en milieu tamponné est plus rapide qu'en milieu non tamponné. En revanche, l'extrait **ARD** ne réduit que 46.34% des radicaux libres (**Figure VII. 8**). En outre, les paramètres de calcul de l'activité antioxydante sont résumés dans les **Tableaux VII. 12 et 13**.

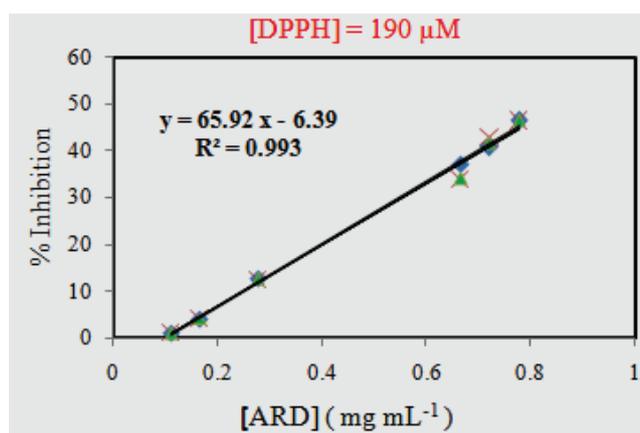


Figure VII. 8 : Variation du % Inhibition en fonction de la concentration de l'extrait ARD.

Tableau VII. 12 : Paramètres d'estimation de l'activité antioxydante à [DPPH] = 50 μM.

Paramètre calculés	Acide férulique	BRB*	ARD**
	Tampon acétate 0,05 M, pH=6, λ_{\max} = 522 nm, T = 25°C		
Temps de réaction (min)	10	15	15
EC ₅₀ (mg mL ⁻¹)	0,006 ± 0,001	0,235 ± 0,005	0,358 ± 0,005
t _{EC₅₀} (min)	≤ 7	≤ 5	≤ 8
AE	23,809	0,851	0,349
Sans tampon, λ_{\max} = 517 nm			
Temps de réaction	30	30	30
EC ₅₀ (mg mL ⁻¹)	0,008 ± 0,002	0,345 ± 0,001	0,397 ± 0,003
t _{EC₅₀}	≤ 25	≤ 15	≤ 15
AE	5	0,193	0,167

* : extrait du butanol des racines de *B. dioica*, ** : décocté lyophilisé des parties aériennes d'*A. longa*

Tableau VII. 13 : Paramètres d'estimation de l'activité antioxydante à [DPPH] = 190 μM.

Paramètre calculés	Acide férulique	B.R.B	A.R.D
	Tampon acétate 0.1M, pH=3, λ_{\max} = 522 nm, T = 40°C		
Temps de réaction (min)	15	30	30
EC ₅₀ (mg mL ⁻¹)	0,017 ± 0,001	0,380 ± 0,001	0,526 ± 0,001
t _{EC₅₀} (min)	5 < t _{EC₅₀} < 7	5 < t _{EC₅₀} ≤ 8	10 < t _{EC₅₀} < 15
AE	8,40 < AE < 11,76	0,32 < AE ≤ 0,52	0,12 < AE < 0,19
Sans tampon, λ_{\max} = 517 nm			
Temps de réaction	30	60	60
EC ₅₀ (mg mL ⁻¹)	0,016 ± 0,01	0,470 ± 0,001	% Inhibition
t _{EC₅₀}	10 < t _{EC₅₀} < 12	25 < t _{EC₅₀} < 30	46,34 < 50%
AE	5,20 < AE < 6,25	0,07 < AE < 0,08	

L'activité antioxydante est souvent estimée par le calcul de l' EC_{50} : plus sa valeur est basse, plus l'activité est meilleure. Ainsi, les antioxydants testés sont classés par ordre décroissant de l'activité, indépendamment de la concentration initiale des radicaux libres en milieu tamponné :

Acide férulique > BRB > ARD

En revanche, l'activité antioxydante est dite très forte si $AE > 10 \cdot 10^{-3}$. Cette condition est vérifiée pour tous les antioxydants testés quelles que soient les conditions opératoires, à l'exception de l'extrait **ARD** au milieu non tamponné et de concentration en radicaux libres de $190 \mu\text{M}$.

D'un autre point de vue, on propose de tenir compte du $t_{EC_{50}}$ et du temps global de la réaction, autrement dit de la cinétique de la réaction. Étant donné que les valeurs de $t_{EC_{50}}$ des antioxydants testés sont comprises entre 5 et 30 min, on déduit qu'ils ont alors un comportement cinétique intermédiaire. L'acide férulique réduit 50% des radicaux libres pratiquement au bout de 7 min en milieu concentré en radicaux libres ($190 \mu\text{M}$) et aussi à faible concentration ($50 \mu\text{M}$). Dans le cas de l'extrait **BRB**, le $t_{EC_{50}}$ est de l'ordre de 5 min du temps total de réaction (15 min, $50 \mu\text{M}$) et (30 min, $190 \mu\text{M}$). On peut conclure que l'étape rapide de la cinétique de réduction des radicaux libres définit l'étape déterminante pour l'estimation de l'activité antioxydante.

La biodisponibilité d'une substance médicamenteuse est évaluée en fonction de sa concentration et de sa vitesse pour atteindre la circulation générale, tout en définissant les intervalles en seuil thérapeutique et toxicologique. Par analogie au phénomène de la biodisponibilité, pour remplacer un antioxydant par un autre, nous suggérons :

- de définir le seuil de toxicité ;
- de définir la vitesse de réduction des radicaux à différentes concentrations ;
- la concentration minimale de réduire le maximum des radicaux libres ne doit pas excéder le seuil de toxicité.

6. Conclusion

L'application du plan du criblage révèle que les facteurs de stabilité du radical DPPH en solution est dépendante de sa concentration. L'estimation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH devrait être déterminée préférentiellement par les paramètres cinétiques de la réaction de réduction des radicaux libres. Cependant pour une mesure fiable de l'activité antioxydante d'un tel antioxydant, elle devrait être réalisée dans un milieu proche ou identique du domaine d'application. Dans l'espoir d'étudier ce phénomène dans des matrices biologiques, une similitude entre l'application *in vitro* et *in vivo* devrait être tenue en considération.

Références bibliographiques

-
- [1] Ayres, G.H., 1949. Evaluation of accuracy in photometric analysis. *Anal. Chem.* **21**, 652-657.
- [2] Fadda, A., Serra, Molinu, M.G., Azara, E., Barberis, A., Sanna, D., 2014. Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. *J. Food Comp. Anal.* **35**, 112-119.
- [3] Sharma, O. P., Bhat, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* **113**, 1202–1205.
- [4] Liaw, J.w., Tsai, S.w., Lin, H.H., Yen, T.C., 2012. Wavelength-dependent faraday-tyndall effect on laser-induced microubble in gold colloid. *J. Quant. Spectrosc. RA.* **113**, 2234-2242.
- [5] Ozelik, B., Lee, J.H., Min, D.B., 2003. Effects of Light, Oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Food Chem. Toxicol.* **68**, 487-490.
- [6] Blois, M.S., 1959. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- [7] Mathieu, D., Nony, J., Phan-tan-Luu, R., 2000. New efficient methodology for research using optimal design (Nemrodw) software. Marseille: L.P.R.A.I.
- [8] Ravikumar, K., Krishnan, Ramalingam, S., 2007. Optimization of process variables by the application of response surface methodology for dye removal using a novel adsorbent. *Dyes Pigments* **72**, 66-74.
- [9] Dawidowicz, A.L., Olszowy, M., 2012. Mechanism change in estimating of antioxidant activity. *Talanta* **97**, 312-317.

Conclusion générale

Dans le but de valoriser la phytothérapie traditionnelle tunisienne et trouver de nouveaux produits à haute valeur ajoutée, nous nous sommes intéressés aux études phytochimiques de deux espèces de la flore tunisienne : *Aristolochia longa* et *Bryonia dioica*, et à rechercher quelques propriétés biologiques de leurs extraits.

Les premiers travaux ont été consacrés à l'extraction, la séparation, la purification, l'identification et à la quantification des huiles essentielles obtenues des racines et des parties aériennes de l'espèce *A. longa*. L'analyse de quatre échantillons des racines d'*A. longa* a permis d'identifier en total 103 composés. L'échantillon collecté au mois d'avril (2013) constitue l'assemblage moléculaire le plus complexe avec 51 composés en comparaison avec les échantillons collectés au mois de septembre 2011 (35 composés), août 2009 (37 composés) et mars 2012 (35 composés). Cette diversité moléculaire est répartie essentiellement en sesquiterpènes oxygénés (50,2 - 81,1%) suivis de monoterpènes oxygénés (5,9 - 28,0%), sesquiterpènes hydrocarbonés (0,7 - 18,4%) et monoterpènes hydrocarbonés (0,0 - 0,8%).

Dans les parties aériennes, l'analyse du profil chimique a permis d'identifier en total 70 composés, dont 37 molécules supplémentaires par rapport à celles déjà mises en évidence dans les huiles essentielles des racines. Parmi les composés discriminants on cite : l'isocaryophyllène (4%), l' α -humulène (0,6 - 0,9%), l' α -cadinol (0,4 - 0,5), le Z-carveol (0,4%), le dihydroactinidiolide (4,5 - 0,2%), le pin-2-en-8-ol (29,0 - 17,7%) et le 8-acetoxy-pin-2-ène (15,0 - 25,6%). L'identification structurale de ces derniers, par résonance magnétique nucléaire (RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) uni- et bidimensionnelle et par spectrométrie de masse, a été effectuée après des étapes de fractionnement et de purification sur colonne ouverte de silice en utilisant un gradient pentane/éther diéthylique de polarité croissante.

L'activité antimicrobienne et antifongique des huiles essentielles a été évaluée qualitativement, pour la première fois, par la méthode de diffusion de disque sur les différentes souches Gram⁽⁺⁾, Gram⁽⁻⁾ et un champignon (*C. albicans*). On constate que les souches de Gram⁽⁺⁾ sont plus sensibles aux différentes huiles que les souches de Gram⁽⁻⁾ et le champignon.

En outre, l'extraction, l'identification et la quantification des acides gras libres des fractions lipidiques d'*A. longa* et *B. dioica*, ainsi que leurs activités antimicrobiennes ont été étudiées. Après interprétation des spectres de masses (GC-MS), l'ensemble des acides identifiés dans les

différents organes d'*A. longa* (**A**) et de *B. dioica* (**B**) ont été classés en acides gras polyinsaturés (**AGPI**) variant de 20,1 à 45,4%, en acides gras mono insaturés (**AGMI**) variant de 10,1 à 41,2%, et en acides gras saturés (**AGS**) variant de 26,7 à 52,2%.

Les parties aériennes des deux espèces présentent des composés majoritairement en **AGPI** et en **AGS** pour leurs teneurs élevées en acide linoléique, acide stéarique et acide palmitique. L'acide oléique (25,0% (AR) et 39,5% (BR)), l'acide linoléique (20,0% (AR) et 32,0% (BR)) constituent les composés dominants des racines. Ainsi, les valeurs pour les deux paramètres (**AGPI**)/(**AGS**) et (ω -6)/(ω -3) dans les parties aériennes des deux espèces sont de même ordre de grandeur que d'autres espèces comestibles. Par conséquent, les parties aériennes des deux espèces peuvent être considérées comme une source importante et saine d'AG essentiels.

Le pouvoir antimicrobien des fractions lipidiques d'*A. longa* et de *B. dioica* a été évalué, également pour la première fois, qualitativement par la détermination de diamètre de zones d'inhibition et quantitativement par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (**CMI**) et des concentrations minimales bactéricides (**CMB**). Dans la présente étude, les résultats des **CMI** et des **CMB** montrent que les souches de bactéries testées présentent une sensibilité distincte aux différentes fractions lipidiques.

D'après nos connaissances, le fractionnement de la fraction d'acétate d'éthyle du décocté issu de l'hydrodistillation de l'espèce *A. longa* est étudié pour la première fois et conduit à identifier une nouvelle molécule. Ainsi, pour prouver l'intérêt du traitement des résidus issus de l'hydrodistillation, il est recommandé de tester biologiquement cette molécule dans l'espoir de découvrir son pouvoir thérapeutique.

L'application du plan du criblage révèle que les facteurs de stabilité du radical DPPH en solution est dépendante de sa concentration. L'estimation de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH devrait être déterminée préférentiellement par les paramètres cinétiques de la réaction de réductions des radicaux libres. Cependant pour une mesure fiable de l'activité antioxydante d'un tel antioxydant, elle devrait être réalisée dans un milieu proche ou identique du domaine d'application.

Dans l'espoir d'étudier ce phénomène dans des matrices biologiques, une similitude entre l'application *in vitro* et *in vivo* devrait être tenue en considération. Ces plantes cachent encore leurs secrets, pour prouver scientifiquement les déductions traditionnelles de leurs activités biologiques : un criblage bio guidé est indispensable.