

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique**

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences de L'ingénieur

Département de Génie des Procédés

Thèse de Doctorat d'Etat

Spécialité : Chimie Organique Appliquée

**CARACTERISATION DES MOLECULES LIPIDIQUES ET
PHENOLIQUES DE PISTACHIER DE L'ATLAS « *PISTACIA*
ATLANTICA »**

Par

Mohamed YOUSFI

Devant le jury composé de :

Mme. N. MIMOUNE	Pr., USDB – Blida	Présidente
Mr. M. BEZZINA	Pr., USDB – Blida	Examineur
Mr. E. M. GAYDOU	Pr., Université de Marseille III	Examineur
Mr. H. A. Y. BADJAH	Pr., USTHB - Alger	Examineur
Mr. R. BELAL	Pr., USDB - Blida	Rapporteur
Mr. B. NADJEMI	Pr., ENS - Alger	Co-rapporteur
Mr. A. TOUATI	MC, ENS - Alger	Examineur invité

Blida 2005

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique**

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences de L'ingénieur

Département de Génie des Procédés

Thèse de Doctorat d'Etat

Spécialité : Chimie Organique Appliquée

**CARACTERISATION DES MOLECULES LIPIDIQUES ET
PHENOLIQUES DE PISTACHIER DE L'ATLAS « *PISTACIA
ATLANTICA* »**

Par

Mohamed YOUSFI

Devant le jury composé de :

Mme. N. MIMOUNE	Pr., USDB – Blida	Présidente
Mr. M. BEZZINA	Pr., USDB – Blida	Examineur
Mr. E. M. GAYDOU	Pr., Université de Marseille III	Examineur
Mr. H. A. Y. BADJAH	Pr., USTHB - Alger	Examineur
Mr. R. BELLAL	Pr., USDB - Blida	Rapporteur
Mr. B. NADJEMI	Pr., ENS - Alger	Co-rapporteur
Mr. A. TOUATI	MC, ENS - Alger	Examineur invité

Blida 2005

.()

% %

()

Abstract

This work is devoted to the study of lipids and phenols of the different parts of the *Pistacia atlantica tree*.

The fatty acids were analysed by GLC. The glyceridic fraction is mainly composed of oleic, linoleic, palmitic and stearic acids.

Triacylglycerols were analyzed by HPLC and the main species of triacylglycerols were thus identified and quantified. The nature of fatty acids in Sn-2 position of glycerol have been determined by enzymatic hydrolysis using porcine pancreatic lipase.

In the insaponifiable matter, tocopherol content is high in the α and γ isomers being the most abundant.

The structure of six sterols have been identified using the couplage mass spectrometry and GLC.

The second part of this studie concerns the extraction and quantification of the phenolic compounds from the different parts of pistacia atlantica tree and to study the antioxidant

activity of total phenolic extract and to characterize the new natural compounds of potential therapeutic interest from this plant.

Résumé

Ce travail est consacré à la caractérisation des molécules lipidiques et phénoliques des différentes parties de l'arbre de Pistachier de l'Atlas.

L'étude CPG de la fraction glycéridique de l'huile de fruit a permis l'identification de cinq acides gras majoritaires (acides : oléique, palmitique, linoléique, palmitique et stéarique).

Les triglycérides constitutifs de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas ont pu être déterminés par la digestion enzymatique et par CLHP. Nous trouvons principalement les triglycérides OLL, LOO, OOO, POO et POL, accompagnés en plus de PPL, PPO et LLL.

La digestion enzymatique ménagée des triglycérides par la lipase pancréatique de porc nous indique que l'acide oléique contribue d'environ 57 % à l'estérification de la position Sn-2 de la molécule de glycérol. L'acide linoléique y prend sa part de 34 %.

Dans la fraction insaponifiable de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas, les tocophérols sont abondants et riches en deux isomères α et γ . Les proportions relatives des stérols ont été déterminées par CPG. Six stérols sont identifiés par l'analyse complémentaires des spectres de masse. Certains de ces composés (le cholestérol et le stigmastanol) sont rarement rencontrés dans les huiles végétales.

L'études des phénols des différentes parties de la plantes a permis de mettre en évidence la richesse de ces parties en composés phénoliques.

L'activité antioxydante des extraits phénoliques a été déterminée par deux méthodes :

Chimique et biologique. Une corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés a été établie.

La lutéoline, l'acide gallique, le gallate de méthyle , hispidine et hispolone ont été isolés pour la première fois dans les extraits des fruits, gales et champignon de l'arbre de Pistachier de l'Atlas.

Une nouvelle molécule de dérivé hydroxycinnamique a été isolée pour la première fois de l'extrait méthanolique du champignon.

REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit de plusieurs stages de recherche effectués dans divers laboratoires de chimie.

Tout d'abord, je remercie Monsieur BELAL Rachid, maître de conférences de l'université de Saad DAHLAB de Blida, et Monsieur BOUBAKEUR Nadjemi, maître de conférences de l'Ecole Normale Supérieure d'Alger, d'avoir dirigé ma thèse, ainsi que pour l'aide qu'il m'ont apporté et pour leur intérêt constant qu'ils n'ont cessé d'accorder à l'orientation et à la réalisation de ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Michel DERBEZY, de l'Ecole Supérieure de Chimie de Marseille (France), qui m'a accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire de Chimie Analytique dans un cadre d'un stage de formation en 1998.

Je tiens également à remercier Madame le Professeur Claudette BERSET de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agro-alimentaires de Paris (France), d'avoir eu l'amabilité de m'accueillir dans son laboratoire de Chimie des Substances Naturelles pour effectuer des expériences relatives au thème de la thèse dans le cadre d'un stage de formation en 1999. Je tiens à lui rendre hommage pour ses conseils très précieux qui m'ont ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine des anti-oxydants.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur Gerardo PALA , professeur à l'université de Parme (Italie) qui a mis à mon entière disposition le matériel de son laboratoire ainsi que son expérience personnelle dans le domaine de chimie des agro-alimentaire lors de mon séjour scientifique en Italie en 2000.

Les tests biologiques des anti-oxydant n'ont pu être fait sans la contribution de Monsieur Pierre STOCKER, maître de conférences à l'Institut Méditerranéen de la Recherche en Nutrition (IMRN) à Marseille (France). Qu'il trouve ici toute ma gratitude pour son aide précieuse ainsi que l'expression de mon amitié profonde.

Que Monsieur Emile GAYDOU, professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Saint-jérôme de Marseille (France), trouve ici l'expression de mes sincères remerciements de m'avoir accueilli dans son Laboratoire dans le cadre d'une bourse FAD de 18 mois (2003-2004). J'ai pu effectivement réaliser une grande partie de ma thèse, notamment la partie caractérisation des molécules phénoliques. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour son aide, ces conseils et ces orientations qui m'ont beaucoup aider à réaliser à terme cette partie.

Mademoiselle Isabelle BOMBARDA maître de conférences m'a précieusement aidé lors de mon stage de formation FAD et je tiens à lui rendre hommage et à lui exprimer mon amitié profonde.

Enfin, je tiens à rendre un hommage tout particulier à la mémoire du feu Monsieur Mahmoud Mohammed HOUCEINE EL-KHALAFI du Laboratoire des Huiles et Graisses du Centre National de Recherche du Caire (Egypte) qui fut le premier à m'initier sur le domaine de la chimie des substances Naturelles.

Mes remerciements vont à l'égard des messieurs les membres de jury, présidés par Madame le Professeur MIMOUNE Nadia, rectrice de l'université Saad DAHLAB de Blida, à qui je tiens à lui exprimer mes vifs remerciements d'avoir accepté de présider le jury, malgré ces multiples préoccupations.

Egalement, j'exprime ma gratitude à Messieurs BAJAH Hadj Ahmed Yacine, professeur à l'USTHB d'Alger et BEZZINA Mohamed, Professeur à l'université Saad Dahlab de Blida d'avoir eu l'obligeance d'examiner mon travail de thèse.

Je teins également à remercier Monseieur Emile GAYDOU, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Saint-jérôme de Marseille (France), d'avoir eu l'amabilité d'accepter d'examiner ce travail et pour la peine qu'il a pris pour ce déplacer de France en Algérie.

Que Monsieur TOUATI Abdelkader, maître de conférences de l'Ecole Normale Supérieure d'Alger, trouve ici mes remerciements d'avoir eu la gentillesse d'examiner mon travail en sa qualité d'examineur invité.

Je tiens à Remercier tout particulièrement Monsieur le professeur BENBERTAL Djamel, Directeur de laboratoire 'Sciences Fondamentales, de l'univesrité Ammar Telidji de Laghouat, pour son précieuse aide et appui. Je tiens à signaler que certains de mes expériences ont été effectués dans ce laboratoire avec les moyens qui y sont disponibles.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin au cours ce travail, en particulier MM. Belkacem YOUSFI, Ibn Khaldoun LEFKAIER, Bachir HELIFA, Amar DJERIDANE, Djamel BOUTASSOUNA, Aissa GACEMI.

Je ne saurai oublier tous mes collègues du laboratoire des sciences fondamentales de l'université de Laghouat pour leurs soutiens. Le témoignage de ma gratitude toute particulière va à l'égard de ma famille : mes parents, ma femme, mes enfants qui ont supporté lourdement mes absences multiples dus à mon travail de thèse et notamment lors de mes déplacement à l'étranger.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	9
INTRODUCTION	15
CHAPITRE 1 : DONNEES HISTORIQUES ET ECONOMIQUES DES CORPS GRAS	18
1.1. Aperçu historique	18
1.2. Production des corps gras	19
1.3. Propriétés des corps gras	20
1.4. Utilisation des corps gras	21
CHAPITRE 2: CARACTERISTIQUES GENERALES DU PISTACHIER DE L'ATLAS	22
2.1. Caractéristiques botaniques	22
2.2. Travaux antérieurs	25
2.3. Extraction de l'huile	25
2.4. Caractéristiques physico-chimiques	26
2.5. Etude spectroscopique de l'huile	27
2.5.1. Spectre Infra Rouge	27
2.5.2. Spectre Ultra Violet (UV)	28
2.5.3. Spectre de résonance magnétique nucléaire du C 13 RMN (¹³ C)	28
2.6. Conclusion	29
CHAPITRE 3 : ETUDE DE LA FRACTION GLYCERIDIQUE	31
3.1. Généralités	31
3.2. Les acides gras	32
3.2.1. Données générales	32
3.2.2. Analyse des acides gras	32
3.3. Résultats	36
3.4. Etude des acides gras libres	38
3.5. Conclusion	39
CHAPITRE 4 : ETUDE DES TRIACYLGLYCEROLS	40
4.1. Introduction	40
4.2. Méthodes d'analyse des triacylglycérols	42

4.3. Les acides gras des triacylglycérols	46
4.3.1. Acides gras totaux des TAG	46
4.3.2. Acides gras en Sn-2 et Sn-3 par hydrolyse enzymatique	47
4.3.3. Détermination des TAG à partir des acides gras en position 2	48
4.4. Analyse des triacylglycérols par CLHP	51
4.5. Résultats des différentes analyses	55
4.6. Conclusion	57
CHAPITRE 5 : ETUDE DE LA FRACTION INSAPONIFIABLE	58
5.1. Introduction	58
5.2. Fractionnement de l'insaponifiable	61
CHAPITRE 6 : ETUDE DES TOCOPHEROLS	63
6.1. Introduction	63
6.2. Dosage quantitatif des tocophérols	64
6.2.1. Dosage des tocophérols totaux	64
6.2.2. Dosage quantitatif des tocophérols individuels	65
6.3. Conclusion	68
CHAPITRE 7 : ETUDE DES STEROLS	69
7.1. Description générale des stérols	69
7.2. Fonctions biologiques des stérols	75
7.2.1. Rôle dans la membrane cellulaire	75
7.2.2. Rôle dans les hormones	75
7.2.3. Rôle de stockage	75
7.2.4. Autres rôles des stérols	76
7.3. Méthodes d'analyse des stérols	76
7.3.1. Caractérisation des stérols	76
7.3.2. Dosages	76
7.3.3. Identification des stérols	77
7.4. Analyse des stérols de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas	80
7.5. Identification des différents stérols séparés	82
7.6. Conclusion	85
CHAPITRE 8 : STRUCTURE ET PROPRIETES DES COMPOSES PHENOLIQUES	86
8.1. Les différentes classes de composés phénoliques	86
8.2. Les composés non flavonoïdes	86
8.2.1. Les acides phénoliques	87
8.2.2. Les stilbènes	88

8.3. Les composés flavonoïdes	89
8.4. Flavones et flavonols	92
8.5. La glycosilation des flavonoïdes	93
8.6. Formation de liaisons hydrogène	95
8.7. Propriétés des flavonoïdes	95
8.7.1 Activité biologique des flavonoïdes dans le règne végétal et animal	95
8.7.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes	97
8.7.3. Propriétés complexantes des flavones et flavonols	99
8.8. Les tanins	100
8.8.1. <i>Types des tanins</i>	100
8.8.2. Activité biologique des tanins	101
8.9. Les anthocyanes	103
8.9.1. Propriétés pharmacologiques des anthocyanes	104
8.10. Autres composés phénoliques	104
CHAPITRE 9 : ANALYSE ET CARACTERISATION DES POLYPHENOLS	105
9.1. Extraction des phénols	105
9.2. Les techniques de séparation	105
9.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)	106
9.3.1. Séparation sur gel de silice	106
9.3.2. Séparation sur gel de polyamide	108
9.3.3. Séparation sur couche mince de cellulose	108
9.3.4. Révélation des flavonoïdes	109
9.4. Chromatographie sur colonne	110
9.4.1. Gel de silice	110
9.4.2. Gel de sephadex	111
9.5. Chromatographie en phase gazeuse	111
9.6. La chromatographie liquide de haute performance	114
9.6.1. Séparation sur colonnes à gel de silice	115
9.6.2. Séparation sur colonnes en phase inversée	115
9.7. Méthodes de caractérisation	117
9.7.1. Méthodes d'hydrolyse	117
9.7.2. Spectrométrie UV- Visible	117
9.7.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	123
9.7.4. Spectrométrie de masse	129

CHAPITRE 10 : ACTIVITE ANTIOXYDANTE	135
10.1. Activité antioxydante	135
10.1.1. Activité antioxydante dans le monde végétal	135
10.1.2. Phénomène d'oxydation des lipides	136
10.1.3. Mécanisme d'autoxydation	137
10.2. Rôle des antioxydants	138
10.2.1. Définition d'un antioxydant	138
10.2.2. Mécanisme d'action des antioxydants	138
10.3. Principaux antioxydants	141
10.3.1. Antioxydants à caractère enzymatique	141
10.3.2. Antioxydants naturels non enzymatiques	142
10.4. Les principales méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	150
10.4.1. Méthodes de dosage de l'activité antiradicalaires	151
10.4.2. Méthodes spécifiques aux premiers stades de l'oxydation	152
10.4.3. Méthodes propres aux produits secondaires	154
10.4.4. Méthodes indirectes	156
CHAPITRE 11 : RESULTATS DES ANALYSES DES PHENOLS	157
11.1. Introduction	157
11.2. Tests préliminaires	157
11.2.1. Recherche de Tanins	157
11.2.2. Recherche de flavonoides	158
11.2.3. Recherche de quinones	158
11.2.4. Résultats	158
11.3. Méthodes d'extraction des polyphénols	159
11.3.1. Méthodes utilisées	160
11.4. Quantification des composés phénoliques	165
11.4.1. Dosage des phénols totaux	165
11.4.2. Estimation de la teneur en flavonoides	166
11.5. Séparation et identification des composés phénoliques dans les extraits par CLHP	167
11.6. Méthode d'évaluation de l'activité anti-oxydante	169
11.6.1 Evaluation qualitative de l'activité anti-oxydante par test chimique	169
11.6.2 Evaluation quantitative de l'activité anti-oxydante	171
11.6.3. Evaluation qualitative de l'activité anti-oxydante par test biologique	173
11.7. Caractérisation des composés responsable de l'activité anti-oxydante	176
11.7.1. Isolement et identification des composés phénoliques dans les fruits et les feuilles	176

11.7.2. Molécules identifiées dans les galles et champignons	183
11.8. Effet inhibitrice des extraits phénoliques	198
11.8.1 Introduction	198
11.8.2. Estimation de l'activité inhibitrice des polyphénols sur carboxylesterase	199
11.8.3 Résultats	199
CONCLUSION	202
APPENDICE	206
Appendice A : Liste des abréviations	206
Appendice B : Courbes, formules chimiques, spectres de masse	209
Appendice C : Expérimentale	220
REFERENCES	232

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 2.1 : Vue d'un arbre de Pistachier de l'Atlas	23
Figure 2.2 : Fruit de Pistachier de l'Atlas	23
Figure 2.3 : Feuilles de Pistachier de l'Atlas	24
Figure 2.4 : Gales de Pistachier de l'Atlas	24
Figure 2.5 : Champignon de Pistachier de l'Atlas	24
Figure 2.6 : Spectre RMN du carbone 13 de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas	30
Figure 3.1 : Mécanisme général (ester méthylique) ; Réarrangement de Mac Lafferty	34
Figure 3.2 : Spectre de masse des EMAG saturés	35
Figure 3.3 : Spectre de masse des EMAG mono-insaturés	35
Figure 3.4 : Spectre de masse des EMAG insaturés	36
Figure 3.5 : Chromatogramme des EMAG de l'huile de fruit du Pistachier de l'Atlas	37
Figure 4.1 : Différentes étapes de la méthode de Brockerhoff	44
Figure 4.2 : Différentes méthodes d'analyse stéréospécifique des TAG	44
Figure 4.3 : Distribution des AG sur les trois positions du glycérol	45
Figure 4.4 : Différents isomères de position d'un TAG ABC	49
Figure 4.5 : Chromatogramme CLHP des T.A.G de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas	54
Figure 4.6 : Pourcentages des T.A.G déterminés par CLHP	57
Figure 5.1 : CCM des insaponifiables de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas	62
Figure 6.1 : Structure des différents tocophérols et tocotriénols	63
Figure 6.2 : Courbe d'étalonnage externe de l' α - tocophérols	66
Figure 6.3 : Chromatogramme CLHP des tocophérols individuels de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas	66
Figure 6.4 : Chromatogramme CLHP des tocophérols individuels étalons	67
Figure 7.1 : Cyclopentanoperhydrophénanthrène	70

Figure 7.2 : Numérotation des carbones du sitostérol	71
Figure 7.3 : Principaux noyaux tétracycliques (a) et chaînes latérales (b) dans les stérols	73
Figure 7.4 : Fragmentations caractéristiques des stérols triméthylsilylés	78
Figure 7.5 : Fragmentation des Δ^5 -stérols	79
Figure 7.6 : Fragmentation de la chaîne latérale du TMS Δ^5 -aveanstérol	79
Figure 7.7 : Fragmentation des $\Delta^{22(23)}$ stérols	80
Figure 7.8 : Chromatogramme des stérols de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas	82
Figure 8.1 : Les dérivées de l'acide p-hydrobenzoïque	87
Figure 8.2 : Les acides hydroxycinnamiques	87
Figure 8.3 : Structures chimiques de quelques stilbènes	88
Figure 8.4 : Structure de base des flavonoïdes : la phényl-2 benzopyrone	89
Figure 8.5 : Structures des différentes classes des flavonoïdes	92
Figure 8.6 : Réaction de cyclisation du glucose et numérotation des sucres	94
Figure 8.7 : Structure des tannins condensés	101
Figure 8.8 : Structure de base des anthocyanes	103
Figure 8.9 : Structure de base des dihydrochalcones	104
Figure 9.1 : Systèmes synnamoyl et benzoyl d'un flavonoïde	118
Figure 9.2 : Effet de l'acide borique	119
Figure 9.3 : Effet de chlorure d'aluminium et de l'acide chlorydrique	122
Figure 9.4 : Déplacement chimique des protons H-6 et H-8 dans 5,7-dihydroxyflavonoïde	124
Figure 9.5 : Fragmentation commune des flavonoïdes par IE	131
Figure 9.6 : Mécanismes de fragmentation par IE de quelques flavonoïdes aglycones	134
Figure 10.1 : Mécanisme d'autoxydation	137
Figure 10.2 : Mécanisme d'action d'un antioxydant phénolique vis-à-vis d'un radical acide gras	140
Figure 10.3 : Action pro-oxydante des métaux	140
Figure 10.4 : Structures de quelques acides phénoliques	147
Figure 10.5 : Quelques antioxydants de synthèse	149
Figure 10.6 : Action du radical DPPH	152
Figure 10.7 : Réaction entre l'acide thiobarbiturique et le malondialdéhyde	155
Figure 11.1 : Courbes de densité optique en fonction du temps pour les extraits phénoliques de plantes	170

Figure 11.2 : Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration volumique des extraits	171
Figure 11.3 : Variation des valeurs de TEAC en fonction du contenu en polyphénols	173
Figure 11.4 : Courbes d'hémolyse en présence d'extraits de plantes ($10^{-5}M$)	174
Figure 11.5 : Structure chimique de la lutéoline	178
Figure 11.6 : Spectre RMN du proton de la lutéoline	178
Figure 11.7 : Spectre RMN du carbone de la lutéoline	179
Figure 11.8 : Spectre de masse (IE) de la lutéoline	180
Figure 11.9 : Spectre RMN- ^{13}C du gallate de méthyle	181
Figure 11.10 : Spectre RMN- ^{13}C de l'acide gallique	182
Figure 11.11 : Structure chimique de l'acide gallique et le gallate de méthyle	182
Figure 11.12 : Protocole isolement et identification des composés anti-oxydant	184
Figure 11.13 : CCM de l'extrait chloroformique du champignon	186
Figure 11.14 : Spectre RMN du proton composé 1	187
Figure 11.15 : Spectre RMN du proton composé 2	188
Figure 11.16 : Spectre RMN du carbone composé 1	188
Figure 11.17 : Spectre RMN du carbone composé 2	189
Figure 11.18 : Spectre de masse du composé 1	190
Figure 11.19 : Spectre de masse du composé 2	191
Figure 11.20 : Spectre RMN du proton du composé 3	193
Figure 11.21 : Spectre RMN du carbone du composé 3	193
Figure 11.22 : Spectre RMN 2D HMQC du composé 3	194
Figure 11.23 : Spectre RMN 2D HMBC du composé 3	195
Figure 11.24 : Spectre RMN du carbone du composé 3	196
Figure 11.25 : représentation graphique $1/V = f([polyphénols])$ de l'activité enzymatique de la CER en fonction de la concentration de polyphénols de l'extrait du fruit du Pistachier de l'Atlas	200

Tableau 1.1 : Sources naturelles des matières grasses	20
Tableau 2.1 : Aire de Pistachier de l'Atlas en Afrique du nord	22
Tableau 2.2 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas	27
Tableau 3.1 : Composition en acides gras de l'huile de fruit du Pistachier de l'Atlas	37
Tableau 3.2 : Composition en acides gras libres et liés de l'huile de fruit du Pistachier de l'Atlas	38
Tableau 4.1 : Proportions des EMAG des triacylglycérols contenus dans l'huile de Pistachier de l'Atlas	46
Tableau 4.2 : Principaux acides gras en position Sn-2 des TAG	48
Tableau 4.3 : Taux des différents AG dans les positions 2 et 1+3	49
Tableau 4.4 : Exemple de calcul des taux des différents TAG	50
Tableau 4.5 : Répartition des acides gras dans les triacylglycérols de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas	55
Tableau 5.1 : Teneur en insaponifiable de quelques huiles végétales	60
Tableau 6.1 : Tocophérols individuels de l'huile de Pistachier de l'Atlas	67
Tableau 7.1 : Principaux stérols présents dans le règne végétal	74
Tableau 7.2 : Identification des principaux stérols triméthylsilylés par leurs fragments caractéristiques	78
Tableau 7.3 : Composition en stérols de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas	85
Tableau 9.1 : Système de solvants rencontrés dans la littérature (CCM)	107
Tableau 9.2 : Déplacements chimiques de H-6 et H-8 dans 5,7-dihydroflavonoïdes	124
Tableau 9.3 : Déplacements chimiques des protons de H-5, 6 et 8 dans 5- dihydroxyflavonoïdes	125
Tableau 9.4 : Déplacements chimiques des protons de H-2', 3', 6' dans 4- oxyflavonoïdes	125
Tableau 9.5 : Déplacements chimiques de C-2' et 6' dans 3',4'-dioxycénés flavonoïdes	126
Tableau 9.6 : Déplacements chimiques des protons H-2 et H-3 dans les flavanones et dihydroflavonols	127
Tableau 11.1 : Synthèse des résultats des tests chimiques concernant les polyphénols	159
Tableau 11.2 : Rendements des extraits et taux des polyphénols totaux	162
Tableau 11.3 : Pourcentage des extraits et aspects	164

Tableau 11.4 : Teneur en phénols et en flavonoïdes des extraits	166
Tableau 11.5 : Résultats de l'analyse CLHP des extraits phénoliques	168
Tableau 11.6 : Inhibition d'hémolyse de différents extraits phénoliques de plantes comparées à celle de l'acide ascorbique	175

INTRODUCTION

Cette étude est consacrée à la valorisation phytochimique de l'arbre de Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica*). Cette valorisation consiste à étudier les principaux constituants chimiques des différentes parties de la plante à savoir : les feuilles, les fruits, les gales et la partie dégradée de l'arbre (champignon) d'une part et de mettre en évidence leurs importances sur le plan nutritionnel et pharmaceutique d'autre part. Les trois dernières parties suscitées sont connues par la population locale sous les noms «El Khodiri, El Afse et Sora» respectivement.

Le Pistachier de l'Atlas est une plante de la famille des anacardiées. Cette famille recense plusieurs espèces réparties en plusieurs genres, les plus connus sont : le *Pistacia vera*, le *Pistacia lentiscus* et le *Pistacia terebenthius* [1]. L'une des principales caractéristiques du Pistachier de l'Atlas est sa très grande résistance à la sécheresse.

Ce travail a été entrepris pour plusieurs raisons :

- Tout d'abord, cet arbre est couramment rencontré dans toutes les zones steppiques et présahariennes et mêmes dans le Hoggar [2]. C'est une plante souvent employée en médecine traditionnelle, à des usages divers. D'ailleurs, les fruits, les gales et le champignon de Pistachier de l'Atlas sont disponibles dans les marchés locaux du sud algérien.
- Le fruit de cette plante est riche en matière grasse. L'huile du fruit est utilisée comme matière première pour la saponification, pour l'éclairage et pour la préparation des cosmétiques adoucissants [3]. Mise à part son utilisation en alimentation des troupeaux, il est également utilisé par la population locale d'une façon artisanale en médecine traditionnelle comme antiseptique et antidiarrhéique.
- Certaines plantes de la famille des anacardiées sont utilisées comme plantes médicinales en Turquie et en Iran. Il a été constaté qu'un certain nombre de composés extraits des plantes de cette famille et notamment l'espèce *Pistacia lentiscus* présente des propriétés antifongiques et antibactériennes et antioxydantes [4-11].

Si les autres espèces du Pistachier ont déjà fait l'objet de nombreuses études concernant la composition chimique des feuilles et gales en huiles essentielles, flavonoïdes et tanins [12-17], peu de travaux ont été consacrés à l'étude des constituants chimiques des différentes parties du Pistachier de l'Atlas. Seule la composition en acides gras totaux de l'huile et la composition en protéines et acides aminés et éléments minéraux de son tourteau ont été déterminées [18-20]. Il nous a paru intéressant, d'une part, de confirmer puis d'approfondir ces observations et les comparer, et d'autre part, d'étendre cette étude aux autres constituants de l'huile, tels que les triacylglycérols, la fraction insaponifiable (stérols, tocophérols) et aux autres constituants phénoliques.

Une première partie de ce travail sera consacrée à l'étude de deux fractions saponifiable et insaponifiable de l'huile du fruit, car, à notre connaissance, aucune analyse chimique de la fraction lipidique insaponifiable n'a été conduite auparavant sur cette espèce. Nous montrerons dans un premier temps comment en combinant des méthodes chromatographiques, nous déterminerons la composition en acides gras totaux et la nature des triacylglycérols ainsi que la distribution des acides gras sur les positions internes et externes de la chaîne du glycérol. Dans un second temps, nous étudierons la composition qualitative et quantitative des tocophérols de façon à connaître le potentiel vitaminique de l'huile. Nous envisagerons ensuite l'analyse des stérols, composés qui seront identifiés par le couplage chromatographique en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse.

Dans une deuxième partie, nous allons étudier la composition chimique du tourteau du fruit et autres parties de la plante en produits phénoliques. Dans cette partie, nous nous intéressons à quantifier les phénols totaux et les flavonoïdes et étudier l'activité antioxydante et antiradicalaire de tous les différents extraits polaires, et nous essayerons d'isoler et caractériser par la combinaison de techniques analytiques chromatographiques et spectroscopiques les molécules responsables de cette activité. A notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature des travaux concernant cette deuxième partie.

A l'issue de cette étude, nous pourrions établir une carte d'identité pour chacune des parties étudiées de l'arbre ce qui conduira à dégager les principaux caractères chimiotaxonomique du Pistachier de l'Atlas et définir les domaines de valorisation dans lesquels les lipides des fruits ainsi que les composés du Pistachier pourraient offrir les meilleurs résultats.

Enfin, cette espèce étant une plante médicinale réputée dans toute l'Algérie et dans certains pays du monde (Grèce, Turquie, Iran, Inde, ...), nous tenterons de justifier ses propriétés par une étude de l'activité antioxydante, car la contenance en ces composés biologiques très actifs pourrait justifier les propriétés thérapeutiques du Pistachier de l'Atlas.

CHAPITRE 1

DONNEES HISTORIQUES ET ECONOMIQUES DES CORPS GRAS

1.1. Aperçu historique

On définit un corps gras, qu'il soit d'origine animale ou végétale, comme étant l'ensemble des constituants solubles dans les solvants non ou peu polaire (hexane, éther, chloroforme...). Les triglycérides sont les constituants majoritaires et essentiels des lipides neutres, mais elles contiennent bien d'autres composés liposolubles, tels que les phospholipides, les cérides, les constituants de l'insaponifiable (stérols, tocophérols, hydrocarbures,...) [21].

Depuis les temps les plus reculés, l'homme a utilisé les corps gras pour leurs différentes propriétés, notamment en cosmétologie et en médecine. De nombreux textes anciens font ainsi références à diverses huiles de graines ou à des graisses animales.

Il est communément établi dans l'histoire des corps gras de distinguer deux périodes : la période qui précède les travaux de CHEVREUL et celle qui vient après. Il faut attendre la fin du XVII-ième siècle pour que débutent les travaux de TACHEN sur la connaissance chimique des corps gras. Un siècle plus tard, SCHEELE, DAR CET, BERTHOLET et VOGEL approfondissent l'étude de la structure chimique des corps gras [22].

En 1813, CHEVREUL travaille à l'analyse d'un savon préparé à partir de graisse de porc et de la potasse. Il définit ainsi un savon comme un mélange des sels alcalins d'acides particuliers, ne provenant pas de l'oxydation de la graisse par l'oxygène de l'air, mais préexistant dans la graisse, combinés avec la glycérine anhydre.

Puis, PELOUZE, BOUDET et BERTHOLOT continuent sur cette voie et précisent la structure de la fraction glycéridique. Parallèlement, bien d'autres chercheurs se sont intéressés à l'étude des phospholipides et des stérols. BENECKE et HESSE ont ainsi mis en évidence

l'existence dans les huiles végétales de substances très proches du cholestérol, les phytostérols.

A la fin du XIX-ième siècle, l'essentiel sur la composition et la structure des corps gras est connu.

1.2. Production des corps gras

Au cours des quarante dernières années, la production mondiale annuelle des matières grasses est passée de 29 à 287.7 millions de tonnes dont 182 millions de tourteaux et 82 millions d'huile végétales [23].

Ces matières grasses proviennent de graines et fruits oléagineux, les corps gras d'origine animale étant représentés par le beurre, le saindoux, le suif et les huiles marines. Le tableau 1.1 regroupe les différentes origines des matières grasses.

Les huiles de Soja, de palme et du tournesol représentent à elles seules plus de 65% des huiles végétales produites, le reste de la production d'huiles végétales provient des huiles d'arachide, de coton, d'olive et de sésame. Les zones géographiques de production des matières grasses sont très diversifiées. L'Europe de l'est, premier producteur mondial, et les états unis représentent à eux seuls 30% de la production mondiale. La Malaisie, la Chine, l'ex URSS, l'Inde, le Brésil, l'Indonésie, l'Argentine, le Japon et le Canada représentent quant à eux 49% .

L'huile de Soja est produite principalement par les Etats-Unis et la CEE, l'huile de Palme par la Malaisie et l'Indonésie, l'huile de Colza par l'Europe, la Chine et l'Inde et enfin l'huile de Tournesol par l'ex URSS et la CEE.

Tableau 1.1 : Sources naturelles des matières grasses

Origine	Matière grasse
Végétale <ul style="list-style-type: none"> • Graines oléagineuses • Graines, noyaux, fèves de régions tropicales • Fruits oléagineux 	<ul style="list-style-type: none"> • Tournesol, Colza, Moutarde, Soja, , pépins de raisin, Carthame, sésame, Cameline, Oeillette, Lin, Amande, Noisette, Noix, Onagre, Bourrache, Pépins de cassis, Germe de blé. • Arachide, coton, Coprah, palmiste Cacao, Karité, Ricin. • Olive, Palme, Avocat
Animale <ul style="list-style-type: none"> • Porc, Bœuf, Mouton, Canard, Oie, Poulet, Hareng, morue, Sardine • Vache, Brebis 	<ul style="list-style-type: none"> • Saindoux, Suif, Graisse d'os, Graisse de volaille, huiles de marines. • Produits laitiers.

1.3. Propriétés des corps gras

Les corps gras possèdent des propriétés biochimiques et nutritionnelles par leur apport en acides gras essentiels et vitamines liposolubles [22,24].

L'acide linoléique et ses dérivés en n-6 (acide dihomog- δ -linoléique, acide arachidonique), l'acide linoléique et ses dérivés en n-3 (acide eicosapentanoïque) sont considérés comme des acides gras essentiels car, non synthétisés par les mammifères, ils doivent être apportés par l'alimentation. On leur attribue de nombreuses vertus thérapeutiques [25,26], telles que des effets hypocholestérolémiant et hypotriglycéridémiant (régulation de la lipémie), un rôle protecteur contre l'athérosclérose et la thrombose (fonction rénale). Ils participent également au maintien de l'intégrité de l'épiderme (fonction épidermique) [27]. Enfin, ils interviennent dans la régulation de la fonction reproductrice et du système immunitaire.

Les matières grasses contiennent comme constituants mineurs certaines vitamines liposolubles, telles que les vitamines A (rôle de la vision), D (antirachitique), E (antioxydant) et K (antihémorragique) [22].

Les corps gras se caractérisent également par leurs propriétés pharmacologiques, diététiques et cosmétiques. Ils peuvent être ainsi utilisés comme véhicule et excipient de principes actifs. Les huiles d'amande douce, d'olive, d'arachide, de maïs sont des exemples d'huiles végétales employées à cet effet [22,28-29].

Certaines huiles végétales possèdent des applications thérapeutiques grâce à leurs propriétés antibiotiques et antifongiques. On peut citer l'huile de chaulmoogra, extraite de graines de plusieurs variétés d'hydnocarpus (flacourtiacées), qui été utilisé pour le traitement de la lèpre. Cette huile contient un acide gras particulier, l'acide chaulmoogrique ou cyclopentène tridécanoïque [22].

Les huiles poly-insaturées possèdent des effets pharmacologiques par leur teneur en acides gras essentiels. On peut citer les huiles d'onagre, de bourrache, de pépins de cassis comme caractéristique de la famille n-6 et les huiles de poisson pour la famille n-3 [22].

Enfin, les phospholipides, stérols et autres constituants mineurs de l'insaponifiable confèrent aux huiles diverses propriétés, telles que des propriétés émulsifiantes pour les phosphatidyl-aminoalcools, une régulation du métabolisme du cholestérol pour les phytostérols.

Les insaponifiables totaux du Soja et d'avocat ont trouvé des applications cosmétiques par leurs effets sur le métabolisme du tissu conjonctif [30].

1.4. Utilisation des corps gras

La majorité de la production mondiale en matières grasses est destinée à l'alimentation humaine ou animale [2]. Les corps gras subissent des transformations à des fins alimentaires comme l'hydrogénation, l'interstérification, margarines et l'émulsion, ou à des fins non alimentaires comme les huiles siccatives, les alcools gras, et les savons; leurs principales utilisations industrielles étant donc comme tensioactifs, lubrifiants, cosmétiques, additifs pour matières plastiques [31,32].

CHAPITRE 2

CARACTERISTIQUES GENERALES DU PISTACHIER DE L'ATLAS

2.1. Caractéristiques botaniques

Le Pistachier est un arbre dioïque appartenant à la famille des anacardiées (*Anacardeaceae*). L'étude monographique de genre *pistacia*, faite par ZOHARY [1], montre que ce genre comprend 4 sections et 11 espèces.

Le pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica*) connu par le nom local «Betoum» est l'un de ces espèces végétales la plus caractéristique de l'Atlas saharien de l'Algérie. Son arbre de hauteur allant de 5 à 15 mètres, de tronc qui peut atteindre un diamètre de 1mètre, pousse dans les régions présahariennes du pays (figure 2.1). Ses fruits sont des petites graines vertes de 5 à 8 mm de taille (figure 2.2). Les feuilles de l'arbre sont composés de 7 à 12 folioles ovales acuminées, tomenteuses, qui deviennent coriaces à l'âge adulte (figure 2.3). Mis à part les fruits, on trouve aussi les gales qui poussent sur les tiges des feuilles (figure 2.4) et un champignon qui se forme tout le long du tronc (figure 2.5). L'aire du Pistachier de l'Atlas s'étend depuis les îles Canaries à l'ouest jusqu'au proche orient vers l'est. On le trouve aussi en Grèce, en Turquie, en Iran et au Pakistan [33]. L'aire du Pistachier de l'Atlas en Afrique du nord a été tracée par MONJAUZE [34] (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Aire de Pistachier de l'Atlas en Afrique du nord [34]

Pays	Aire en km²
Tunisie	180 000
Algérie	50 000
Maroc	50 000
Libye	25 000
Egypte	25 000
TOTAL	330 000



Figure 2.1 : Vue d'un arbre de Pistachier de l'Atlas
(Image prise dans les environs de la ville de Laghouat – Algérie)



Figure 2.2 : Fruit de Pistachier de l'Atlas



Figure 2.3 : Feuilles de Pistachier de l'Atlas



Figure 2.4 : Gales de Pistachier de l'Atlas



Figure 2.5 : Champignon de Pistachier de l'Atlas

2.2. Travaux antérieurs

Peu de travaux ont été consacrés à l'analyse physico-chimique des différentes parties de l'arbre de Pistachier de l'Atlas.

La composition du fruit en acides gras, en acides aminés, en éléments minéraux et le dosage quantitatif des protéines, des fibres et de l'amidon ont été l'objet de quelques études. Les valeurs des taux en matière grasse citées dans la littérature diffèrent considérablement les unes des autres. Toutefois, les valeurs moyennes s'échelonnent entre 40 et 50% d'huile. La plupart des analyses indiquent une teneur en protéines de l'ordre de 7,40 à 8,70%, une teneur en fibres de 30,80 à 33,80% et un rendement en amidon de 4,90 à 5,40% [18-20].

L'existence d'acide gras majoritaire palmitique, oléique et linoléique a été également mise en évidence. Les acides aminés essentiels comme le thréonine, cystine, valine, méthionine ont été également décelés.

La composition minérale indique la présence des macros éléments comme le calcium, le phosphore, le magnésium, le potassium et le sodium, ainsi que la présence des micro-éléments comme le manganèse, le cuivre, le zinc, le fer et le sélénium.

Par contre, nous n'avons pas trouvé de références bibliographiques concernant la composition de l'huile de fruit du Pistachier de l'Atlas en triacylglycérols, en phospholipides et en fraction insaponifiable (Tocophérols et stérols).

De même, aucun travail n'a été consacré aux autres parties de l'arbre (feuilles, gales et la partie dégradée (champignon)).

2.3. Extraction d'huile

Les fruits de Pistachier de l'Atlas récoltés d'une petite forêt située dans la région de Tadjerouna (sud ouest de Laghouat) sont avant tout traitement séchés à l'étuve à 70°C pendant 24 heures pour inactiver les enzymes susceptibles d'hydrolyser les glycosides. Les graines de Pistachier de l'Atlas sont broyées en poudre fine.

L'huile est obtenue après 8 heures d'extraction à froid par l'hexane. Après séchage et évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient un rendement en huile de 45%. Si nous comparons ce résultat avec ceux d'autres graines alimentaires comme le tournesol, le soja et l'olive (taux allant de 30 à 35%), les fruits du Pistachier de l'Atlas sont relativement riche en huile.

L'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas obtenue est d'une couleur jaune orangée, qui provient peut être de la présence de pigments et de phénols. Elle présente à la température ambiante deux phases : une phase inférieure très visqueuse, due peut être à la forte concentration en acides gras saturés et une phase supérieure plus liquide. Cette huile a une odeur typique très agréable.

2.4. Caractéristiques physico-chimiques

Nous avons déterminé selon les normes AFNOR (Association Française de Normalisation) [35] quelques indices physico-chimiques qui caractérisent les matières grasses.

Ces indices permettent de faire quelques estimations sur :

- les masses moléculaires moyennes des acides gras et des triacylglycérols, déterminées par l'indice de saponification (IS)
- le nombre des insaturations par la mesure de l'indice d'iode (II)
- la teneur en acides gras libres par détermination de l'indice d'acides (IA).

Nous avons également déterminé la teneur de l'huile en matières insaponifiables et quelques caractéristiques physiques tel que l'indice de réfraction et la densité. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas

Indice	IA	% AL	II	IS	M ^{A.G}	M ^{TG}	d	η	% MI
Valeur	18,70	9,4	88	199	268	843	0,9065	1,4740	1,72

A.L : Acides gras libres (acidité exprimée par rapport à l'acide oléique)

M.I. : Matière insaponifiable

M^{A.G} : masse moléculaire moyenne des acides gras.

M^{TAG} : masse moléculaire moyenne des triacylglycérols

d : densité , η : indice réfraction

Les valeurs des indices de saponification et d'iode indiquent une forte prépondérance d'acides gras de longueurs de chaînes moyennes entre 16 à 18 atomes de carbone avec un taux de saturation élevé par rapport à d'autres huiles végétales comme le tournesol, l'arachide, le soja [22]. La forte valeur de l'indice d'acide peut être expliquée par des dégradations enzymatiques lors de la conservation ou du séchage des fruits. Une dégradation de l'huile est à écarter puisque la détermination de l'indice d'acide a été faite immédiatement après extraction.

La teneur en insaponifiable de 1,72% correspond à une huile relativement riche en insaponifiable, puisque l'on admet qu'elle varie généralement dans les huiles végétales alimentaires entre 0,5 et 1,2% [22].

2.5. Etude spectroscopique de l'huile

2.5.1. Spectre Infra Rouge

Le spectre infrarouge de l'huile montre l'existence de toutes les bandes d'absorptions caractéristiques des huiles végétales alimentaires. On peut citer quelques valeurs du nombre d'onde $\bar{\nu}$:

- une forte absorption à $\bar{\nu}=1747\text{cm}^{-1}$, caractéristique de la fonction carbonyle C=O des esters.
- une absorption d'intensité moyenne à $\bar{\nu}=1456\text{cm}^{-1}$, indique la présence des doubles liaisons C=C et ce qui indique la présence des acides gras insaturés dans la composition d'huile.
- une forte absorption à $\bar{\nu}=3020\text{cm}^{-1}$, caractéristique de la fonction éthylénique =C-H.
- une absorption de faible intensité à $\bar{\nu}=3474\text{cm}^{-1}$, moyennement large indiquant la présence d'une fonction OH due à l'existence de mono- ou dia-cyglycérols, ou des acides gras libres, car la valeur élevée de l'indice d'acide notée indique l'existence d'acides gras libres dans la composition d'huile.

2.5.2. Spectre Ultra Violet (UV)

Le spectre ultra violet de la solution d'huile dans le cyclohexane montre l'existence d'une bande d'absorption caractérisée d'une longueur d'onde maximale de 212 nm et qui correspond aux transitions électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$ et ce qui appuie l'existence des insaturations dans les composés de l'huile.

2.5.3. Spectre de résonance magnétique nucléaire du carbone 13 RMN (^{13}C)

Comme l'huile de Pistachier de l'Atlas est caractérisée par une acidité très supérieure à celles rencontrée couramment dans les huiles végétales, il nous a donc paru intéressant d'effectuer une étude spectroscopique par RMN du carbone 13 afin de déterminer la nature des constituants majeurs.

Le spectre RMN du carbone 13 de l'huile dans le chloroforme deutérié (figure 2.6) montre dans plusieurs régions du spectre des signaux que l'on rencontre habituellement dans les huiles de graines alimentaires. Tout d'abord, nous observons deux signaux à un déplacement chimique $\delta = 62.05$ ppm et $\delta = 68.86$ ppm attribuables respectivement à la résonance des atomes de carbone des triacylglycérols C1,3 et C2. De plus, on remarque aussi deux signaux à $\delta = 172.76$ ppm et $\delta = 173.20$ ppm qui caractérisent respectivement la

résonance des carbonyles des acides gras en une position interne 2, et en deux positions externes 1,3 [36,37]. Dans la région de résonance des atomes éthyléniques (figure 2.6), on remarque la présence de signaux qui indiquent l'existence des acides gras insaturés. Par contre le spectre RMN du carbone de l'huile de fruit ne montre aucun signal qui pourrait être attribuable à la résonance des atomes de carbone des acides gras particuliers, tels que les acides gras cyclopropéniques (AGCE) et les acides gras époxydiques (AGEP) [38,39].

2.6. Conclusion

L'étude préliminaire de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas nous a permis de déterminer les principales constantes physico-chimiques de l'huile et ses caractéristiques spectroscopiques. Cette étude nous a permis également de constater que l'huile du fruit est fortement acide et possède dans sa structure une teneur relativement élevée d'acides gras saturés. L'étude du spectre RMN du carbone 13 exclu la présence de diverses espèces moléculaires de nature glycérique autres que les triacylglycérols et notamment les acides gras particuliers, tels que les acides gras cycliques.

Pistachier 13C

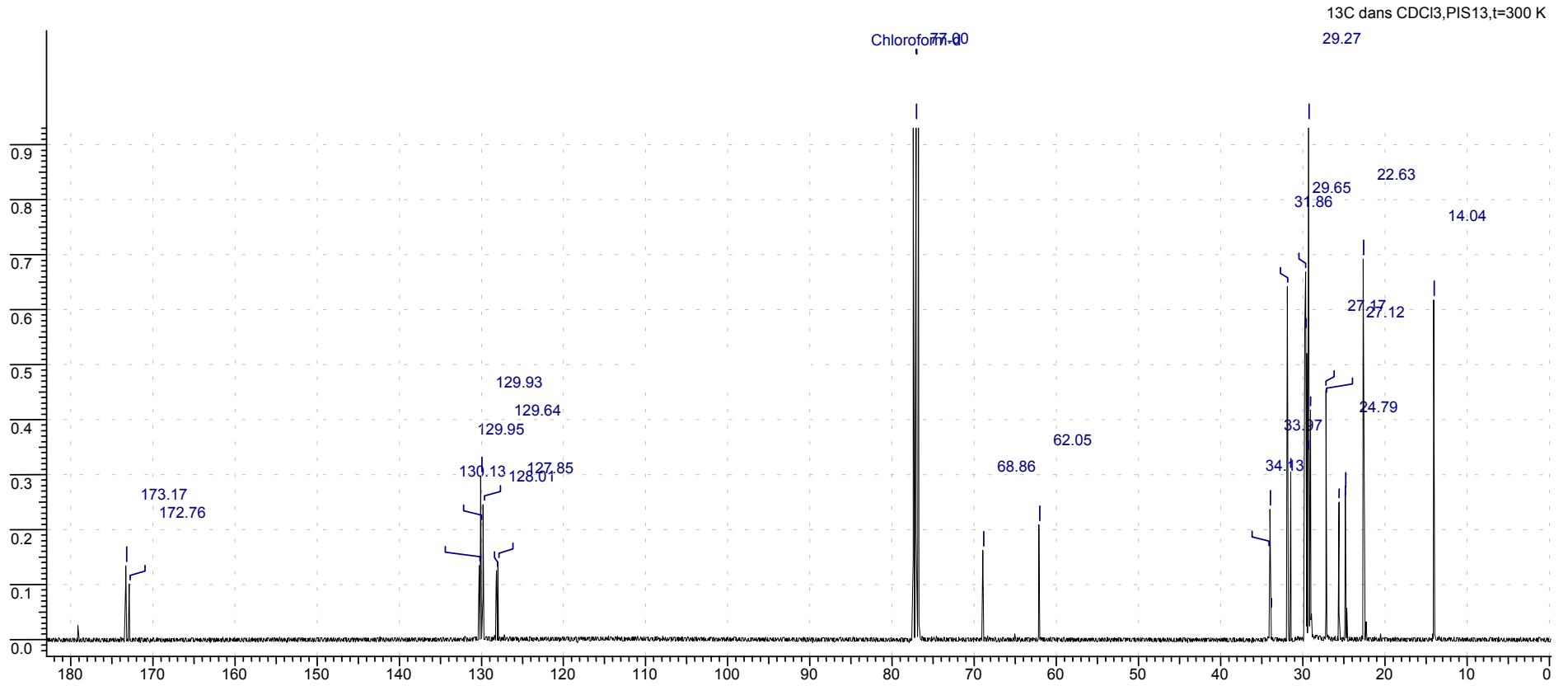


Figure 2.6 : Spectre RMN du carbone 13 de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas

CHAPITRE 3

ETUDE DE LA FRACTION GLYCERIDIQUE

3.1. Généralités

La fraction lipidique totale d'un tissu végétal ou animal est l'ensemble des composés organiques insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants non polaires. Elles comprennent des diverses catégories composées de :

- lipides de réserve, constitués de triacylglycérols (TAG), constituants largement majoritaires, ainsi que de composés métaboliquement proches, les monoacylglycérols (MAG) et les diacylglycérols (DAG).
- lipides de constitution, représentés par les phospholipides. Ce sont les constituants essentiels des membranes cellulaires.

Lors de la saponification d'une huile végétale par un hydroxyde alcalin, on obtient deux fractions :

- une fraction majoritaire constituée de sels d'acides gras résultant de l'hydrolyse des TAG, des DAG, des MAG, des phospholipides, des glycolipides. Cette fraction appelé saponifiable est soluble dans l'eau.
- une fraction minoritaire constituée de divers composés, tels que les triterpènes, les vitamines liposolubles, les alcools gras, les hydrocarbures des carotènes et des caroténoïdes, les stérols et les tocophérols. Cette fraction appelée insaponifiable est soluble dans presque tous les solvants organiques non polaires.

Dans cette partie, nous nous intéressons à l'analyse quantitative et qualitative des acides gras de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas.

Nous établirons ensuite la structure glycérique de cette huile. Nous nous intéresserons tout d'abord à l'étude des acides gras en position sn-2 des triacylglycérols puis à leur composition.

3.2. Les acides gras

3.2.1. Données générales

Les acides gras (AG) n'existent pratiquement pas à l'état libre dans les cellules et les tissus, mais combinés sous forme d'esters. Ce sont des acides organiques à longue chaîne, généralement à nombre pair d'atomes de carbone (14 à 30 atomes) possédant une seule fonction carboxylique et une chaîne carbonée (queue) conférant à la plupart des lipides leurs propriétés d'insolubilité dans l'eau et leur consistance grasseuse ou huileuse.

Ces acides gras, généralement non ramifiés, diffèrent entre eux par la longueur de leur chaîne, la présence et le nombre et la position de leurs doubles liaisons. On observe une prédominance très marquée des acides de 16 à 18 atomes de carbone dans le règne végétal. La double liaison, lorsqu'elle existe, est plus généralement de configuration Cis. La plupart des organismes vivants sont capables de synthétiser des AG mono-insaturés par désaturation des AG saturés correspondants [40].

Les AG poly-insaturés sont intéressants sur le plan nutritionnel. Certains d'entre eux jouent un rôle vital dans la cellule, d'où leur dénomination d'acides gras essentiels (AGE), il s'agit des acides linoléiques (série n-6) et α -linoléique (série n-3) et de leurs dérivés supérieurs. Ces AGE ne sont pas synthétisés par les mammifères. Ils doivent donc être apportés par l'alimentation. L'acide linoléique est le précurseur des thromboxanes, des prostacyclines, des leucotriènes et des prostaglandines qui ont un rôle préventif vis-à-vis des troubles du métabolisme et des maladies cardiovasculaires, ainsi qu'une action sur la structure des membranes biologiques et de certaines de leurs fonctions [41]. Ceci explique l'intérêt croissant des AGE en cosmétologie et en agroalimentaire.

3.2.2. Analyse des acides gras

L'identification des AG est couramment réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) après leur transformation préalable en esters méthyliques (EMAG) de façon à accroître leur volatilité [42]. Cette technique permet de séparer les EMAG en fonction de leur nombre d'atomes de carbone mais aussi en fonction du nombre et de la position des doubles liaisons, ainsi que d'éventuels groupes fonctionnels [43].

Les EMAG sont préparés par plusieurs méthodes décrites dans la littérature, on peut citer deux méthodes :

- Estérification des acides gras par le méthanol en présence d'un catalyseur acide, le trifluorure de bore (BF_3) selon la méthode recommandée par 'International Union of Pure and Applied Chemistry' (IUPAC) [44, 45]. Cette estérification a lieu sur les acides gras libres, par conséquent, il est nécessaire d'effectuer une saponification préalable par un hydroxyde alcalin (hydroxyde de potassium en milieu hydroalcoolique). Cette méthode est valable uniquement si l'huile ne comporte pas d'AG particuliers, tels que des acides gras polyéthyléniques conjugués ou époxydiques [43].
- Transestérification par action du méthylate de sodium en solution méthanolique [46]. Cette technique n'est valable que si l'indice d'acide d'huile n'est pas trop élevé (teneur en acides gras libres inférieure ou égale à 3%).

Les identifications se font par comparaison des temps de rétention (TR) de produits étalons ou par calcul des longueurs de chaînes équivalentes (LCE). Cette méthode permet de caractériser les AG par une valeur numérique que l'on peut rechercher dans les tables de données citées dans la littérature [47a]. Mathématiquement, la LCE est définie par la formule suivante :

$$LCE(X) = m + (n - m) \frac{\text{Log } TR(X) - \text{Log } TR(M)}{\text{Log } TR(N) - \text{Log } TR(M)}$$

où M est l'acide gras saturé à m atomes de carbone ; N est l'acide gras saturé à n atomes de carbone ; $n > m$; X est l'acide gras recherché.

L'analyse CPG des EMAG est effectuée sur une colonne de type 'Méga 10' susceptible de séparer les isomères de position des AG insaturés. L'identification des EMAG est réalisée en trois étapes. Tout d'abord nous injectons les EMAG étalons, puis nous calculons les valeurs des LCE et en fin nous faisons une analyse chromatographique gazeuse couplée à un détecteur de masse pour enlever toute ambiguïté.

En spectrométrie de masse à impact électronique (SMIE), les EMAG saturés se reconnaissent rapidement à la présence dans le spectre de masse de deux ions principaux à

$M/Z = 74$ (réarrangement de MAC LAFFERTY (figure 3.1), pic de base) et $M/Z = 87$ [48].

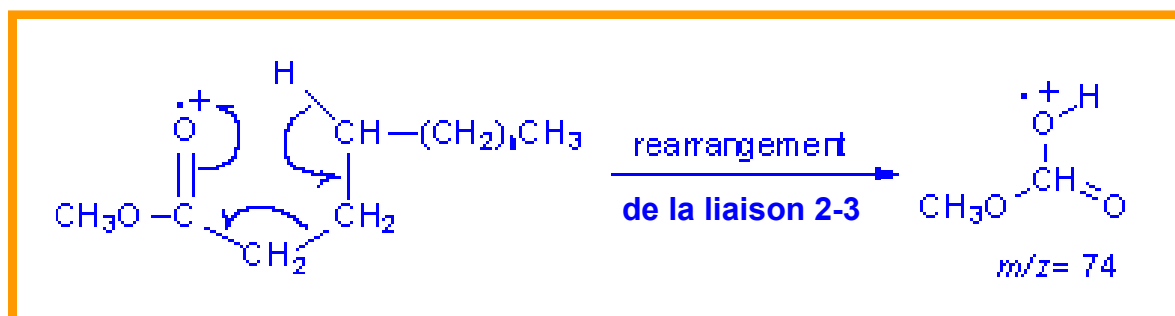


Figure 3.1 : Mécanisme général (ester méthylique) ; Réarrangement de Mac Lafferty

Le spectre SMIE à 70eV des EMAG à chaîne normale est caractérisé par un ion moléculaire M^+ net, accompagné de pics significatifs à $[M-31]^+$ (perte du radical méthoxy) et à $[M-43]^+$ (perte d'un fragment C_3) (figure 3.2). Les fragments correspondants à la série $[\text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2)_n]^+$ sont également présents, principalement les ions à $m/z = 87, 143$ et 199 (figure 3.2).

Le spectre de masse des esters insaturés est très différent de ceux des esters saturés et varie beaucoup en fonction du nombre des doubles liaisons (figures 3.3 – 3.4). Le spectre de masse des esters méthyliques mono-insaturés (IE, 70eV) montre un pic moléculaire faible accompagné de fragments $[M-32]^+$ (perte de méthanol) et $[M-31]^+$ (perte de méthoxy). On observe également des pics correspondants à $[M-116]^+$ et $[M-43]^+$. Les pics $m/z = 74$ et 87 sont présents, mais à plus faible intensité. Le pic de base pour les esters mono-insaturés est à $m/z = 55$, alors que pour les esters di-insaturés il est à $m/z = 67$ (figures 3.3 – 3.4).

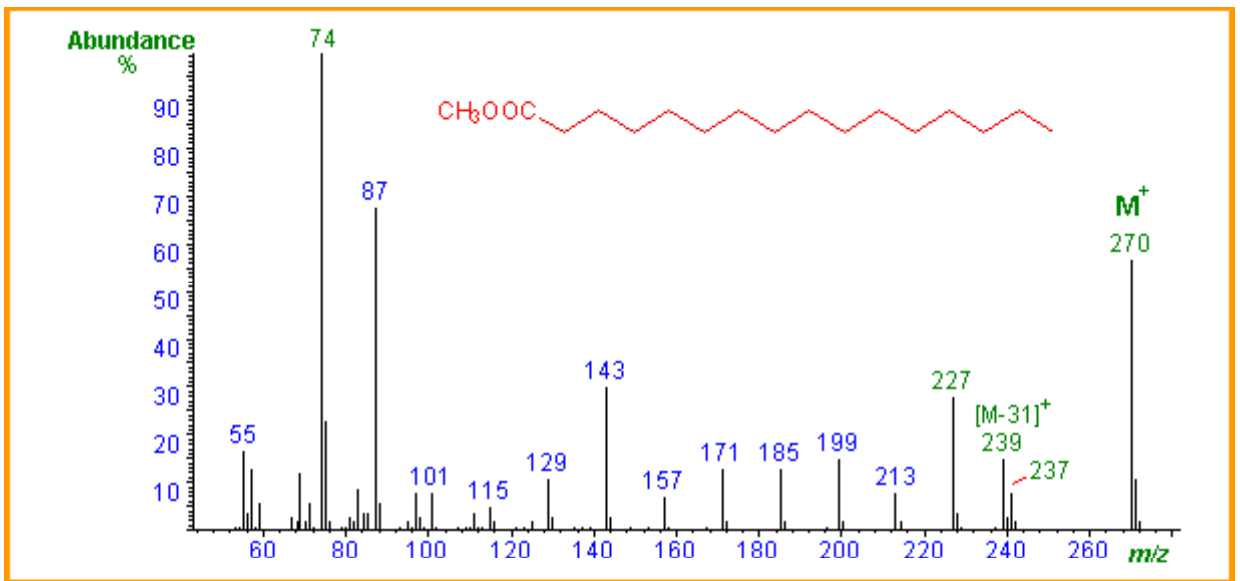


Figure 3.2 : Spectre de masse des EMAG saturés : Acide palmitique

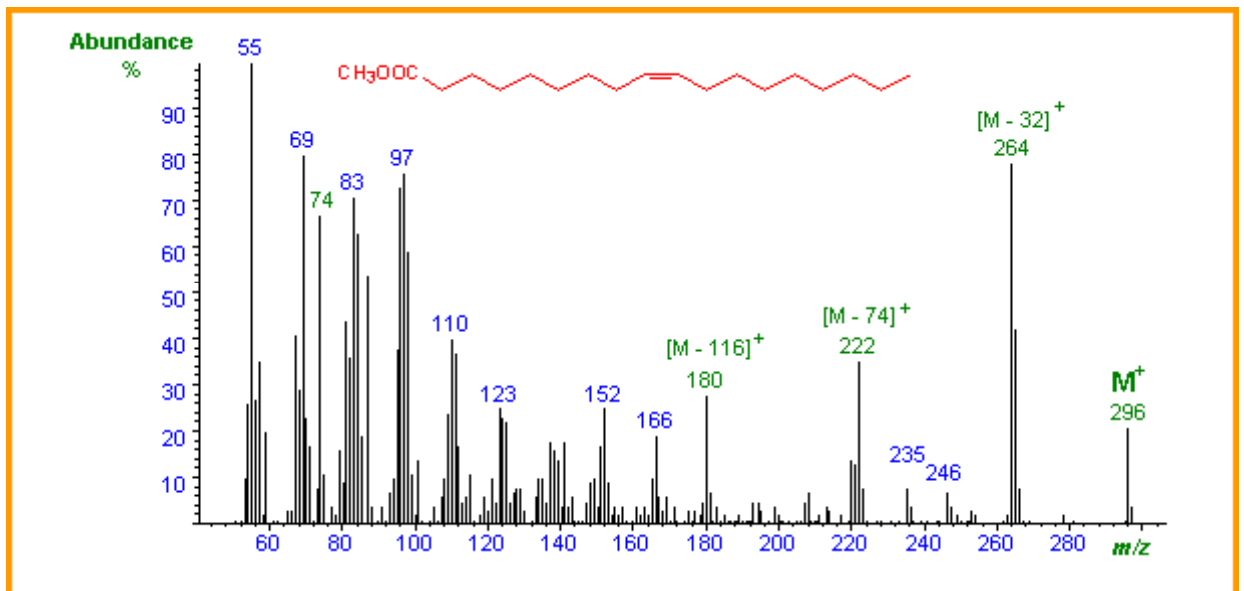


Figure 3.3 : Spectre de masse des EMAG mono-insaturés : Acide oléique

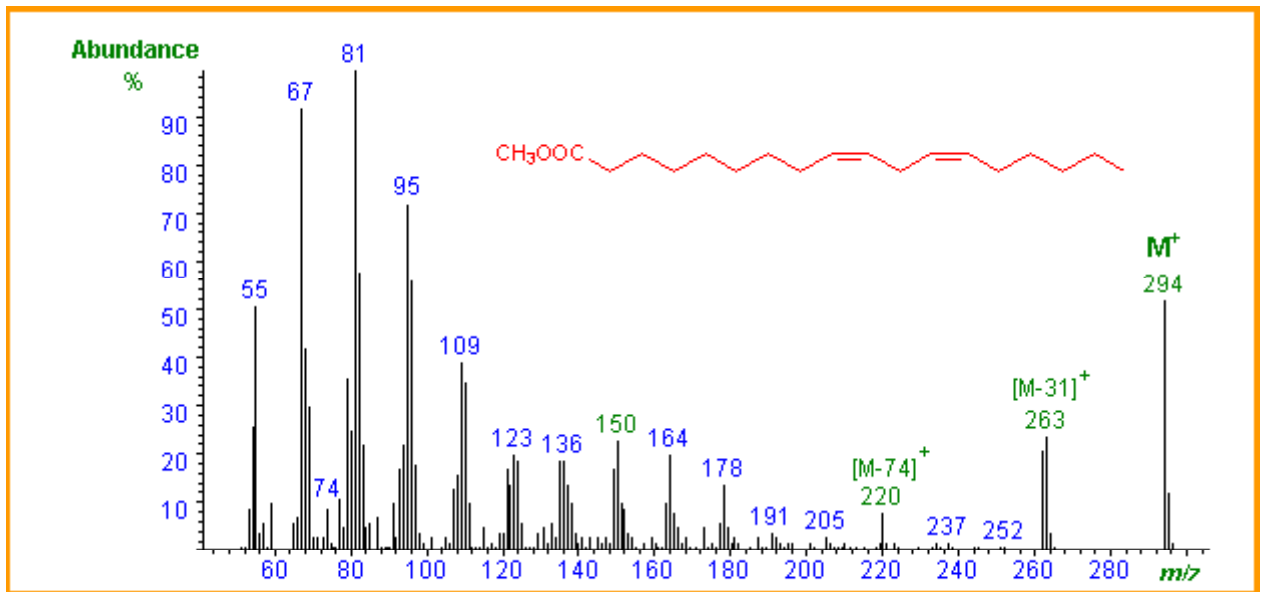


Figure 3.4 : Spectre de masse des EMAG polyinsaturés : Acide lionoléique

3.3. Résultats

A partir du chromatogramme des EMAG de l'huile de fruit (figure 3.5) et des valeurs des LCE, ainsi que des spectres de masse de chaque composé séparé, nous avons obtenu les résultats consignés dans le tableau 3.1. Nous observons que l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas contient cinq acides gras habituellement rencontrés dans les huiles végétales, en l'occurrence l'acide palmitique, l'acide palmitéolique, l'acide stéarique, l'acide oléique et l'acide linoléique. Cette huile est caractérisée par sa richesse en acides gras mono et di-insaturés. Elle est de type oléique-linoléique. Les acides gras insaturés y représentent 73% des acides gras totaux. On note aussi une valeur élevée du taux des acides gras saturés et en particulier l'acide palmitique (24%). Si l'on compare ces valeurs à celles des huiles d'autres espèces qui appartiennent à la même famille botanique, comme le *Pistacia lentiscus* d'origine française, ou le *Pistacia térébenthine* en Turquie, ou bien le *Pistacia chinensis* de l'Australie ou encore le *Pistacia atlantica* de l'Iran, on remarque que les proportions en acides gras majoritaires sont très proches [49,18].

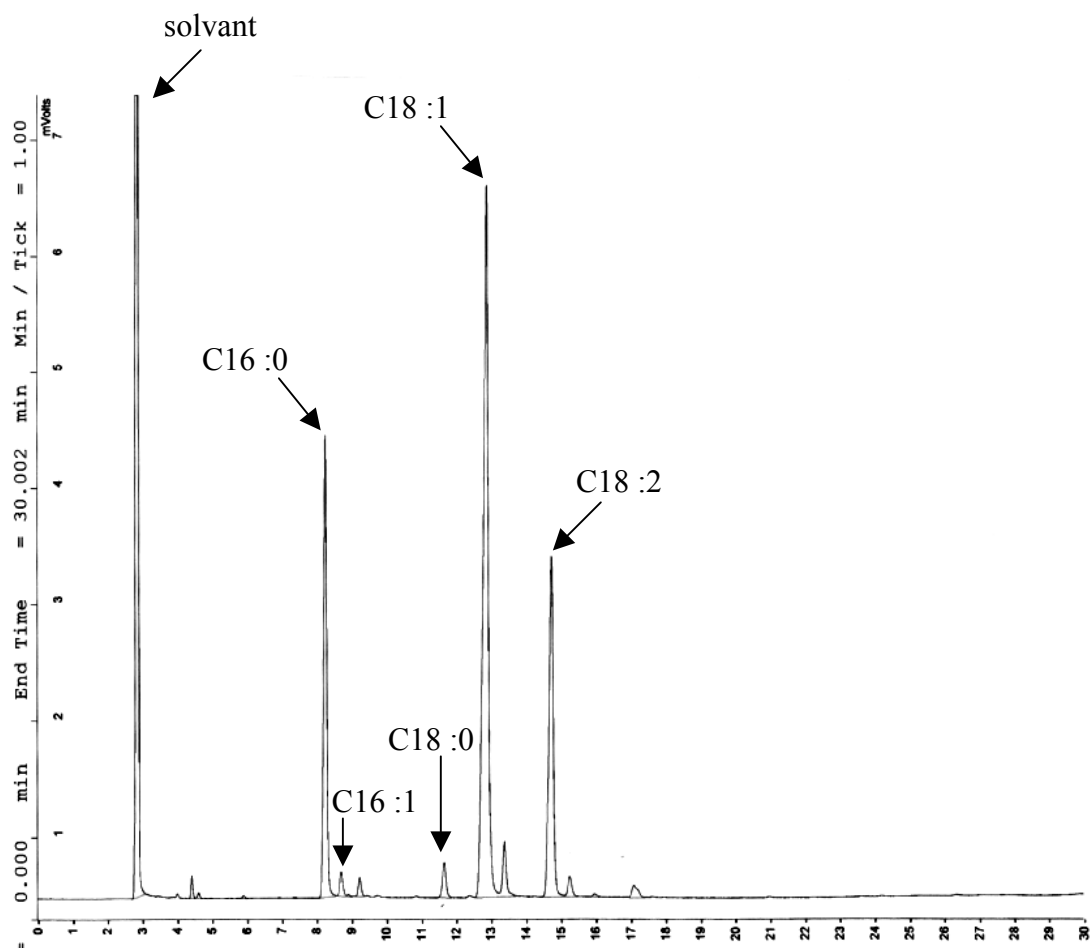


Figure 3.5 : Chromatogramme des EMAG de l'huile de fruit du Pistachier de l'Atlas

Tableau 3.1 : Composition en acides gras de l'huile de fruit du Pistachier de l'Atlas

Acides gras		Taux (%)
Palmitique	C16 :0	24,00
Palmitéolique	C16 :1	01,00
Stéarique	C18 :0	01,75
Oléique	C18 :1	46,00
Linoléique	C18 :2	27,25
Total AGS		25,75
Total AGI		74,25

3.4. Etude des acides gras libres

La valeur élevée de l'indice d'acide de l'huile de fruit nous a ramené à isoler les acides gras libres par leur fixation sur résine, puis à en déterminer la composition par chromatographie en phase gazeuse. Pour ce faire, une quantité de l'huile bien connue est solubilisée dans de l'éther, après l'ajout de 5g de résine Amberlite A-26 déjà préparée. Le mélange est recouvert par un papier d'aluminium et est agité pendant 1 heure. Après filtration, la résine est lavée par de l'éther et du méthanol. Après séchage de la résine sous courant continu d'azote, celle-ci est introduite dans un flacon à sertir, on ajoute 2 ml d'une solution méthanolique de trifluorure de bore à 10%. L'analyse des esters méthyliques des acides gras libres a été faite de la même manière que celle des acides gras totaux. Le tableau 3.2 regroupe les résultats obtenus.

Tableau 3.2 : Composition en acides gras libres et liés de l'huile de fruit du Pistachier de l'Atlas

Acides gras	% en acides gras libres AGL	% en acides gras totaux
C16 :0	32,40	24,00
C16 :1	01,26	01,00
C18 :0	02,24	01,75
C18 :1	40,35	46,00
C18 :2	23,75	27,25
Total AGS	34,64	25,75
Total AGI	65,36	74,25

La composition en acides gras des deux fractions libres et totaux est caractérisée par une proportion élevée en acides gras saturés (65,36% pour la fraction acides gras libres et 74,25% pour les acides totaux). L'acide oléique est le plus important suivi de l'acide linoléique. Parmi les acides gras insaturés, on enregistre la présence de l'acide palmitique à une proportion assez élevée (32,40% dans la fraction acides gras libres et 24% pour les

acides totaux), ainsi que la présence de l'acide stéarique mais avec des proportions faibles (2,24% pour les acides libres et 1,75% pour les acides totaux).

Si l'on compare la nature et la composition en acides gras libres à celles des acides gras totaux, on note une identité au point de vue qualitatif, par contre les acides gras saturés, en particulier l'acide palmitique, sont en proportions plus importantes dans la fraction des acides gras libres et ceci au détriment des acides oléique et linoléique.

3.5. Conclusion

Notre étude sur la composition de l'huile du fruit du Pistachier de l'Atlas en acides gras vient en complément des travaux déjà consacrés sur les huiles d'autres espèces de la même famille [18,49]. Les résultats obtenus montrent que l'huile du fruit du Pistachier de l'Atlas contient un taux très important d'acides gras insaturés (oléique et linoléique). Nous pouvons donc conclure que cette huile végétale a une valeur diététique due à sa forte teneur en ces deux acides gras essentiels, comme dans le cas des huiles de tournesol, de soja et de maïs.

Nous avons étudié et quantifier la nature des acides gras libres de l'huile de fruit. La nature des acides gras libres (AGL) est la même que celles des acides gras totaux, cependant, la teneur en acides gras saturés est plus importante dans la fraction AGL en défaveur de l'acide oléique. Ceci explique la raison pour laquelle l'huile est particulièrement solide à température ambiante. Ce critère a été déjà remarqué lors de la détermination de l'indice d'iode, et confirmé ensuite par l'étude de la composition de l'huile en acides gras par CPG.

Suivant les résultats obtenus, nous pouvons classer l'huile du fruit du Pistachier de l'Atlas parmi les huiles végétales alimentaires de type «oléo-linoléique».

CHAPITRE 4

ETUDE DES TRIACYLGLYCEROLS

Après avoir déterminé la composition en acides gras de l'huile du fruit du Pistachier de l'Atlas, nous allons maintenant étudier les différentes combinaisons possibles de ces acides sur la molécule de glycérol, en rappelant tout d'abord quelques définitions relatives aux triacylglycérols.

4.1. Introduction

Les triacylglycérols (TAG), appelés aussi «graisses neutres», sont les constituants les plus abondants d'une huile végétale, ce sont des esters du glycérol avec trois molécules d'acides gras. Selon l'identité des trois acides gras qui estérifient le glycérol, on obtient différents types de TAG :

- les triacylglycérols simples, où les fonctions alcool du glycérol sont estérifiées par des AG identiques.
- les triacylglycérols mixtes, où les fonctions alcool du glycérol sont estérifiées par deux ou trois AG différents.

Les multiples combinaisons avec les molécules de glycérol font que les corps gras sont des mélanges très complexes de composés. La manière dont les acides gras sont associés pour former les diverses molécules de triacylglycérols joue un grand rôle quant aux propriétés physiques, à la réactivité chimique et aux comportements physiologiques des corps gras.

La détermination de la structure glycéridique d'un corps gras, en prenant en compte la nature et les proportions de chacun des isomères, nécessite l'identification et la qualification des différents types de glycérides présents. L'isolement de ces derniers les uns des autres permet de préciser la nature et la proportion de chacun des acides gras

occupant chacune des trois positions du glycérol et d'en déduire quels isomères sont présents et quelle est la proportion de chacun d'entre eux.

Afin d'obtenir le maximum de renseignements sur la nature des TAG dans l'huile de Pistachier de l'Atlas, nous étudierons successivement :

- la nature et les proportions des acides gras pris en compte pour l'identification des TAG ;
- la nature et les proportions des acides gras en position Sn-2 du glycérol ;
- la nature et les proportions des TAG différents entre eux par la nature des trois acides gras présents.

La combinaison de ces trois types des résultats expérimentaux nous conduira à une composition en TAG, où ne seront pas distinguées les positions Sn-1 et Sn-3.

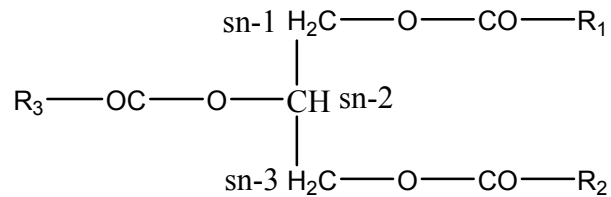
La non équivalence des trois positions du glycérol entraîne l'existence d'isomères de position (lorsque les trois fonctions alcool ne sont pas acylées de la même façon) et d'isomères optiques (lorsque les deux fonctions alcool primaires sont acylées de façon différentes, le carbone médian du glycérol devenant asymétrique).

Une numérotation unifiée des trois positions du glycérol est nécessaire afin de distinguer sans ambiguïté les isomères de position des isomères optiques. Cette numérotation stéréospécifique (Sn) indique que dans la représentation de Fischer de la molécule de glycérol, dans laquelle la fonction alcool secondaire est placée à gauche de la chaîne carbonée, le carbone supérieur est le numéro 1, le carbone médian le numéro 2 et le carbone inférieur le numéro 3.

Le nombre de combinaisons ternaires des divers acides gras ainsi identifié est assez important. Si on désigne par n le nombre total d'acides gras, on peut avoir au maximum :

- N_1 T.A.G, si on considère l'ensembles des TAG et de leurs isomères de positions et optiques (distinction des positions 1 et 3 du glycérols), avec $N_1 = n^3$.

- N_2 TAG, si l'on inclut les isomères de position, mais sans tenir compte des énantiomères (non différenciation des positions 1 et 3), avec $N_2 = \frac{n^3 + n^2}{2}$
- N_3 TAG, différents entre eux uniquement par la nature des AG, avec $N_3 = \frac{n^3 + 3n^2 + 2n}{6}$



Où R_1 , R_2 et R_3 représentent les radicaux des chaînes d'acides gras.

4.2. Méthodes d'analyse des triacylglycérols

En pratique, il n'existe pas une méthode parfaite pour déterminer la composition glycéridique exacte d'une matière grasse, mais on peut la faire en combinant plusieurs méthodes d'analyse. La majorité des méthodes utilisées pour identifier les TAG sont des techniques chromatographiques :

- La chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur colonne capillaire OV₁ : dans ce cas, la séparation se fait en fonction du nombre total d'atomes de carbone [50]. L'inconvénient de cette méthode est que les TAG de même condensation en carbone, ayant des nombres d'insaturation différents, ont le même temps de rétention. En plus, l'opération de l'analyse demande une température très élevée dans le four d'environ 350°C.
- La chromatographie sur couche mince (CCM) de silice imprégnée d'une solution de nitrate d'argent : le fractionnement se fait en fonction du degré d'insaturation des différents TAG [47b], des TAG, ayant le même nombre d'insaturation mais des condensations en carbone différentes, ont le même facteur de rétention R_f .

- La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) colonne en phase inverse de type RP18 : la séparation a lieu en fonction du nombre d'atomes de carbone et du nombre d'insaturation [51,52].
- Les analyses stéréospécifiques : l'analyse stéréospécifique des TAG consiste à déterminer la distribution des différents AG sur les trois positions du glycérol. Si l'estérification des positions 1 et 3 se fait par des AG différents, les TAG résultants sont asymétriques et optiquement actifs. Cependant, l'activité optique de ces stéréoisomères est trop faible pour être détectée. Des méthodes, autres que physiques, de détermination de la configuration des TAG ont été ainsi mises au point.

La détermination des AG, estérifiant la position 2 du glycérol, a été réalisée pour la première fois en 1965 par BROCKERHOFF [53], en effectuant une digestion enzymatique de TAG par la lipase pancréatique de porc qui est une glycérol esterhydrolase spécifique de la position 2. Il existe une autre méthode déterminant les acides gras estérifiant les fonctions alcools primaires du glycérol. Il s'agit de la réaction de Grignard utilisant le bromure d'éthyle magnésium, réactif sans spécificité de chaîne, ni régiosélectivité [54]. Ces deux méthodes ne donnent que la répartition des AG sur les positions 2 et 1,3 du glycérol. Néanmoins, la comparaison des résultats obtenus par hydrolyse enzymatique et hydrolyse chimique permet de mettre en évidence une éventuelle spécificité de chaîne de la lipase vis-à-vis d'un ou plusieurs acides gras.

La méthode de BROCKERHOFF est aussi adoptée pour déterminer les AG en positions Sn-1 et Sn-2 et Sn-3 (figure 4.1). Les 1,2 et 2,3 diacylglycérols (DAG) obtenus après action du bromure d'éthylmagnésium sur les TAG et séparation par CCM, sont transformés en 1- et 3- phosphatidylphénols. Ceux-ci subissent alors une digestion enzymatique par la phospholipase A₂ de venin de serpent, qui n'hydrolyse que les 3-phosphatidylphénols.

La (figure 4.1) regroupe les différentes méthodes d'analyse stéréospécifique des TAG.

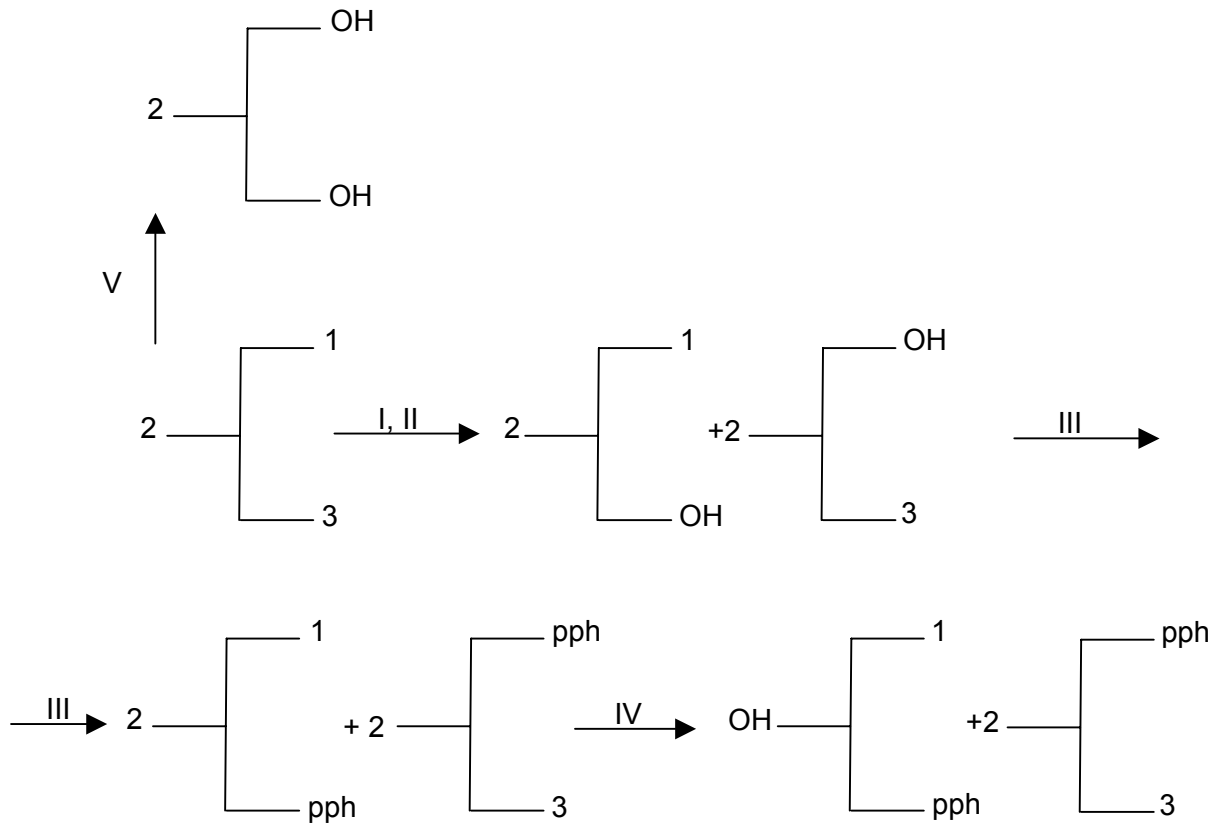


Figure 4.1 : Différentes étapes de la méthode de BROCKERHOFF

I : EtMgBr ; II : C.C.M; III : dichlorophosphate de phényle, pyridine ; IV : phospholipase A₂ ; V : lipase pancréatique du porc

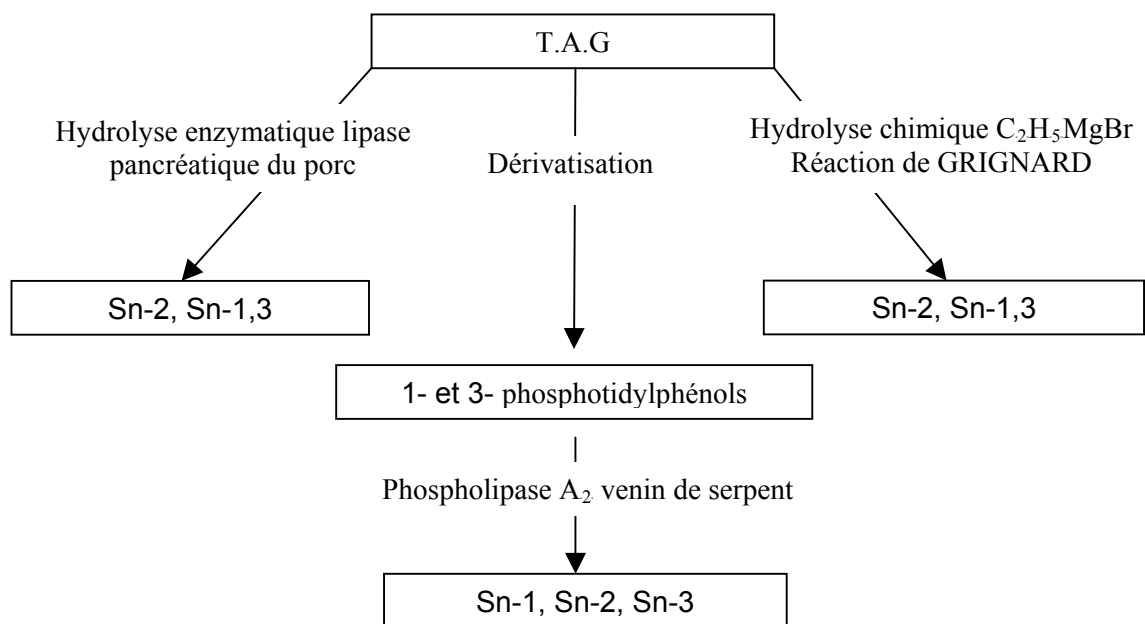


Figure 4.2 : Différentes méthodes d'analyse régiospécifique des TAG

L'ensemble de ces méthodes appliquées à un grand nombre de corps gras d'origine diverse (graisses animales, huiles végétales, laits) ont permis d'énoncer des règles générales de distribution des AG au sein de TAG naturels [47c].

Ainsi, dans les TAG végétaux, les AG saturés estérifient préférentiellement les positions 1 et 3 du glycérol. La position 2 est occupée principalement par les acides gras mono- ou poly-insaturés. Les acides gras particuliers se retrouvent majoritairement en position 3 (figure 4.3-a).

La distribution des AG des TAG des graisses animales diffère des graisses végétales. La position 1 est ainsi occupée par des AG saturés. Les AG courts et insaturés estérifient la position 2. Enfin la position 3 est occupée par les AG longs (figure 4.3-b)..

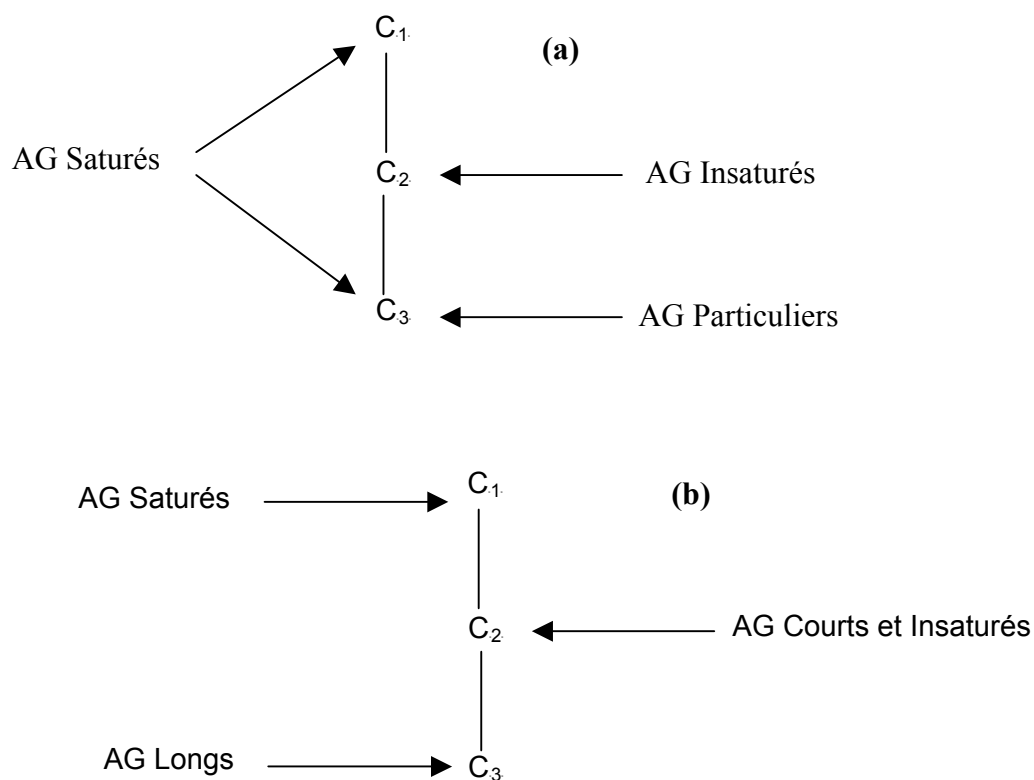


Figure 4.3 : Distribution des AG sur les trois positions du glycérol
(a) – graisse végétale ; (b) – graisse animale

L'étude de la distribution stéréospécifique des AG dans les TAG est intéressante à plusieurs points de vue. La plus grande importance accordée à la détermination des AG en position 2 est due à un intérêt historique. Son analyse a été la première à être développée. Cette analyse est très importante puisque, lors de la digestion chez les mammifères, les 2-monoacylglycérols, ainsi que les AGL correspondants sont absorbés par les muqueuses intestinales après hydrolyse préférentielle des TAG sur les positions Sn-1 et Sn-3 par la lipase pancréatique du porc [55,56].

4.3. Les acides gras des triacylglycérols

4.3.1. Acides gras totaux des TAG

Les TAG sont isolés de l'huile brute par chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice par élution du benzène selon la norme IUPAC 2.231 [44].

Après une estérification en milieu basique, les EMAG correspondants ont été analysés par CPG. Dans le tableau 4.1 nous rapportons les proportions des EMAG des TAG. D'après les données de ce tableau, nous n'observons que très peu de variation de composition entre les AG, des TAG et les AG totaux de l'huile.

Tableau 4.1 : Proportions des EMAG des triacylglycérols contenus dans l'huile de Pistachier de l'Atlas

Acides gras	Huile (%)	TAG (%)
C16:0	24,0	22,5
C16:1	01,0	01,0
C18:0	01,7	01,5
C18:1	46,0	47,5
C18:2	27,2	27,5

Du fait qu'un certain nombre d'AG sont en proportion très faibles (< à 1.0%), lors de la quantification des TAG, nous nous sommes intéressés qu'aux acides gras

majoritaires, les acides oléiques, linoléique, palmitique et stéarique dont les proportions sont supérieures à 1%.

4.3.2. Acides gras en Sn-2 et Sn-3 par hydrolyse enzymatique

Il y a hydrolyse préférentielle des positions 1 et 3 du glycérol par la lipase pancréatique de porc, qui est un glycérol esterhydrolase. Cette spécificité n'est pas absolue, la position 2 pouvant être également hydrolysée mais avec une vitesse beaucoup plus faible.

Afin de diminuer les réactions secondaires, telles que la migration de groupes acyles de la position 2 vers les positions 1 et 3, la durée de la réaction doit être courte (5 à 10 mn). D'après Luddy et al. [57], un taux d'hydrolyse de l'ordre de 50% est préférable. Il faut également nous placer dans les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme. Pour cela, nous ajoutons au milieu réactionnel du chlorure de calcium CaCl_2 , les ions Ca^{++} étant cofacteur de cette enzyme, ainsi que du cholate de sodium, l'acide cholique jouant le rôle d'émulsifiant. Cette réaction s'effectue en milieu tamponné de phosphate à $\text{pH} = 8$, et à une température de 37°C (température optimale de la lipase).

Les divers produits obtenus par cette hydrolyse sont : les monoacylglycérols (MAG), les diacylglycérols (DAG), les acides gras libres (AGL) et les triacylglycérols résiduels (TAG).

Après fractionnement des différentes classes par CCM ou colonne ouverte [58,59], celles-ci subissent une estérification afin d'obtenir les EMAG correspondants qui sont ensuite analysés par CPG. La composition en AG de la position 2 du glycérol est directement donnée par la composition en AG des TAG.

La composition en AG de position 1 et 3 du glycérol est calculée par la relation suivante [47] :

$$[Sn-1,3] \% = \frac{3 [T.A.G] \% - [Sn-2] \%}{2}$$

Le tableau 4.2 résume les résultats obtenus sur l'huile du fruit du Pistachier de l'Atlas.

Tableau 4.2 : Principaux acides gras en position Sn-2 des TAG

Acides gras	T.A.G totaux	Position-2	Position- 1,3
C16 :0	22,5	07,7	29,9
C16 :1	01,0	-	01,5
C18 :0	01,2	-	01,8
C18 :1	46,0	57,7	40,1
C18 :2	27,0	34,6	23,2

La digestion enzymatique des TAG de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas par la lipase pancréatique de porc nous montre que les acides oléique et linoléique représentent respectivement environ 58% et 35% des acides gras en position interne. L'acide stéarique occupe cette position en très faible proportion (<1%) et l'acide palmitique dans une proportion d'environ 8%. On remarque également que les acides palmitique, oléique et linoléique sont aussi répartis sur les positions externes (1+3) avec des teneurs 30%, 40% et 23% respectivement. En revanche, la position Sn-2 est très largement occupée par les acides gras insaturés C18 (oléique+linoléique) avec un taux de 92.3% des acides gras totaux du TAG de l'huile.

L'ensemble de ces résultats confirme bien les règles de distributions stéréospécifiques des acides gras sur la molécule de glycérol. En effet, les acides gras insaturés occupent préférentiellement la position Sn-2 du glycérol, fait qui avait déjà été énoncé par plusieurs auteurs [47,57,60-69].

4.3.3. Détermination des TAG à partir des acides gras en position 2

Si l'on considère que les acides gras estérifient la molécule de glycérol en suivant une loi de distribution de position des acides gras dans les triacylglycérols établie par plusieurs auteurs [60-62, 70-72], il nous est alors possible, en utilisant les résultats de la

digestion de la lipase pancréatique des triacylglycérols, de quantifier les isomères de position des différents TAG.

Soit ABC, un TAG, mixte. Six isomères différents de positions existent (figure 4.4).

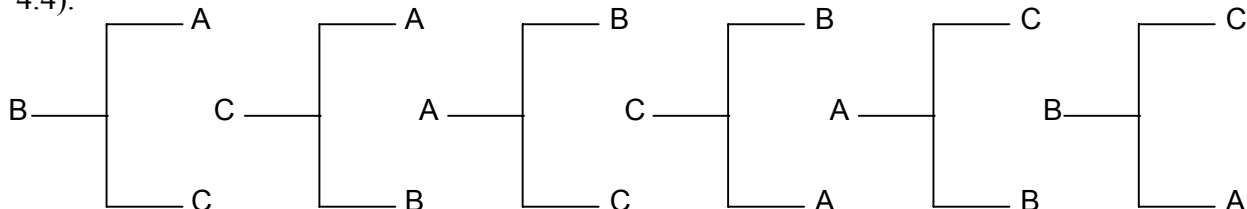


Figure 4.4 : Différents isomères de position d'un TAG ABC

On a déjà vu que la digestion des TAG par la lipase pancréatique donne uniquement les pourcentages des acides gras en Sn-2 et en Sn-1,3. Les positions Sn-1 et Sn-3 ne sont pas différenciées. Donc, seuls trois types de TAG peuvent être quantifiés. Ils seront notés A(BC), B(AC), C(AB). Les AG entre parenthèses estérifient les positions Sn-1 et Sn-3.

Pour déterminer la composition des TAG, nous avons adopté la méthode de Coleman [71,72]. Si x est le pourcentage d'un acide gras dans le triacylglycérol et y le pourcentage de cet acide gras en position 2 dans le triacylglycérol, alors le quotient $\frac{3x-y}{2}$ représente le pourcentage de l'acide en position 1+3. De la même manière, on peut calculer le pourcentage de tous les acides gras de l'huile de Pistachier de l'Atlas dans les trois positions 2 et 1+3. Le tableau 4.3 regroupe ces valeurs.

Tableau 4.3 : Taux des différents AG dans les positions 2 et 1+3

Acide gras	P	P ₀	S	O	L	Ln
x	24.70	1.48	1.27	48.44	22.90	0.93
3x	74.10	4.44	3.81	145.32	68.70	2.80
y	7.70			57.70	34.60	
$\frac{3x-y}{2}$	33.20	2.22	1.90	43.81	17.05	1.4

P : palmitique ; P₀ : palmitéolique ; S : stéarique ; O : oléique ; L : linoléique ; Ln : linolénique

Le pourcentage de chaque triacylglycérol est calculé par la méthode détaillée dans le tableau 4.4. Dans ce tableau, nous donnons un exemple simple pour le calcul des pourcentages des TAG où l'acide oléique occupe la position 2.

Tableau 4.4 : Exemple de calcul des taux des différents TAG

Mono TAG	%	DAG	%	TAG	%
-O-	57.70	$PO - 57.70 \frac{33.20}{100}$	19.15	$POP \ 19.15 \frac{33.20}{100}$	6.36
				$POP_0 \ 19.15 \frac{2.22}{100}$	0.425
				$POS \ 19.15 \frac{1.90}{100}$	0.364
				$POO \ 19.15 \frac{43.81}{100}$	8.39
				$POLL \ 19.15 \frac{17.08}{100}$	3.27
				$POLn \ 19.15 \frac{1.40}{100}$	0.268

En suivant le même calcul, nous obtenons un nombre des différents isomères de TAG égal à 108.

Nous avons aussi calculé les taux des différents isomères des TAG par une méthode statistique décrite dans la littérature.

Si l'on considère que les acides gras sont distribués au hasard sur les trois positions de la molécule de glycérol, la proportion statistique de chacun des TAG est calculée de la façon suivante :

$$AAA \% = a^3 \cdot 10^{-4}$$

$$AAB \% = 3 a^2 \cdot b \cdot 10^{-4}$$

$$ABC \% = 6 a \cdot b \cdot c \cdot 10^{-4}$$

où a , b et c représentent les pourcentages respectifs des acides gras A , B et C dans TAG déterminés par CPG.

Ces dernières formules ne tiennent pas compte de la distribution réelle des AG sur la molécule de glycérol. En réalité, et d'après les résultats obtenus lors de l'hydrolyse enzymatique des TAG, les positions 1 et 3 du glycérol sont estérifiées préférentiellement par les acides gras saturés et la position 2 est occupée préférentiellement par les AG insaturés. En tenant compte de ces résultats, nous avons préféré d'adopter la méthode dite '*distribution «2-random-1, 3random»*', où les proportions des différents isomères de TAG sont calculées par les relations suivantes :

$$AAA\% = a_{1,3}^2 \cdot a_2 \cdot 10^{-4}$$

$$AAB\% = \left[2(a_{1,3} \cdot a_2 \cdot b_{1,3}) + (a_{1,3}^2 \cdot b_2) \right] \cdot 10^{-4}$$

$$ABC\% = \left[2(a_{1,3} \cdot b_2 \cdot c_{1,3}) + 2(c_{1,3} \cdot a_2 \cdot b_{1,3}) + 2(a_{1,3} \cdot c_2 \cdot b_{1,3}) \right] \cdot 10^{-4}$$

où $a_{1,3}$, $b_{1,3}$ et $c_{1,3}$ représentent les pourcentages respectifs des acides gras A , B et C en position 1 et 3, et a_2 , b_2 et c_2 représentent les pourcentages respectifs des acides gras B et C en position 2.

4.4. Analyse des triacylglycérols par CLHP

L'analyse des TAG par chromatographie liquide à haute performance fait intervenir plusieurs paramètres dont les principaux sont :

- Le nombre de partition (NP) : Il s'agit du nombre total d'atomes de carbone du triacylglycérol, excepté ceux du glycérol (NC) diminué de deux fois le nombre d'insaturations existant dans les chaînes d'A.G (NI) [51,73-75], soit :

$$NP = NC - 2 \cdot NI$$

Le nombre NP caractérise l'ordre d'élution des TAG dans une colonne à phase inverse. L'utilisation de ce seul paramètre ne donne cependant qu'un classement assez sommaire des TAG présents, car différentes molécules peuvent avoir le même NP . Précisons néanmoins que, pour un même nombre de partition, les TAG sont

élués par ordre décroissant du nombre de leurs doubles liaisons (NI). L'utilisation de coefficients correcteurs introduits par l'I.U.P.A.C [75] précisent les valeurs de NP . Ces coefficients ont été déterminés pour les acides oléique, linoléique et linoléique. Le NP devient alors le nombre de carbone équivalent (NCE) avec :

$$NCE = NC - (2.60.n_1) - (2.35.n_2) - (2.17.n_3)$$

où n_1 , n_2 et n_3 représentent le nombre d'insaturation respectivement des acides oléique, linoléique et linoléique.

- Le temps de rétention relatif (TRR) : Ce paramètre complémentaire du NP est déterminé selon la méthode de Goiffon et al. [51,52], on considère :

$$\log TRR(A) = \frac{1}{3} \log TRR(AAA)$$

$$\log TRR(B) = \frac{1}{3} \log TRR(BBB)$$

$$\log TRR(C) = \frac{1}{3} \log TRR(CCC)$$

où A , B et C sont les acides gras constitutifs des TAG. On en déduit que :

$$\log TRR(ABC) = \log TRR(A) + \log TRR(B) + \log TRR(C)$$

Il est possible de calculer les TRR théoriques des différents TAG susceptibles d'être présents dans les corps gras étudiés à partir des témoins appropriés.

- Les proportions expérimentales des TAG : La détection des TAG se faisant par réfractomètre différentielle. Il est nécessaire dans la mesure du possible de corriger les résultats expérimentaux par un coefficient de réponse K_i . PERRIN et NAUDET [74] ont proposé le calcul approché suivant :

$$K_i = \frac{n_{ooo} - n_s}{n_i - n_s}$$

où n_{ooo} est l'indice de réfraction de la trioléine (OOO) ; n_i est l'indice de réfraction du TAG considéré ; n_s est l'indice de réfraction du solvant d'éluion ; $n_i = 1.3542$ pour un mélange d'acétonitrile et acétone (75 : 25 : V/V).

Les indices de réfraction des T.A.G homogènes étant donnés dans la littérature [52], on peut alors facilement calculer le K_i de n'importe quel TA. G mixte selon la relation suivante :

$$n_i = n_{ABC} = \frac{1}{3}(n_{AAA} + n_{BBB} + n_{CCC})$$

sachant que $n(\text{LnLnLn}) = 1.4879$, $n(\text{LLL}) = 1.4750$, $n(\text{OOO}) = 1.4656$ et $n(\text{PPP}) = 1.4750$, $n(\text{SSS}) = 1.4601$, où LnLnLn est le trilinoléine, PPP est le tripalmitine, SSS est le tristéarine.

Les conditions optimales de séparation ont été obtenues avec une phase mobile composée d'un mélange d'acétonitrile/acétone (75 :25 : V/V) au débit de 1 ml/mn (figure 4.5).

Dans un souci de clarté et pour ne pas faire intervenir dans nos calculs des TAG dont les proportions sont inférieure à 0,5%, seuls les AG dont la proportion est supérieure à 3% ont été pris en considération.

A partir des temps de rétention connus d'échantillons authentiques de TAG homogènes (PPP, SSS, OOO, LLL, LnLnLn), nous avons déterminé les logarithmes des temps de rétention des acides gras pris en compte. Nous avons ensuite calculé les temps de rétention théoriques des dix TAG détectés.

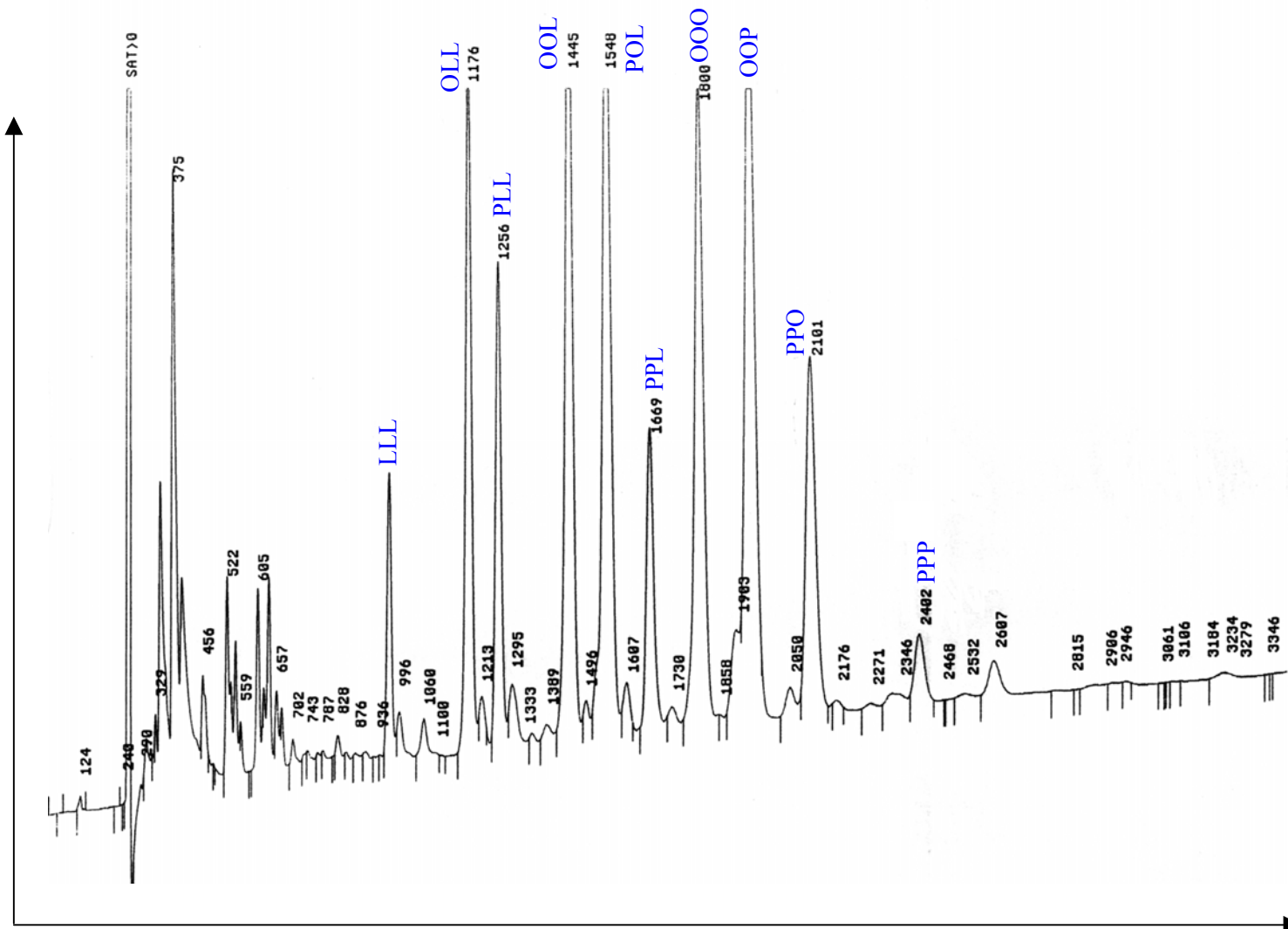


Figure 4.5 : Chromatogramme CLHP des T.A.G de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas

4.5. Résultats des différentes analyses

En utilisant toutes les méthodes de détermination des TAG déjà présentées avant, nous avons pu calculer les proportions probables des divers isomères de position en tenant compte des concentrations mesurées pour les acides gras en position 2. Le tableau 4.5 regroupe les diverses espèces moléculaires de TAG ayant une teneur supérieure à 0,5%.

Tableau 4.5 : Répartition des acides gras dans les triacylglycérols de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas

TAG	% CLHP	TAG Hydrolyse enzymatique	%	Statistique	1-random 2-random 3-random
LLL	02,60	L(LL)	02,50	01,20	01,00
LLO	08,41	L(LO)	09,24	07,62	06,85
LLP	06,12	O(LL)	01,68	02,60	04,14
		L(LP)	03,92		
LOO	16,50	P(LL)	00,22	10,74	15,26
		L(OO)	06,64		
LPO	17,01	O(LO)	08,63	16,44	17,74
		L(PO)	10,06		
		P(LO)	01,15		
LPP	05,07	O(LP)	06,54	02,80	04,68
		P(PL)	00,88		
OOO	12,40	L(PP)	03,82	11,36	11,07
		OOO	11,07		
OOP	16,70	O(OP)	16,80	17,40	18,26
		P(OO)	01,48		
PPO	08,00	P(PO)	02,24	08,86	08,59
		O(PP)	06,36		
PPP	01,50	PPP	00,85	01,50	00,85
Autres	--	--	--	--	--

Dans l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas étudiée, nous retrouvons systématiquement de façon majoritaire les TAG suivants : POO, PLO, OOL, OOO, LLO, PPO (figure 4.6). Il est très remarquable que l'huile est riche en TAG formés par la combinaison des acides gras oléique, linoléique et palmitique, acides que l'on retrouve couramment dans la composition des huiles végétales [54,76]. La position Sn-2 est estérifiée principalement par les acides oléique et linoléique, acides que l'on retrouve en position Sn-2 des espèces moléculaires majoritaires des triacylglycérols.

Les TAG de l'huile de Pistachier de l'Atlas sont largement représentés par des espèces moléculaires possédant l'acide oléique [OOO, O(LO), O(OP), (OPP)], ainsi que l'acide linoléique [L(OO), L(LO), L(PO)] en position Sn-2. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés dans la littérature sur des huiles de soja, de maïs, d'olive, d'arachide et d'arganier [76].

Il est important de noter que les valeurs des taux des TAG qui contiennent deux chaînes oléines et une chaîne linoléine (O, O, L) et qui sont calculées par les deux méthodes (statistiques : '*1-random, 3-random*' et expérimentale : la digestion enzymatique) sont en accord avec les valeurs expérimentales mesurées par CLHP. La même remarque est faite sur les triacylglycérols de type (P, O, L) et (P, P, O). Par contre, nous notons une légère différence entre ces proportions pour les TAG de type (L, L, L), (O, O, O) et (L, L, P). Une différence importante est à noter entre les proportions statistiques et expérimentales pour les espèces moléculaires de type (L, L, O), (L, O, O) et (L, P, P).

L'analyse par CLHP et le calcul à partir des résultats de la digestion enzymatique confirme que l'huile de Pistachier de l'Atlas contient une quantité minimale des triacylglycérols trisaturé (PPP), espèce moléculaire absente dans la majorité des huiles végétales.

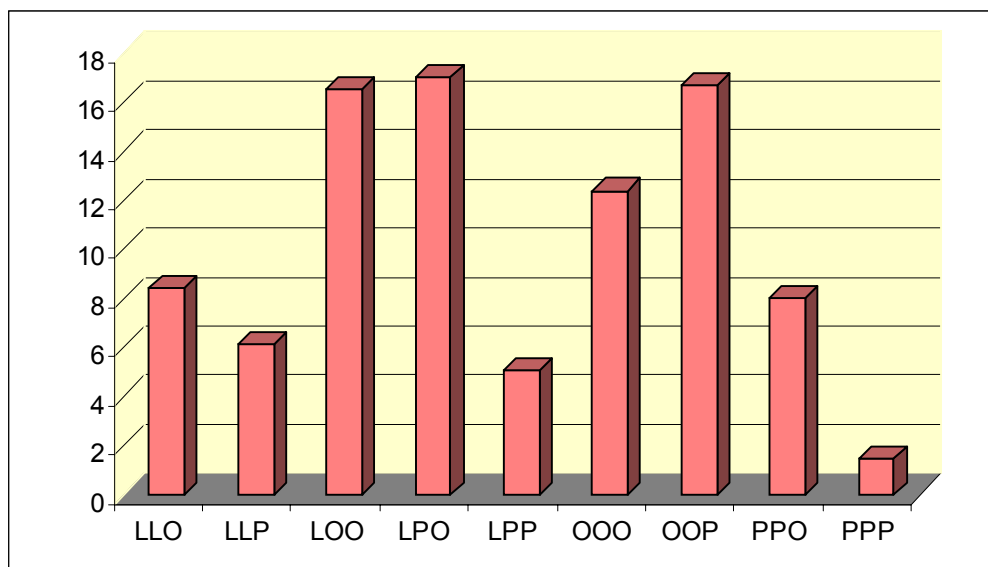


Figure 4.6 : Pourcentages des T.A.G déterminés par CLHP

4.6. Conclusion

Grâce à l'utilisation conjointe de la digestion enzymatique par la lipase pancréatique de porc et de la CLHP, nous avons pu réaliser une étude complète des triacylglycérols de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas, étude non encore entreprise à notre connaissance.

Dans un premier temps, la composition des TAG de l'huile de Pistachier de l'Atlas en acides gras montre que les acides gras insaturés (oléique et linoléique) représente environ 73% des acides totaux, marge que l'on retrouve dans toutes les huiles alimentaires d'origine végétale. Il faut noter aussi que cette étude nous a permis de noter que la teneur en acide linoléique (22%) est plus élevée que celle trouvée pour l'huile d'olive (10%). Les résultats de la digestion enzymatique par la lipase de porc montre que la distribution des A.G dans les T.A.G suit les règles de positions énoncées par plusieurs auteurs [47,57,60-69]. La position Sn-2 est préférentiellement occupée par les acides gras insaturés C18 (oléique et linoléique), résultats déjà publiés pour plusieurs huiles d'origines végétales [63,64]. De même, les isomères des TAG majoritaires sont ceux possédant l'acide oléique en position Sn-2. Suite aux résultats de l'analyse des TAG par CLHP, les proportions des différentes classes de triacylglycérols, tri-insaturés (GU_3), mono-saturés (GSU_2) et di-saturés (GS_2U) sont respectivement 39,9%, 39,8% et 13,0%. Ces valeurs sont en bon accord avec celles calculées en utilisant les résultats de la digestion enzymatique par la lipase de porc.

CHAPITRE 5

ETUDE DE LA FRACTION INSAPONIFIABLE

5.1. Introduction

La fraction insaponifiable ou partie non glycéridique est l'ensemble des constituants d'une huile ou d'une graisse qui, après action d'un hydroxyde alcalin (saponification), sont solubles dans les solvants classiques des lipides (solvants apolaires ou peu polaires) [21,22].

L'étude de cette fraction insaponifiable est complexe du fait de la diversité de ses constituants d'une part, et de la faible quantité de matériel de départ disponible d'autre part. En effet, contrairement aux graisses animales, le taux de l'insaponifiable des huiles végétales est relativement faible (0,2 à 2,0%) en masse [49]. Le beurre de carité constituant une exception avec une teneur d'environ 10% [21]. Les différentes classes de composés pouvant être présentes dans un insaponifiable sont les suivantes :

- des hydrocarbures, notamment les hydrocarbures terpéniques en C30 et C40 (carotènes), ces derniers étant caractérisés par des systèmes polyéthyléniques conjugués ;
- des xanthophylles qui dérivent des précédents par oxydation (caroténoïdes) contenant une ou plusieurs fonctions oxygénées ;
- des alcools aliphatiques supérieurs (alcools gras de 16 à 30 atomes de carbone) qui, lorsqu'ils sont estérifiés, forment des cires de protection de certains tissus ;
- des aldéhydes et des cétones responsables des saveurs ;
- des vitamines liposolubles (vitamines A, D, E). La vitamine E et les composés voisins sont désignés globalement par les termes de tocophérols et tocotriénols. Elles sont observées de façon systématique dans les lipides d'origine naturelle ou avant la

saponification. Elles sont également présentes sous forme libres et sous forme d'esters d'acides gras ;

- des composés triterpéniques provenant de la cyclisation du 2,3-époxyqualène. Cette classe de composés regroupe les alcools triterpéniques, les 4 α -méthylstérols, les stérols et les dérivées polyfonctionnels de ces composés ;
- des cétones triterpéniques rarement rencontrées dans le règne végétal ;
- Les stérols, les 4 α -méthylstérols et les alcools triterpéniques, par leur nature et leurs propriétés, constituent une véritable empreinte digitale de l'huile. Ils permettent son identification et par la suite sa détection dans un mélange, d'où l'intérêt en cas de fraudes éventuelles ;

Par ailleurs, ces composés présentent un intérêt chimiotaxonomique important. Les plantes d'une même famille botanique présentent le plus souvent des filières triterpéniques voisines. Après saponification de l'huile, l'insaponifiable est extrait par l'oxyde d'éthyle. L'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas que nous avons étudié contient une teneur de 1,72% (m/m) d'insaponifiable. Cette valeur indique que l'insaponifiable est une fraction mineure des huiles. On remarque que la teneur en insaponifiable de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas est comparable à d'autres huiles végétales (tableau 5.1).

Tableau 5.1 : Teneur en insaponifiable de quelques huiles végétales

Huile	% en insaponifiable
Tournesol	0,5 – 1,5
Colza	0,7 – 1,8
Soja	0,5 – 1,6
Maïs	0,8 – 2,0
Pépins de raisin	0,8 – 1,5
Carthame	1,0 – 1,5
Sésame	0,5 – 1,5
Oeillette	0,5 – 1,3
Lin	0,3 – 1,2
Amande	0,3 – 1,2
Noisette	0,5 – 0,7
Noix	0,5 – 1,0
Pépin de cassis	1,0 – 1,2
Citrouille	1,2
Courge	2,1
Melon	1,0
Germe de blé	3,0 – 4,0
Arachide Afrique	0,6- 1 0
Arachide Amérique du sud	0,6 – 0,9
Coton	0,6 – 1,5
Coprah	0,6 – 1,5
Palmiste	0,3 – 0,8
Beurre de cacao	0,3 – 0,5
Karité	7,0 – 10,0
Olive vierge	0,4 – 0,8
Palme	0,5 – 1,2
Avocat	1 – 12,0

5.2. Fractionnement de l'insaponifiable

Plusieurs méthodes et techniques sont utilisées pour fractionner l'insaponifiable dont :

- la chromatographie sur couche mince de silice (CCM) : elle permet de repérer les diverses classes de constituants, par comparaison avec des étalons commerciaux (tocophérol, lanostérol, cholestérol) [77].
- la chromatographie préparative sur colonne ouverte d'alumine hydratée à 5% [77,78] : l'éluant employé est un mélange hexane/éther de polarité croissante, cette méthode demande pour travailler une quantité de l'ordre de 1g.
- la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) sur colonne de silice : elle permet aussi de doser les composés triterpéniques [79,80]. L'éluant employé est un mélange hexane/alcool isopropylique (98,5 : 1,5 V/V). On peut en particulier fractionner les Δ_5 et Δ_7 stérols dont les temps de rétentions relatifs par rapport au cholestérol sont 1,0 et 1,1. Cette méthode présente l'avantage, par rapport à la CCM, d'un dosage quantitatif de chacune des deux classes de stérols.

Dans notre cas, l'insaponifiable de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas a été fractionné selon la technique CCM sur silice avec comme éluant un mélange hexane/éther (7 : 3 V/V). On réalise deux migrations successives. Cette analyse montre que l'insaponifiable de l'huile étudiée possède une forte intensité relative pour les spots correspondants au Δ_5 stérols ($R_f = 0,37$), aux tocophérols ($R_f = 0,58$) aux hydrocarbures ($R_f = 0,70$), et de façon moindre aux alcools triterpéniques ($R_f = 0,51$) et aux 4α -méthylstérols ($R_f = 0,45$). Nous observons aussi des traces de Δ_7 stérols ($R_f = 0,34$) (figure 5.1).

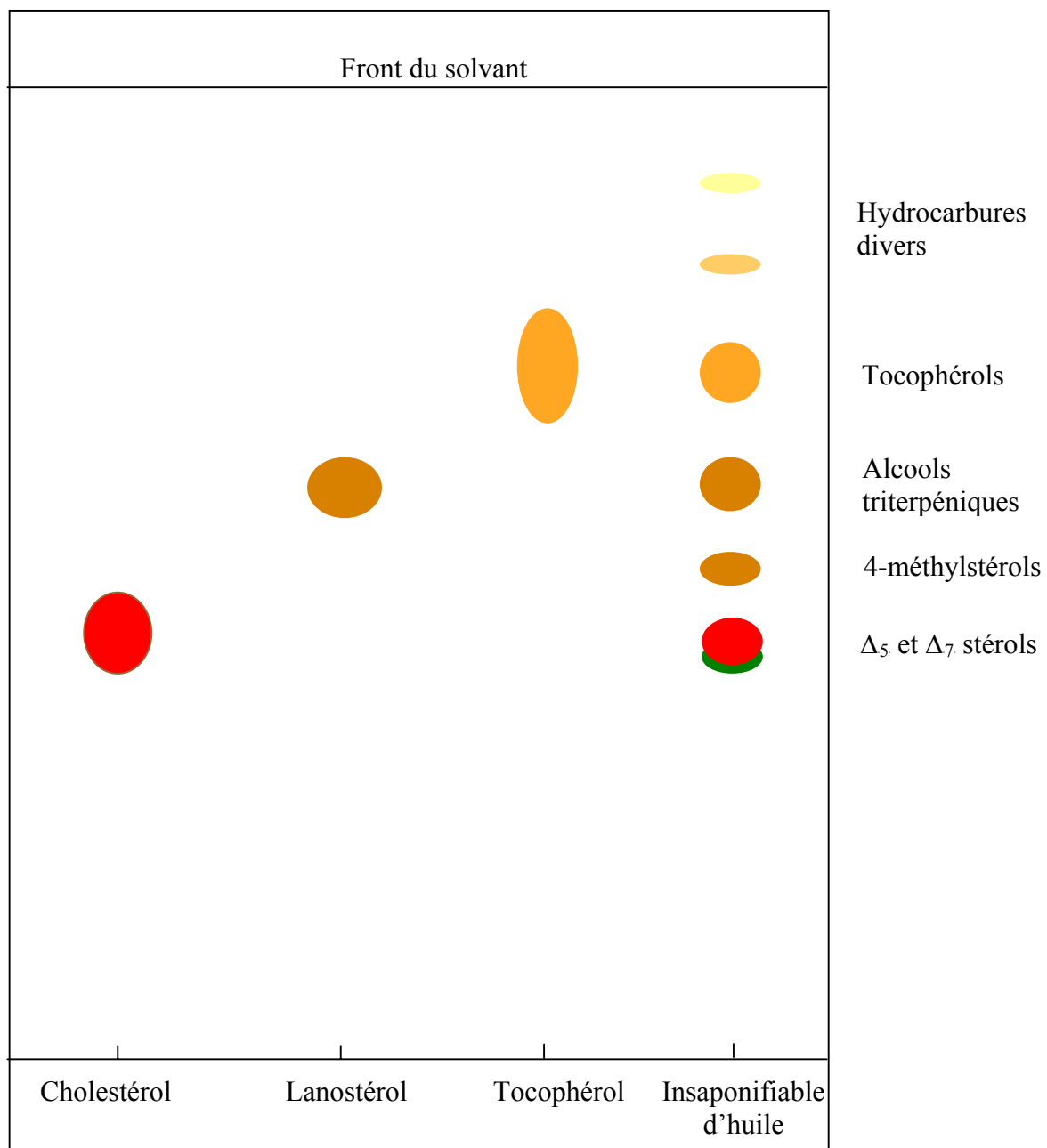


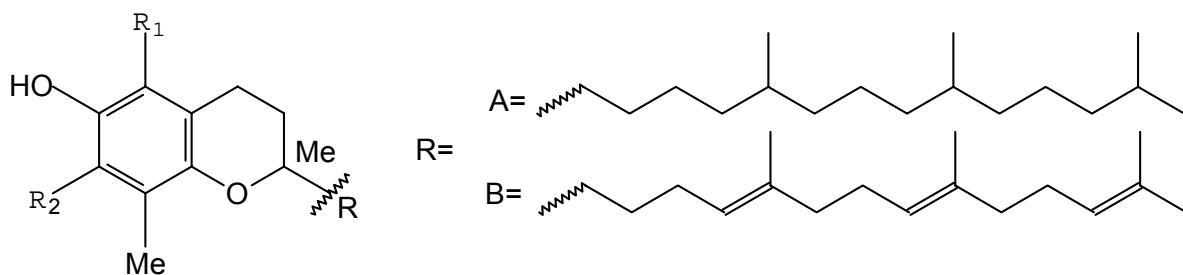
Figure 5.1 : CCM des insaponifiables de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas
 Révélateur solution aqueuse d'acide sulfurique H_2SO_4 50% suivit d'un chauffage à l'étuve à 110 °C

CHAPITRE 6

ETUDE DES TOCOPHEROLS

6.1. Introduction

Les tocophérols constituent une fraction mineure de l'insaponifiable des corps gras. Ce sont des composés phénoliques possédant un noyau chromane portant en carbone 2 une chaîne latérale tri-isopropénique saturée dans le cas des tocophérols et tri-insaturée dans le cas des tocotriénols. La substitution du noyau aromatique par des groupes méthyles conduit aux huit combinaisons naturelles données dans la figure 6.1.



		Composés	
R ₁	R ₂	A	B
Me	Me	α-tocophérol	α-tocotriénol
H	Me	β-tocophérol	β- tocotriénol
Me	H	γ-tocophérol	γ- tocotriénol
H	H	δ-tocophérol	δ- tocotriénol

Figure 6.1 : Structure des différents tocophérols et tocotriénols

Les tocophérols sont généralement des constituants mineurs des corps gras végétaux. Ils existent principalement sous forme monomère [77]. Ces composés sont classés dans le groupe des vitamines liposolubles (vitamine E de fertilité). Bien que leurs structures diffèrent peu, leurs effets sont très variables.

En effet, la forme α présente l'activité vitaminique la plus importante, tandis que l'isomère γ est plus efficace comme antioxydant. Cet isomère (γ) économise l'oxygène de la respiration cellulaire, protège les substances oxydables. De plus, il intervient dans le métabolisme des graisses en empêchant la dégradation des acides gras [77,81].

La recherche médicale a démontré les effets bénéfiques de la vitamine E, entre autres dans le retard de l'évolution de l'infection par le virus HIV en SIDA clinique et dans la réduction des symptômes qui y sont associés. Des études cliniques sont requises pour illustrer les effets bénéfiques potentiels de ces nutriments dans la prolongation de la période asymptomatique de l'infection par le virus en HIV en combinaison avec un traitement par un médicament antiviral chez les patients souffrants du SIDA [82].

6.2. Dosage quantitatif des tocophérols

6.2.1. Dosage des tocophérols totaux

Nous avons adopté la méthode de dosage colorimétrique d'EMMERIE-ENGEL [83]. Cette méthode est basée sur la réaction d'oxydoréduction entre les tocophérols et le fer ferrique (Fe^{3+}) qui est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}). Ce dernier et en présence de réactifs spécifiques comme l'orthophénantroline forme un complexe rouge-orangé stable dont le coefficient d'extinction molaire à 510 nm est très élevé.

Ce dosage peut être réalisé soit à partir de l'insaponifiable [84], soit à partir de l'huile [85]. Chacun de ces dosages a ses avantages et inconvénients. Lorsqu'on effectue l'analyse à partir de l'huile totale, on ne tient pas compte des composés tocophéroliques engagés dans des combinaisons de type esters. En effet, la réaction d'oxydo-réduction, conduisant à des composés de type quinonique, ne peut avoir lieu. L'analyse effectuée ne tient compte que des tocophérols libres. Dans le cas du dosage à partir de l'insaponifiable, on dose les tocophérols totaux, initialement libres et estérifiés. Lors des différentes

manipulations nécessaires, une dégradation partielle de ces composés peu avoir lieu, sauf cas particulier des huiles végétales pauvres en esters tocophéroliques. En fin de compte, les deux méthodes de dosages donnent des résultats assez proches.

Une droite étalon tracée à partir d' α -tocophérol commercial permet de relier la densité optique et la concentration en tocophérols

Nous avons effectué le dosage sur l'huile brute. Le résultat montre que la teneur de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas en tocophérols totaux est de 936 mg/kg. Toutefois, cette valeur est peu élevée par rapport à celle que l'on trouve dans les huiles de maïs, de tournesol et d'olive dont les valeurs sont respectivement de 1168, 673 et 200 mg/kg [22].

6.2.2. Dosage quantitatif des tocophérols individuels

Le dosage des tocophérols individuels peut être réalisé soit par CPG [86,87], soit par CLHP [88,89]. Nous avons choisi cette dernière technique car elle donne de meilleurs résultats. Nous avons effectué l'analyse sur l'huile directe. Nous avons utilisé une colonne apolaire à phase inverse (RP18) et un mélange méthanol/acétonitrile (70 : 30 V/V) comme éluant de débit de 1 ml/mn. La détection est faite par fluométrie avec une longueur d'onde d'excitation de 290 nm et celle de l'émission de 330 nm. L'identification des différents tocophérols présents dans l'huile de Pistachier de l'Atlas est faite par la co-injection des tocophérols étalons (standards) (α , β , γ , δ). Un étalonnage externe nous a permis de calculer la quantité de chaque tocophérol individuel contenu dans l'huile figure 6.2.

L'étude des chromatogrammes CLHP de l'huile de fruit (figure 6.3) et de ceux des tocophérols individuels étalons (figure 6.4) nous a permis d'aboutir aux résultats portés dans le tableau 6.1.

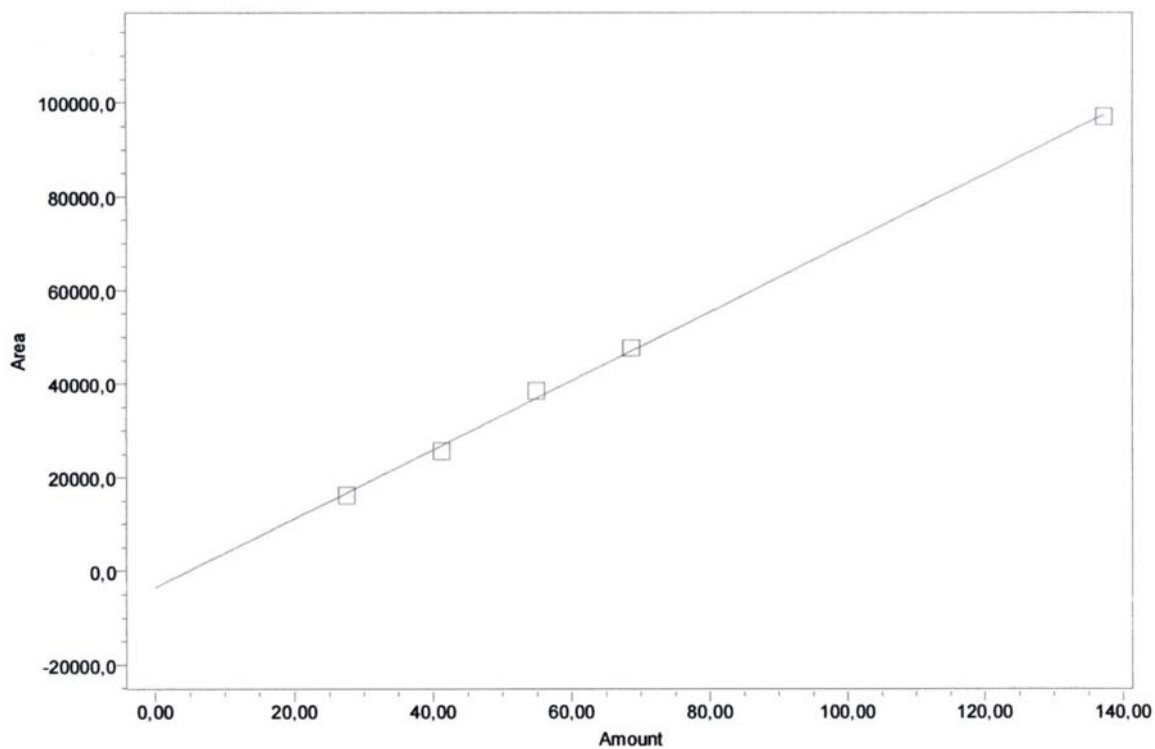


Figure 6.2 : Courbe d'étalonnage externe de l' α - tocophérols

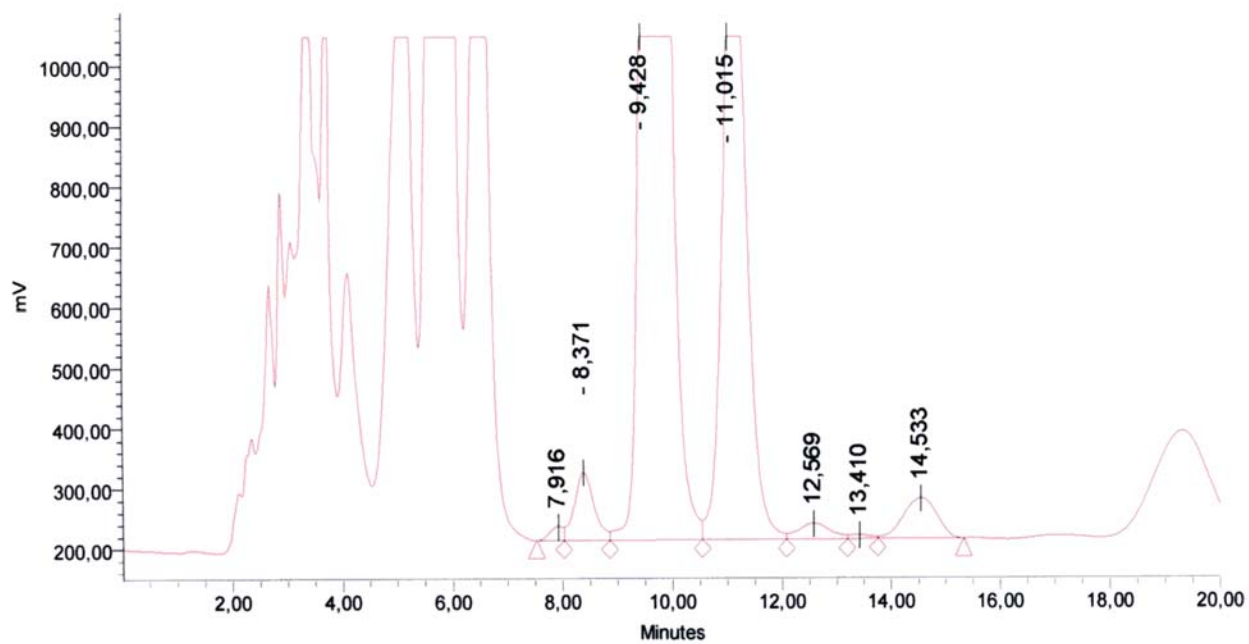


Figure 6.3 : Chromatogramme CLHP des tocophérols individuels de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas

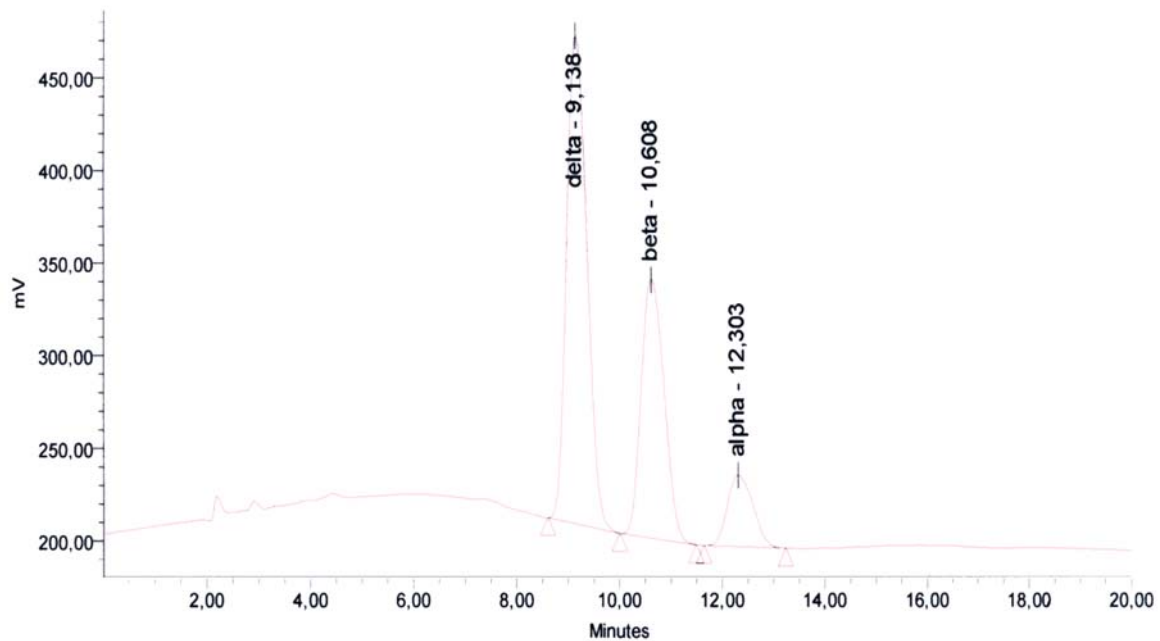


Figure 6.4 : Chromatogramme CLHP des tocophérols individuels étalons

Tableau 6.1 : Tocophérols individuels de l'huile de Pistachier de l'Atlas

Tocophérols	%	mg/kg
α -tocophérol	58,10	398,8
β - tocophérol	--	--
γ - tocophérol	37,24	255,6
δ - tocophérol	04,66	32,0
Total	100	686,4

L'analyse des tocophérols de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas fait apparaître une très forte prédominance des deux isomères α et γ -tocophérol avec des teneurs respectives de 398,8mg/kg et 255,6 mg/kg. Il faut noter que la valeur de la teneur en tocophérols totaux trouvée par le dosage colorimétrique (936 mg/kg) est bien supérieure à

celle déterminée par CLHP (686,4 mg/kg), soit une différence de 249.6 mg/kg. A notre avis, cet écart relativement important est due à l'existence des xanthophilles et des carotènes dans l'huile qui pourraient interférer avec le dosage colorimétrique, car il est conseillé de passer l'échantillon sur une colonne de terre à foulon avant la lecture de la densité optique afin d'éliminer les xanthophiles et les carotènes. Malheureusement, par faute d'indisponibilité de terre à foulon, cette étape de purification n'a pu être faite.

6.3. Conclusion

L'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas est une huile riche en composés tocophéroliques, si on la compare aux huiles d'arachide (360 mg/kg) ou d'avocat (83 mg/kg). Par contre, elle se rapproche des huiles de pépins de raisin (700 mg/kg), du fait de sa richesse en γ - tocophérol. Elle bénéficie par ailleurs d'une résistance importante à l'oxydation. De même, la forte teneur en α -tocophérol confère à l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas de bonnes propriétés biologiques vitaminique E.

CHAPITRE 7

ETUDE DES STEROLS

7.1. Description générale des stérols

Les stérols sont universellement répandus chez les êtres vivants, aussi bien dans le règne animal que dans le règne végétal. On les trouve également chez les micro-organismes.

La plupart des organismes Eucaryotes ont besoin de stérols, qui ont un rôle architectural et interviennent comme une partie intégrante des membranes cellulaires.

Les animaux sont capables de synthétiser certains stérols. Le cholestérol étant l'exemple le plus répandu. D'autres peuvent être contenu dans l'alimentation. En effet, chez les végétaux, les structures stéroliques sont beaucoup plus nombreuses, certaines semblent d'ailleurs caractéristiques d'une famille. Ainsi, les stérols ont un rôle chimiotaxonomique beaucoup plus fin que d'autres composés lipidiques comme les acides gras.

Les phytostérols sont présents dans la fraction lipidique. Dans les huiles de graines ou de fruits, ils sont généralement présents en faibles teneurs. Ils peuvent être rencontrés sous forme libre ou combinée, dont la principale est l'estérification par un corps gras.

Les stérols sont des alcools polycycliques à point de fusion élevé. Ils sont stables, sans odeur et sans goût [90]. Ils sont relativement inertes et contribuent peu aux propriétés des huiles bien qu'ils les caractérisent mieux que ne le font les acides gras.

Les stérols sont des composés tétracycliques. Ils comportent le plus souvent 27, 28 ou 29 atomes de carbone. Le squelette de base est le cyclopentanoperhydrophénanthrène représenté sur la figure 7.1.

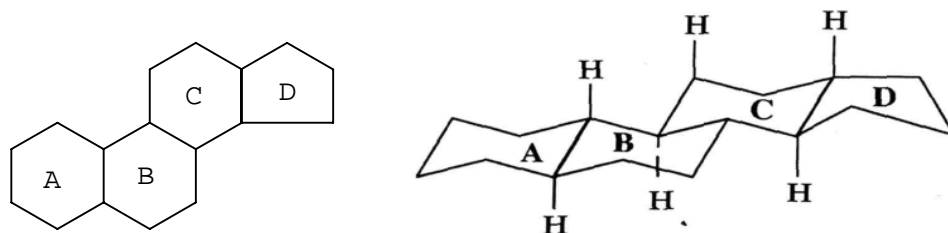


Figure 7.1 : Cyclopentanoperhydrophénanthrène

Les stéroïdes appartiennent à la famille des allo-stéranes caractérisée par la conformation des cycles chaise-chaise - chaise-bateau. La jonction des cycles A et B est trans. La numérotation des carbones se fait dans l'ordre suivant : d'abord, les squelettes de base à partir du cycle A, puis ses substituants et enfin la chaîne latérale comme le montre la figure 7.2. La position des substituants est repérée par rapport au plan du cycle comme suit : β au-dessus, α au-dessous. La numérotation inverse est appliquée pour la chaîne. Les différents stéroïdes connus à ce jour possèdent des substituants communs :

- Sur le carbone 3 : dans les stéroïdes naturels la fonction alcool est en position β .
- Sur les carbones 10 et 13 : un groupement méthyle en β , exceptionnellement, un 14α -méthyle.
- Une ou plusieurs doubles liaisons sur les cycles : sur le cycle B en général, plus rarement sur les cycles C et D.
- Sur le carbone 17 : une chaîne latérale généralement en position β . Elle est saturée, mono ou di-insaturée et comporte au minimum deux substituants : un groupement isopropyle en fin de chaîne et un groupement méthyle sur le carbone 20. Le carbone 24 peut être substitué par des groupements, méthyle, éthyle, méthylène ou éthylène (Z ou E).

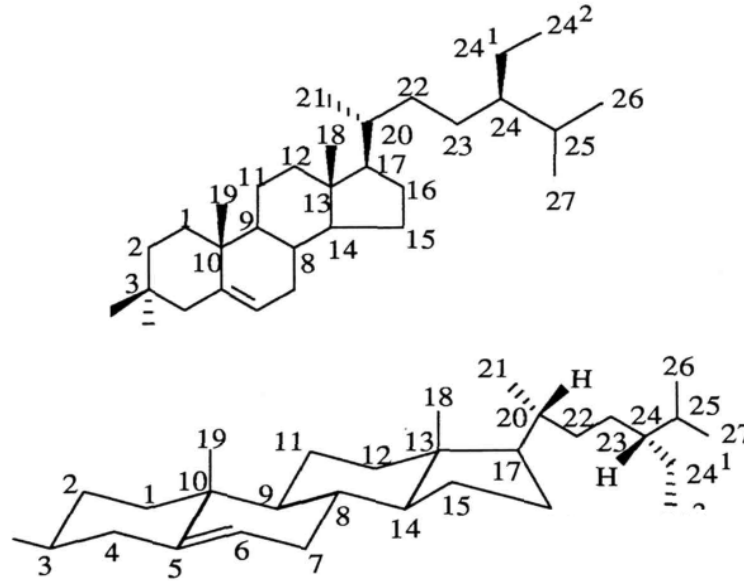


Figure 7.2 : Numérotation des carbones du sitostérol

Les stérols sont répartis en trois groupes selon la nature du substituant sur le carbone 24 :

- Série du cholestane : c'est le système de base comportant 27 atomes de carbone. Il n'y a pas de substituant sur la position 24.
- Série de l'ergostane : ces composés présentent en plus un groupe méthyle. Dans ce cas, le carbone 24 est de configuration S, que la chaîne latérale soit saturée ou non. Les stérols présentant un carbone 24 de configuration R et une chaîne latérale saturée appartiennent à la série campestane.
- Série du stigmastane : les stérols possèdent un groupe éthyle en 24. Le carbone 24 est de configuration R avec une chaîne latérale saturée, ou de configuration S avec une chaîne latérale insaturée. Lorsque la chaîne latérale est saturée et le carbone 24 est de configuration S, les stérols appartiennent à la série pariférestane.

Cependant, la plupart des stérols courants ont un nom usuel.

Les types de stérols rencontrés dans le monde végétal sont caractérisés par leur noyau tétracyclique et leur chaîne latérale.

Le noyau tétracyclique présente en général une double liaison, le plus souvent en 5, elle peut également être rencontrée en 7, beaucoup plus rarement en 8(9) ou 9(11). Le noyau cyclopropanique en 9-10-19 et le groupement méthyle en 14 α , présents chez les précurseurs, subsistent rarement.

Les possibilités existantes sur la chaîne latérale sont nombreuses (figure 7.3). La chaîne peut être saturée. Elle comporte une ou deux doubles liaisons qui ne sont jamais conjuguées et présente 8, 9 ou 10 atomes de carbone. La substitution a généralement lieu en 22, 24(25), ou 25(27). Le carbone 24 est généralement en position α mais on rencontre certains stérols, tels que le brassicastérol, où il se positionne en β . La configuration de ce carbone 24 est R, si la chaîne est saturée et S si la chaîne comporte une double liaison 22.

Les principaux stérols rencontrés dans le règne végétal sont répertoriés dans le tableau 7.1. Certains stérols sont très fréquents : le cholestérol, le campestérol, le brassicastérol, le stigmastérol, le sitostérol, le Δ_5 -avénastérol (ou isofucostérol), le spinastérol, le Δ_7 -stigmastérol et le Δ_7 -avenastérol. Les Δ_5 -stérols sont majoritaires, particulièrement ceux substitués en 24 [22].

Le stérol le plus abondant dans le règne végétal est sans conteste le sitostérol suivi du campestérol, puis du stigmastérol et enfin le Δ_5 -avénastérol. Le brassicastérol est présent uniquement chez les *Brassicaceae*. On rencontre certaines familles chez les Δ_7 -stérols où ceux-ci sont prépondérants. C'est le cas entre autres des familles botaniques des *Sapotaceae* [91], des *Phytolaccaeeae* [92], des *Cucurbitaceae* [93], des *Theaceae* [94] et des *Chenopodiaceae* [95]. Le cholestérol, longtemps considéré comme exclusivement animal, a été mis en évidence chez de nombreux végétaux [96-102], cependant en petite quantité par rapport aux autres stérols.

Le 22-déhydrocholestérol, le démostérol, le 24-méthylène cholestérol et notamment le fucostérol sont caractéristiques des algues marines. Le Δ_7 -chlostérol, le zymostérol, le fécostérol et l'ergostérol sont plus fréquemment rencontrés chez les champignons [103].

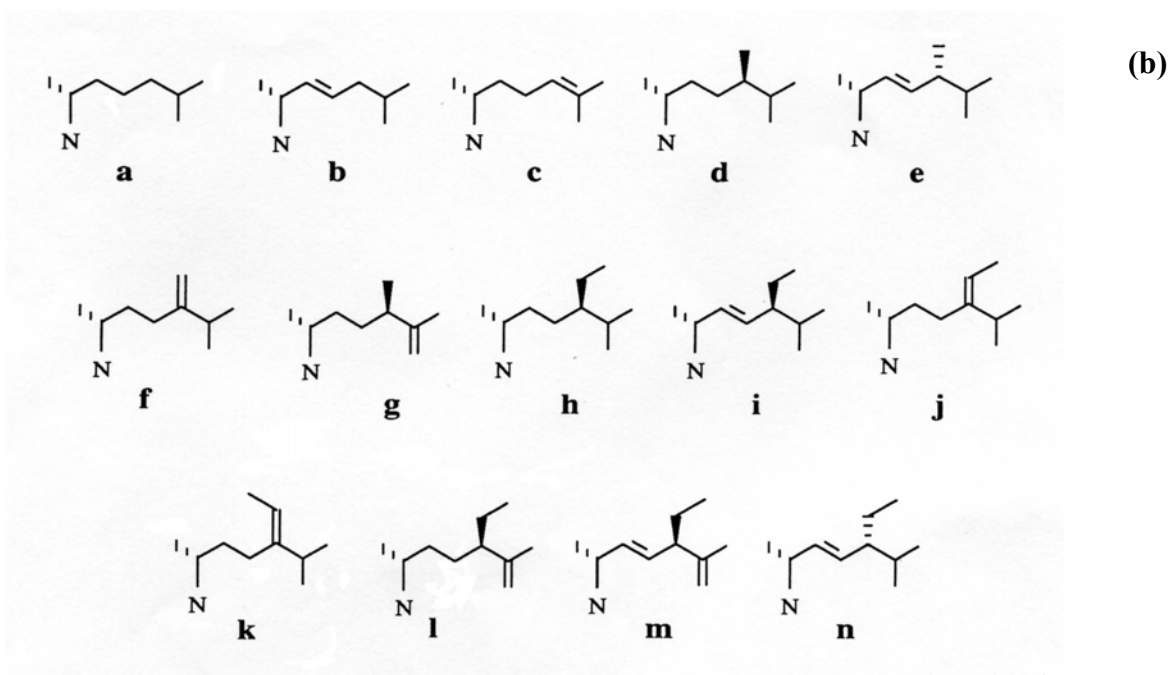
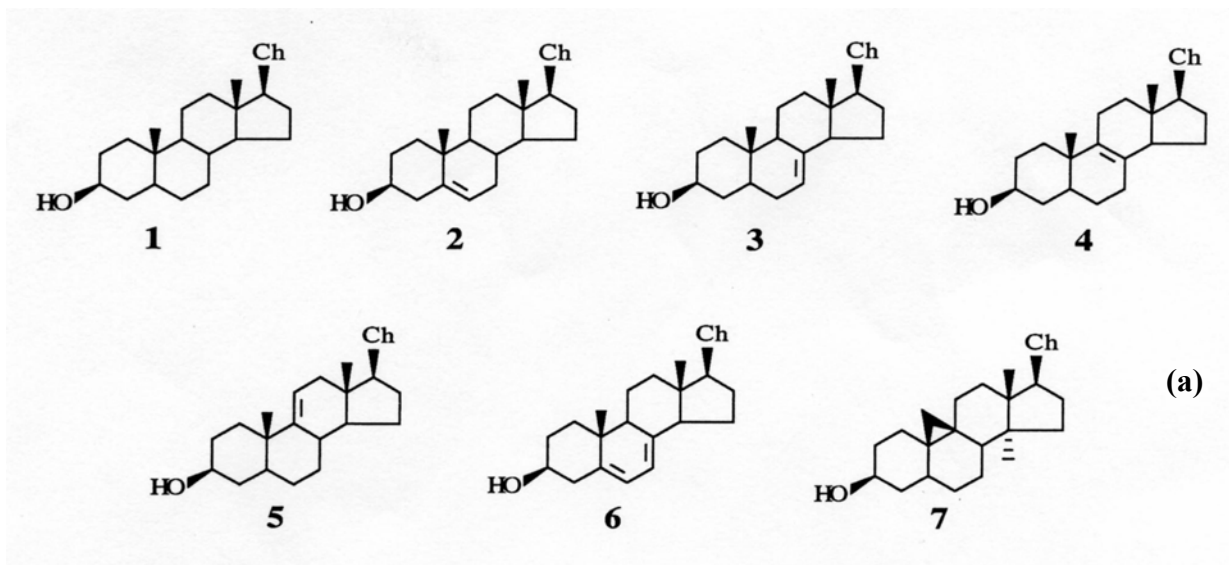


Figure 7.3 : Principaux noyaux tétracycliques (a) et chaînes latérales (b) dans les stérols

Tableau 7.1 : Principaux stérols présents dans le règne végétal

Stérol (Figure 7.3)	Nomenclature	Nom usuel
1a	cholestan- 36- ol	cholestanol
1d	24a- ergostanol	campestanol
1h	stigmastan- 36- ol	stigmastanol
2a	cholest- 5- en- 36- ol	cholestérol
2d	24a- ergost- 5- en- 36-ol	campestérol
2h	24a- stigmast- 5- en- 36- ol	sitostérol
2b	cholesta-5,22(E)- dien- 36- ol	22- déhydrocholestérol
2e	246- ergosta- 5,22(E)- dien- 36- ol	brassicatérol
2i	24a- stigmasta- 5,22(E)- dien- 36- ol	stigmastérol
2c	cholesta- 5,24(25)- dien- 36- ol	desmostérol
2f	ergosta- 5,24(24!)- dien- 36- ol	24-méthylène cholestérol
2j	stigmasta- 5,24(24!)(Z)- dien- 36- ol	Δ 5-avenastérol ou isofucostérol
2k	stigmasta- 5,24(24 ¹)(E)- dien- 36- ol	fucostérol
2l	24a- stigmasta- 5,25- dien- 36- ol	clérostérol
2m	24cc- stigmasta- 5,22(E),25- trien- 36- ol	-
3a	cholest- 7- en- 36- ol	Δ 7-cholestérol ou lathostérol
3d	24a- stigmast- 7- en- 36- ol	Δ 7-stigmastérol ou schottérol
3e	246- ergosta- 7,22(E)- dien- 36- ol	chondrillastérol
3k	stigmasta- 7,24(24 ¹)(E)- dien- 36- ol	isoavenastérol
3j	stigmasta- 7, 24(24 ¹)(Z)- dien- 36- ol	Δ 7-avenastérol
3l	24a- stigmasta- 7,25- dien- 36- ol	.
3m	24cc - stigmasta- 7,22(E),25- trien- 36- ol	-
4c	cholesta- 8,24(25)- dien- 36- ol	zymostérol
4f	ergosta- 8,24(24!)- dien- 36- ol	fécostérol
4i	24a- stigmasta- 8,22(E)- dien- 36- ol	-
4l	24cc- stigmasta- 8,25- dien- 36- ol	-
5h	24a- stigmast- 9(11)- en- 36- ol	-
6a	cholesta- 5,7- dien- 36- ol	Δ 7 -déhydrocholestérol
6n	248- ergost- 5,7,22(E)- trien- 36- ol	ergostérol
7a	14ot- methyl- 98,19- cyclo- cholestan- 36- ol	polUnastérol

7.2. Fonctions biologiques des stérols

De nombreuses fonctions biologiques sont attribuées aux stérols libres. Parmi eux, nous mentionnons les plus citées dans la littérature.

7.2.1. Rôle dans la membrane cellulaire

C'est la première fonction reconnue aux stérols [104]. Ils ont un rôle architectural [105] au niveau de la membrane cellulaire animale soit elle ou végétale dans laquelle ils interagissent avec les phospholipides en modifiant sa perméabilité.

7.2.2. Rôle dans les hormones

Heftmann [106] trouve des similitudes entre la biosynthèse des hormones végétales et celle des hormones animales. Chez les animaux, l'oxydation et l'aromatisation des stérols conduisent aux hormones qui sont responsables des processus de croissance, de respiration et reproduction. Nes [105] a aussi reconnu aux stérols ce rôle de précurseur d'hormones stéroïdiennes. Ils sont par exemple à l'origine de la biosynthèse des sapogénines stéroïdiques présentes chez le fenugrec [107]. L'action directe des stérols comme hormone n'est pas prouvée. Biscus et al. [108] ont notamment remarqué que le sitostérol n'avait aucune action sur la croissance des *chrysanthemum*, mais stimulait l'initiation des boutons de fleurs.

La fonction des stérols dans la croissance et la reproduction a été reconnue chez les microorganismes, tels que *candida rugosa*, à qui un stérol est indispensable pour la production de la lipase [106]. Il en est de même pour les insectes phytopages [105].

7.2.3. Rôle de stockage

Certains stérols constitueraient un stock inerte rapidement convertible en composés biologiquement actifs. Ainsi, le sitostérol fonctionnerait comme une réserve pour les plantes qui pourraient produire d'autres stérols et par conséquent d'autres hormones [105,100].

7.2.4. Autres rôles des stérols

Les stérols favoriseraient la sensibilisation aux antibiotiques des champignons [106]. Sims et al. [108] attribuent à certains phytostérols la protection d'huiles végétales de la polymérisation oxydative.

Les Δ_7 -stérols semblent être associés à la pigmentation des organes végétatifs de la plante chez *Cucurbita maxima L* [109]. Ce sont des constituants des feuilles, tiges, fleurs et péricarpes, mais pas des racines et des cotylédons.

7.3. Méthodes d'analyse des stérols

Les techniques exposées ici concernent aussi bien les stérols présents naturellement sous forme libre que les stérols totaux obtenus après saponification. Il est possible de les caractériser, de les doser et de les identifier.

7.3.1. Caractérisation des stérols

En CCM, nous avons vu que les stérols sont généralement séparés des autres constituants en utilisant un éluant hexane/éther (7/3 V/V) avec un facteur de rétention $R_f = 0,37$.

Les stérols peuvent être mis en évidence par l'emploi de divers réactifs caractéristiques. Les tests de Liebermann-Burchard, de Salkowski [110], la pulvérisation de dichlorofluorescène à 0,2% dans l'éthanol [111], ainsi que la carbazole et la rhodamine B ou 6G [112] permettent la révélation des stérols.

La spectroscopie infrarouge (IR) permet de vérifier la présence d'hydroxyle, mais elle est difficilement exploitable dans des mélanges.

7.3.2. Dosages

Le dosage des stérols totaux peut être réalisé par précipitation de leurs digitonides [113], par absorption spectrophotométrique suivant le test de Liebermann-Burchard [114],

par méthode enzymatique avec la cholestérol oxydase [115], et également par chromatographie en phase gazeuse [116].

Les stérols peuvent également être quantifiés par la technique de Sperry-Webb modifiée [117]. Il s'agit d'une mesure spectrophotométrique de l'absorbance des digitonides après le test de Liebermann-Burchard.

7.3.3. Identification des stérols

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est l'une des techniques les plus utilisées pour l'analyse des stérols végétaux. De nombreuses phases de colonnes capillaires ont été testées SE30 et OV1 (100% méthylpolysiloxane) et OV17 (50% phényl, 50% Méthylpolysiloxane) [101].

Les stérols sont analysés sous forme libre ou acétylée ou silylée [118], et identifiés par leurs temps de rétention relatifs (TRR) par rapport au cholestérol ou au sitostérol. La dérivation améliore en général la séparation des stérols entre eux.

La spectrométrie de masse (SM) permet d'obtenir la masse moléculaire et la fragmentation des composés. Elle est très souvent couplée à la CPG (CG-SM) [110,120] et complète l'information obtenue précédemment. Les stérols sont également analysés sous forme libre ou acétylée ou silylée. Il semble cependant que les dérivées triméthylsilylés donnent des indications plus précises pour les spectres de masse [121].

Les principaux fragments des stérols silylés, permettant l'identification de la série à laquelle ils appartiennent, sont résumés dans le tableau 7.2 et représentés sur la figure 7.4 [121]. Le tableau 7.2 regroupe l'identification des stérols mono et di-insaturés en 5, 7, 22 et 24 car se sont les plus courants, mais il ne faut pas exclure la présence possible de composés minoritaires possédant une double liaison dans les positions inhabituelles, ainsi que des stérols tri-insaturés.

Tableau 7.2 : Identification des principaux stérols triméthylsilylés par leurs fragments caractéristiques

	Saturé	monosaturé		di-insaturé			
		Δ_5	Δ_7	$\Delta_{5,22}$	$\Delta_{5, 24(24)}$	$\Delta_{7, 22}$	$\Delta_{7, 24/24}$
Pic de base	215	M-129 ou 129	255 ou M	M-129 ou 129	M-129 ou 129	253	343
Fragments typiques	305	M-129	345	343	386	343	386
	229	M-211	229	M-43	371/372	M-43	371/372
		129		M-43-90	343	M-43-90	343
					296		296
					281		281
				253		253	

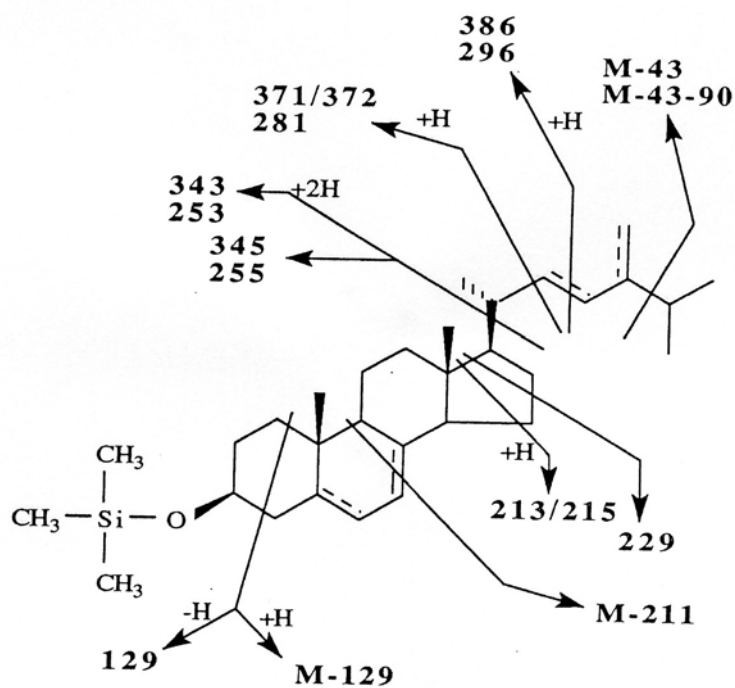


Figure 7.4 : Fragmentations caractéristiques des stérols triméthylsilylés

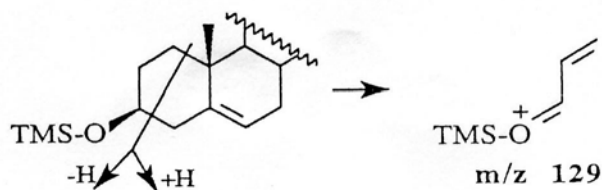


Figure 7.5 : Fragmentations caractéristiques des stérols triméthylsilylés

Le pic moléculaire des stérols silylés est toujours observé et indique la série et le nombre d'insaturation. Les stérols silylés présentent également des pics caractéristiques : M pic de masse ; M-90 : M-(CH₃)SiOH ; M-CH₃ ; M-15-90 ; 213/215 (rupture du cycle D).

Tous les Δ_5 -stérols silylés présentent dans leur spectre de masse comme pic de base le fragment $m/z = 129$, accompagné dans tous les cas de l'ion M-129. Ils se forment de la manière indiquée dans la figure 7.4.

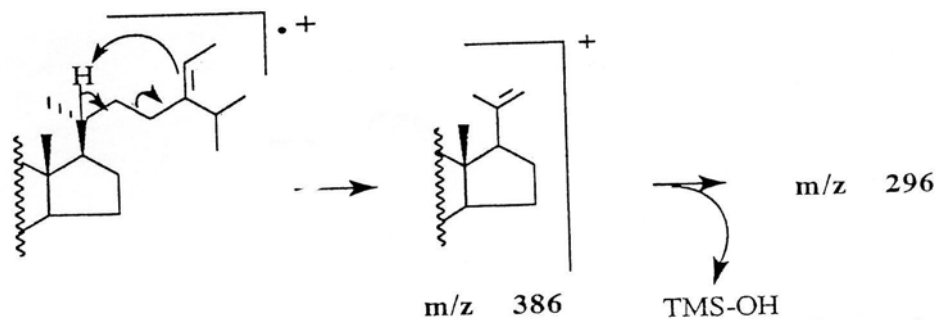


Figure 7.6 : Fragmentation de la chaîne latérale du TMS Δ_5 -aveanstérol

Les Δ_5 -stérols présentent une seconde insaturation en 24(24¹) comme le Δ_5 -avenastérol (ou isofucostérol) et montrent un clivage allylique de la liaison C22-23 avec un transfert d'un atome d'hydrogène par réarrangement de MacLafferty schématisé dans la figure 7.5.

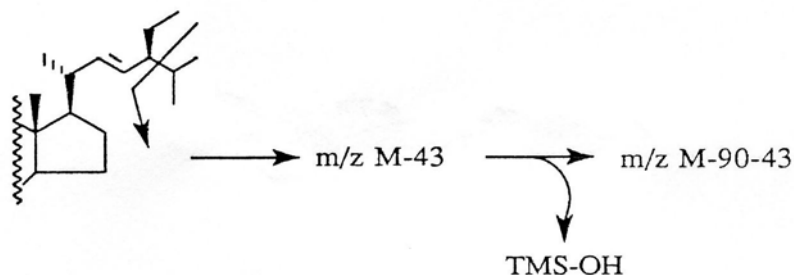


Figure 7.7 : Fragmentation des $\Delta_{22(23)}$ stérols

Le stigmastérol est un Δ_5 -stérol dont la seconde insaturation se situe sur le carbone 22(23). La fragmentation caractéristique de ces stérols au niveau de la chaîne latérale est résumée sur la figure 7.6.

Les spectres de masse des Δ_7 -stérols sont caractérisés par l'absence des fragments $m/z = 129$ et M-129. Chez les stérols monoinsaturés, on note les fragments $m/z = 129$ et 345 (M-CL). Chez les di-insaturés, $m/z = 343$ (M-CL-2H). Dans tous les cas, les stérols sont accompagnés de $m/z =$ M-CL-42, M-CL-42-90, M-CL-27 et M-CL-27-90. Ces deux derniers fragments sont issus d'un ion intermédiaire obtenu après rupture du cycle D.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est utilisée pour l'identification d'un composé pur. L'isolement préalable du stérol est indispensable. L'analyse peut être une RMN du proton et/ou du carbone 13 [112].

L'infrarouge (IR) est une technique moins employée. Elle est parfois couplée à la masse CPG (C.G-IRTF). Cette méthode complémentaire d'identification peut être très utile, car les spectres de certains stérols se distinguent nettement dans la région de l'empreinte digitale [123].

7.4. Analyse des stérols du fruit de Pistachier de l'Atlas

L'analyse des stérols a donc commencé par un fractionnement de l'insaponifiable par CCM préparative. Deux migrations sont nécessaires. L'élution étant effectuée par un mélange hexane/diéthyl éther [7/3 (V/V)]. Après le grattage de la zone correspondante aux stérols, ces derniers sont désorbés par le chloroforme. Après évaporation du solvant à pression réduite, les stérols sont silylés puis directement analysés par CPG couplée à un détecteur de spectrométrie de masse.

Le chromatogramme (figure 7.8) montre 7 pics (S_1 à S_7). A partir des spectres de masse de chaque stérol, nous notons les ions moléculaires à $m/z = 458, 472, 484, 486$ et 488 , et des fragments à $m/z = [M-15], [M-90]$ et $[M-150-190]$. Nous remarquons aussi et dans la majorité des spectres de masses des stérols séparés des fragments à $m/z = 213$ et 255 d'intensités variables. Le fragment $m/z = 213$ correspond au clivage du cycle D avec un transfert d'un atome d'hydrogène, alors que le deuxième fragment $m/z = 255$ est caractéristique du clivage de la chaîne latérale entre les deux carbone C_{17} et C_{20} . Ces deux fragments nous permettent de déterminer la formule brute de la chaîne latérale par différence avec la masse de l'ion moléculaire [124-126]. Dans la plupart des spectres de masse des stérols de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas, nous remarquons les fragments à $m/z = 129$ et $M-129$. Ce dernier résulte du clivage allylique des liaisons C_1-C_{10} et C_3-C_4 . Ces deux fragments sont caractéristiques des Δ_5 -stérols silylés [124,119,127] (stérols silylés ayant une insaturation en (5/6)). Nous remarquons aussi dans le spectre de masse des stérols, d'une part l'absence totale des fragments caractéristiques des Δ_5 -stérols, et d'autre part l'existence de deux fragments de faibles intensités à $m/z = 300$ et 302 et qui peuvent être dus à des réactions de Diel-Alders pour ce type de stérols. Notons aussi l'existence d'un fragment intense à $m/z = 255$ qui résulte du clivage de la chaîne latérale. Tous ces fragments sont caractéristiques des stérols silylés ayant une insaturation en (7/8) (Δ_7 -stérols).

Il est possible de localiser la position de la double liaison dans la chaîne latérale et cela à partir du fragment $m/z = 372$ ($M-C_8H_{15}-1H$) qui est due au clivage allylique $C_{20}-C_{22}$ avec un transfert d'un atome d'hydrogène du cycle D.

Les deux fragments $m/z = 345$ ($M-C_{10}H_{19}$) et $m/z = 343$ ($M-C_{10}H_{19}-2H$), qui sont selon Willie [126] et Djerrasi [125] caractéristiques d'un clivage allylique de la chaîne latérale, possèdent une double liaison entre les deux carbone $C_{22}-C_{23}$.

En fin et ce qui attire notre attention, c'est l'absence totale des fragments caractérisants les Δ_5 - et Δ_7 -stérols silylés du spectre de masse du stérol de masse moléculaire 416. Ce stérol est caractérisé par un pic intense à $m/z = 215$ et qui est absent dans tous les spectres de masse des autres stérols.

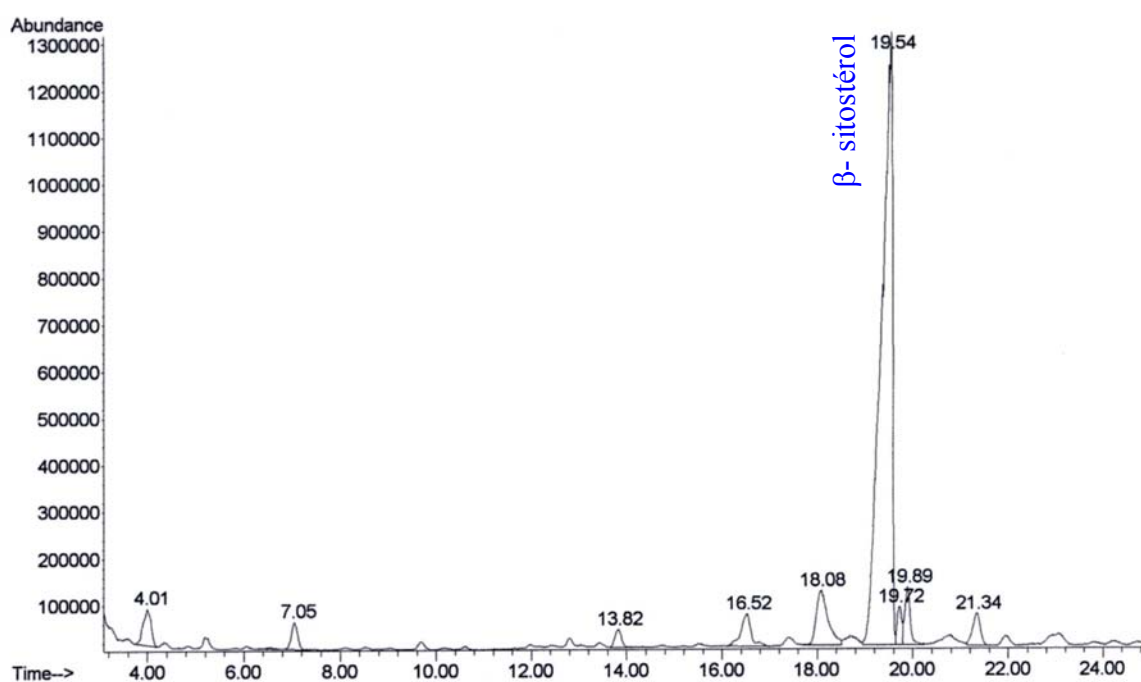


Figure 7.8 : Chromatogramme des stérols du fruit de Pistachier de l'Atlas

Sur la base de ces observations, nous avons essayé d'identifier les structures moléculaires des stérols de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas.

7.5. Identification des différents stérols séparés

- Stérol 1 : S1

TR = 13,82 mn, TRR = 1,00

M(TMS) = 458, M = 386, formule brute $C_{27}H_{46}O$

Caractérisé par un ion de masse $m/z = 253$ qui est la différence $[458 - C_8H_{17} - TMSOH]$. Le stérol est donc de type colestane. La chaîne latérale est saturée avec 8 atomes de carbone. S1 est donc le colestène -5, ol-3 β ou cholestérol.

- Stérol 2 : S2

TR = 16,52 mn, TRR = 1,19

M(TMS) = 472, M=400, formule brute $C_{28}H_{48}O$

L'existence de l'ion de masse $m/z = 255$ qui est la différence [472-C₉H₁₉-TMSOH], montre que ce stérol possède une chaîne latérale saturée avec 9 atomes de carbone.

S2 est le méthyl-24, colestène-5, ol-3 β ou campestérol.

- Stérol 3 : S3

TR = 19,89 mn, TRR = 1,44

M(TMS) = 484, M=412, formule brute C₂₉H₄₈O

Le fragment à $m/z = 257$, [484-C₁₀H₁₉-TMSOH] indique l'existence d'une chaîne latérale avec 10 atomes de carbone mono insaturé.

Le fragment $m/z = 371$ est caractéristique du clivage de la liaison C20-C22. Un autre fragment à $m/z = 386$ caractéristique du clivage de la liaison C22-C23 de type MacLafferty. Ces deux fragments justifient l'existence d'une double liaison en 24(28) et le stérol est de type stigmastane, S1 est donc stigmastadiène -5, 24(28), ol-3 β .

- Stérol 4 : S4

TR = 19,54 mn, TRR = 1,41

M(TMS) = 486, M=414, formule brute $C_{29}H_{50}O$

Ce stérol possède une chaîne latérale mono insaturée de 10 atomes de carbone.

Le fragment $m/z = 255$ [$486-C_{10}H_{21}-TMSOH$].

Le S4 est le stigmastène -5, ol-3 β ou le sitostérol.

- Stérol 5 : S5

TR = 21,33 mn, TRR = 1,54

M(TMS) = 486, M=414, formule brute $C_{29}H_{50}O$

Absence du fragment à $m/z = 129$, donc pas d'insaturation en position 5(6).

L'existence d'un ion à $m/z = 303$ résulte de la différence de la masse moléculaire du $C_{10}H_{19}$ et d'une partie du cycle D, et d'un autre ion à $m/z = 255$ [$486-C_{10}H_{19}-TMSOH$]. Ces deux ions sont caractéristiques des Δ_7 -térols sylvilés. Donc S5 est stigmastène -7, ol-3 β , ou Δ_7 -stigmastène.

- Stérol 6 : S6

TR = 19,70 mn, TRR=1,42

M(TMS) = 488, M=416, formule brute $C_{29}H_{50}O$

Absence totale dans son spectre de masse des fragments caractéristiques de Δ_5 et Δ_7 -stérols, ce qui confirme que ce stérol ne possède pas des doubles liaisons. Donc, c'est un stérol saturé. S6 est le stigmastanol.

- Stérol 7 : S7

TR = 18,08 mn, TRR = 1,31

M(TMS) = 414

C'est un stérol non sylvilé. C'est le stérol 4.

En prenant en compte les identifications précédentes par spectrométrie de masse, les résultats de l'analyse par CPG de la fraction stérolique de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas sont résumés dans le tableau 7.3. Cette huile est caractérisée par sa richesse en Δ_5 -stérols (cholestérol, campestérol, β -sitostérol et Δ_5 -avénastérol) qui représentent plus de 95% des stérols totaux, alors que les Δ_7 -stérols, se présentant seulement en un seul stérol : le Δ_7 -stigmastanol, montre une faibles proportion égale à 2.88%.

Tableau 7.3 : Composition en stérols de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas

TRR	M(TMS)	M	Stérols	%
1.00	458	386	Cholestérol	1.40
1.19	472	400	Campestérol	3.85
1.41	486	414	β -Sitostérol	86.17
1.42	488	416	Stigmastanol	2.04
1.44	484	412	Δ_5 -Avénastérol	3.65
1.54	486	414	Δ_7 -Stigmastérol	2.88

7.6. Conclusion

L'étude de la fraction stérolique de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas nous a permis d'identifier sans ambiguïté six stérols différents. Nous confirmons la présence des autres stérols décrits dans l'huile de *Pistacia vera* [17] : le campestérol, le β -sitostérol et le Δ_5 -avénastérol et Δ_7 -stigmastanol. De plus, nous avons mis en évidence la présence du cholestérol et un stérol saturé : le stigmastanol, deux stérols rarement rencontrés dans les fractions stéroliques du règne végétal.

La proportion élevée du β -sitostérol évaluée à 86% est comparable avec d'autres huiles alimentaires végétales (olive, tournesol, soja,...). Il est intéressant de remarquer que le sitostérol est le composé le plus abondant de l'huile de fruit de Pistachier de l'Atlas, ce qui est souvent remarqués dans les huiles végétales.

CHAPITRE 8

STRUCTURE ET PROPRIETES DES COMPOSES PHENOLIQUES

8.1. Les différentes classes de composés phénoliques

Les composés phénoliques sont présents dans tous les tissus végétaux depuis les racines jusqu'aux fruits. Ils se classent parmi les métabolismes secondaires, par opposition aux protéines, lipides et carbohydrates qui sont les constituants indispensables à la reproduction et à la croissance des végétaux. Pratiquement tous les végétaux fabriquent des phénols et les stockent dans divers organes. Leur présence assure à la plante une protection contre les agents pathogènes, ainsi qu'une aide à la reproduction et à la survie de l'espèce. Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins).

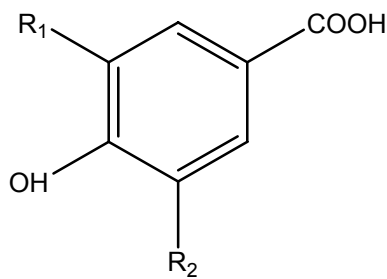
Le terme 'composés phénoliques' désigne de nombreuses substances regroupées en famille. Les différents composés d'une même famille se différencient par la nature et la position des substituants fixés sur un squelette aromatique commun. Les deux classes principales sont les composés non flavonoïdes et les flavonoïdes.

8.2. Les composés non flavonoïdes

Les composés non flavonoïdes regroupent les acides phénoliques ainsi que les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette «flavone».

8.2.1. Les acides phénoliques

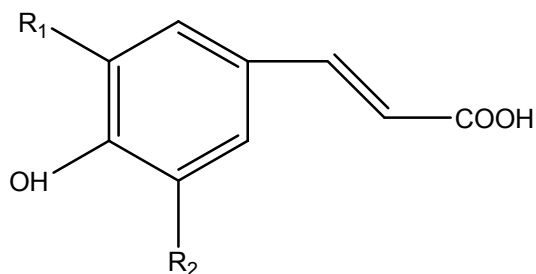
On distingue tout d'abord les dérivées de l'acide benzoïque, composé d'un squelette de sept atomes de carbone (figure 8.1).



Acides hydroxybenzoïques	R ₁	R ₂
Acide hydroxybenzoïque	H	H
Acide protocatechique	OH	H
Acide vanillique	OCH ₃	H
Acide gallique	OH	OH
Acide syringique	OCH ₃	OCH ₃

Figure 8.1 : Les dérivées de l'acide p-hydroxybenzoïque

D'autres composés phénoliques sont également présents, comme les dérivées d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure de type C₆-C₃ (figure 8.2) et qui sont très répandus dans les plantes supérieures, l'acide p-couramique étant le plus important[130].



Acides hydroxycinnamiques	R1	R2
Acide p-couramique	H	H
Acide caféique	OH	H
Acide férulique	OCH ₃	H
Acide sinnamique	OCH ₃	OCH ₃

Figure 8.2 : Les acides hydroxycinnamiques

Parmi les acides hydroxycinnamiques estérifiés, l'acide chlorogénique, ester quinique de l'acide caféique, est très répandu dans les fruits. Ce composé est impliqué dans les mécanismes de brunissement enzymatique. Sa quinone est très réactive et susceptible de réagir par voie d'oxydation couplée [131-133].

Les acides hydroxybenzoïque (squelette (C₆-C₁) (figure 8.1)) sont rarement trouvés dans les fruits mais peuvent être détectés après dégradation des flavonoïdes, et notamment après déglycosylation. Ces composés sont fréquemment présents sous forme liée et peuvent entrer dans la constitution de structures complexes, telles que les tanins hydrolysables. Les esters de l'acide gallique sont retrouvés dans certains fruits notamment le galette d'épicatéchine qui entre dans la composition des tanins condensés du raisin [134].

8.2.2. Les stilbènes

Stilbènes	R1	R2
Pterostilbène	OCH ₃	OCH ₃
Resvératrol	OH	OH
Picéide	OGL	OH

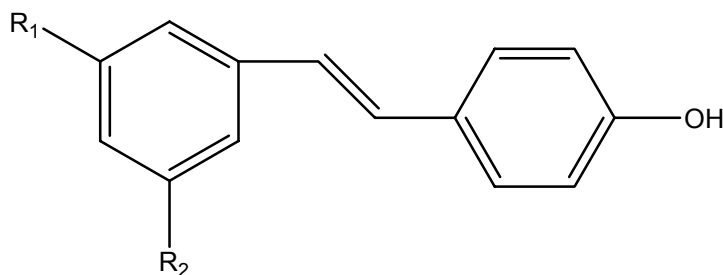


Figure 8.3 : Structures chimiques de quelques stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué (figure 8.3). Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la

totalité de la molécule. Les plus abondants dans les fruits sont le trans-resvératrol et son dérivé glucosylé : le picéide, ainsi que les dimères.

Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à base densité (LDL). Ils pourraient ainsi jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires [135]. On leur attribue aussi des activités chimio-préventives contre le cancer [136].

8.3. Les composés flavonoïdes

Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de base constitué de quinze atomes de carbone ($C_6-C_3-C_6$) comportant deux cycles benzénique A et B reliés entre eux par une chaîne à trois atomes de carbone qui correspond à la phényl-2 benzopyrone (figure 8.4), la numérotation notée sera appliquée pour les différentes sous-classes de flavonoïdes. Ces dernières sont différenciées par le niveau d'oxydation du cycle pyrane: on peut aussi distinguer les anthocyanes, les flavonols, les flavanols et d'autres classes, telles que les flavones, les flavanones et dihydrochalcones.

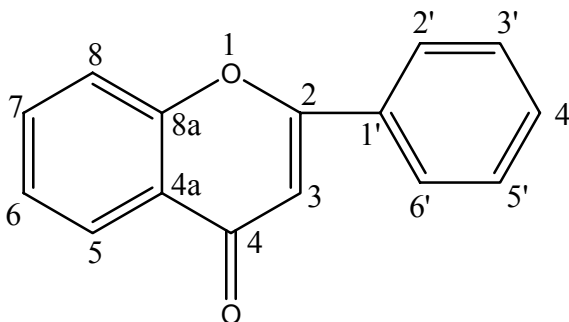
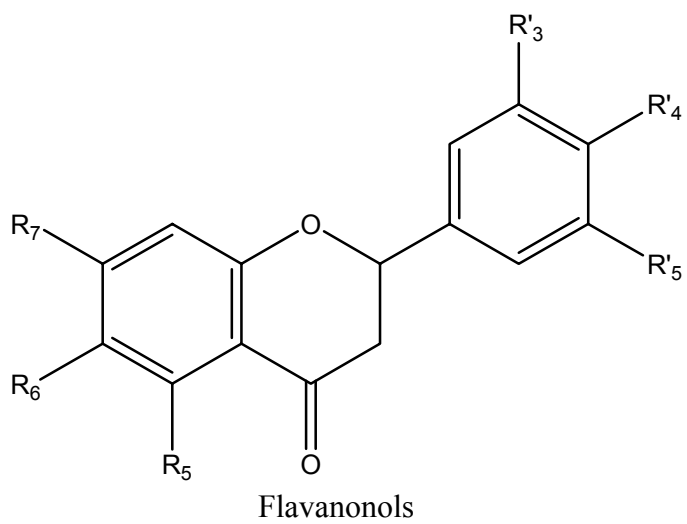
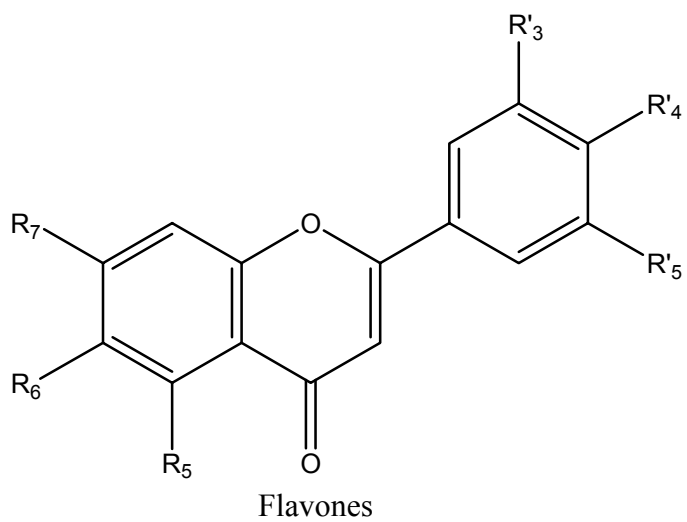
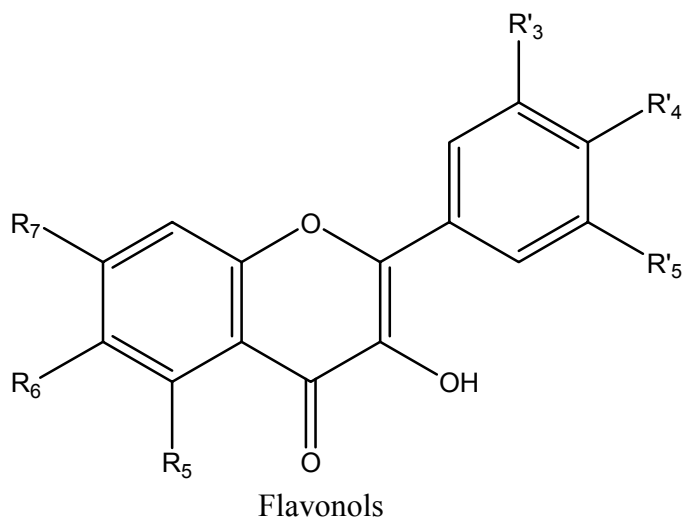
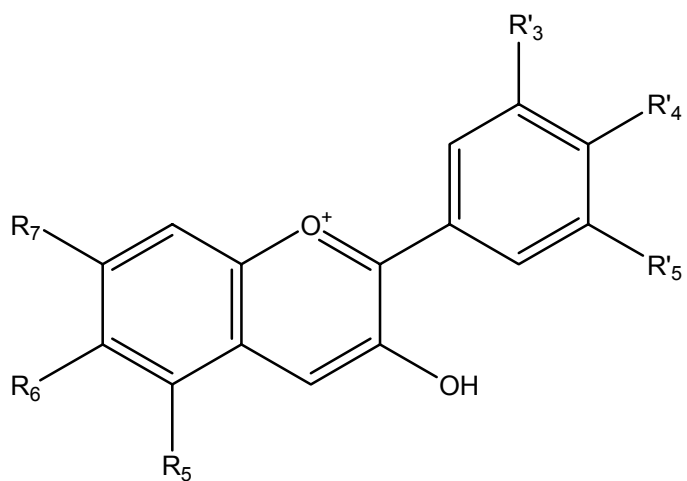


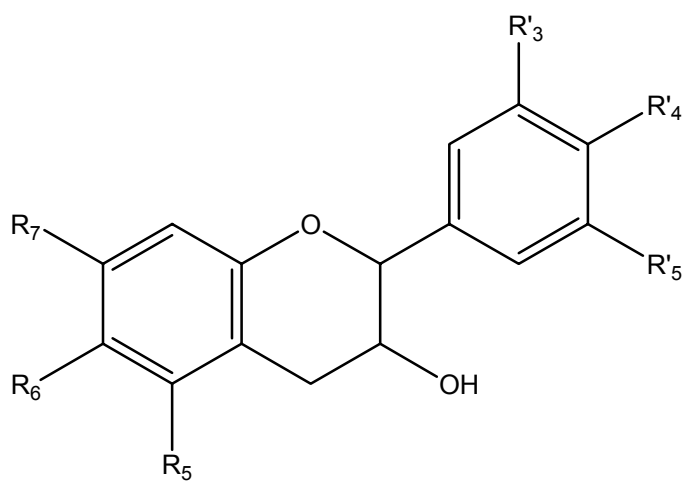
Figure 8.4 : Structure de base des flavonoïdes : la phényl-2 benzopyrone

Le terme ‘flavonoïde’, utilisé pour la première fois par GEISSMAN et HINREINER [137], regroupe tous les composés dont la structure est basée sur celle de la flavone, phényl-2 benzopyrone (figure 8.4). Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2, 4', 6' – tétrahydroxychalcone (figure 8.4) [138]. Par action enzymatique, cette chalcone se métabolise en différentes classes de flavonoïdes [139,140] dont la structure varie selon le degré d'oxydation du squelette de base et la position des substituants sur le noyau central [130]. Les plus importantes sont les flavones et flavonols, pigments jaunes, les anthocyanidines, pigments bleus et rouges des fleurs et des fruits, les catéchines, les flavanones, les flavanols, chalcones, isoflavones etc... (figure 8.5).

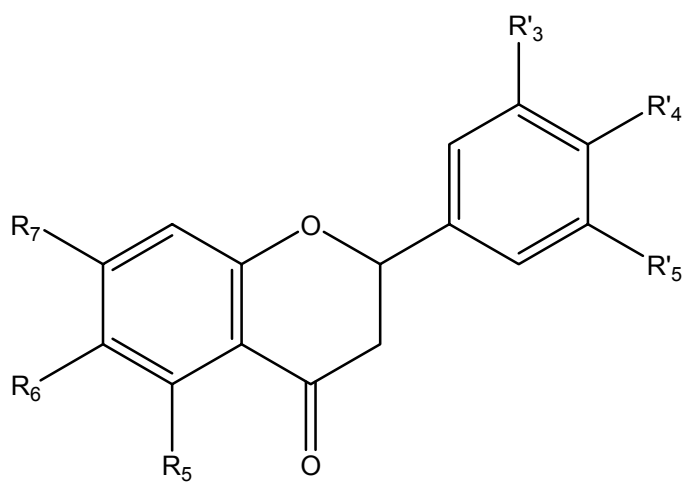




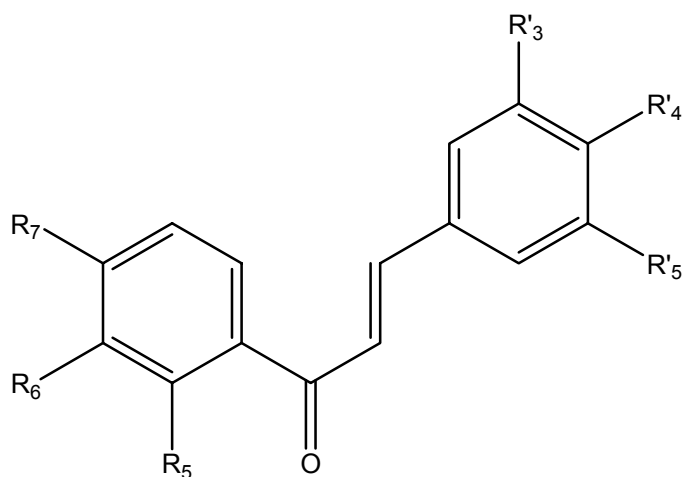
Anthocyanidines



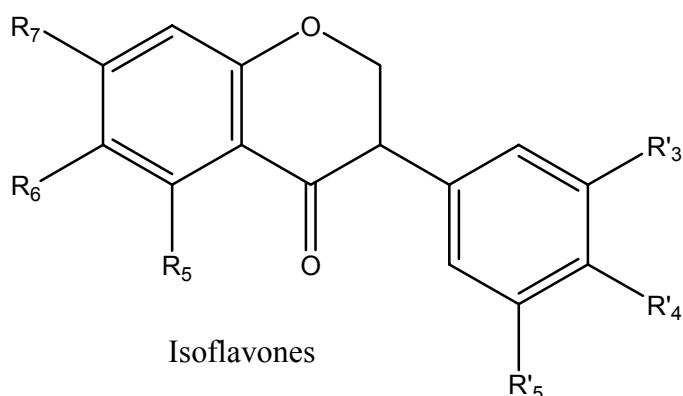
Flavan-3-ols ou catéchines



Flavanones



Chalcones



Isoflavones

Figure 8.5 : Structures des différentes classes des flavonoïdes

8.4. Flavones et flavonols

La flavone, dont la structure de base est une phényl-2 benzopyrone (figure 8.4), est constituée de deux noyaux benzénique A et B reliés par un hétérocyclpyrone appelé C. Les flavonols se différencient des flavones par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 qui est le seul à ne pas être phénolique. Une oxydation supplémentaire sur les cycles A et B n'altère pas la nomenclature du type de flavonoïde. Le système utilisé pour numéroter les carbones et dénommer les cycles nomenclature (IUPAC) est le même pour les flavones et flavonols (figure 8.4).

Des noms communs sont souvent utilisés pour désigner les différents flavonoïdes. Ils découlent généralement de leur plante d'origine, par exemple la tricine qui a été isolée à partir du tritium, la quercétine isolée du quercus, la rotoïnétine du robinia [141].

Dans chaque classe, les composés se distinguent par le nombre et la position des hydroxyles, méthoxyles et autres groupements qui se substituent sur les cycles A et B. le cycle A de la majorité des flavonoïdes est substitué par des groupements hydroxyles en position 5 et 7 et plus rarement par des groupements méthoxyles. Le cycle B est souvent substitué par un, deux ou trois hydroxyles ou méthoxyles.

8.5. La glycosilation des flavonoïdes

Les composés flavoniques existent majoritairement dans les plantes sous forme de glycosides, c'est à dire qu'un ou deux de leurs groupements hydroxyles sont reliés par un lien semi-acétol à un sucre formant des flavonoïdes O- glycosilés. Si théoriquement la molécule glucidique peut être fixée sur n'importe quel groupement hydroxyle du flavonoïde, certaines positions seront privilégiées. Dans le cas des flavones, le sucre est généralement située en 7 et chez les flavonols la position 3 est favorisée [130].

Le composé libéré du sucre, nommé aglycone, est généralement peu soluble. La glycosilation augmente la solubilité et la stabilité des molécules, notamment celles les plus hydroxylées. Par exemple, la quercétine et la myricétine sont sensibles à l'oxydation catalysée par les phénoloses, alors que leurs dérivées 3-O-glycosilés sont stables [142].

La forme cyclique des glucides est généralement un pyrane à six chaînons. Par cyclisation du sucre, un nouveau stéréocentre appelé carbone (C_1) est formé donnant deux anomères désignés par α et β . La liaison avec l'aglycone, de type β , se fait avec le C_1 du glucide par l'intermédiaire d'un atome d'hydrogène (figure 8.6). Les flavonols, et plus particulièrement le kaempférol et la quercétine, offrent la plus grande diversité de liaisons entre les molécules glucidiques et l'aglycone [130].

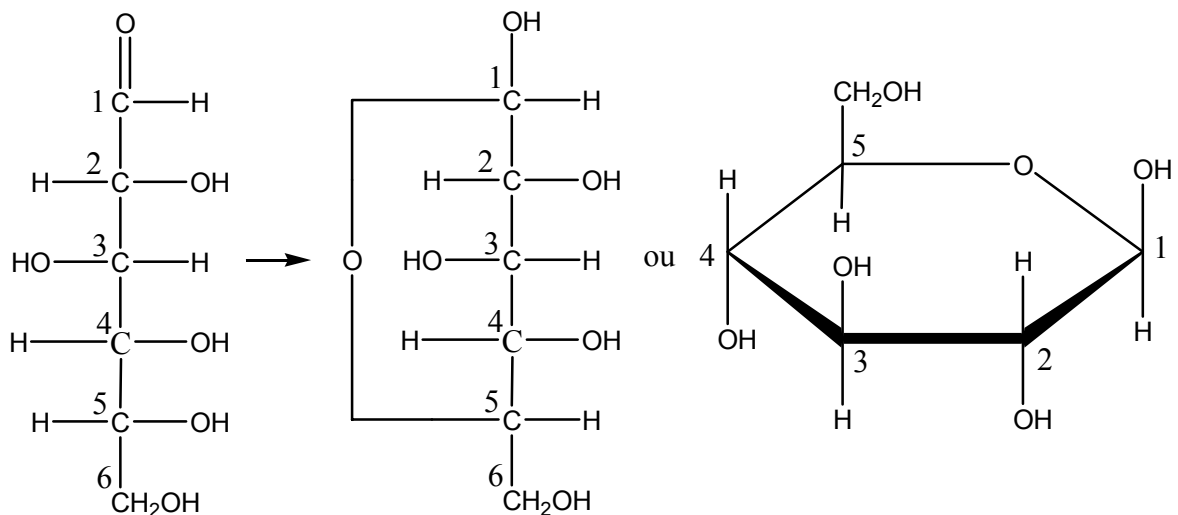


Figure 8.6 : Réaction de cyclisation du glucose et numérotation des sucres

On trouve également des flavones C-glycosides qui se distinguent des O-glycosides comme leur nom l'indique par un sucre directement relié par son carbone C₁ au carbone C₆ ou C₈ du noyau flavonique (formation d'une liaison C-C). Un tel sucre ne se sépare pas de l'aglycone par hydrolyse acide. Dans le cas des flavonoïdes glycosylés, les carbones du sucre sont numérotés avec un double prime «'»'. Dans l'alimentation, les flavonoïdes glycosylés sont généralement plus abondants que les aglycones, ils sont mieux absorbés par l'organisme et ont un effet prédominant sur la quantité de composés présents dans le plasma. La position du sucre sur l'aglycone entraîne des différences de biodisponibilité et/ou de métabolisme entre les différents flavonoïdes glycosylés [143].

La conjugaison entre les cycles A et B de la molécule, qui joue un rôle important dans l'activité anti-oxydante des flavonoïdes, n'est modifiée par la glycosylation en position 3, alors qu'un sucre substitué en position 4' affecte cette relation de conjugaison [144].

8.6. Formation de liaisons hydrogène

Les flavonoïdes sont le siège d'associations inter et intramoléculaires importantes par le biais de liaisons hydrogène qui peuvent modifier leurs propriétés physiques (points de fusion, d'ébullition,...), leurs propriétés chimiques (transfert de protons, solubilité,...) et leurs propriétés spectroscopiques [130].

8.7. Propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un ensemble de propriétés importantes et sont de plus en plus étudiés dans de nombreux domaines, tels que la physiologie, la biologie, la botanique, la chimie, la pharmacie et la technologie alimentaire.

Les flavonoïdes semblent exister dans la nature depuis plus d'un million d'années et ont suivi l'évolution des organismes au cours du temps [145]. Cette très longue association entre les flavonoïdes et différentes espèces à travers l'évolution rend compte de l'extraordinaire gamme d'activités biochimiques et pharmacologiques de ces substances dans les organismes vivants. Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans les plantes [146]. Premièrement reconnus comme les pigments responsables des teintes automnales et des nombreuses nuances de jaunes, oranges et rouges des fleurs, les flavonoïdes sont également présents dans les fruits, les légumes, les graines et les tiges. Comme exemple, le thé est une source très riche en flavonoïdes. Une alimentation journalière équilibrée en contient 1 gramme de flavonoïde [147]. Pharmacologiquement, cette quantité peut fournir des concentrations significatives dans les fluides et les tissus corporels [147].

8.7.1 Activité biologique des flavonoïdes dans les règnes végétal et animal

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la biochimie et la physiologie des plantes. Ils agissent comme antioxydants, inhibiteurs d'enzymes et précurseurs de substances toxiques [140].

En 1938, Szent-Gyogyi montra le rôle important joué par les flavonoïdes dans la respiration des végétaux qui les synthétisent [148]. On suppose désormais qu'ils exercent

cette action en tant que catalyseurs du transport d'électrons au cours de la photosynthèse ou en tant que régulateurs de la phosphorylation des canaux ioniques [149,150]. De plus, ces composés sont impliqués dans photosensibilisation et le transfert d'énergie, dans l'action des hormones et des régulateurs de croissance des plantes, dans la morphogenèse et dans les défenses contre l'infection [151].

Des études ont montré que les flavonoïdes activent la modulation des gènes des bactéries impliquées dans le contrôle de la fixation de l'azote, ce qui suggère que les flavonoïdes sont en relation étroite avec l'activation et l'expression des gènes [152-155].

Les flavonoïdes sont responsables de la majorité des couleurs des fleurs présentes dans la nature et suscitent ainsi l'attraction des insectes pour la pollinisation. Chaque classe de pollinisateurs préfère une couleur particulière: les abeilles sont attirées par les fleurs bleues alors que les papillons préfèrent les fleurs roses ou mauves. Les flavonoïdes glycosylés jouent un rôle important dans la stimulation alimentaire et sont utilisés particulièrement par les insectes phytopages pour reconnaître leurs plantes nourricières. Leur activité alimentaire semble provenir de la structure glycosyle plutôt que des structures de l'aglycone. La nature du sucre est essentielle dans cette activité alimentaire puisqu'une même aglycone substituée par des sucres différents peut devenir inactive pour l'insecte. Par exemple, pour le bombyx mori, l'isoquercétine est un stimulant alimentaire, alors que la rutine n'a aucun effet et que la quercétine-3-O-rhamnoside le repousse [156].

Dans le règne animal, l'alimentation constitue un apport en flavonoïdes pouvant avoir un rôle biologique important compte tenu de leurs nombreuses propriétés. Par exemple, une accumulation de flavones et de leurs glucosides dans les ailes des papillons contribuent à les colorer. Dans ce cas, les flavones proviennent des feuilles dont se sont nourries les chenilles [157]. La propolis des abeilles renferme des flavonoïdes, en particulier de la pinocembrine, de la quercétine, de la chrysin et de la galangine. Ces insectes les fabriquent à partir des sécrétions des bourgeons de certains arbres qu'ils modifient par leurs enzymes salivaires. Ils mettent instinctivement à profit ses propriétés antifongiques et antibactériennes pour aseptiser leurs ruches et en boucher les fentes [158]. Longtemps, les propriétés cicatrisantes et anti-infectieuses de ces substances ont été utilisées par les Egyptiens, les Grecs, les Romains et les Incas et dernièrement des auteurs ont préconisé leur utilisation en dermatologie et cosmétologie [158].

Certains flavonoïdes inhibent la croissance et le développement de certains insectes. Les glycosides ont une activité du même ordre que les aglycones correspondants. Les quantités d'insecticides synthétiques utilisées pour prévenir la dévastation des cultures par les insectes phytogènes sont très coûteuses et causent des problèmes environnementaux, tels que la toxicité résiduelle des cultures et des sols. De plus, des problèmes de résistance des insectes à ces pesticides apparaissent. Les mécanismes par lesquels les insectes interagissent avec les produits chimiques des plantes, tels que les flavonoïdes, sont divers. Ces composés peuvent être toxiques pour les insectes, les attirent ou les repoussent. Le fait de connaître certaines substances des plantes, qui perturbent le chemin métabolique ou le système enzymatique d'insectes nuisibles, sans affecter celui des mammifères ou des insectes utiles, peut conduire à des nouvelles méthodes d'obtention de pesticides biodégradables plus sélectif et moins toxiques pour les espèces inoffensives [140].

8.7.2. Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont depuis longtemps reconnus comme des molécules possédant un nombre remarquables d'actions biochimiques et pharmacologiques. Suggérant que ces composés peuvent affecter significativement les fonctions de multiples systèmes cellulaires. Certains d'entre eux (essentiellement dans des préparations à base de rutine, de rutoside et de quercétine) sont depuis longtemps employés empiriquement dans la pathologie circulatoire en tant que veinotonique et vasculoprotecteur [159].

D'importance historique, on note l'observation d'un mélange de deux flavonoïdes appelés citrine et possédant une activité semblable à celle de la vitamine C [160]. Le terme de vitamine P a alors été introduit pour indiquer que ce produit diminuait la perméabilité et la fragilité capillaire ainsi que les signes d'hypovitaminose C chez les animaux d'expérimentation. Bien qu'appelée vitamine P, cette substance ne répondait pas à la définition d'une vitamine. Cependant, il a été démontré que les flavonoïdes prévenaient l'oxydation de l'acide ascorbique et ainsi en augmentait l'activité biologique.

Les principales propriétés biologiques des flavonoïdes sont :

- Une action antioxydante s'effectuant par «piégeage» des radicaux libres.

- Une activité antibactérienne significative.
- Une activité anti-inflammatoire, analgésique et anti-allergique résultant de leur capacité à inhiber la formation et la libération de prostaglandines (médiateur intercellulaire de l'inflammation) et de leucotriènes (médiateur intercellulaire de l'inflammation et de l'allergie) [161-167]. Certains flavonoïdes agissent en augmentant la perméabilité capillaire [168] et d'autres, en inhibant la libération d'histamine [169,170].
- Une activité radioprotectrice attribuée au piégeage des radicaux hydroxydes [171].
- La capacité d'inhiber l'adhésion et l'agrégation plaquettaires, contribuant ainsi à réduire les tendances à la thrombose [172].
- Certaines propriétés antivirales. La quercétine par exemple réduit l'infection due à la présence de certains virus elle en diminue la réplication [173].
- Une activité anti-sécrétoire gastrique aussi efficace que la cimetidine utile dans le traitement de l'ulcère de l'estomac [174].
- Un pouvoir inhibiteur de l'aldose réductase, enzyme impliquée dans la pathologie des cataractes. Cette enzyme catalyse la réduction du glucose et du galactose en leurs polyols qui s'accumulent alors en grandes quantités au niveau du cristallin qui devient opaque [175]. Un composé tel que la rutine bloque l'aldose réductase et peut constituer un médicament complémentaire du diabète sucré [176].
- La capacité d'inhiber la protéine kinase, enzyme impliquée dans un grand nombre d'activités cellulaires et responsable entre autre de la prolifération des tumeurs [177]. Ainsi, la quercétine empêche la croissance de nombreuses tumeurs malignes [178]. Une étude consacrée à l'activité anti-tumorale des flavonoïdes et plus particulièrement aux relations entre la prolifération des cellules tumorales et la structure chimique des flavonoïdes a montré que les flavones substitués par un glucose inhibent la croissance des tumeurs, alors que les mêmes composés substitués par un rhamnose ou un lutinose en une position identique sont inactifs. L'isoquercétine est le composé le plus actif [179].
- Une activité inhibitrice de la xanthine oxydase, enzyme qui catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique responsable des crises de Gouttes [180,181]. Des

travaux épidémiologiques ont été consacrées à l'étude de la relation entre l'apport des flavonoïdes, le cancer et les maladies cardio-vasculaires [182]. A ce jour, les conclusions de ces recherches suggèrent qu'un apport élevé en flavonoïdes, tels que la quercétine pourrait réduire le risque de maladie coronarienne, mais il ne semble pas jouer un rôle important dans la prévention du cancer. Les flavonoïdes possèdent donc un très large éventail d'actions biologiques à ce jour de nombreux travaux de recherches concernant les propriétés des molécules ne cessent d'être publiés. D'importants progrès ont été faits pour tenter de comprendre leur mécanisme d'action et essayer d'établir des relations entre la structure et l'activité de ces composés [182].

8.7.3. Propriétés complexantes des flavones et flavonols

La capacité des composés phénoliques à former des complexes métaux (le fer, le magnésium, l'aluminium, le cuivre) par un processus de chélation a longtemps été utilisée dans un but analytique, notamment pour la révélation des chromatogrammes et pour le dosage de ces substances. Aujourd'hui, grâce à leurs propriétés complexantes, les flavonoïdes sont utilisés pour détecter la présence d'ions métalliques, tels que le fer [183], le zirconium, l'antimoine [184]. Il est connu depuis longtemps que le phénomène de complexation joue le rôle le plus important dans la coloration des plantes. Des études ont montré que la capacité des flavonoïdes à inhiber la croissance et le développement de certains insectes proviendrait de leurs propriétés complexantes des métaux [146]. L'activité antibactérienne des flavones est également imputée à leur aptitude à chélater les ions métalliques nécessaires au métabolisme bactérien [185].

L'activité antioxydante, notamment la propriété de la vitamine P des flavonoïdes, est reliée à cette capacité à complexer les métaux et de nombreuses applications en découlent. Plus précisément, ces molécules peuvent piéger les radicaux libres responsables de l'oxydation en complexant les ions métalliques catalyseurs de la réaction de formation de ces radicaux [186-190]. Cette capacité d'inhiber l'oxydation en complexant les ions cuivriques a été reconnue comme importante dans la protection de l'acide ascorbique présent dans les jus de fruits naturels [191,192].

Les chélates formés entre les flavones et les métaux sont plus solubles en milieu aqueux que les molécules libres. L'obtention de rutine sous une forme soluble est réalisée en complexant la molécule avec des métaux, tels que le fer, le magnésium, le cobalt qui sont des compléments nutritifs importants [193].

8.8. Les tanins

Les tanins sont connus depuis plusieurs millénaires, essentiellement pour leurs propriétés tannantes (propriétés qu'ils ont de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible). C'est le cas du tanin de châtaignier (*castanea Sp*), de chêne (*quercus Sp*). Aujourd'hui encore, ils sont recherchés pour le traitement de cuirs [194].

Historiquement, les premières caractéristiques structurales des tannins sont ceux des tanins galliques. La seconde classe de tanins hydrolysables, les ellagitanins, n'a connu son essor que vers les années 1950 avec les travaux d'élucidation de Schmidt et Meyer. Cependant, il ne s'agissait là que d'une toute petite partie lorsque l'on considère les connaissances actuelles les concernant. La découverte récente d'activités anticancéreuses et antivirales a engendré un renouveau de l'intérêt porté à cette classe de produits naturels [195,196].

8.8.1. Types des tanins

Ces composés sont par définition des composés phénoliques hydrolysables, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [194].

On distingue chez les végétaux supérieurs deux groupes de tanins différents aussi bien par leur structure que par leur origine biogénétique: les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

Les tanins hydrolysables sont des esters d'un sucre et d'un nombre variable de molécules d'acide phénolique. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide

phénolique est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxy-diphénylique (HHDP) et ses dérivées d'oxydation déhydro-hexa-hydroxydiphénylyde (DHHDP, acide chébulique) dans le cas des tanins ellagiques.

Les tanins considérés ou proanthocyanidols sont des polymères flavoniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone, le plus souvent 4→8 ou 4→6. L'unité de base peut être le catéchol ou l'épicatéchol. Les tanins condensés à la différence des galliques et ellagiques ne s'hydrolysent pas, mais forment à ébullition des composés insolubles appelés phlobaphènes ou rouge de tanin [1]. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiées dans tous les groupes végétaux, gymnospermes et fougères compris (figure 8.7).

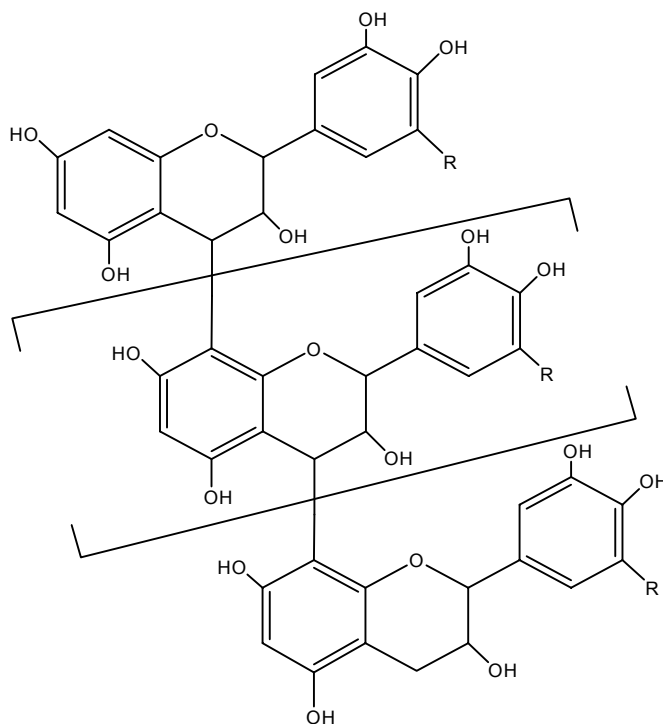


Figure 8.7 Structure des tannins condensés

8.8.2. Activité biologique des tanins

La plupart des propriétés biologiques des tanins sont liées au pouvoir qu'ils ont de former des complexes avec des macromolécules en particulier avec les protéines. Cette propriété semble être essentielle dans leurs activités à l'encontre des virus. Ainsi, leur association avec les protéines de surface des virus ou des cellules hôtes serait à l'origine de la diminution de la charge virale.

De telles activités ont été trouvées à l'encontre de l'herpès [198] et en particulier contre le HIV ou SIDA [195]. L'acide chébulagique extrait de *terminalia chebula*, par exemple, utilise ce mode d'action contre le HIV. Egalement, il apparaît que les tanins agissent en inhibant des enzymes essentielles à la réplication du virus, comme l'acide ellagique inhibiteur de la 'VHI transcriptase reverse' ou l'acide chébulagique et la corilagine, extraits de deux espèces de *phyllanthus*, inhibiteurs de la ADN polymérase du virus Epstein-Barr [196].

De façon plus générale, les tanins sont des inhibiteurs enzymatiques de l'élastase, de l'histidine décarboxylase et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine [194].

L'acide chébulagique est réputé comme inhibiteur de la topoisomérase I et surtout II de l'ADN humain [199]. Ce dernier possède également la propriété, qu'ont de nombreux autres tanins ellagiques, d'être cytotoxique à l'encontre de lignées cellulaires cancéreuses [199]. Plus récemment, des propriétés antiplasmodiales ont pu être trouvées. L'extrait méthanolique d'écorces de *tristianopsis calobuxus* de Nouvelle Calédonie, contenant de nombreux tanins, a donné des résultats prometteurs.

L'acide ellagique est l'un des composés actifs [200]. Plusieurs drogues à tanins existent mais leurs applications restent restreintes. Elles sont utilisées par voie interne pour leur effet anti-diarrhéique et par voie externe pour imperméabiliser les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes. Elles ont également un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. En limitant la perte en fluides et en empêchant les agressions extérieures, les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet antiseptique (antibactérien et antifongique) clairement démontré de ces molécules est intéressant (diarrhées infectieuses, dermatose,...) [194].

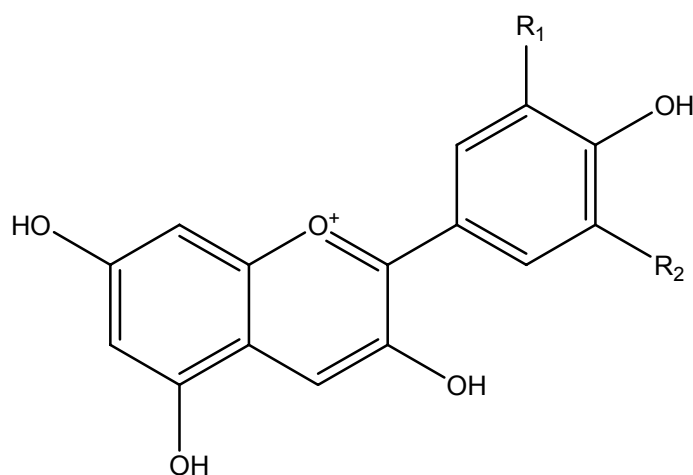
D'autres tanins sont aussi connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. En effet, l'acide chébulagique ou la corilagine extraits de *terminalia citrina* (plante utilisée dans la médecine traditionnelle Thaïlandaise) présentent de nombreuses activités à l'encontre de souches pathogènes de l'homme, comme *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsielle pneumoniae*, *Candida albicans* ou encore *Enterococcus SPP* [201].

Enfin, les potentialités des tannins dans l'inhibition de la peroxydation des lipides ont mis en évidence leurs propriétés de piègeurs de radicaux libres et d'inhibiteurs de la formation de l'ion super oxyde (inhibiteurs de la xanthine oxydase).

8.9. Les anthocyanes

Les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans la coloration des fruits et des fleurs. Ces pigments rouges hydrolysables sont caractérisés par un noyau de base: le noyau flavylum (phenyl-2 benzopyrilium) qui peut être hydroxylé, méthylé, acylé ou glycosylé (figure 8.8). Les anthocyanes sont situées dans les vacuoles, où elles peuvent être intégrées dans les structures appelées anthocyanoplastes [202].

L'aglycone, groupement chromophore, est appelée anthocyanidol. Il est généralement substitué, notamment glycosylé en position 3, ce qui a pour effet de stabiliser le pigment, évitent sa décomposition rapide en composés incolores [203].



Anthocyanidol	R ₁	R ₂
Pélagonidol	H	H
Cyanidol	OH	H
Delphinidol	OH	OH
Péonidol	OCH ₃	H
Pétunidol	OCH ₃	OH
Malvidol	OCH ₃	OCH ₃

Figure 8.8 : Structure de base des anthocyanes

8.9.1. Propriétés pharmacologiques des anthocyanes

Comme les flavonoïdes, les anthocyanes sont considérés comme des facteurs vitaminiques P et sont utilisés comme protecteurs capillaro-veineux. Par ailleurs, les anthocyanes induisent une augmentation de la régénération physiologique du pourpre rétinien. Par électrorétinographie on montre qu'ils accélèrent l'adaptation de la rétine à la vision nocturne.

Une autre application des anthocyanes est liée à leurs propriétés colorantes. Composés atoxiques et ne représentant qu'un nombre réduit d'incompatibilités, ils sont utilisables comme colorant pharmaceutique et alimentaire.

8.10. Autres composés phénoliques

Les autres composés phénoliques comprennent les flavanones qui présentent la même structure que les flavones à la différence de l'absence de double liaison sur l'hétérocycle C. La présence d'un hydroxyle en position 3 sur ces dernières caractérise les flavanols ou dihydroflavonols.

On trouve également les chalcones et les dihydrochalcones et qui sont caractérisés par l'ouverture de l'hétérocycle C (figure 8.9).

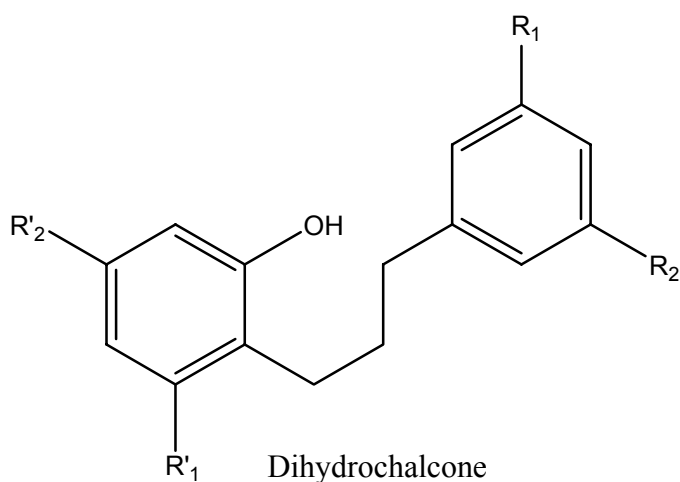


Figure 8.9 : Structure de base des dihydrochalcones

CHAPITRE 9

ANALYSE ET CARACTERISATION DES POLYPHENOLS

9.1. Extraction des phénols

Les solvants utilisés sont choisis suivant la polarité des flavonoïdes à étudier. Les solvants moins polaires sont particulièrement utiles pour l'extraction des aglycones flavonoïdiques, tandis que les solvants plus polaires sont utilisés pour les flavonoïdes glycosylés, les tanins et les anthocyanes.

Les flavonoïdes glycosylés, les flavones hydroxylés et les flavonols sont généralement isolés des plantes par extraction à l'acétone, à l'alcool, à l'eau ou par combinaisons de ces derniers [204-206]. Les aglycones moins polaires comme les flavones et les flavonols très méthylés, sont usuellement extraits avec des solvants, tels que le benzène, le chloroforme, l'éther éthylique ou l'acétate d'éthyle.

9.2. Les techniques de séparation

Les méthodes chromatographiques restent les techniques les plus importantes pour la séparation et la détection des flavonoïdes des extraits bruts de plantes. Les différentes méthodes chromatographiques CP, CL, CCM, CPG, CLHP, ont toutes été appliquées à la séparation des composés flavonoïdiques.

La nature de la plante, degré de la maturité, le climat et la méthode de l'extraction et aussi le solvant utilisé influent tous sur la quantité et le type de polyphénols contenus dans l'extrait d'un tissu.

La quantité des phénols totaux dans un extrait est déterminée en utilisant la méthode de FOLIN-CIOCALTEU. Cette méthode est basée sur la réduction d'un mélange de deux acides: l'acide phosphotungstène ($H_3PW_{12}O_{14}$) et l'acide phosphomolibdique ($H_5PMo_{12}O_{14}$), à un mélange de deux oxydes bleus de tungstène (W_8O_3) et molybdène (Mo_8O_3) et cela en présence des phénols. Les oxydes bleus absorbent la lumière visible à une longueur d'onde $\lambda = 775$ nm. l'intensité de l'absorbance dépend de la quantité des oxydes formés de la réaction de réduction, donc de la quantité des phénols dans l'extrait. Une courbe d'étalonnage d'un phénol standard est nécessaire pour réaliser le dosage. La séparation et le dosage des phénols individuels nécessitent l'utilisation des méthodes chromatographiques.

9.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode efficace pour la séparation et la détection des phénols des extraits bruts de plantes. Les absorbants utilisés sont des gels de silice, de cellulose ou encore, des gels de polyamides. Les solvants utilisés sont de composition très variable.

9.3.1. Séparation sur gel de silice

De nombreux systèmes de solvants peuvent être mis en jeu pour l'élution. Le degré de polarité du solvant dépend du degré de substitution des polyphénols. Les flavones di- et tetra-hydroxylées partiellement ou non méthoxylées des agrumes ont été séparées de deux systèmes de solvants [207], d'une part, benzène: dioxane: acide acétique (90:25:14 V/V/V), et d'autre part n-hexane: n-butanol (17:3 V/V).

D'autres systèmes binaires et ternaires de solvants ont aussi été appliqués sur des composés phénoliques (flavones) de même type, il s'agit de n-butanol: n-hexane (3:17 V/V) [78], toluène: chloroforme: acétone (8:5:7 V/V/V) [208] benzène: pyridine: ammoniac(80:20:1 V/V/V) [209,210].

Deux autres systèmes sont très utilisés à la séparation des flavonoïdes à savoir acétone: acide acétique: eau (3:1:1 V/V/V) et le toluène: acétone: acide formique (4,6:4:1 V/V/V) [211].

Le tableau 9.1 résume les systèmes de solvants utilisés en chromatographie sur couche mince de silice pour la séparation des aglycones flavonoïques et flavonoliques avec ou sans groupements méthoxyles.

Tableau 9.1 : Système de solvants rencontrés dans la littérature (CCM)

Système de solvants	Composition
benzène : acétone	3/1
benzène : acétone	49/1
n-hexane : acétone : n-butanol	8/1/1 et 17/2/1
benzène : méthanol : n-butanol	45/3/2
n-hexane : butanol	17/3
benzène : dioxane : acide acétique	90/25/4
benzène : pyridine : acide formique	72/18/10
chloroforme : méthanol	15/1
chloroforme : acétate d'éthyle	1/1
benzène : acétone : acide acétique	45/5/2
chloroforme : acide acétique	99/1
benzène : pyridine : ammoniac	80/20/1
toluène : chloroforme : acétone	8/5/0,7
benzène : méthanol : tétra chlorure de carbone	20/3/0,7
chloroforme : n-hexane : méthanol	40/40/3
benzène : acétate d'éthyle	6/4
n-hexane : n-butanol	85/15
chloroforme : acétate d'éthyle : acétone	5/4/1 et 5/1/4
benzène : acétate d'éthyle	3/1
benzène : acétone	92.8/7,2

9.3.2. Séparation sur gel de polyamide

La séparation sur polyamide des flavonoïdes par le processus de partition ou d'absorption dépend du type de solvant utilisé. Les solvants lipophiles sont préférables aux solvants aqueux pour la séparation d'aglycones selon leur degré d'oxydation ou de méthylation.

Les mélanges de solvants sont essentiellement à base de benzène, méthyléthylcétone, méthanol, éther de pétrole et le chloroforme.

Le kaempférol (3, 5, 7, 4')-tétrahydroxyflavone a été séparé des anthyllis vulnéraria (papilionacées) [212,213] en utilisant le mélange benzène: méthyléthylcétone:méthanol (4:3:3 V/V/V).

Le kaempférol 7-méthyléther a été isolé par CCM sur polyamide en utilisant le mélange chloroforme: butanone: méthanol (100:0,3:0,6 V/V/V) [214].

Pratiquement, tous les dérivés méthylés de la quercétine ont été distingués sur deux chromatographies dans les solvants benzène: éther: méthyléthylcétone: méthanol (60:26:7:7 V/V/V/V) et benzène: méthyléthylcétone: méthanol (40:30:30 V/V/V) [215].

Le benzène a été remplacé par certains auteurs par le toluène qui est moins toxique. Ainsi, les solvants toluène: éther de pétrole: méthyléthylcétone: méthanol (30:90:2:1,5 V/V/V/V) et (30:60:5:5 V/V/V/V) ont été utilisés pour les flavonoïdes très méthoxylés [216].

Différents aglycones des flavones et flavonols ont été testés sur le même solvant quelque peu modifié [217]. Les composés polaires ont été chromatographiés avec les systèmes toluène:méthanol:méthyléthylcétone:acétylacétone (40:30:20:10 V/V/V/V) et toluène:dioxane:méthanol (80:10:10 V/V/V) [218,219].

9.3.3. Séparation sur couche mince de cellulose

La CCM de cellulose des aglycones de composés flavonoïques, moins utilisés que les deux précédentes, fait souvent intervenir des solvants à base d'acide acétique. Barberar et

al[220] ont mis en évidence des différences dans le comportement chromatographique avec 30 et 60% d'acide acétique de 14 flavones ayant de groupes hydroxyles libres en position C-6 ou C-8 du squelette de la flavone. Les 6-hydroxyflavones ont donné des valeurs R_f plus basses que les 8-hydroxyflavones.

L'acide acétique à 50% a permis à des chercheurs [221] de contrôler les compositions en flavonoïdes d'extraits chloroformiques de *Thymis bacticus*. EGGER [222] a utilisé le solvant chloroforme:acide acétique:eau (4:1:5 V/V/V) sur des flavones et flavonols, plus tard modifié par MARKHAM et PORTER [223] qui ont recommandé le mélange chloroforme: acide acétique:eau (10:9:1 V/V/V) pour des composés similaires. Un système à base de benzène a été préconisé [224] pour les aglycones flavoniques. Il s'agit de benzène:acide acétique:eau (125:72:3 V/V/V).

JANGARD [225] a proposé des séparations sommaires avec à côtés de l'acide acétique à 10%, de l'acide formique à 2% et un solvant faisant intervenir une base, isopropanol: ammoniac:eau (8:1:1 V/V/V).

D'autres systèmes ont donné des séparations correctes, n-butanol:acide chlorhydrique 2N (1:1 V/V), alcool amylique:acide acétique:eau (2:1:1 V/V/V), acétate d'éthyle:acide formique:eau (8:2:3 V/V/V) [226].

9.3.4. Révélation des flavonoïdes

Après leur migration, on visualise les taches à l'aide de révélateurs plus ou moins spécifiques. La lumière ultra-violette (lumière de Wood à 365 nm) est un révélateur sensible surtout si la chromatoplaque a été pulvérisée au préalable avec une solution de réactif.

Avec des dérivés flavoniques, l'acide sulfurique en solution dans l'éthanol agit sur les noyaux chromones, donnant des sels d'oxonium d'une fluorescence jaune qui sous 365 nm, présentent des colorations différentes selon le type du substituant hydroxyle/méthoxyle et leurs positions sur le squelette de la flavone [227]. Les flavones, sont susceptibles de donner des complexes avec les sels métalliques, en particulier le

trichlorure d'aluminium en solution méthanolique [221,227]. Les dérivés flavoniques donnent une coloration jaune intense ainsi qu'une fluorescence jaune verdâtre sous UV.

D'autres révélateurs moins utilisés peuvent être envisagés. Il s'agit du chlorure d'antimoine III en solution dans le chloroforme [228,229], des vapeurs d'ammoniac [221] et d'un réactif de Neu [230] appelé «Naturstoffreagenz A» [221].

9.4. Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est à ce jour la technique la plus utilisée pour l'isolation des grandes quantités de flavonoïdes de leurs extraits bruts des plantes. Les absorbants utilisés pour la séparation des flavonoïdes sont : le gel de silice, cellulose, alumine, polyamides, sephadex et les résines échangeuses d'ions [231,232].

9.4.1. Gel de silice

Le gel de silice est traditionnellement utilisé pour séparer les isoflavones, flavonones, dihydroflavonols et flavones et flavonols très méthoxylées. On peut citer plusieurs exemples dans ce cadre. La formononetine, afrormosin et la texasine sont isolées de l'extrait *baptisia australis* par chromatographie sur colonne de silice, en utilisant le chloroforme et l'éther ou l'acétate d'éthyle de polarité croissante [233]. Les flavones méthylées de l'extrait acétonique des racines de *andropholis paniculta* sont séparées sur gel de silice, l'éluant benzène : hexane (3:11 V/V) a donné apéginine 7, 4' – diméthyl éther, avec le benzène seul donne 5-hydroxy-7, 8, 2', 3' – tétraméthoxyflavone et avec le chloroforme-méthanol (20:0,8 V/V) le produit isolé est le andrographolide [234]. En utilisant le chloroforme et un mélange chloroforme:méthanol (99,5:0,5 V/V), THOMAS et MABRY ont isolé sur une colonne de SiO₂ plusieurs flavones méthoxylées, hymenoxine, scaposine et déméthoxysudachitine [235]. Avec une petite quantité du méthanol dans le chloroforme jusqu'à 5% (V/V), le 6-méthoxylutéolin et ses dérivés méthylés sont successivement séparés des extraits de certaines espèces de *eupatorium* [236]. Les solvants les moins polaires comme benzène:chloroforme (5:2 V/V) et benzène:éther (5:1 V/V), sont respectivement utilisées pour séparer des flavones:nevadensine

(5,7-OH, 6,8,8,4'-OMe) et pectolinarigenine (5,6-OH,7,4'-OMe) de l'extrait chloroformique de *Iva nevadensis* [237]. Un nombre limité de flavonoïdes glycosylés est purifié sur une colonne de gel de silice. Par exemple, le C- et O- glycosides de daïdzeine sont séparés sur gel de silice en utilisant comme solvants l'acétate d'éthyle et l'acétate d'éthyle:méthanol (19:1 V/V) [238]. Les glycosides de la flavanone de naringenine sont élués du gel de silice en utilisant le benzène:méthanol (9:1 V/V) [239]. Il est clair que le gel de silice est toujours absorbant utilisé pour la séparation des flavonoïdes peu polaires comme les aglycones et les flavonoïdes méthylés.

9.4.2. Gel de sephadex

Le gel de hydroxy propylated dextrine, sephadex LH-20, est le type le plus utilisé pour la séparation des flavonoïdes (aglycones ou glycosides). L'élution se fait avec des solvants organiques polaires ou des mélanges eau/solvants, généralement le mélange eau:méthanol est plus utilisé. La quercétine 3,7-diglycoside, la lutéoline 7,7,4'-diglycoside, la quercétine 3-glucoside et la lutéoline et l'apigénine 7-glucosides sont éluées de *Vernonia baldunii* suivant cet ordre d'une colonne de sephadex LH-20 avec le méthanol [240].

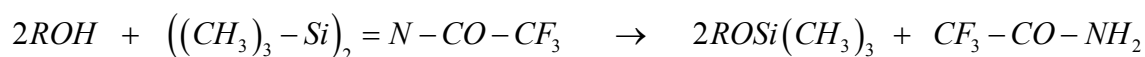
9.5. Chromatographie en phase gazeuse

L'analyse directe par chromatographie en phase gazeuse (CPG) est restreinte à quelques aglycones thermiquement stables et suffisamment volatils, tels que les polyméthoxyflavones (avec ou sans groupement hydroxyle en position C-5 du squelette de la flavone). L'analyse CPG des flavones de quelques agrumes fournit une corrélation entre la structure de la flavone et le temps de rétention. Ainsi, les temps de rétention des flavones ayant un groupement méthoxyle sur le cycle B sont plus courts que ceux des flavones ayant deux groupements méthoxyles. Le temps de rétention ne change pas avec l'introduction d'un méthoxyle en position C-8. Quand le mode de substitution sur le cycle B est le même, les temps de rétention des flavones trisubstituées en 5,6,7 sont plus faibles que ceux des flavones 5,7,8 – trisubstituées. La phase stationnaire utilisée est du type classique de 2m x 3mm à 1% OV-17 et le détecteur utilisé est à ionisation de flamme (FID) [241].

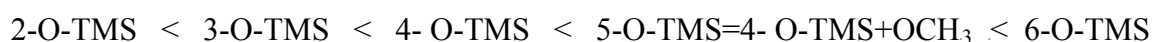
La chromatographie en phase gazeuse interdit l'analyse directe de la plupart des phénols substitués, non volatils et thermiquement instables. Bien que cette technique n'est pas très utilisée pour l'analyse ou l'isolement des flavonoïdes, elle est acceptable pourvu que le polyphénol soit dérivatisé afin d'augmenter sa volatilité. Les dérivés méthylés et triméthylsilylés (TMS) ont été préparés pour l'analyse en CPG sur colonne non polaire. La CPG des dérivés méthylés et triméthylsilylés des hydroxyflavones le sont sur phase liquide mixte (OV-1+OV-17) [242]. Les dérivés TMS sont plus efficaces pour cette approche, bien que les dérivés méthylés et acétylés ont été aussi utilisées [242,243].

Pour la préparation des dérivés TMS, des réactifs, tels que l'hexaméthylsilazane (HMDS), diméthylchlorosilane (DMCS) et triméthylchlorosilane (TMCS) ont été employés. Ces agents silylants montrent une faible efficacité pour les flavones à substitutions multiples. Les N,O-bis (triméthyl-silyl) acetamide (BSA), un composé synthétisé par Klebe et al[243], a aussi été utilisé pour les phénols par plusieurs auteurs [245]. Le N, N-bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA) a été synthétisé par Gehike et Stalling [246] et employé comme agent actif de silylation pour beaucoup de flavonoïdes [247].

Différents procédés de silylation ont été examinés par CASTEELA et al. [248]. Ces auteurs ont rapporté une excellente séparation des dérivés de composés naturels (acides benzoïques, acides cinnamiques, coumarines, flavones, flavonols et isoflavones) où les flavones et flavonols, hormis la flavone elle-même et la rhamnétine (flavone méthoxylée en C-7 étaient 5,7 – dihydroxylés. Par utilisation de BSTFA comme agent silylant pour lequel la réaction :



a été proposée, une colonne de verre remplie de chromosorb WAWDMCS (80-100 mesh) enrobée avec 1,5% SE-30+1.5% SE-52 et une programmation de température de 80 à 300°C ont permis la séparation de 36 substances en simple passage. En considérant l'ordre d'élution, il a été trouvé pour les dérivés flavoniques la séquence suivante des temps de rétention :



exception faite pour la morine 3,5,7,3',4' – pentahydroxyflavone), où le temps de rétention de son dérivé a été trouvé plus petit que celui du dérivé TMS du Kaempférol (3,5,7,4' – tétrahydroxyflavone).

L'Analyse des dérivés silylés a été faite pour la première fois par NARASIMHACHARI et VON RUDOLFF [249]. Ces auteurs ont mené une chromatographie en phase gazeuse sur de nombreux flavonoïdes (flavones, flavonols, flavonones, chalcones, isoflavones, isoflavonones, chromones) dont des flavones et des flavonols essentiellement méthylés, en utilisant le polymère silicone SE-30 comme phase liquide qui permet de travailler à des températures supérieures à 200°C nécessaires pour les flavonoïdes de point de fusion élevé. Il a été trouvé lors de cette étude que certaines flavonones et chalcones sortent suivant 2 pics sur le chromatogramme, l'un plus intense que l'autre. Ceci est dû à une isomérisation flavonone \leftrightarrow chalcone résultant de l'analyse à haute température, résultat remarqué par d'autres chercheurs [250-252].

FURUYA [250] a séparé un mélange de flavonoïdes dont les flavones et des flavonols (dérivés en TMS) sur 1,5% SE-30 en isotherme à 240°C. Il a établi que le temps de rétention croît avec l'augmentation du degré de l'oxydation ou de l'hydroxylation.

D'autres exemples de l'utilisation de SE-30 incluent la séparation de dérivés TMS des flavonoïdes par HEMINGMAY et HICLIS [245] qui ont appliqué la CPG sur colonne remplie aux dérivés TMS pour la détermination de la dihydroquercétine (3,5,7,3',4' – pentahydroxyflavonone) qui est un aglycone contenu dans le bois de mélèze.

La phase stationnaire OV-1 a été trouvée convenable pour la CPG de dérivés TMS des flavones [242], des flavonols [252-253], des flavanones [252]. Egalement, la phase OV-101 a été utilisé par ANDERSEN et VAUGHN [253] pour effectuer des estimations quantitatives de la quercétine. Ces auteurs ont utilisé un détecteur à capture d'électron pour leur travail et ils ont remarqué 2 à 3 fois plus sensible que le détecteur à ionisation de flamme.

Neuf aglycones flavoniques triméthylsilylés ont été séparés sur une colonne remplie de phase liquide OV-17 par VAN HAELEN et VAN HAELEN-FASTRE [254]. Ces auteurs ont noté que la température et le débit du gaz vecteur requis pour élever les flavonoïdes sont incompatibles avec l'utilisation de colonnes capillaires.

GREENAWAY et al. [251] ont détecté par l'analyse couplage CG/MS, en utilisant une colonne capillaire apolaire OV-1, des aglycones flavoniques 5,7-disubstitués dans la propolis qui est un mélange complexe de composé incluant à côté des aglycones, des acides et des esters benzoïques substitués, des acides et des esters phénoliques substitués, ainsi que la cire d'abeille. Le N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacétamide (MSTFA) a été utilisé comme agent de dérivation. Il a été noté une tendance pour les flavones à être chromatographiées sous plus d'une forme et aussi pour les flavonones à se convertir en leurs chalcones correspondantes, ce qui entraîne que l'on n'est pas certain que celles-ci soient originellement présentes dans les propolis.

Dans leurs travaux par analyse CPG sur colonne capillaire, CRESAR et al. [255] ont démontré la haute résolution de cette technique en comparaison à la CPG sur colonne remplie.

Récemment, les produits phénoliques de l'huile d'olive ont été séparés et identifiés par la technique chromatographie gazeuse couplée à la masse sur des colonnes capillaires DB-5MS. L'agent de la dérivation est un mélange de bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide et triméthylchlorosilane (BSTFA-TMCS 99:1 V/V) [256-258].

9.6. La chromatographie liquide de haute performance

La CLHP a été appliquée aux séparations très complexes dans le domaine de la chimie des produits naturels. Le champ de composés qui peuvent être séparés par chromatographie liquide haute performance continue de s'étendre rapidement. Les progrès dans la portée et la souplesse de cette technique sont dus principalement à la disponibilité de l'instrumentation et aux améliorations dans l'efficacité et la nature des matériaux de remplissage des colonnes. Des informations utiles sur la théorie et sur la relation entre théorie et pratique en CLHP ont été publiées [259,260]. WARD et PETHER [261] sont les premiers à avoir introduit cette technique analytique à l'analyse des flavonoïdes.

La CLHP a été principalement utilisés pour déterminer quantitativement les constituants des plantes, pour contrôler la pureté d'échantillons naturels et pour des comparaisons chimiotaxonomiques.

C'est sans doute pour l'utilisation très large des colonnes en «phase inversée» de grande capacité que la CLHP est devenue une méthode de choix pour l'isolement des produits phénoliques.

Le choix initial d'une colonne est fonction de la classe de flavonoïdes à séparer et de la capacité de la colonne à donner de bonnes caractéristiques (reproductibilité, sélectivité). Bien que les tailles des particules puissent entraîner des différences, les tailles les plus utilisées restent 10 µm, 5 µm et 3 µm.

Les colonnes RP-18 sont utilisées dans la plupart des études sur la séparation des composés flavoniques. Cependant, BIANCHINI et GAYDOU [262] ont appliqué la CLHP en phase normale sur les flavones polyméthoxylées du genre citrus.

9.6.1. Séparation sur colonnes à gel de silice

Ce matériel de remplissage de colonne n'est pas souvent employé, mais peut être recommandé pour la séparation d'aglycones flavoniques non polaires ou faiblement polaire. La CLHP utilisant le lichrosorb Si60 comme adsorbant et un mélange n-heptane:isopropanol (60:40 V/V) comme éluant s'est avérée être une méthode efficace pour la séparation des polyméthoxyflavones présentes dans les fruits du genre citrus [262]. La tangérentine, la tétra-o-méthylscutellaréine, la heptaméthoxyflavone, la nobilétrine et la sinensétine ont été séparées et identifiées dans les extraits de peaux d'agrumes en moins de 25 minutes.

9.6.2. Séparation sur colonnes en phase inversée

Peu après l'introduction de la CLHP, de nombreuses phases stationnaires apparaissent sur le marché. Les plus importantes sont chimiquement appelées «phases stationnaires greffées» qui sont préparées par liaisons de molécules variées d'organosilanes comme l'octadécyl-trichlorosilane, l'octyltrichlorosilane ou le phényltrichlorosilane. Un des facteurs les plus importants affectant la performance des colonnes à phase greffée est la quantité de matériel organique déposé sur la surface de silice [242].

La phase stationnaire est moins polaire que la phase mobile et la procédure est appelée «chromatographie en phase inversée». Ainsi, les solutés très polaires possèdent des temps de rétention plus petits que les solutés apolaires. Pour les aglycones possédant uniquement peu de groupements hydroxyles ou les aglycones complètement méthoxylés, il est clair que la chromatographie en phase inversée n'est pas nécessairement indiquée, puisque cette classe de flavonoïdes peut être facilement séparée par chromatographie d'adsorption sur gel de silice [262]. Néanmoins, plusieurs auteurs ont obtenu d'excellentes séparations d'aglycones non polaires sur colonnes greffées octadécylsilyl ou octylsilyl. DONDI et al. [263] ont étudié le comportement chromatographique en RP-CLHP de composés flavonoïdiques pour trois colonnes différentes Lichrosorb C8 (7 μ m), Bondapack C18 (5 μ m) et Bakerbond C18 (5 μ m).

Les solvants utilisés sont généralement les systèmes méthanol/eau, acétonitrile/eau. L'addition de l'acide acétique, formique ou phosphorique améliore la séparation et empêche les traînées, mais des systèmes sans acides ont été utilisés avec succès dans un bon nombre d'études [264-266].

L'innovation technologique dans les détecteurs UV à longueurs d'ondes variables a permis un choix de longueur d'onde pour la détection quantitative et qualitative des flavonoïdes. Les longueurs d'onde les plus utilisées en UV sont 254, 280 et 340 nm.

Plusieurs auteurs [267-269] ont pris avantage de l'innovation de spectroscopie UV et utilisé des détecteurs spectroscopiques à barrettes de photodiodes. Des systèmes CLHP sophistiqués incluent maintenant des ordinateurs qui contrôlent des parties du procédé chromatographique et aussi le stockage des spectres d'échantillons pour des analyses par comparaison avec des composés de référence d'une banque de données et permet en effet de différencier les classes de composés phénoliques. Le traçage simultané du profil de l'absorbance UV dans les trois dimensions [270] peut être utilisé pour détecter les composés mineurs, même s'ils sont noyés derrière de larges pics et lever certaines ambiguïtés sur la nature des composés étudiés. Il est également devenu courant d'utiliser la CLHP couplée à la spectrométrie de masse ou à la RMN du proton qui permet d'apporter des informations complémentaires sur la nature des composés étudiés [271].

9.7. Méthodes de caractérisation

L'étude structurale de composés phénoliques fait intervenir plusieurs méthodes de caractérisation.

9.7.1. Méthodes d'hydrolyse

On distingue les méthodes d'hydrolyse par voie enzymatique qui provoquent, dans le cas de molécules glycosylées, par exemple la rupture des liaisons osidique permet de confirmer la nature du substituant osidique et sa conformation dans la molécule selon la spécificité de l'enzyme utilisée [272]. La caractérisation des os peut être également réalisée par voie d'hydrolyse chimique. Cette méthode permet de libérer les os qui peuvent ensuite être identifiés [273].

L'hydrolyse en milieu acide fort en présence d'un catalyseur, est utilisée pour identifier la nature des proanthocyanidols par rupture des liaisons interflavoniques et formation des anthocyanidols correspondants [274-275]. La caractérisation des unités constitutives des proanthocyanidols et de leur degré de polymérisation et généralement effectuée par rupture des liaisons interflavoniques en présence d'un agent nucléophile (α -toluène thiol, phloroglucinol) et un milieu acide. Lorsque l'agent nucléophile est le toluène thiol, la méthode d'hydrolyse est dite 'thiolyse' [276-278]. L'analyse du milieu réactionnel par CLHP donne la composition de l'extrait proanthocyanidolique en unités terminales et en unités supérieures et intermédiaires. Ces dernières étant libérées sous la forme de dérivés benzylthioéthers. Le degré de polymérisation moyen (DPM) de la fraction polymérique est estimé en calculant le rapport entre toutes les unités et les unités terminales.

9.7.2. Spectrométrie UV- Visible

Les composés phénoliques absorbent dans l'UV et certaines de ces molécules absorbent également dans le visible, notamment les anthocyanes (λ_{\max} =520-530nm). Ainsi, les spectres UV- visibles apportent une information sur la nature des composés

phénoliques étudiés, car on peut distinguer les trois grandes familles des phénols par les longueurs d'onde maximales d'absorption : 280nm pour les composés hydroxybenzoïques, 320 nm pour les dérivés hydroxycinnamiques et enfin les flavonoïdes sont caractérisés par la longueur d'onde de 350 nm.

La spectroscopie UV-Visible est généralement la technique la plus utilisée pour déterminer le squelette du flavonoïdes, car les spectres UV-Visible de la majorité des flavonoïdes montrent deux bandes d'absorptions maximales. La première bande est dans l'intervalle 240 - 285 nm nommée 'bande II', tandis que la deuxième se situe dans la région 300 – 400 nm appelée 'bande I'. La bande II est généralement caractéristique du cycle A (système benzoyl) et la bande I est caractéristique du cycle B (système cinnamoyl) (figure 9.1).

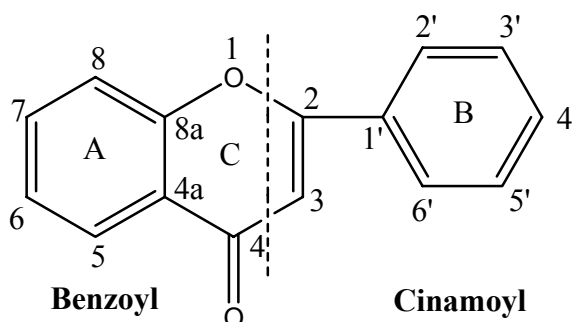


Figure 9.1 : Systèmes synnamoyl et benzoyl d'un flavonoïde

Les spectres UV-visibles peuvent également donner des indications sur leur structure (position des groupements hydroxyles et des substitutions) après addition des réactifs qui se complexent ou réagissent avec les flavonoïdes. Les réactifs utilisés dans ce cas sont le méthoxyde de sodium, l'acétate de sodium, l'acétate de sodium/acide borique, le chlorure d'aluminium et le chlorure d'aluminium/l'acide chlorhydrique. Ces réactifs créent des déplacements des spectres UV-Visible des flavones et flavonols.

En effet, l'utilisation du méthoxyde de sodium permet de détecter les groupements hydroxylés libres en position 3 et/ou 4'. Un effet bathochrome entre 40 et 65 nm de la bande I (340-360nm) est constaté par rapport au spectre UV-visible obtenu dans le méthanol.

L'addition du métoxy de sodium à un extrait méthanolique induit un léger effet bathochrome sur la bande II (250-270nm) dans le cas où le groupement hydroxylé en position 7 est libre. L'addition de l'acide borique à la solution méthanolique après addition du métoxy de sodium provoque un déplacement bathochrome de la bande I (28 nm pour la rutine) si le groupement hydroxylé en 4' est libre et les positions 3 ou 7 sont substituées. La présence de l'acétate de sodium, l'acide borique chélate tous les groupements d'hydroxyles en ortho dans les flavonoïdes sauf les hydroxyles en 5 et 6 (figure 9.2).

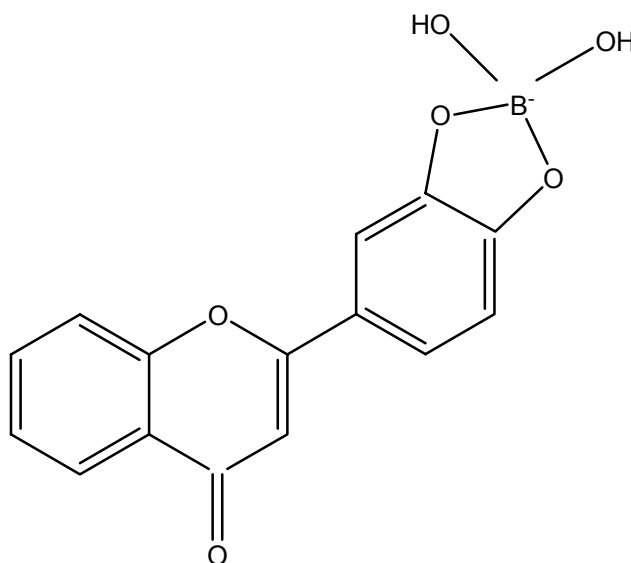
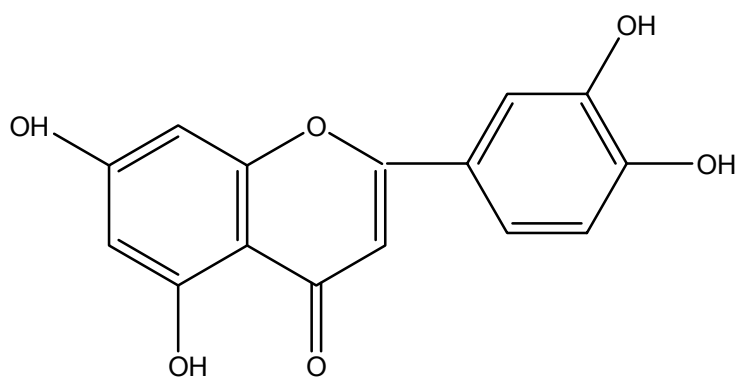
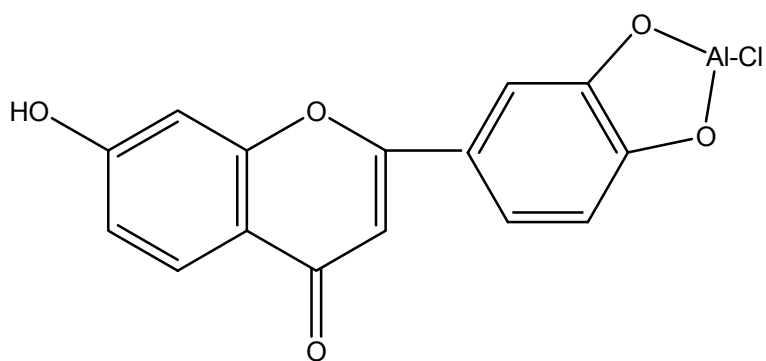
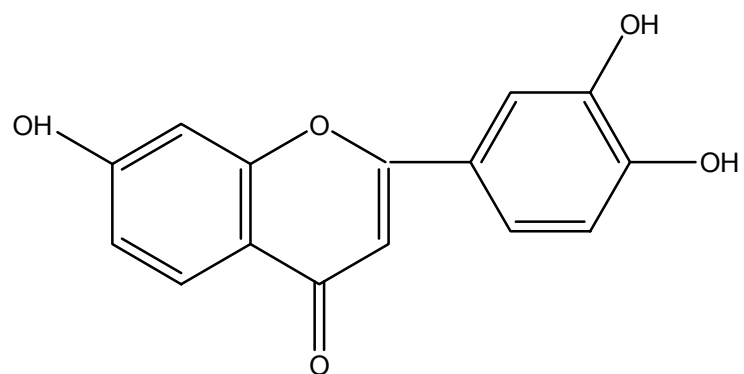
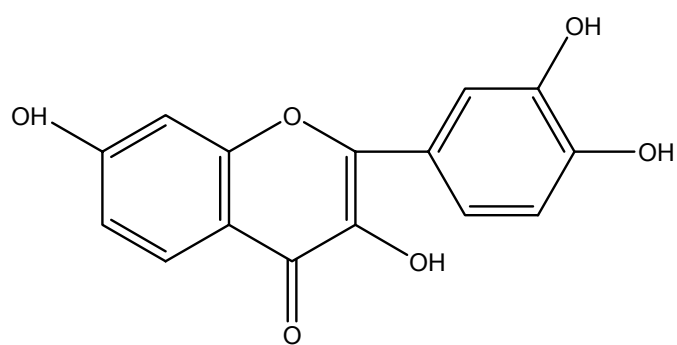
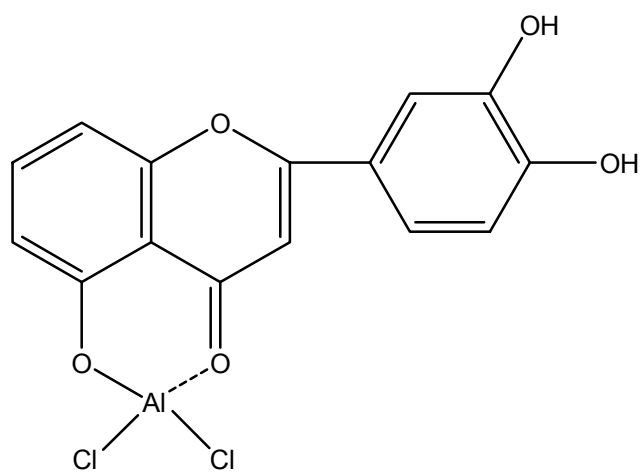
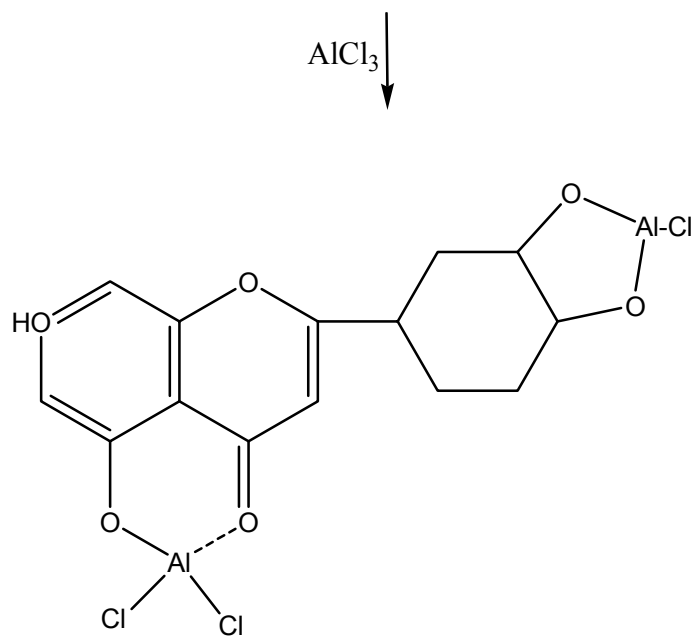


Figure 9.2 : Effet de l'acide borique

Les chalcones et flavonols qui contiennent dans le cycle B des groupements ortho-dihydroxyls montrent un déplacement important de 12-30 nm (bathochrome) dans la bande I en présence de l'acétate de sodium/acide borique.

L'addition du chlorure d'aluminium à une solution méthanolique induit des complexations provoquant un déplacement bathochrome de la bande I par rapport à la solution méthanolique. Il peut y avoir complexation entre la fonction cétone de l'hétérocycle et les groupements hydroxylés libres en position 3 ou 5. Ces complexes sont stables et résistent à l'addition d'acide. Il y a également complexation de ce sel avec les groupements ortho-dihydroxylés du noyau B. Dans ce cas, les complexes sont sensibles à l'addition de l'acide chlorhydrique à la solution et un déplacement hypsochrome par rapport au spectre enregistré avec chlorure d'aluminium est noté (figure 9.3).





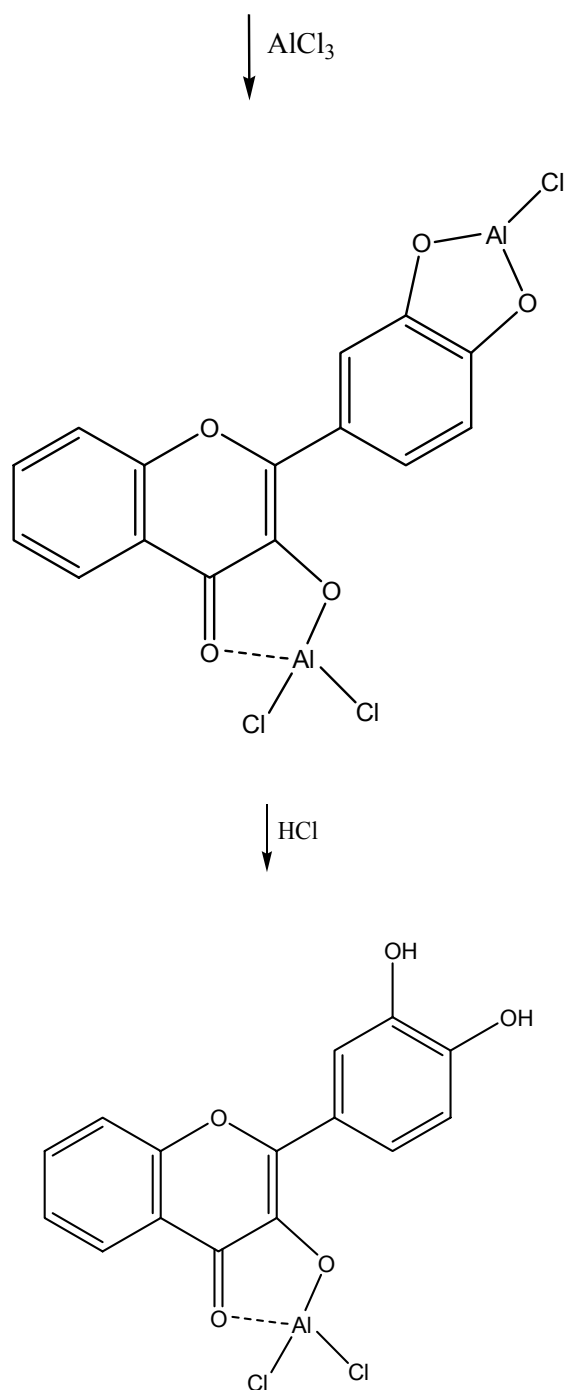


Figure 9.3 : Effet de chlorure d'aluminium et de l'acide chlorhydrique sur les flavonoïdes

Les anthocyanes qui possèdent des groupements orthodihydroxylés donnent également des complexes avec le chlorure d'aluminium. Comme ces molécules ne possèdent pas de fonction cétone sur l'éthérocycle C, il n'y a pas d'autres possibilités de complexation.

9.7.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est devenue un des outils les plus importants pour l'identification de molécules et l'élucidation de leur structure. Les dix dernières années ont été marquées notamment par l'introduction de la RMN à transformée de Fourier à haute résolution et de diverses bidimensionnelles (2D) qui ont permis d'améliorer considérablement la résolution et la sensibilité de cette technique d'analyse. La RMN du carbone 13 et du proton est utilisée en routine pour caractériser et confirmer la structure d'un composé phénolique ou pour déterminer le schéma de substitution d'un phénol.

La solubilité limitée de nombreux phénols dans les solvants chlorés ne permet pas parfois la réalisation de spectres dans l'hexadéutérodiméthylsulfoxyde (DMSO-d₆). L'inconvénient de ce solvant est que la récupération du produit est parfois difficile.

Le point de départ de l'analyse d'une molécule isolée est l'étude du spectre proton (¹H) unidimensionnel (1D) qui apporte des informations tant qualitatives que quantitatives. En effet, chaque proton d'une molécule donne un signal qui possède un déplacement chimique caractéristique et peut présenter des constantes de couplage avec les protons voisins. Des informations concernant les groupes fonctionnels et la position des ¹H les uns par rapport aux autres peuvent ainsi être obtenues. De plus, l'intégration des signaux, proportionnelles aux nombres de ¹H, permet d'accéder au nombre total de ¹H de la molécule. Dans le cas des composés phénoliques, trois zones de déplacements chimiques caractéristiques peuvent être définies correspondant respectivement aux ¹H, des cycles A, B et C [279]. Les protons 2', 5' et 6' du cycle B sont les plus déblindés par rapport aux protons du cycle A. Pour ce cycle (par exemple dans le 5,7-dihydroxyflavonoïde), les protons C-6 et C-8 du cycle A ont des déplacements chimiques voisins comprises entre 5,7 et 6,9 ppm, et des signaux apparaissent comme des doublets avec une constante de couplage $J = 2,5$ Hz. Par contre, dans le 7-hydroxyflavonoïde, le proton en plus en C-5 dans ce composé sera bien déblindé par le groupement carbonyle en C4 (figure 9.4). Un signal apparaît en un doublet à 8,0 ppm avec une constante de couplage de $J = 8,9$ Hz due au couplage ortho avec le proton H-6. Le signal H-6 sera quadruplet q:dd ($J_1 = 9$ Hz, $J_2 = 2$ Hz) et H-8 apparaît comme un doublet d ($J = 2,5$ Hz) (tableaux 9.2 et 9.3).

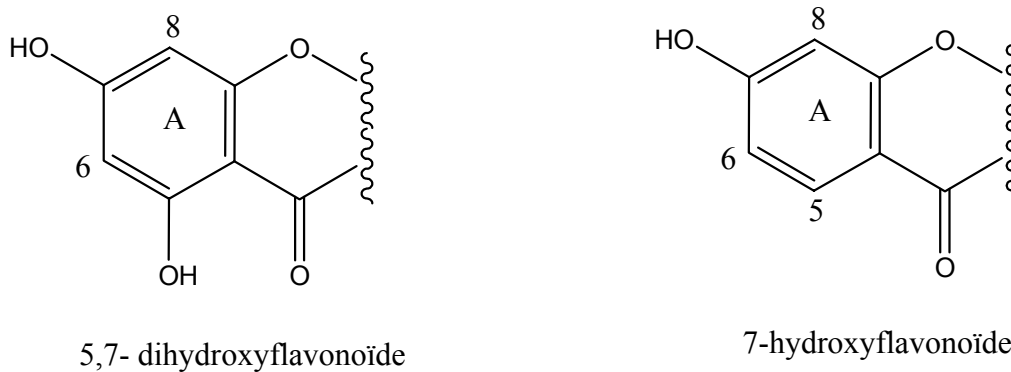


Figure 9.4 : Déplacement chimique des protons H-6 et H-8 dans 5,7- dihydroxyflavonoïde

Tableau 9.2 : Déplacements chimiques de H-6 et H-8 dans 5,7- dihydroflavonoïdes

	H-6 (ppm)	H-8 (ppm)
Flavones, flavonols, isoflavones	6,0 - 6,2 d	6,3 - 6,5 d
7-glycosides	6,2 - 6,4 d	6,5 - 6,9 d
Flavones, dihydroflavonols	5,75 - 5,95 d	5,9 - 6,1 d
7- glycosides	5,9 - 6,1 d	6,1 – 6,4 d

Tableau 9.3 : Déplacements chimiques des protons de H-5, 6 et 8 dans 5-dihydroxyflavonoïdes

	H-5 (ppm)	H-6 (ppm)	H-8 (ppm)
Flavones, flavonols, isoflavones	7,2 - 8,2 d	6,7 - 7,1 dd	6,7 - 7,0 d
Flavonones, dihydroflavonols	7,7 - 7,9 d	6,4 - 6,5 dd	6,3 - 6,4 d

En ce qui concerne les protons du cycle B, pour les 4'-oxygénés flavonoïdes, les signaux des protons des carbones C-2', 3', 5' et 6' apparaissent suite à la rotation du cycle B comme deux paires ortho couplés d ($J = 8,5$ Hz) dans l'intervalle 6,5 – 7,9 ppm (tableau 9.4).

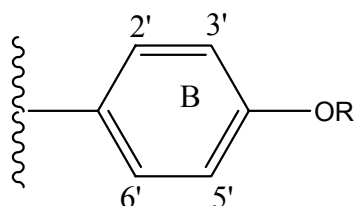


Tableau 9.4 : Déplacements chimiques des protons de H-2', 3', 6' dans 4- oxyflavonoïdes

	H-2',6' (p.p.m)	H-3',5' (p.p.m)
Flavonones	7,1 - 7,3 d	6,5 - 7,1 d
Dihydroflavonols	7,2 - 7,4 d	6,5 - 7,1 d
Isoflavones	7,2 - 7,5 d	--
Chalcones (H-2,6 et H-3,5)	7,4 - 7,6 d	--
Aurones	7,6 - 7,8 d	--
Flavones	7,7 - 7,9 d	--
Flavonols	7,9 - 8,1 d	--

Dans le cas des composés 3',4'-dioxygénés flavonoïdes, le proton C-5' dans 3',4'-dioxygénés flavones et flavonols apparaît comme signal doublet d ($J = 8,5$ Hz) dans l'intervalle 6,7 - 7,1 ppm (tableau 9.5).

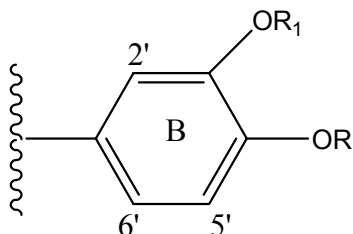
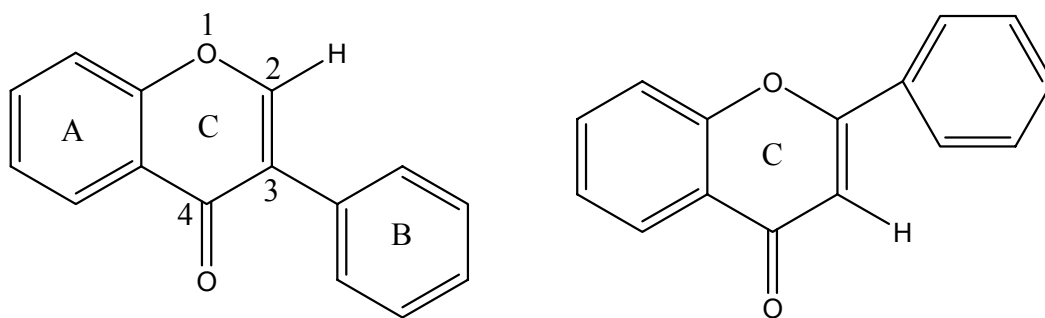


Tableau 9.5 : Déplacements chimiques de C-2' et 6' dans 3',4'-dioxygénés flavonoïdes

	H-2' (ppm)	H-6' (ppm)
Flavones (3',4'-OH et 3'-OH, 4'-OMe)	7,2 - 7,3 d	7,3 - 7,5 q
Falvonols (3',4'-OH et 3'-OH, 4'-OMe)	7,5 - 7,7 d	7,6 - 7,9 q
Flavonols (34-OMe, 4'-OH)	7,6 - 7,8 d	7,4 - 7,6 q
Flavonols (3',4'-OH,3-oglycosyl)	7,2 - 7,5 d	7,3 - 7,7 q

Dans le cas des composés 3',4'-dioxygénés isoflavones, flavonones et dihydroflavonols, les signaux des protons H-2',5' et 6' apparaissent comme multiplet dans l'intervalle 6,7 - 7,1 ppm. Le proton du C-3 dans les flavones apparaît toujours comme un signal singulier à 6,3 ppm. Le déplacement chimique du proton C-2 dans les isoflavones sera dans l'intervalle 7,6 - 7,9 ppm. Ce signal est singulier.



Dans les flavanones, le proton au carbone C-2 apparaît comme un signal quadruplet q ($J_{\text{trans}} = 11 \text{ Hz}$, $J_{\text{cis}} = 5 \text{ Hz}$), centré à 5,2 ppm. Le signal des deux protons en carbone C-3 est aussi un quadruplet due à l'interaction spin-spin des autres protons ($J = 17 \text{ Hz}$) avec H-2. Dans les dihydroflavonols, la valeur du déplacement chimique de ce signal est de 2,8 ppm, les deux protons aux carbones C-2 et C-3, apparaissent comme des doublets d ($J = 11 \text{ Hz}$). Le signal de H-2 à 4,9 ppm est bien séparé du proton H-3 qui est à 4,3 ppm. La glycosylation de 3-hydroxyl cause un champ faible des deux signaux H-2 et H-3 (tableau 9.6).

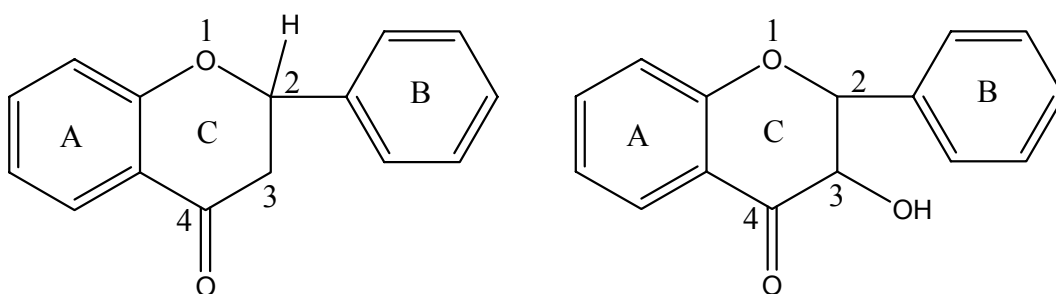
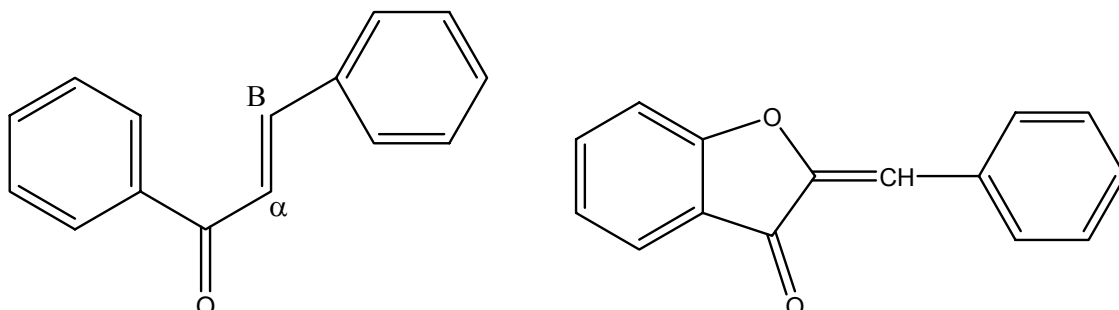


Tableau 9.6 : Déplacements chimiques des protons H-2 et H-3 dans les flavanones et dihydroflavonols

	H-2 (ppm)	H-3 (ppm)
Flavonones	5,0 -5,5 q	~ 2,8 qq
dihydroflavonols	4,8 -5,0 q	4,1 - 4,3d
dihydroflavonols	5,0 - 5,6 q	4,3 - 4,6d

Pour les chalcones, les protons H_α et H_β apparaissent comme des doublets d ($J = 17\text{Hz}$) dans l'intervalle 6,7 - 7,4 et 7,3 - 7,7 ppm, respectivement. Le proton benzélique dans les aurones apparaît comme signal singulier dans l'intervalle 6,5 -6,7 ppm.



les spectres ^{13}C 1D donnent eux aussi des informations sur l'environnement chimique des carbones de la molécule, notamment le nombre de ^1H auxquels ils sont liés et la présence de substituants attachés directement ou proches dans l'espace. Certains déplacements chimiques caractéristiques peuvent aider à la détermination de la structure. Ainsi, dans le cas des flavonols, il a été montré qu'un déplacement chimique du C2 inférieur à 80 ppm caractéristique d'une configuration 2,3 cis, alors qu'un déplacement chimique supérieur à 80 ppm de quelques ppm indique une configuration 2,3 trans [280]. D'autre part, une liaison interflavanique de type A est indiquée par un fort déblindage de l'ordre de 20 ppm du C2 [281-282].

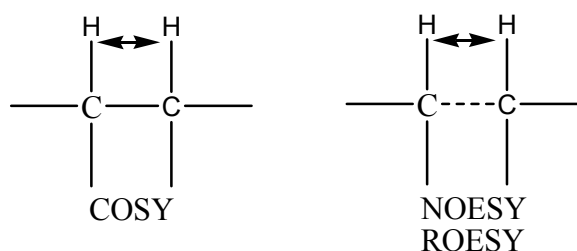
Cependant l'interprétation des spectres 1D peut s'avérer difficile notamment lorsque les signaux de différents atomes ^1H ou ^{13}C de la molécule possèdent des déplacements chimiques très proches. L'amélioration de la résolution apportée par les spectres 2D permet bien souvent de résoudre ces problèmes.

Les séquences 2D sont très utiles pour affiner la structure et la conformation des composés étudiés. Les séquences les plus utilisées pour la détermination de la structure des composés phénoliques peuvent être classées en deux grandes familles : les séquences homonucléaires ^1H et les séquences hétéronucléaires ^1H - ^{13}C .

Les principales séquences 2D homonucléaires ^1H sont les séquences COSY, TOCSY, NOESY et ROSEY. Les spectres COSY donnent les corrélations entre ^1H par 2 ou 3 liaisons. Ils permettent d'identifier des ^1H géminaux et vicinaux et aussi de mesurer les constantes de couplages entre ces ^1H à partir du dédoublement des pics de corrélation.

Ils peuvent s'avérer particulièrement utiles lorsque les spectres 1D ^1H sont trop confus et/ou présentent des signaux dégénérés.

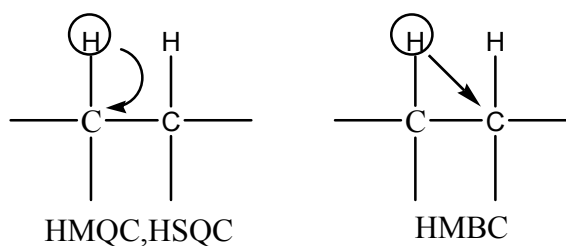
Les spectres NOESY et ROESY permettent d'accéder aux corrélations entre protons proches dans l'espace. La présence des taches de corrélation et leur intensité donnent des indications sur la conformation et sont utilisées pour confirmer les attributions et les structures.



132

Les séquences 2D hétéronucléaires en détection inverse (c'est à dire du signal ^1H) sont de plus en plus utilisées pour l'étude de noyaux peu sensibles comme le ^{13}C en raison de leur plus grande sensibilité par rapport aux méthodes de détection directe.

Les séquences HSQC et HMQC permettent d'observer les corrélations entre ^1H et ^{13}C directement liés (couplage ^1J) alors que la séquence HMBC permet d'accéder aux corrélations longues distances entre ^1H et ^{13}C voisins (couplages ^2J , ^3J et parfois ^4J).



9.7.4. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant la détermination des masses des molécules isolées. Cette méthode d'analyse nous apporte des informations sur la nature d'un composé, sa masse moléculaire et sa structure.

La première étape d'analyse d'un composé en spectrométrie de masse consiste à le transformer à l'état gazeux et former des ions de ce composé. Les ions formés sont ensuite soumis à un champ magnétique fort. Leur trajectoire, dans une enceinte sous vide, permet alors de déterminer le rapport masse/charge (m/z).

Un spectromètre de masse est composé classiquement de quatre éléments: un système d'introduction de l'échantillon, une source dans laquelle est ionisé l'échantillon, une zone de collision où les ions se fragmentent et les molécules de solvants sont éliminées, un analyseur de masse.

Il existe plusieurs sources d'ionisation : impact électronique, ionisation chimique, ionisation par bombardement d'ions ou d'atomes rapides (FAB), désorption de champ, désorption Laser, Maldi, thermospray et électrospray, appelée aussi électronebulisation. Les sources 'impact électronique' et 'électrospray (ES ou ESI)' sont souvent les plus utilisées dans la majorité des laboratoires recherches pour caractériser les molécules phénoliques.

Le principe de l'électronebulisation est la vaporisation d'un échantillon, à température atmosphérique, sous l'effet d'un champ électrique fort selon un mode d'ionisation positif ou négatif qui provoque une accumulation de charges à la surface du liquide qui va se rompre pour former des gouttelettes hautement chargées. Dans la zone de collision, une différence de potentiel est appliquée, permettant l'acheminement des ions vers l'analyseur quadripolaire. L'avantage des sources à l'électronebulisation consiste dans le fait que celle-ci est une méthode d'ionisation douce qui permet d'observer les pics moléculaires tout en favorisant la formation de fragments en jouant sur la différence de potentiel de la zone de collision.

L'application de cette méthode à l'étude structurale des composés phénoliques a pour avantage la possibilité d'avoir des informations sur la masse moléculaire et sur la présence de résidus glycosilés [283]. La détermination des substitutions sur les aglycones est rendue facile grâce à la fragmentation des molécules. Dans ce cas, on retrouve généralement, en plus du pic correspondant à l'ion moléculaire, le pic correspondant à l'aglycone. La différence entre ces deux masses nominales permet de mettre en évidence la substitution par un ou plusieurs résidus glycosilés ou non.

La méthode d'impact électronique (IE) est largement utilisée pour réaliser des spectres de masse de flavonoïdes aglycones et glycosylés. Cette technique est valable pour l'étude structurale de toutes les classes des flavonoïdes aglycones et glycosylés.

La plupart des flavonoïdes aglycones montrent un pic intense qui correspond au pic moléculaire (M^+) et qui est, dans la plupart des cas, le pic de base. Par contre, le pic moléculaire est rarement observé dans le cas des dérivés silylés des flavonoïdes. Le pic moléculaire des flavonoïdes aglycones est toujours accompagné par plusieurs pics comme $[M-H]^+$ et $[M-CH_3]^+$ pour les flavonoïdes méthoxylés.

On observe aussi et d'une façon générale des ions qui résultent des clivages des deux noyaux A et B. Quelques ions sont obtenus par la fragmentation retro de Diels-Alders (RDA). Deux fragmentations communes pour les flavonoïdes qui seront désignées par le chemin I et le chemin II. Le chemin I correspond au clivage classique retro-Diels-Alder (figure 9.5).

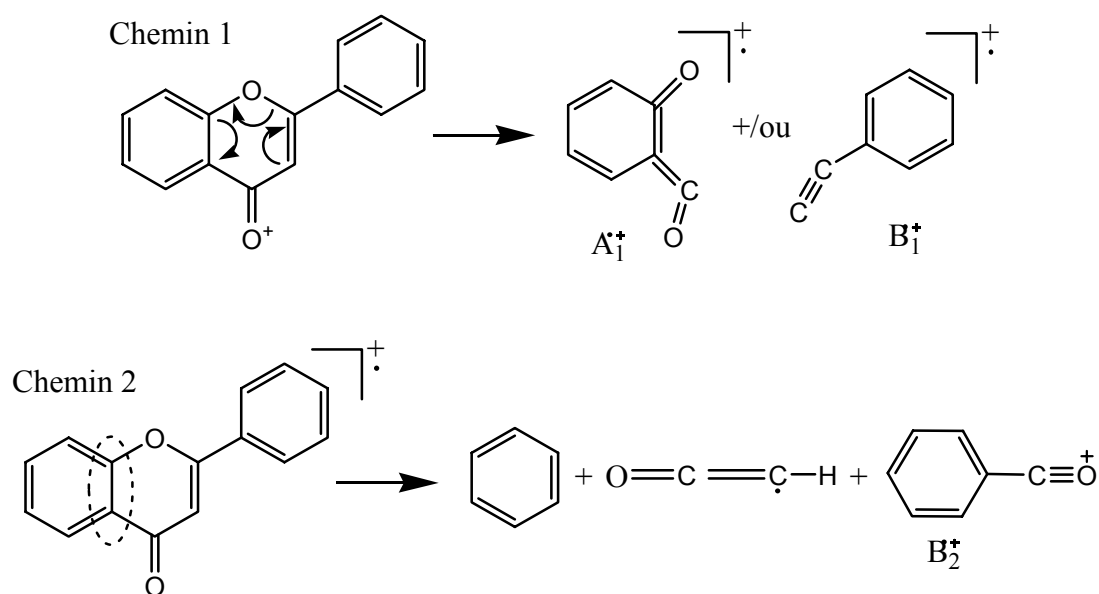
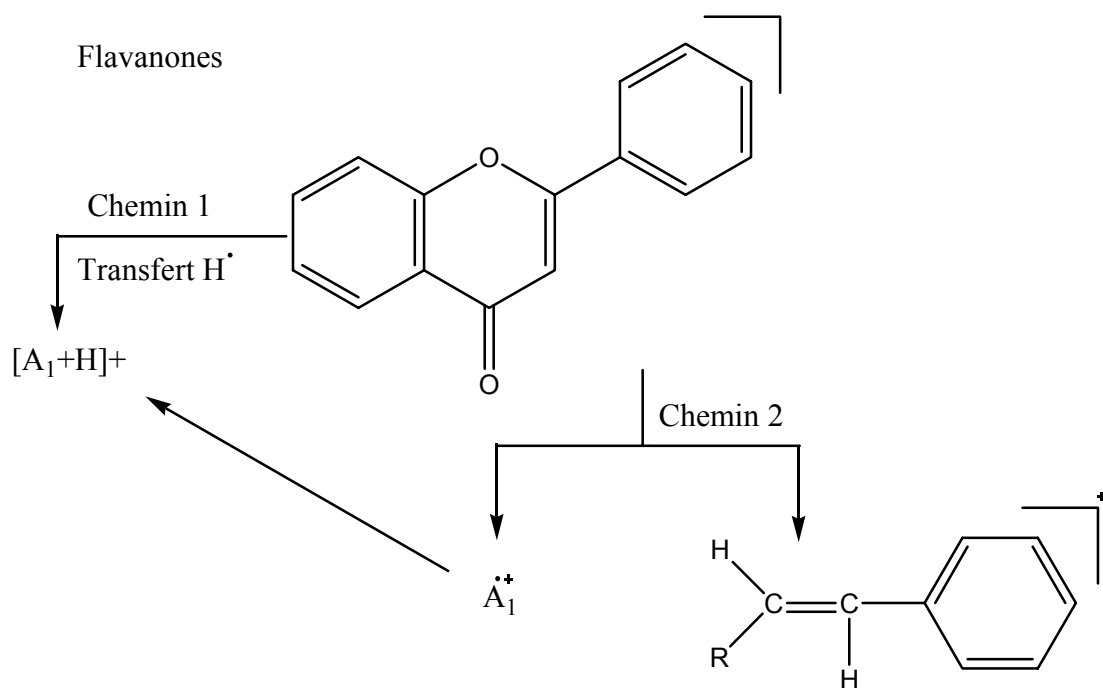
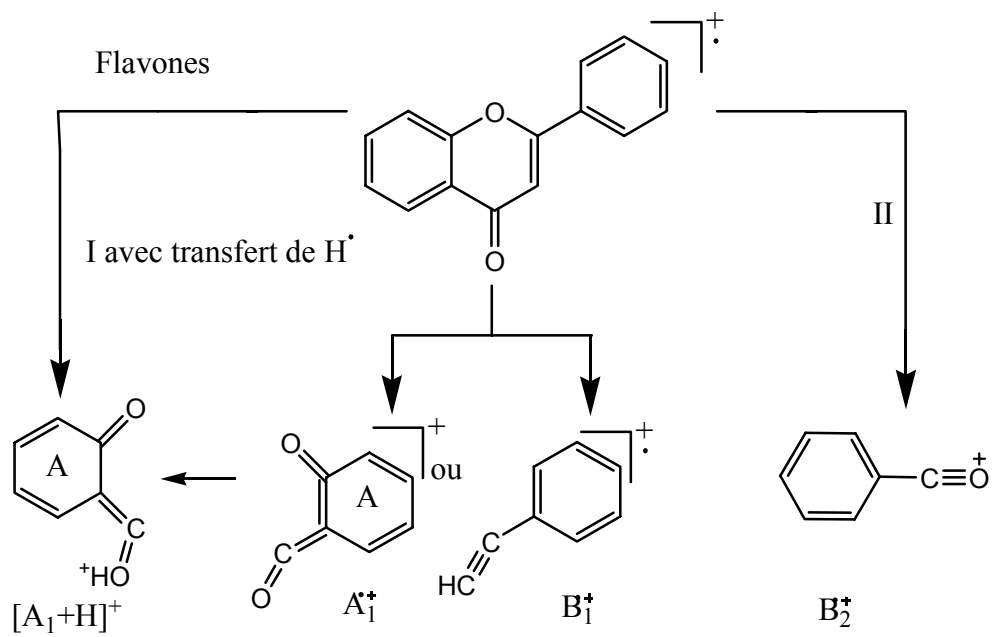
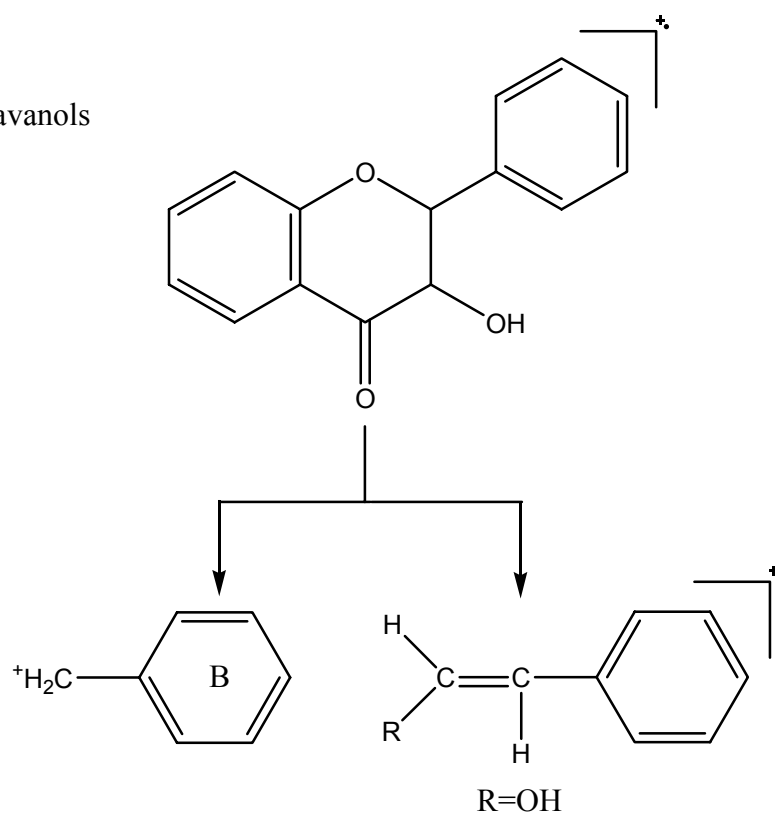


Figure 9.5 : Fragmentation commune des flavonoïdes par IE

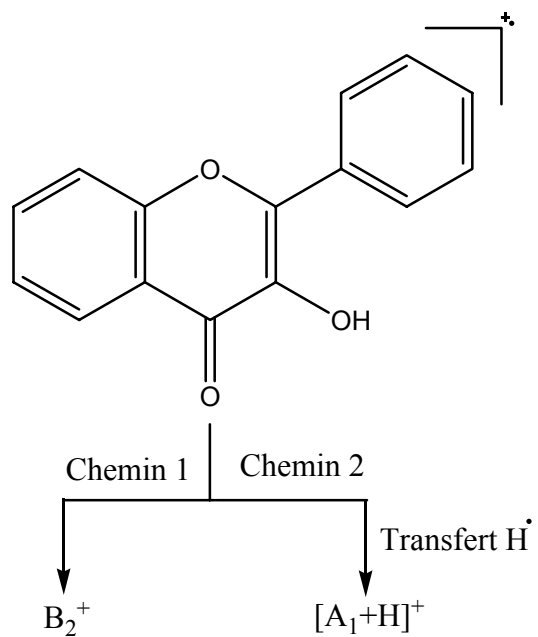
Des mécanismes de fragmentation de quelques classes de flavonoïdes aglycones sont illustrées dans la figure 9.6.



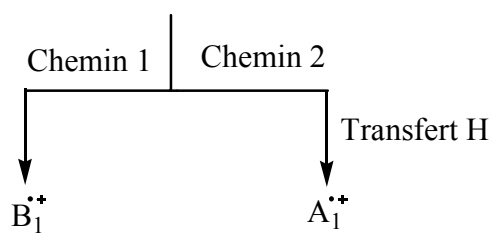
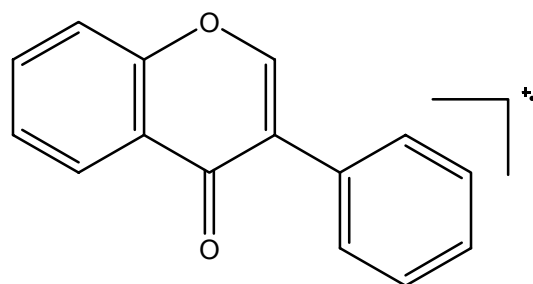
DihydroFlavanols



Flavonols



Isoflavones



Chalcones

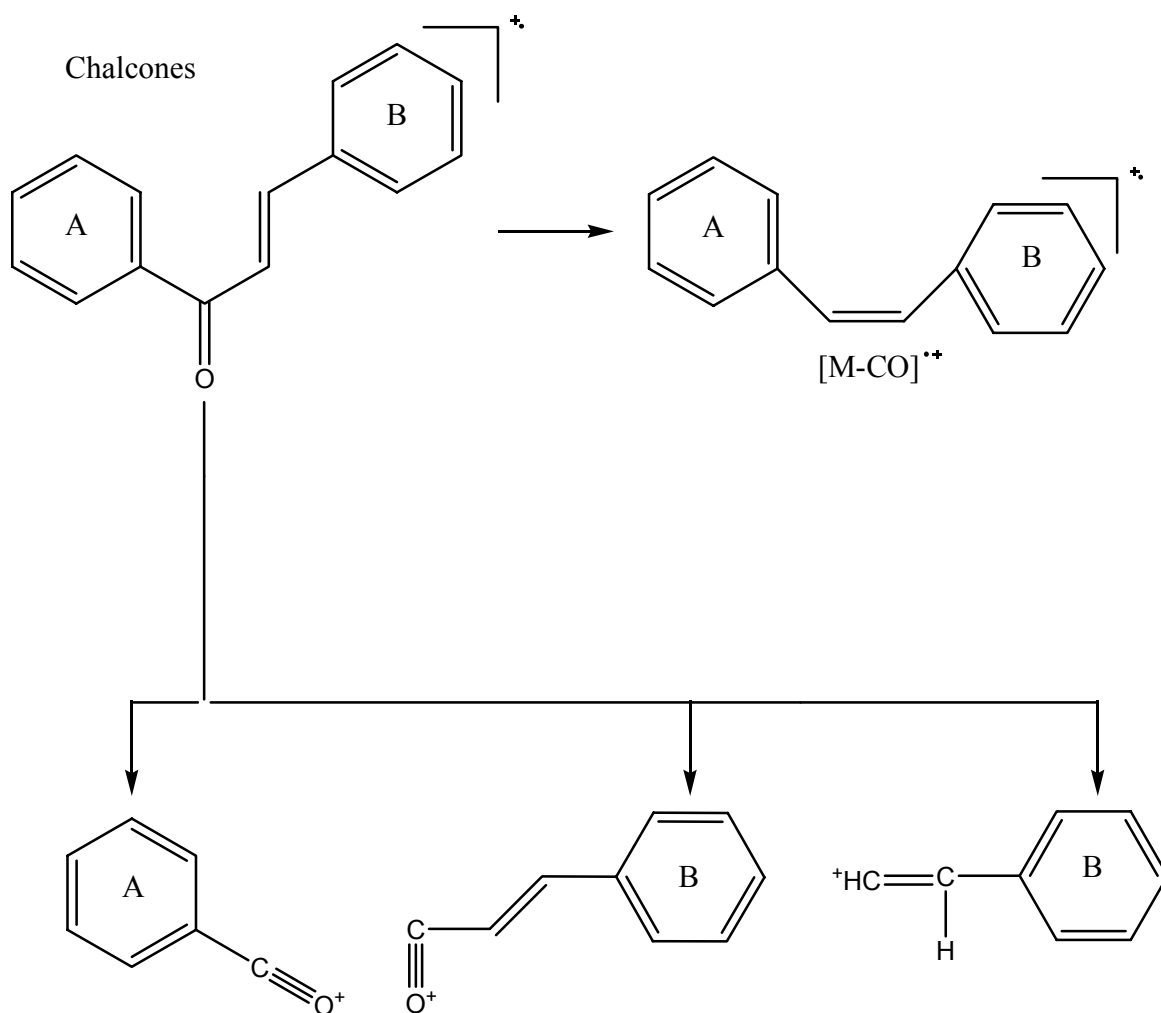


Figure 9.6 : Mécanismes de fragmentation par IE de quelques flavonoïdes aglycones

CHAPITRE 10

ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

L'activité antioxydante (AAO) a été étudiée par de nombreux auteurs, au travers d'une grande diversité de principes actifs, de drogues, de molécules, de modes d'action et de grande variété de tests susceptibles de mettre en évidence cette activité. Les phénomènes caractérisant l'AAO ont été surtout abordés vis à vis des corps gras qui sont un des principaux champs d'application des produits à effet antioxydant. Il y a donc une multitude de résultats concernant ce type d'étude. Ces derniers ne sont malheureusement pas toujours corrélés entre eux.

10.1. Activité antioxydante

10.1.1. Activité antioxydante dans le monde végétal

Les plantes, comme tous les êtres vivants, ont à se défendre contre les agressions de l'oxygène. Pour ce faire, elles ont développé tout un ensemble de substances dont certaines ont pérennisé jusque dans le règne animal, tandis que d'autres constituent aujourd'hui des originalités propres aux végétaux.

S'il est probable que certaines molécules ont été sélectionnées au cours de l'évolution grâce à leurs activités, il est certain que l'intégration de l'oxygène moléculaire au métabolisme s'est fait très tôt grâce aux chaînes respiratoires et à des structures spécifiques. Il existe en dehors de ces chaînes les enzymes qui sont chargés de diminuer l'agressivité de l'oxygène et par extension celle des radicaux libres. Parmi elles, on cite plusieurs grandes classes : la catalase, la peroxydase, la superoxyde dismutase, la lipoxydase, la glutathion-oxydoréductase. Une analogie de structure a été établie entre les sites actifs de ces enzymes et ceux des chaînes respiratoires. On remarque également que

ce type de structure se retrouve au sein du règne animal. L'hémoglobine et ses dérivés sont les principaux transporteurs d'oxygène via le fer.

Les végétaux ont mis très tôt au point une structure analogue : la chlorophylle. *In vitro*, il a été démontré qu'elle pouvait réagir en présence d'un radical peroxyde pour donner un radical tétrapyrrole stable [284]. *In vivo*, la chlorophylle excitée transmet son énergie aux systèmes photosynthétiques PS I et PS II. Au sein des extraits, un tel système de transmission d'énergie n'existe pas et c'est pour cela que l'on préfère décolorer les extraits afin d'éviter une éventuelle activité pro-oxydante [285]. On retrouve ces propriétés de capture/stabilisation de radicaux chez de nombreuses substances azotées. Parmi elles, on trouve de nombreux acides aminés, tels la lysine, l'arginine, le l'histidine, le tryptophane, la cystéine, la méthionine et la thréonine [286-288]. Il n'est pas donc étonnant que l'on retrouve ce même type d'action chez des composés issus de ce groupe : les alcaloïdes [289-290]. L'AAO apparente de ces substances peut s'expliquer par le fait que l'azote, en relation avec un autre groupement nucléophile de la molécule, permet la décomposition non radicalaire des hydroperoxydes et empêche ainsi la propagation de l'oxydation [291]. La caféine a montré une AAO comparable au BHA et au BHT dans un système modèle à base d'acide linoléique [292].

Les exemples pourraient s'étendre, mais le fait que les alcaloïdes ne soient pas des substances pharmacologiquement inactives, les recherches d'AAO se sont focalisées vers d'autres familles de composés. Il existe parmi elles un autre groupe propre au règne végétal : les flavonoïdes.

10.1.2. Phénomène d'oxydation des lipides

Les corps organiques qui possèdent des doubles liaisons (acides gras par exemple) sont particulièrement sensibles à l'oxydation car les électrons π constitutifs se délocalisent facilement pour donner lieu à des équilibres mésomères impliquant l'existence de radicaux libres. L'oxygène se fixe alors, pour former après réaction en chaîne, des hydroperoxydes.

Dans les aliments, les peroxydes vont donner naissance à des produits secondaires (composés cétoniques, aldéhydiques...) qui vont altérer profondément leur saveur. Les changements de caractéristiques associés à la détermination des huiles végétales et des

graisses animales sont le développement de goûts et d'odeurs désagréables et des changements dans la couleur et la viscosité de l'huile oxydée.

Dans le milieu biologique, les acides gras polyinsaturés présents sont facilement oxydés en peroxydes qui contribuent probablement aux avaries et dysfonctionnement dans la cellule et les tissus. Ces peroxydes peuvent être à l'origine de troubles pulmonaires, de problèmes inflammatoires ou de cancers et sont aussi impliqués dans les phénomènes de vieillissement.

Les principales causes d'oxydation sont la chaleur, la lumière, les catalyseurs (sels métalliques) et l'agitation thermique.

10.1.3. Mécanisme d'autoxydation

L'autoxydation est régie par un mécanisme radicalaire en chaîne procédant par initiation, propagation et termination [293-294] (figure 10.1).

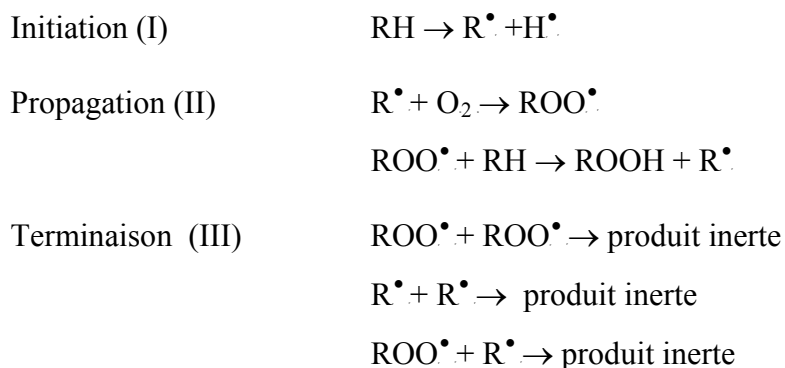


Figure 10.1 : Mécanisme d'autoxydation

Si RH est une molécule dans laquelle H est à atome d'hydrogène particulièrement labile, la phase d'activation (I) conduit à l'arrachement d'un radical H^\bullet entraînant la formation d'un radical R^\bullet . L'oxygène atmosphérique qui est à l'état triplet sous forme de biradical s'additionne sur le radical R^\bullet pour donner un radical hydroperoxyde. Ce dernier se stabilise en attaquant une autre molécule RH à laquelle il arrache son hydrogène labile. Le radical R^\bullet régénéré peut à son tour être attaqué par l'oxygène (II). Dans des conditions favorables,

cette phase s'auto entretient, c'est l'auto oxydation ou autoxydation. Elle s'arrête par l'union de deux radicaux libres se saturant mutuellement III.

10.2. Rôle des antioxydants

10.2.1. Définition d'un antioxydant

Le terme antioxydant désigne une substance qui, ajoutée à faible dose à des matières spontanément à l'air, est capable d'empêcher l'action de l'oxygène. Elle interfère sur le processus normal d'oxydation en augmentant le temps au bout duquel cette oxydation aura produit des odeurs indésirables et une détérioration décelable.

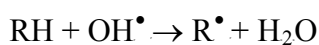
Toutes fois, pour être efficace, les antioxydants doivent être additionnés le plus tôt possible dans le processus de fabrication. Ils ne peuvent en effet inverser la réaction d'oxydation, mais seulement la ralentir ou la stopper [295].

10.2.2. Mécanisme d'action des antioxydants

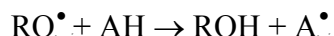
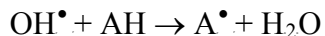
En fonction de leur moment d'intervention, et de leur mécanisme d'action dans la réaction d'oxydation à l'air, on peut classer les antioxydants en deux groupes différents:

- Antioxydants préventifs : Les antioxydants préventifs désactivent les espèces actives et les précurseurs possibles de radicaux libres. Ils suppriment de ce fait la génération des radicaux libres [296-297].

Les hydroperoxydes génèrent des radicaux qui peuvent servir d'initiateur à la réaction d'autoxydation :

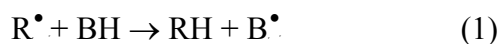


Des substances (AH) capables de piéger OH• ou RO•, formés lors de la composition des hydroperoxydes inhibent l'autoxydation des lipides au niveau de sa phase d'initiation :



De telles substances sont appelées antioxydants préventives [298].

- Antioxydants de rupture de chaînes : Les antioxydants de rupture de chaîne constituent le groupe le plus largement cité dans les mécanismes d'oxydation faisant intervenir les antioxydants. Ce sont des produits (BH) capables d'interrompre la réaction d'antioxydation comme donneurs d'hydrogènes vis-à-vis d'un radical peroxyde ROO• ou allyle R• formé dans la phase de propagation du processus d'antioxydation pour conduire à un radical stable B• [297-299].



Il est important de noter que l'addition d'oxygène sur un radical R• dans la réaction d'antioxydation est extrême rapide et que la réaction (2) se fait donc préférentiellement. Les antioxydants de type phénolique, qui sont les plus importants, réagissent selon ce mécanisme. L'antioxydant phénolique cède un hydrogène pour donner un intermédiaire radical stable qui se réarrange pour engendrer une structure quinonique [299,300], selon le schéma représenté dans la figure 10.2.

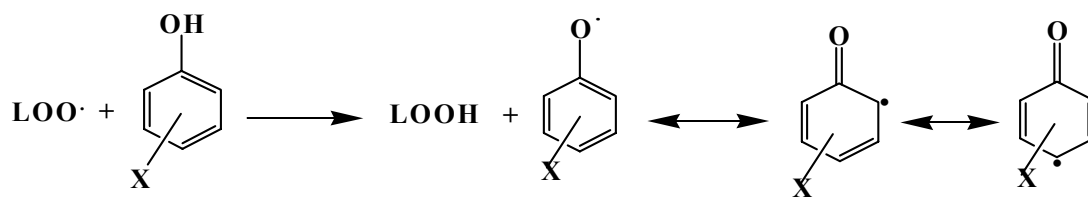


Figure 10.2 : Mécanisme d'action d'un antioxydant phénolique vis-à-vis d'un radical acide gras

- Synergisme (mot grec *synergos* qui signifie travailler ensemble) : C'est le phénomène dans lequel un mélange de deux ou plusieurs composés provoque plus d'activité physiologique que ce à quoi on s'attendait sur la base de leurs efficacités individuelles. Bien que le rôle exact de la synergie des antioxydants ne soit pas connu, beaucoup de ces effets seraient dus à des désactivateurs de métaux ou agents chélatants qui éliminent ou diminueraient les effets de métaux catalysant l'antioxydation des lipides.
- Action pro oxydante : Les substances pro-oxydantes favorisent la formation de radicaux en multipliant les possibilités d'initiation de chaîne. Ce sont principalement des traces de métaux sous forme de sels. Ces sels de métaux vont orienter l'évolution des hydroperoxydes vers la réaction de scission O-O-, donc vers la formation de radicaux qui vont servir d'initiateurs à la réaction d'autoxydation (figure 10.3). Le retour du métal à sa valence initiale peut s'effectuer selon plusieurs voies, chacune d'entre elles génèrent également des radicaux libres initiant la réaction d'autoxydation [293,300].

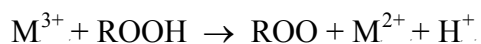
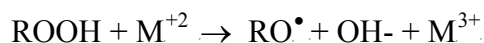


Figure 10.3 : Action pro-oxydante des métaux

Notons toutefois que la nature du métal, ainsi que celle de la partie organique à laquelle il est lié par une liaison ionique, influent sur l'activité prooxydante.

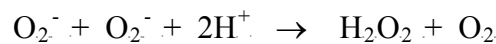
10.3. Principaux antioxydants

10.3.1. Antioxydants à caractère enzymatique

Ils sont présents dans l'organisme. Ce sont des antioxydants physiologiques. En dehors des états pathologiques ou du vieillissement, la toxicité de l'oxygène ne se s'exerce pas. Ils existent donc dans des systèmes protecteurs. Ces systèmes ont la tâche de circonscrire les processus oxydatifs de défense, de lutter contre les espèces oxydantes indésirables et d'éviter leur apparition.

Trois enzymes constituent les clés de cette protection.

- Les superoxydes dismutases (SOD) : Ils accélèrent considérablement la dismutation de O_2^- en eau oxygénée :



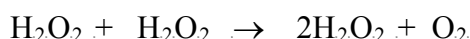
Les SOD apparaissent donc comme des moyens de défense de première importance dans la lutte contre la toxicité de l'oxygène [173]. Elles existent dans les mitochondries (SOD à manganèse) et dans le cytosol SOD à cuivre et à zinc.

- La glutathion peroxydases : La glutathion peroxydase (GSH peroxydase), enzyme cytosolique séléniée, transforme non seulement le peroxyde d'hydrogène, mais aussi les peroxydes lipidiques. L'eau oxygénée et les lipoperoxydes sont réduits en présence de glutathion. Deux molécules de glutathion fournissent deux H en formant une liaison disulfure entre elles. Une molécule de peroxyde d'hydrogène est ainsi transformée en deux molécules d'eau [302,303] :



Le glutathion est régénéré par la glutathion-réductase en présence d'un facteur, le NADPH.

- La catalase : Elle joue un rôle important dans la dismutation des superoxydes et de l'eau oxygénée [303,304] :



Cette enzyme confinée dans les peroxysomes est présente chez tous les mammifères.

10.3.2. Antioxydants naturels non enzymatiques

Les enzymes ne sont pas la seule protection de l'organisme contre les radicaux libres. Un autre type de protection est assuré par des substances capables de neutraliser les radicaux libres. Ces substances sont aussi efficaces comme conservateurs antioxydants dans les aliments. Parmi ces antioxydants, nous citons les principaux composés :

- La vitamines E : Elle est composée d'une ou de plusieurs substances de nature phénolique appelées tocophérols ou tocotriénols (voir Partie I, chapitre 6). Sa grande solubilité dans les huiles et les graisses fait d'elle le meilleur antioxydant naturel lipidique.

On résume le terme de vitamine E à l' α -tocophérol qui est de loin le plus répandu dans les huiles végétales [296]. Dans l'industrie alimentaire, l'utilisation d'extraits d'origines naturelles riches en tocophérols seuls ou en mélange avec l' α -tocophérol de synthèse est permise pour la protection des matières grasses et des margarines, à une concentration de 0,05%. L' α -tocophérol réagit avec les radicaux libres en formant un radical tocophéryle qui stoppe la chaîne de la réaction radicalaire grâce à sa stabilité.

- L'acide ascorbique : L'activité antioxydante de l'acide ascorbique ou vitamine C, peut s'exercer de quatre manières :
 - Il peut agir comme capteur d'oxygène.
 - Il peut agir comme donneur d'hydrogène aux antioxydants phénoliques, après que ceux-ci aient cédé leurs protons au cours de la réaction en chaîne d'antioxydation.

- Il peut agir comme synergiste.
- Il peut agir comme antioxydant préventif par chélation des métaux.

L'acide ascorbique, à cause de son insolubilité dans les corps gras, sera de préférence utilisé en milieux aqueux (jus de fruit, confiture, ...) [303].

- Les flavonoïdes : Depuis quelques temps, il est reconnu que plusieurs classes de flavonoïdes montrent une activité antioxydante vis-à-vis d'une variété de composés facilement oxydables. Bien que de nombreuses études aient été menées sur les flavonoïdes dans le but d'établir leurs propriétés antioxydantes, il n'y a pas de relation claire entre la structure des flavonoïdes et leur activité. Ceci est notamment dû à la variété des systèmes employés dans l'évaluation de leur activité antioxydante et les différents paramètres mesurés [304,305].

L'action antioxydante des flavonoïdes s'effectue par «piégeage» des radicaux libres, celle-ci procéderait d'un double mécanisme : d'une réaction directe sur les radicaux libres et/ou d'une action indirecte par chélation de certain ions métalliques lourds, eux mêmes catalyseurs de la formation de radicaux libres [306].

Plusieurs flavonoïdes se sont trouvés être de fort inhibiteurs des enzymes lipoxgénases et prostaglandines synthétase, qui convertissent les acides gras polyinsaturés en dérivés contenant de l'oxygène. Une telle action expliquerait leur intervention dans les processus d'inflammation et d'allergies [307,308]. Pour Baumann et al. [309], la plus grande activité contre ces deux enzymes a été trouvée pour la lutéoline (5,7,3',4'-tétrahydroxyflavone) et la 3',4'-dihydroxyflavone, à environ $3 \cdot 10^{-5}$ M. Elles inhibent 50% de l'activité de la lipoxgénase.

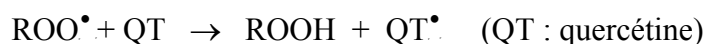
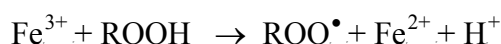
Caldwelle et al. [310] ont démontré que les flavonoïdes, avec leur grande absorption dans la région 300 - 400 nm, jouent un rôle de filtres pour la protection des chloroplastes contre les dégâts de l'UV. Cette habilité à filtrer la lumière renforce leur pouvoir antioxydant et fournit un haut niveau de protection contre les oxydants générés thermiquement ou par la lumière.

Certains flavonoïdes inhibent l'oxydation de l'acide ascorbique. Ce comportement est attribué à l'habilité des flavonoïdes à réagir comme radicaux libres accepteurs et aussi comme piègeurs par complexation des ions métalliques catalyseurs [311].

Letan [312] a testé l'activité antioxydante de la quercétine (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone) par la mesure du taux de cuivre catalysant l'oxydation de l'acide ascorbique à 25°C. Les résultats montrent que la structure α -hydroxycétone de l'hétérocycle est la plus importante portion complexante (métal) de la molécule. Le groupe 4,4'-O-diphénolique ne montre pas de propriétés chélatantes. La méthylation en 4' ou en 7 augmente la capacité complexante des dérivés O-méthylés de la quercétine.

Les travaux de CLEMESTON et ANDERSEN [313] sur la protection de l'acide ascorbique, ont montré que les aglycones flavoniques avec des substituants en 3' et 4' du cycle B sont de bons inhibiteurs.

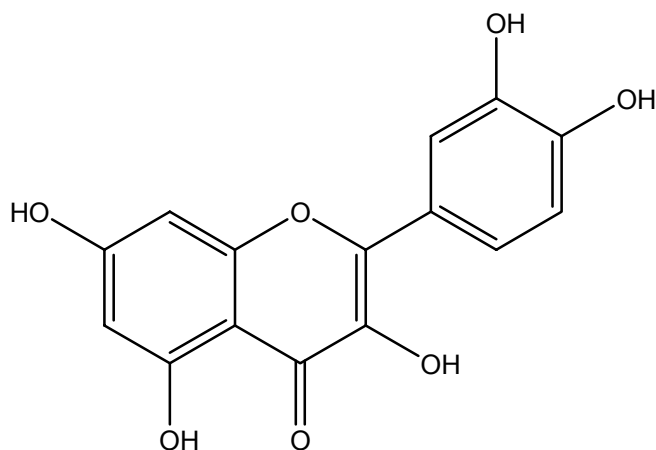
Selon Das et PRASANTA [314], l'inhibition par la quercétine de la peroxydation lipidique catalysée par le fer est due à la propriété antioxydante de ce flavonol, et pourrait agir selon le schéma de l'action pro-oxydante décrit par NAUDET [293] et WATERS [301] :



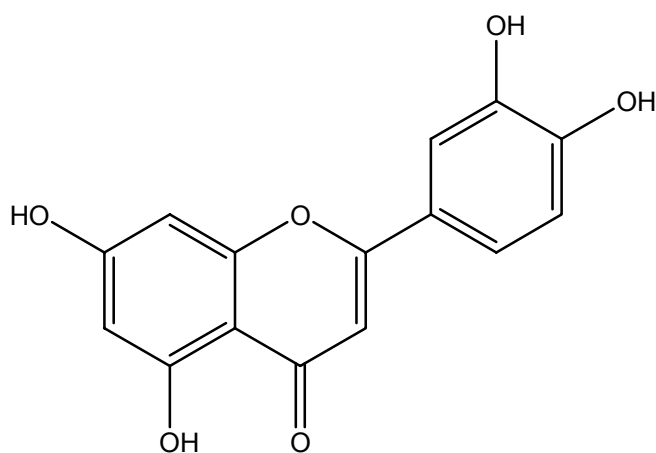
Depuis qu'il est reconnu que le potentiel antioxydant et inhibiteur de la peroxydation lipidique prédomine dans la capacité de piègeur de radicaux beaucoup plus que dans la chélation des métaux, le problème de la chimie des radicaux des aglycones flavonoïdiques est devenu une matière d'intérêt important [315].

L'efficacité antioxydante de groupes hydroxyyles particuliers dans le squelette flavone est liée à leur habilité à former des radicaux libres quand un atome d'hydrogène est perdu. Trois groupes structuraux émergent :

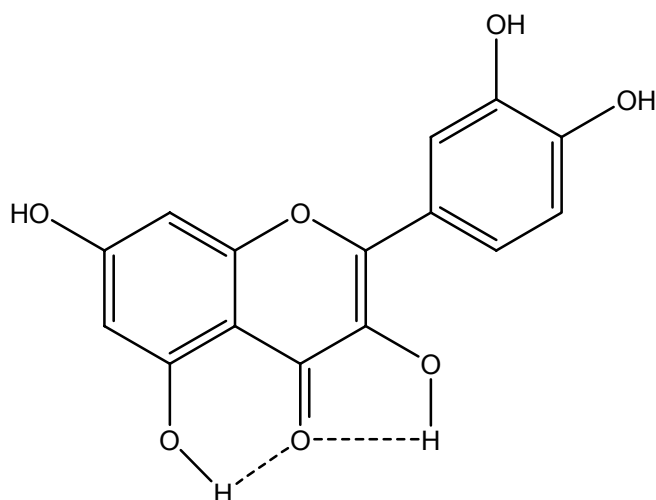
1. La structure ortho-hydroxy dans le cycle B [307, 316, 317] :



2. La double liaison 2,3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo, responsable de la délocalisation des électrons à partir du cycle B [314] :

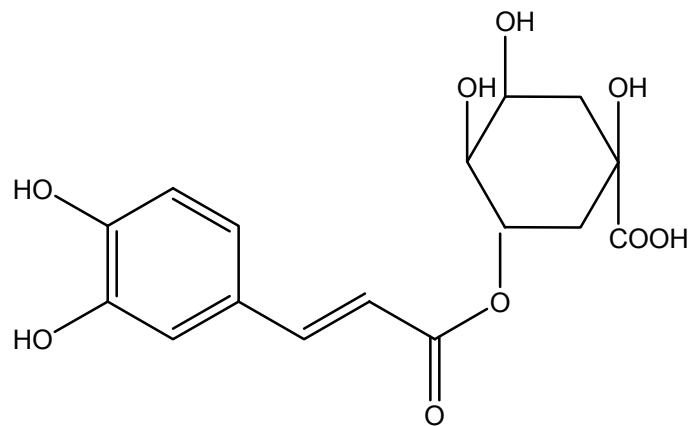


3. Les deux groupes 3- et 5-hydroxyle [316,318] :

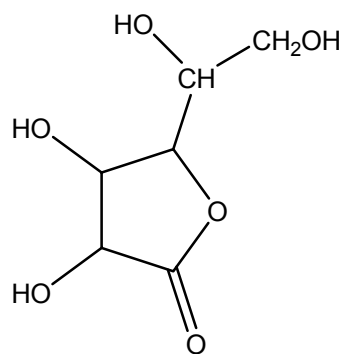


Le blocage des fonctions hydroxyles actives par méthylation crée une diminution dans le caractère inhibiteur des flavonoïdes [312]. Cependant, MIURA et NAKATANI [315] ont remarqué que ces flavonoïdes ont une activité plus élevée que l' α -tocophérol et est similaire au BHT pour les 5,4'-dihydroxy -7-méthoxy, 5,4'-dihydroxy -7,3',6'-triméthoxy- et 5,4'-dihydroxy- 7,8,3',6' -tétra méthoxy flavones. Ces résultats ainsi que ceux obtenus par CHOLBI et al. [319] pour deux polyméthoxy flavones naturelles, la gardénine D (5,3'-dihydroxy -6,7,8,4'-tétra méthoxy flavone) et la 5-diméthylnobilétine (5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentaméthoxy flavone) sont particulièrement intéressants. Les flavones méthoxylées se solubilisent très bien dans les milieux biologiques, ce qui permet leur utilisation à une administration *In vivo* plus approprié que les composés hydroxylés polaires.

- Les acides phénoliques : Les composés acides incorporant les groupes phénoliques ont été impliqués à plusieurs reprises comme antioxydants actifs. Parmi les acides phénoliques à caractère antioxydant rencontrés dans la littérature, on peut citer des dérivés de l'acide cinnamique, tels que l'acide caféique [320], les esters de l'acide caféique comme l'acide chlorogénique[321,322] et l'acide ascorbique [323] (figure 10.4).



Acide chlorogénique



Acide ascorbique

Figure 10.4 : Structures de quelques acides phénoliques

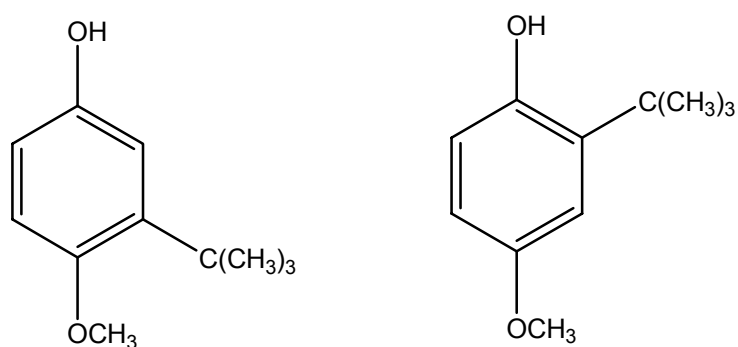
- Antioxydant de synthèse : Cette famille de substances est relativement limitée, étant donné qu'elle correspond à des corps qui sont étrangers au milieu biologique humain comme animal, donc biochimiquement suspects. Ces antioxydants, comme le tertio buthyl hydroxy toluène (BHT) et le tertio buthyl hydroxy anisole (BHA), jouent un rôle capital dans l'alimentation,

L'utilisation du BHT (figure 10.5) convient particulièrement bien à la stabilisation des graisses animales et des huiles végétales. Il contribue indirectement à la conservation de la valeur nutritive des protéines, et à la stabilité des autres éléments vitaux, tels que les vitamines A et E [324]. Le BHA existe sous forme de mélange de deux isomères de position, le 2-tertio buthyl 4-hydroxyanisole et la 3-tertio buthyl - 4-hydroxyanisole (figure 10.5) [399]. Le BHA est efficace dans les graisses animales, mais il est moins efficace que le BHT dans les huiles végétales. Il résiste bien aux températures rencontrées dans les aliments cuits ou frits et c'est un des produits les plus remarquables pour préserver le transfert des propriétés de l'huile végétale de cuisson, à l'aliment frit [324].

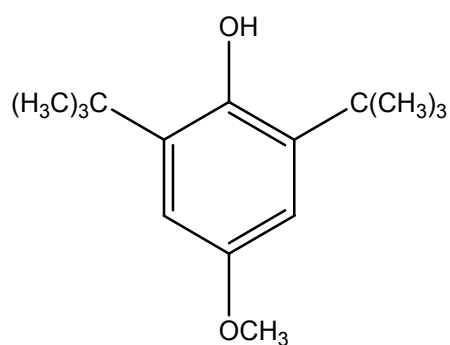
- Les gallates de propyle, octyle et dodécyle : L'activité antioxydante de l'acide gallique est connue depuis longtemps. Il constitue en effet l'un des composants conférant au clou de girofle ses propriétés antioxydantes [325].

Les gallates de pyrole, d'octyle et de d'écocyle (figure 10.5) stabilisent bien les graisses animales, et en synergie avec le BHA, protègent les huiles végétales [299].

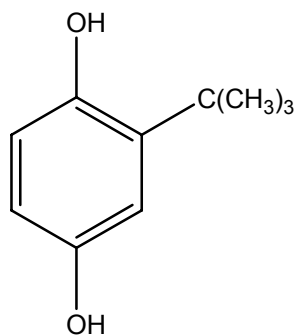
- La tertibutylhydroquinone (TBHQ): L'efficacité de la TBHQ (figure 3.5) est similaire à celle du mélange BHT/BHA dans les graisses animales. Elle est plus efficace dans les huiles végétales. La TBHQ est le meilleur antioxydant pour la protection des huiles de friture [289]. Elle est cependant généralement utilisée pour les huiles brutes, pendant le stockage et le transport avant raffinage [324].



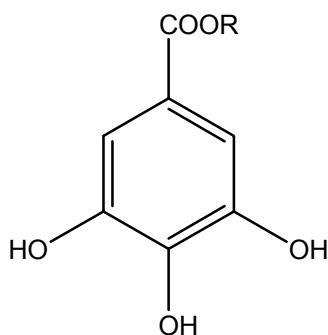
tert-butyl hydroxyanisole (BHA)



tert-butyl hydroxytoluène (BHT)



tert-butyl hydroquinone (TBHQ)



Esters de l'acide gallique

$R=C_3H_7$ gallate de propyle

$R=C_8H_{17}$ gallate d'octyle

$R=C_{12}H_{25}$ gallate de dodécyle

Figure 10.5 : Quelques antioxydants de synthèse

10.4. Les principales méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les techniques permettant de déterminer l'activité antioxydante d'un composé ou d'un ensemble de composés sont basées sur la mesure de l'oxydation des lipides. L'activité antioxydante (AAO) peut être définie comme une capacité de protection contre l'oxydation. Dans le domaine de la lipochimie, cette notion est souvent assimilée à la défense anti-radicalaire. En effet, l'altération des lipides est un phénomène mettant en jeu des radicaux libres. Cela aboutit à la création de divers produits dont certains modifient sensiblement les qualités des corps gras.

L'oxydation des lipides est aujourd'hui bien connue. Pour son utilisation se pose le problème de la protection de ses produits et donc d'évaluation de cette protection. Pour cela l'analyste doit faire appel à diverses méthodes d'évaluation de l'AAO. On ne peut pas déterminer directement cette activité. En fait, on mesure l'oxydation, puis l'AAO est déduite par rapport à un témoin. Le problème consiste donc à choisir un test spécifique de ce que l'on veut mettre en évidence et que les informations de ce dernier soient corrélées par d'autres observations (rancœur, odeur, ou résultat d'autres tests). L'AAO ne résulte pas seulement d'une activité anti-radicalaire mais également d'une capacité à empêcher l'action de substances pro-oxydantes. On trouve ainsi des agents purement anti-radicalaire (BHA, BHT) purement séquestrant (érythrorbate de sodium, dérivés de l'acide citrique) ou des produits dont le mode d'action peut être mixte (flavonoïdes).

A la vue de ces éléments, nous pouvons donc poser une classification des tests d'activité antioxydante en plusieurs catégories :

- Méthodes mettant en évidence l'activité antiradicalaire.
- Méthodes spécifiques aux premiers stades de l'oxydation.
- Méthodes propres aux produits secondaires.
- Méthodes indirectes.

10.4.1. Méthodes de dosage de l'activité antiradicalaires

Il existe plusieurs techniques qui permettent de mettre en évidence des activités antiradicalaires spécifiques.

Une méthode d'observation des plus intéressantes est la résonance paramagnétique électronique (RPE) [326-328] couplée à la capture des radicaux (Spin Trapping) [329], cette technique permet de tester l'activité antiradicalaire de différents antioxydants. Elle n'est pas caractéristique d'une espèce radicalaire particulière, ce qui en fait un outil de choix dans le cadre d'une approche biologique du thème [330,331]. Il est possible d'utiliser une grande variété de générateurs de radicaux libres. Ce procédé est corrélé par d'autres méthodes [332], mais exige des installations lourdes, ce qui est un handicap pour l'utiliser en routine.

La chimioluminescence est utilisée pour mettre en évidence l'oxygène singulet [330], le radical superoxyde [333], ou la décomposition des hydroperoxydes [334-336]. Cette technique est une des rares permettant de mettre en évidence les stress oxydatif cellulaire. Le dosage peut être indirect. On utilise alors du luminol qui génère une luminescence à 430 nm. la sensibilité de ce type de test est de l'ordre de 10^{-2} mol/l [337,338].

De nombreux tests prennent des enzymes comme générateur radicalaire. La méthode dite au pyrogallol utilise la superoxyde dismutase (SOD) pour transformer l'anion superoxyde en eau oxygénée. Le principe du dosage est basé sur la compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par le radical superoxyde et sa dismutation par la SOD. On peut utiliser la xanthine oxydase pour générer de l'eau oxygénée qui produira des radicaux libres par l'intermédiaire d'un système de fenton (sel métallique, eau oxygénée): l'antioxydant testé inhibe la réaction proportionnellement à sa concentration [339]. Une des méthodes les plus en vogue actuellement est celle dite au DPPH (di-phényl-picryl-hydrazine) [198]. L'engouement pour cette technique est dû principalement à sa rapidité de mise en œuvre. Le DPPH capte un radical non peroxydique pour former une espèce stable qui absorbe à 530 nm (figure 10.6) [340].

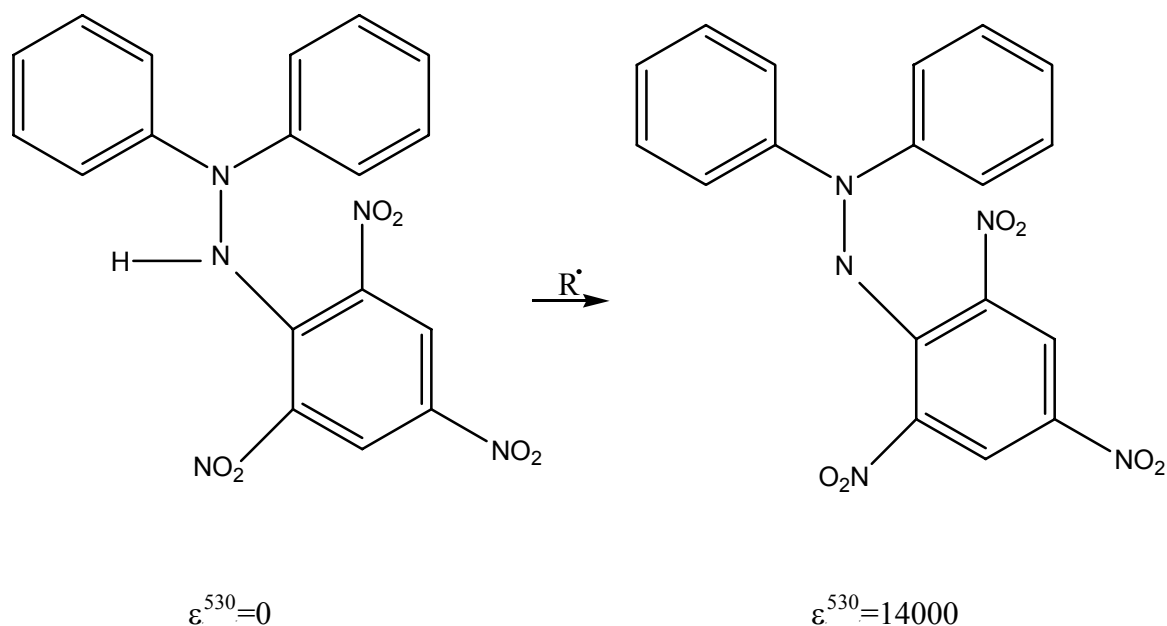
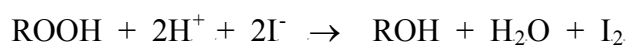


Figure 10.6 : Action du radical DPPH

Une autre méthode d'évaluation de l'AOO, celle de MILLER et RICE-EVAN [341], est basée sur la diminution de l'absorbance d'un radical cation stable $ABTS^{\bullet+}$ en présence d'une solution antioxydante .

10.4.2. Méthodes spécifiques aux premiers stades de l'oxydation

Il convient de réserver au sein de cette partie une place particulière aux mesures iodométriques (indice de peroxyde). Ces dernières sont basées sur la réduction des hydroperoxydes par l'ion iodure selon la réaction :



L'iode formé est dosé en suite par titrimétrie spectrophotométrie ou colorimétrie. Ces méthodes sont considérées comme empiriques, car de nombreux facteurs peuvent perturber la mesure : l'addition de l'iode aux doubles liaisons des acides gras, la réactivité de l'oxygène dissout dans le milieu, même l'intervention de l'expérimentateur. Mais toutes ces difficultés ont pu être appréhendées dans le cadre de

normalisation de la méthode (AFNOR 60220, IUPAC2 501, AOCS cd 8-53). L'unité de mesure de l'indice de peroxyde est exprimée en μg d'oxygène actif par g de corps gras. Le dosage s'effectue généralement en milieu acide acétique-chloroforme, mais l'AOCS conseille de remplacer le solvant chloré par l'iso-octane pour des raisons de toxicité évidentes. Des protocoles dérivés ont été mis au point pour les faibles indices de peroxydes [341], pour étendre la mesure aux diallyls et aux dicuményles peroxydes [342] ou par spectrométrie [343,344].

Les hydroperoxydes peuvent également être dosés selon la méthode dite au thiocyanate de fer. La mesure est basée sur la réduction du thiocyanate ferreux en thiocyanate ferrique qui absorbe à 520 nm. La technique est donnée comme plus sensible que l'indice de peroxyde [345].

Il existe d'autres procédés permettant d'appréhender une AAO via la réactivité des peroxydes lipidiques. On retrouve parmi eux les méthodes au β - carotène et au dimère de sésamol [346-348]. Ces tests se déroulent en émulsion et se basent sur la décoloration des chromophores en fonction du temps. La mesure s'effectue par colorimétrie. Le β -carotène est également utilisé en tant que révélateur d'AAO pour la chromatographie en couche mince.

La formation de la fonction hydroperoxyde entraîne pour les acides gras poly-insaturés une migration d'une double liaison, créant ainsi une conjugaison qui absorbe à 230 nm. Le dosage des diènes conjugués a fait l'objet d'une normalisation AFNOR 60223 et IUPAC 2.505. L'expérimentateur travaille généralement avec des traces d'un agent peroxydant [349,350].

De plus en plus fréquemment, les auteurs décrivent la structure des peroxydes formés. Cela a été rendu possible par le développement des méthodologies de chromatographie liquide haute performance (CLHP) [351-354]. Les mesures sont possibles avec un détecteur UV à 220 nm, ou avec un détecteur électrochimique ou un détecteur de luminescence. Cette technique est extrêmement sensible et demande très peu de corps gras.

L'infra rouge à transformée de Fourier (IRFT) a déjà été utilisé pour visualiser les hydroperoxydes. Des chercheurs ont obtenu une très bonne corrélation entre ce procédé

et l'indice de peroxyde obtenu par voie traditionnelle pour tous les échantillons d'huiles végétales testées [355,356]. Cette méthode permet également de mettre en évidence les phénomènes de dégradation lipidique.

Chacune de ces méthodes permet de déduire par rapport à un témoin l'AAO d'un produit. Mais la formation de ces produits d'oxydation primaire que sont les hydroperoxydes ne présage en rien l'évolution ultérieure de l'échantillon testé. De même, ce ne sont pas ces composés proprement dits qui sont responsables des caractéristiques organoleptiques (odeur, flaveur,...) du produit et qui justifient l'ajout en amont d'un antioxydant. Ces caractéristiques organoleptiques sont liées à la formation des produits secondaires. Il convient donc d'appréhender l'AAO vis à vis de ces composés.

10.4.3. Méthodes propres aux produits secondaires

Comme nous venons de le voir, l'IRTF peut servir à déduire une AAO en permettant de visualiser les produits secondaires. Les premiers essais ont été réalisés très tôt [357]. On peut estimer que la technique arrive aujourd'hui à la maturité car bien plus sensible qu'auparavant [358].

Les produits secondaires qui résultent de l'oxydation comportent très souvent une fonction carbonyle. La méthodologie la plus logique consiste donc à essayer de doser ces derniers. Pour cela, il existe divers tests dont celui à la dinitro-phényl-hydrazine (DNPH). La mesure s'effectue par colorimétrie à 430 nm [359]. L'indice de para-anisidine est une autre technique permettant d'arriver au même résultat. Ce procédé permet le dosage à 350 nm des produits de réaction avec para-anisidine [360]. Cette méthode a fait l'objet d'une normalisation ISO 6885, IUPAC 2.504.

La méthode la plus utilisée actuellement permettant de doser les produits secondaires est celle à l'acide thiobarbiturique (TBA). Elle permet de doser le malondialdéhyde (MDA) grâce à la réaction décrite dans la figure 10.7 :

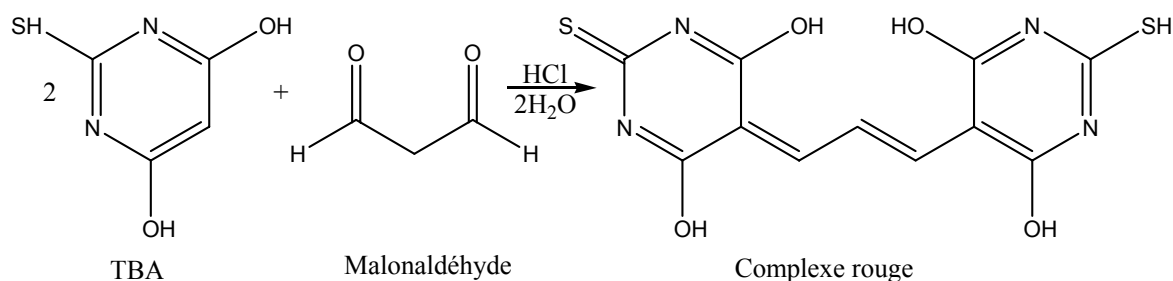


Figure 10.7 : Réaction entre l'acide thiobarbiturique et le malondialdéhyde

Il existe malheureusement de nombreux produits qui réagissent avec le TBA [361]. De ce fait, un test de distinction entre le MDA et les substances réactives au TBA (TBARS) est nécessaire. De nombreuses variantes de ce test ont été mises au point afin de minimiser la part des artéfacts dans les résultats [362,363]. Le TBA peut être remplacé par un autre réactif. Ainsi, le 2-phényl-N-méthyl-indol réagit avec la MDA pour former un complexe qui absorbe à 587 nm, ou avec les aldéhydes conjugués pour former un chromophore.

Une autre méthode, basée sur la fluométrie, permet de différencier le MDA des autres composés aldéhydiques. L'émission de fluorescence est suivie à 405 et 470 nm et permet d'avoir une bonne sensibilité [364,365]. Pour essayer de doser une catégorie de produits particuliers, ici les époxydes, on peut utiliser divers procédés dont un normalisé (AOCS cd 9-57). L'acide picrique a été un des premiers réactifs utilisés à cette fin. C'est un bon chromophore qui permet de doser des teneurs inférieures à 0.1% [366,367]. Aujourd'hui, les techniques ont gagné en sensibilité au point de pouvoir doser les différents isomères [368,369]. Une limite est toutefois à apporter : les époxydes s'ouvrent en milieu acides et l'on voit donc que cette catégorie de tests sera dans certains cas inapplicable.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode assez complète. Elle permet de quantifier la formation des différents produits secondaires, ainsi que la disparition des acides gras. Cette technique permet donc d'appréhender en plus un aspect cinétique des dégradations [370-372].

L'avantage évident est la possibilité d'effectuer des couplages avec la spectrométrie de masse (SM) ou avec l'IRFT.

10.4.4. Méthodes indirectes

Nous citons ici trois méthodes uniquement. La première est basée sur la consommation d'oxygène [373]. L'échantillon est maintenu sous pression constante d'oxygène et l'on peut en déduire la vitesse d'oxydation des corps gras. La deuxième permet de mesurer la perte en acides gras poly-insaturés (AGPI) [350]. La limite évidente de cette technique est contenue dans son nom : un corps gras pauvre en AGPI sera peu pratique à utiliser avec ce type d'analyse. La troisième met en évidence l'augmentation de masse de l'échantillon, grâce à une pesée, qui est associée à l'oxydation. Dans le cas d'une mesure d'AAO, cette méthode permet d'obtenir une variable similaire au temps d'induction [374,375].

CHAPITRE 11

RESULATS DES ANALYSES DES PHENOLS

11.1. Introduction

La réalisation de tests préliminaires a eu pour but d'orienter les recherches chimiques en déterminant la présence ou l'absence de grands groupes de métabolites secondaires connus pour des activités biologiques divers. Ces tests ne sont qu'à titre indicatif et n'ont aucun cas de valeur quantitative même si pour certains, l'apparition d'un précipité plutôt qu'un trouble permet de fixer un ordre de grandeur.

Notre attention s'est portée sur les polyphénols (flavonoïdes, tannins, quinones).

11.2. Tests préliminaires

Selon les molécules recherchées, des tests ont été réalisés soit directement à partir de la poudre végétale, soit à partir d'une décoction de celle-ci.

11.2.1. Recherche de Tanins [376]

La mise en évidence des tanins est basée sur la coloration qu'ils donnent avec une solution de perchlorure de fer à 1%. Les tanins galliques et ellagiques donnant des colorations et des précipités bleus/noirs et les tanins condensés des précipités bruns/verdâtres.

Dans un tube à hémolyse contenant quelques millilitres de la décoction, nous versons quelques gouttes de perchlorure de fer et on note la coloration.

11.2.2. Recherche de flavonoïdes [376]

Nous préparons deux tubes à essais contenant chacun 5 mL de décoction, dans l'un d'eux nous ajoutons quelques gouttes d'une solution d'acide chlorhydrique pur, l'autre servant de témoin pour la comparaison.

La réaction est positive si l'on obtient une coloration rouge. Nous adoptons la notation + à +++ en fonction de l'intensité de la coloration caractérisant une présence plus ou moins importante de flavonoïdes.

11.2.3. Recherche de quinones [377]

Ce test est réalisé en parallèle sur la décoction et sur la poudre végétale.

Nous préparons deux tubes à hémolyse contenant quelques millilitres de la décoction et nous introduisons dans l'un d'eux quelques gouttes d'une solution de potasse (KOH) à 4%.

Dans un bêcher contenant 2g de poudre végétale, nous ajoutons 4 à 5 gouttes d'acide chlorhydrique à 5% pour l'humidifier et on attend 3 minutes. Nous ajoutons alors 20 mL d'éther éthylique, puis nous attendons de nouveau 2 heures. Nous filtrons ensuite la solution

Quelques gouttes du filtrat sont déposées dans deux verres à montre. Dans l'un d'eux, nous ajoutons quelques gouttes d'une solution de potasse à 4%.

Dans les deux cas, la présence de quinones est caractérisée par l'apparition d'une coloration rouge.

11.2.4. Résultats

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces tests chimiques préliminaire est montré dans le tableau 11.1. Il apparaît très clairement que les différentes parties de

Pistachier de l'Atlas sont en possession d'une grande quantité de polyphénols et en particulier des tanins qui semblent occuper une place importante dans les métabolites secondaires dans les gales et feuilles.

Il en est de même pour les flavonoïdes qui semblent être plus abondants chez les fruits et le champignon de Pistachier de l'Atlas. Les quinones enfin sont toujours absentes au niveau de toutes les quatre parties de l'arbre.

Tableau 11.1 : Synthèse des résultats des tests chimiques concernant les polyphénols

Parties de l'arbre	Tanins	Flavonoïdes	Quinones
Fruits	+	++++	-
Feuilles	+++	+	-
Gales	++++	-	-
Champignon	-	++++	-

11.3. Méthodes d'extraction des polyphénols

Les méthodes d'extraction habituellement utilisées mettent en jeu la macération ou la percolation à froid ou à chaud.

La première consiste à faire macérer le matériel végétal pulvérisé dans un solvant, chaud ou froid sous agitation. Après filtration, le solvant est renouvelé plusieurs fois jusqu'à épuisement du végétal.

La percolation consiste à faire passer lentement un solvant à travers une couche de substance végétale pulvérisée.

Pour ces techniques, l'avancement et l'efficacité de l'extraction sont généralement contrôlés par chromatographie sur couche mince qui constitue une méthode simple et rapide d'évaluation des extraits obtenus.

Le choix du solvant d'extraction est fonction du type de constituants que l'on veut extraire. Trois démarches sont possibles :

- Utiliser un solvant dans le quel la substance active est totalement insoluble. On élimine de cette manière tous les autres constituants solubles dans ce solvant.
- Utiliser un solvant dans lequel la substance active est faiblement soluble. Dans ce cas, la substance active est extraite à chaud. Elle est récupérée par précipitation en refroidissant la solution obtenue.
- Utiliser un solvant dans le quel la substance active est très soluble. De cette manière, on récupère directement la substance active par évaporation du solvant.

Le pouvoir extractif d'un solvant est fonction de sa polarité. Les solvants polaires sont en général les plus utilisés dans l'extraction des végétaux. Ceci s'explique par le fait que les plantes renferment une grande quantité d'eau et que les principes actifs des végétaux sont hydrosolubles.

A partir de ces considérations, nous avons recherché les techniques d'extraction utilisées dans la littérature, plus particulièrement pour l'extraction des antioxydants phénoliques. La majorité de ces composés étant de nature polaire. Ils sont extraits avec des solvants polaires.

11.3.1. Méthodes utilisées

Ces méthodes sont consacrées à la mise au point d'une méthode permettant d'extraire et de doser les différentes parties de la plante en polyphénols totaux, afin d'une part de pouvoir les classer suivant leur activité antioxydante, et d'autre part de découvrir des propriétés biologiques des extraits ou des molécules isolées.

Tous utilisent des extraits préparés à partir de la poudre végétale, c'est pourquoi dans un premier temps deux types d'extraits bruts ont été préparés, à savoir un extrait au méthanol et un extrait à l'acétone. La raison de choix de ces deux solvants est de couvrir une large gamme de polarité dans le cadre d'un criblage préliminaire. Par la suite les extraits obtenus ont été étudiés dans divers domaines.

Nos études ont été surtout guidées par trois idées majeures suivantes :

- La quantification de nos extraits en polyphénols totaux par une simple méthode basée sur la spectrométrie UV-Visible.
- Dans l'optique de découvrir de nouvelles molécules possédant une activité antioxydante pour lutter contre les radicaux libres responsables de la dégradation des cellules vivantes, nos extraits ont été testés pour leur effet antioxydant dans des systèmes modèles.
- Le domaine de la nutrition est en permanence à la recherche de molécules pour lutter contre les effets de la détoxification, c'est la raison pour laquelle nos extraits ont été testés pour leur éventuelle capacité inhibitrice à l'encontre d'une enzyme : la carboxylesterase.

Compte tenu de nos objectifs que nous nous sommes fixé, la démarche expérimentale que nous avons adoptée est de mettre au point une technique d'extraction des différentes parties étudiées permettant de procéder en suite à la fois à un dosage quantitatif de l'activité antioxydante des extraits et à un isolement des composés responsables de cette activité.

Dans un premier temps nous testons deux méthodes d'extraction pour la quantification des phénols totaux. Dans un second temps, nous décrivons les différents moyens d'évaluation de l'activité antioxydante.

La complexité des mélanges d'extraits, nous amène à mettre au point une méthode d'extraction simple pour l'extraction des polyphénols.

Enfin, nous isolons et nous purifions les composés phénoliques responsables à cette activité antioxydante.

Pour évaluer l'efficacité de chacune des parties étudiées de l'arbre, nous avons appliqué un protocole identique d'extraction par deux solvants différents, et de dosage des phénols totaux ainsi le dosage de l'activité antioxydante pour chacun des extraits des parties étudiées.

Nous avons utilisé deux solvants de polarités différentes, à savoir le méthanol et l'acétone. A partir d'une quantité de 2 g de la matière végétale mise en contact avec 50 mL de méthanol. La même opération est faite avec l'acétone. Après évaporation des solvants, nous avons obtenu des rendements d'extraction différents. De même nous avons quantifié les polyphénols totaux dans chaque extrait, et déterminé leurs pouvoirs antioxydants.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 11.2.

Tableau 11.2 : Rendements des extraits et taux des polyphénols totaux

Partie de la plante	Méthanol			Acétone		
	Rendement d'extraction (%)	Phénols totaux (mg/g)	TEAC (mM)	Rendement d'extraction (%)	Phénols totaux (mg/g)	TEAC (mM)
Fruits	11,20	40,10	98,90	02,40	30,07	55,41
Feuilles	36,50	180,40	387,60	13,80	60,15	258,26
Gales	43,50	100,00	382,90	03,00	20,05	77,02
Champignon	19,50	100,25	114 ,50	09,50	80,20	95,22

On remarque d'après les données du tableau précédent que le rendement des extraits en utilisant le méthanol comme solvant sont plus importants qu'en utilisant comme solvant de l'acétone. Ce résultat exprime ainsi la bonne capacité du méthanol à faire extraire les composés phénoliques ce qui est d'ailleurs confirmé d'autre part par la quantification des polyphénols totaux.

Les résultats sont présentés dans le tableau 11.2 où figurent, d'une part les pourcentages pondéraux d'extraits obtenus lors de l'extraction par chacun des deux solvants utilisés, et d'autre part les résultats concernant la quantité des phénols totaux ainsi que l'activité antioxydante, exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity=capacité antioxydante équivalente en Trolox). Le TEAC définie comme étant la

concentration millimolaire d'une solution de Trolox possédant la capacité antioxydante équivalente à une solution 1,0 mM de la substance étudiée.

La valeur de TEAC la plus élevée correspond à l'activité antioxydante la plus importante.

Les résultats obtenus pour chacune des parties varient dans le même sens, ce qui montre que ces parties se comportent de la même manière quelque soit le type du solvant utilisé pour l'extraction.

Les pourcentages d'extraits méthanoliques sont, dans tous les cas plus importants que les extraits acétoniques. Les valeurs atteintes sont très variables selon les parties. En effet on peut observer que les gales contiennent 43,5% d'extrait méthanolique et 3% d'extrait acétonique seulement. De même, les feuilles renferment 36,5% d'extrait méthanolique et 13,8% d'extrait acétonique. Il faut aussi remarquer que les pourcentages des extraits méthanoliques dans les fruits et le champignon sont moins faibles par rapport aux gales et feuilles. Les valeurs sont de 11,2% et 19,20% respectivement.

D'autre part, si l'on s'intéresse aux teneurs en phénols totaux et aux valeurs des TEAC pour chacune des parties, nous constatons que celles-ci sont nettement plus élevées lorsque l'extraction est réalisée par le méthanol. Nous constatons aussi que la teneur en phénols totaux est très variable d'un extrait à l'autre. Pour les extraits acétoniques les valeurs sont comprises entre 20,05 et 80,20 mg/g pour les gales et champignon respectivement. Par ailleurs, pour les extraits méthanoliques, les valeurs sont comprises entre 40,10 mg/g pour les fruits et 180,40mg/g pour les l'extrait de feuille.

Dans le même sens, les valeurs du coefficient d'activité antioxydante (TEAC) pour les extraits méthanoliques sont comprises entre 98,9 mM pour l'extrait du fruit et 387,58m M pour l'extrait de feuille, tandis que ces valeurs atteint 55,41 mM et 258,26 mM dans les extraits acétoniques des fruits et feuilles respectivement.

En conclusion, nous pouvons dire que les extraits méthanoliques présentent les valeurs les plus élevées des pourcentages d'extraction, des quantités en phénols totaux et des activités antioxydantes que celles des extraits acétoniques.

Il semble donc raisonnable de penser que les composés antioxydants ont une structure phénolique, ce qui se traduit par une activité antioxydante plus forte que celle des extraits acétoniques déterminé dans les mêmes conditions de dosage.

Si l'on réfère à la littérature, il s'avère que la plupart des auteurs travaillent à partir de matériel végétal sec, en utilisant des solvants polaires. Dans notre cas, nous sommes orienté vers une méthode d'extraction basée sur la macération d'un solvant polaire à froid sur le végétal préalablement séché et broyé.

Suite aux résultats obtenus précédemment, nous avons opté comme solvant un mélange de système méthanol:eau. L'ajout de l'eau va renforcer la capacité du méthanol à extraire plus les composés phénoliques.

Pour ce faire, une quantité bien déterminée de végétal sèche est introduite dans un Erlen Meyer, puis mélanger avec un volume bien déterminé d'un mélange méthanol:eau de proportion (80/20 V/V). Après filtration et évaporation du méthanol, l'extrait aqueux est dépigmenté (élimination des lipides, pigments, chlorophylles) par de l'éther de pétrole.

Les polyphénols sont extraits après par l'acétate d'éthyle en présence des solutions aqueuses de sulfates d'ammonium à 20% et d'acide orthophosphorique à 2%.

Le protocole d'extraction et de dosage utilisé dans ces essais ainsi que la méthode de détermination de l'activité antioxydante sont décrits dans la partie expérimentale. L'extrait est ensuite débarrassé du solvant par évaporation à pression réduite, puis pesé et ensuite récupéré dans le méthanol. Il est enfin conservé au réfrigérateur pour des éventuels tests et analyses. Les résultats obtenus pour chaque extrait sont regroupés dans le tableau 11.3.

Tableau 11.3 : Pourcentage des extraits et aspects

	Pourcentage d'extrait	aspect
Fruits	10,20	Poudre pâteuse jaune
Feuilles	38,40	Poudre marron
Gales	27,20	Poudre marron
Champignon	18,20	Poudre rouge

Les pourcentages pondéraux des extraits d'acétate d'éthyle sont très proches que celui obtenus lors de l'extraction par macération directe et à froid avec le méthanol, sauf pour les deux extraits des gales où l'on constate une très grande différence entre les valeurs des pourcentages des extraits (43,20% dans le cas où l'extraction est réalisé directement par le méthanol (tableau 11.2) contre 27,20% dans le cas de la méthode adoptée). Ces résultats ne sont pas surprenant compte tenu du fait que dans le cas où l'extraction est réalisée avec le mélange méthanol:eau, les phénols de poids moléculaires faibles et moyens sont extractibles de la solution aqueuse par de l'acétate d'éthyle et qu'une quantité importante d'autres phénols, comme les tanins de poids moléculaires élevés, restent solubles dans la phase aqueuse. En effet, les tests préliminaires nous ont montré que les gales sont riches en tanins.

11.4. Quantification des composés phénoliques

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur la teneur en phénols totaux de l'échantillon. Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Ross en utilisant le réactif de FOLIN-SIOCALTEU [378], tandis que les flavonoïdes ont été quantifiés par le dosage direct par le trichlorure d'aluminium d'après une méthode adaptée de LAMAISON et CARNAT [379].

11.4.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage est réalisé selon la méthode citée avant, en utilisant le réactif de FOLIN. Le réactif est formé d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$ et d'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ qui sont réduits par l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène W_8O_{23} et de molybdène Mo_8O_3 .

A partir d'un échantillon étalon d'acide gallique exprimé en g/l, nous avons tracé une courbe d'étalonnage donnant l'intensité de la densité optique à une longueur d'onde de 755 nm en fonction de la concentration en phénols (g/l). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 11.4.

11.4.2. Estimation de la teneur en flavonoïdes

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe très stable avec les groupements hydroxyles OH des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde de 430 nm. Les valeurs des teneurs en flavonoïdes dans les extraits des différentes parties étudiées sont consignées aussi dans le tableau 11.4.

Tableau 11.4. Teneur en phénols et en flavonoïdes des extraits

Partie de la plante	Teneur en phénols totaux (mg /g)	Teneur en flavonoïdes (mg /g)	TEAC (mM)
Fruits	23,48	21,48	383,00
Feuilles jaunes	122,50	13,80	660,76
Gales	113,70	9,00	641,92
Feuilles vertes	112,10	11,55	631,01
Champignons	54,77	50,10	320,00

D'après les résultats du tableau 11.4, nous constatons que les teneurs en phénols totaux et flavonoïdes sont très variables d'un extrait à l'autre. Pour les phénols totaux, les valeurs s'étalent de 23,5mg/g dans l'extrait des fruits jusqu'à 122,50 mg/g dans l'extrait des feuilles. En revanche, pour les teneurs en flavonoïde, on remarque que les valeurs sont comprises entre 9,0 mg/g dans l'extrait des gales et 50,10 mg/g dans l'extrait de champignon.

Dans les extraits des fruits et de champignon, on remarque que les teneurs en flavonoïdes sont très proches des valeurs à celles des phénols totaux, ce qui indique que presque tous les phénols existants dans ces deux parties possèdent des structures flavonodiques. Par contre, dans les extraits des feuilles et gales et feuilles on remarque que la majorité des phénols présents ne sont pas des flavonoïdes. Ces résultats reflètent bien la pauvreté des gales et feuilles de Pistachier de l'Atlas en flavonoïdes par rapport aux autres

parties fruits et champignon et que les flavonoïdes ne représentent que 10% des phénols totaux dans les gales et feuilles.

Enfin de compte, nous pouvons conclure que les parties étudiées de l'arbre de Pistachier de l'Atlas sont des sources prometteuses en composés phénoliques en particuliers les gales et les feuilles et que les flavonoïdes englobent une partie majoritaire des phénols totaux dans les fruits et champignon au contraire des gales et feuilles où les flavonoïdes sont très minoritaires environ 10% de la totalité des phénols.

Egalement, les parties étudiées de l'arbre de Pistachier de l'Atlas sont riches en substances phénoliques en particuliers les feuilles et les gales. Les flavonoïdes constituent une partie très importante de phénols totaux des fruits et de champignon et une teneur moins importante dans les gales et les feuilles.

11.5. Séparation et identification des composés phénoliques dans les extraits par CLHP

Nous avons essayé de séparer les composés phénoliques des quatre extraits par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). L'analyse a été effectuée sur un chromatographe WATERS équipé d'une colonne apolaire de type RP-18 et un détecteur à barrettes dediode. Deux mélanges de solvants ont été utilisés pour l'élution. Le débit est de 1 mL/mn et la température du four est de 30°C. La détection a été effectuée entre 200 et 800 nm.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 11.5. La détermination des caractéristiques spectrales des pics chromatographiques fournis par le détecteur nous a permis de déduire seulement la nature des composés phénoliques existants dans les extraits et de les classer sous trois familles de phénols, à savoir : les phénols de dérivés hydroxybenzoïques, hydroxycinnamiques et les flavonoïdes.

Tableau 11.5 : Résultats de l'analyse CLHP des extraits phénoliques

Extrait	Nombre de pics	Longueur d'onde, nm			% relatif		
		280	320	240 – 260 et 340-380	F	HC	HB
Fruits	11	3	1	7	95	<1	5
Feuilles	11	7	1	3	8	<1	92
Gales	10	9	--	1	2	--	98
Champignon	05	1	1	3	99	1	--

F : Flavonoïdes **HC** : Phénols dérivés hydrocinnamiques **HB** : Phénols dérivés benzoïques

En se basant sur les spectres UV/Visible de chaque composé séparé par CLHP nous avons pu regrouper les composés phénoliques de chaque extraits en deux groupes de phénols : phénols de dérivés hydroxybenzoïques qui sont caractérisées par la longueur d'onde 280 nm et les flavonoïdes qui absorbent à deux longueurs d'ondes 250 et 350 nm.

Onze pics sont détectés dans l'extrait des fruits, parmi eux, deux pics montrent des spectres UV indiquant l'existence de deux composés phénoliques de dérivés hydroxybenzoïques. Le reste possède des spectres UV caractéristiques des flavonoïdes. Il est important de noter que parmi ces flavonoïdes un pic est majoritaire dont la composition relative est de 65%, absorbant à deux longueurs d'onde 248 et 348 nm.

Par ailleurs, si les pourcentages relatifs des produits séparés par CLHP des extraits feuilles et gales sont différents, leurs profils chromatographiques sont en revanche pratiquement semblables. Les spectres UV de la majorité des produits séparés indiquent que les composés phénoliques sont de dérivés hydroxybenzoïques.

En adoptant la méthode de Lamaison, la quantification des flavonoïdes dans l'extrait de champignon s'est avérée la même que celle des phénols totaux. Ce résultat n'a pas été toutefois confirmé par les spectres UV/Visible. En effet, les longueurs d'ondes d'absorption des trois produits majoritaires de l'extrait de champignon (tableau 11.6) absorbent à des longueurs d'onde de 260 et 373 nm qui ne sont pas des spectres caractéristiques des flavonoïdes et qui sont, à notre avis, caractéristiques d'autres produits

de structure phénolique d'insaturation importante. Ces trois produits diffèrent par leurs pourcentages relatifs globaux dans l'extrait dont l'un est majoritaire avec un taux de 68%.

Eu égard aux résultats obtenus, nous constatons que les résultats qualitatifs obtenus par les méthodes colorimétriques utilisées pour le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes sont en corrélation avec ceux de l'analyse par CLHP pour les extraits des fruits et feuilles et gales. Pour les extraits de champignon, nous ne pouvons confirmer cette similitude.

Les extraits analysés contiennent des teneurs importantes en composés phénoliques, ce qui nous incite à les isoler pour permettre leur identification. Ces étapes seront abordées par la suite.

11.6. Méthode d'évaluation de l'activité anti-oxydante

Les méthodes utilisées pour déterminer l'activité anti-oxydante des composés purs ou des extraits sont relativement peu nombreuses et font généralement intervenir la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence et en absence de l'anti-oxydant.

11.6.1. Evaluation qualitative de l'activité anti-oxydante par test chimique

Afin d'évaluer l'activité anti-oxydante de nos extraits, nous avons utilisé dans notre travail une méthode basée sur la réaction entre un radical cationique stable $ABTS^{\bullet+}$ et les extraits anti-oxydants (réaction initialement proposée par CATHERINE RICE et al.) [380].

La décoloration du radical $ABTS^{\bullet+}$ est mesurée à 734 nm par spectrophotométrie à intervalle de temps régulier en présence et en absence des extraits anti-oxydants.

La diminution de la densité optique du mélange sera donc d'autant plus vite que l'anti-oxydant sera plus efficace.

En mesurant la densité optique de nos échantillons chaque minute, nous obtenons les profils des densités optiques en fonction du temps représentés dans la figure 11.1.

Les essais nous ont permis d'estimer le temps total de l'expérience à 5 mn, temps au bout duquel on ne note plus d'évolution significative de la valeur de la densité optique.

Les courbes obtenues sont tout à fait régulières et il est possible de classer sans ambiguïté les extraits selon leur activité anti-oxydante.

Sur la figure 11.1 sont représentées les courbes de la variation de la densité optique du radical $ABTS^{\dot{+}}$ seul et avec les extraits phénoliques des différentes parties étudiées. D'après ces courbes, on remarque que la chute de la densité optique du radical après une minute de contact avec ces extraits anti-oxydants est très importante et surtout pour les extraits des feuilles et gales.

En se basant sur la chute de la densité optique du radical $ABTS^{\dot{+}}$, on peut classer nos échantillons suivant leur activité anti-oxydante dans l'ordre suivant :

feuilles > gales > fruit > champignon

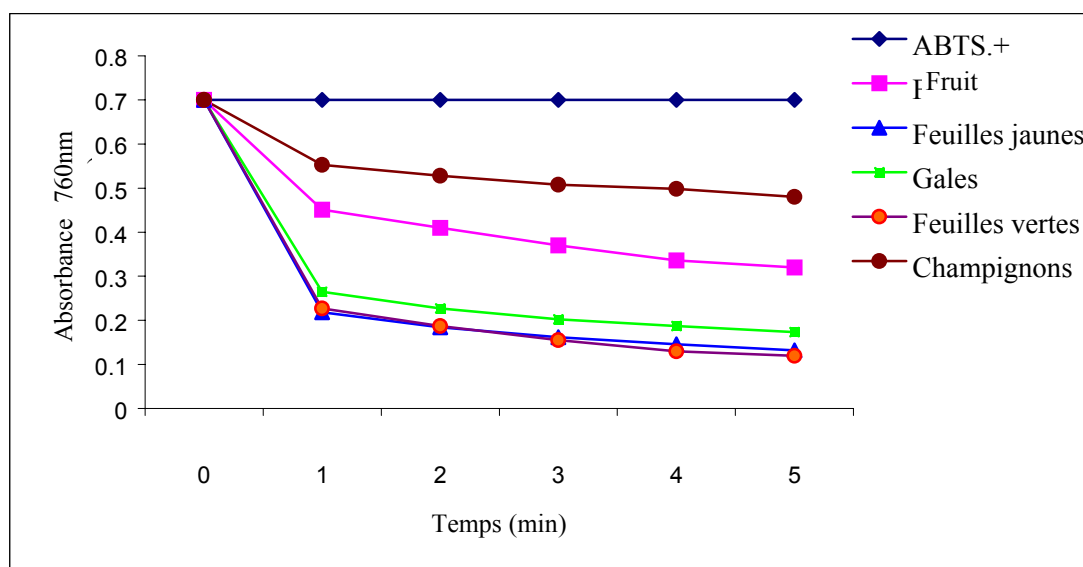


Figure 11.1 : Courbes de densité optique en fonction du temps pour les extraits phénoliques de plantes

11.6.2. Evaluation quantitative de l'activité anti-oxydante

Nous avons évalué quantitativement l'activité anti-oxydante en utilisant la même méthode décrite précédemment. Nous avons étudié la diminution de la densité optique du radical ABTS^{•+} à différentes concentrations volumiques des extraits en fonction du temps.

La figure 11.2 montre la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration volumique des extraits. Le pourcentage de l'inhibition I% est calculée selon la relation suivante :

$$I\% = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \cdot 100$$

Où A_0 est la densité optique moyenne du radical seul au début et à la fin de la mesure, A_i est la densité optique du radical après 5 mn de contact avec l'anti-oxydant. Une courbe d'étalonnage a été préparée pour différentes concentrations (0.5, 1, 1.5 mM) de Trolox afin de calculer la pente de la droite I% fonction de la concentration (figure 4.2).

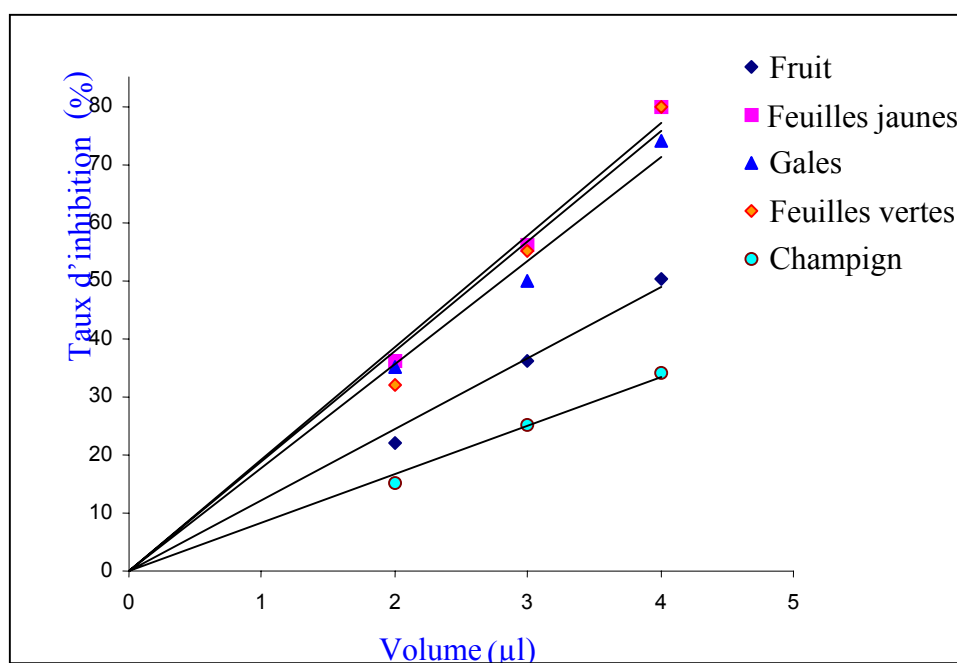


Figure 11.2 : Variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration volumique des extraits

Les valeurs du TEAC des extraits ont été déterminées en calculant le pourcentage d'inhibition de la densité optique I% du radical $ABTS^{\dot{+}}$ en absence et en présence de l'anti-oxydant.

L'ensemble des résultats obtenus pour les valeurs du TEAC a été reporté dans le tableau 11.4.

Les résultats obtenus prouvent que chacun des extraits possède une activité antioxydante qui varie d'une partie de la plante à une autre. De même, la concentration en flavonoïdes des extraits suggère que ces composés, autres que les acides phénoliques, sont responsables de l'activité antioxydante dans cette analyse.

A partir d'une analyse des données, nous avons constaté qu'il y a une corrélation entre la teneur en phénols et l'activité anti-oxydante (coefficient de corrélation $R^2 = 0,86$) des extraits (figure 11.3).

Par ailleurs, si la valeur du TEAC dans les fruits est supérieure à celle du champignon, la quantité en phénols totaux dans les fruits est en revanche inférieure à celle dans le champignon. Ceci nous met en garde à ne pas lier le niveau d'activité anti-oxydante directement à la quantité des phénols. En effet, ce niveau diffère d'une partie de la plante à une autre selon la nature des composés phénoliques. L'activité anti-oxydante dépend donc non seulement de la présence des phénols, mais surtout de leurs structures chimiques.

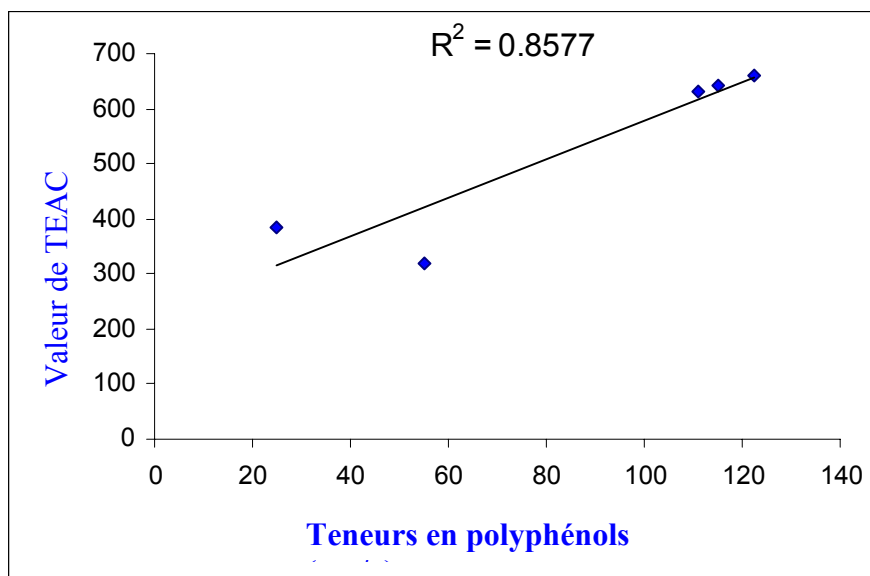


Figure 11.3. Variation des valeurs de TEAC en fonction du contenu en polyphénols

11.6.3. Evaluation qualitative de l'activité anti-oxydante par test biologique

Afin de tester le pouvoir anti-oxydant des extraits phénoliques des différentes parties de la plante sur des cellules vivantes, nous avons opté à faire un test biologique celui de l'hémolyse du sang humain. Pour ce faire, nous évaluons l'état de défense des substances phénoliques vis-à-vis l'intégrité des cellules sanguines induit par AAPH In vitro. Pour réaliser ce test, le sang est récupéré sur anticoagulant EDTA quarante huit heures au maximum avant la réalisation du test. La réaction a lieu dans une plaque multipuits, où une quantité de 100 μ l de sang dilué 50 fois dans de l'eau physiologique a été mélangée à 85 μ l d'une solution d'AAPH (20 mg/ml) et à 85 μ l de l'extrait phénolique de concentrations finales de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} mol/l. La plaque est alors agitée pour homogénéiser le milieu réactionnel, puis immédiatement lue dans un spectrophotomètre IEMS (Lab Systems) afin d'évaluer la variation de la densité optique due à l'hémoglobine relarguée dans le milieu. La longueur d'onde du spectrophotomètre est fixée à 450 nm. Nous déterminons ainsi l'analyse cinétique de la lyse des hématies effectuées sous commande informatique en utilisant le logiciel BIOLISE.

Le test d'hémolyse est réalisé pour les extraits phénoliques des quatre parties de la plante, en choisissant comme anti-oxydant de référence l'acide ascorbique.

Le choix de l'acide ascorbique est lié au fait qu'il est l'antioxydant primaire dans le plasma sanguin d'une part et qu'il est classé parmi les antioxydants les plus puissants connus d'autre part.

Il est bon de rappeler que le temps de demi-hémolyse $T_{1/2}$ est le temps nécessaire pour que les globules rouges se détruisent. Ce temps nous indique donc le niveau de résistance du sang contre la lyse. Autant ce temps est grand, autant est forte la résistance du sang contre sa dégradation et l'activité anti-oxydante de l'extrait en question est de ce fait autant grande.

La comparaison de l'activité anti-oxydantes des extraits des différentes parties de la plante (figure 11.4) nous montre que l'extrait de fruit réalise le plus grand temps d'hémolyse de 4h, valeur 2 fois plus grande que le temps noté en absence d'anti-oxydant. Les autres extraits : feuilles, gales et champignon réalisent des temps moindres de 200, 160 et 150 mn respectivement.

Les pourcentages d'inhibition du test d'hémolyse sont présentés dans le tableau 11.6. Ces pourcentages sont déduits des différentes mesures de $T_{1/2}$ pour une concentration de $5 \cdot 10^{-6}M$ pour les extraits, ainsi que pour l'acide ascorbique (vitamine C).

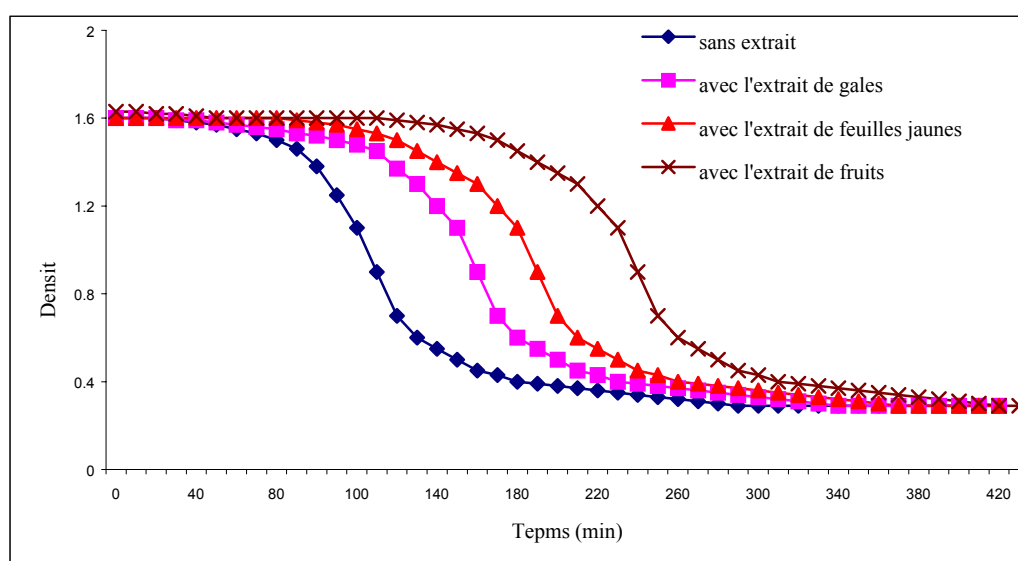


Figure 11.4 : Courbes d'hémolyse en présence d'extraits de plantes ($10^{-5}M$)

Tableau 11.6 : Inhibition d'hémolyse de différents extraits phénoliques de plantes comparées à celle de l'acide ascorbique

Extraits	Inhibition d'hémolyse (%) 5.10⁻⁶ M
Fruits	90,50
Feuilles jaunes	53,00
Gales	62,00
Feuilles vertes	50,00
Champignons	43,00
Acide ascorbique	30,00

Si l'on se base sur la concentration d'extrait utilisée, nous constatons que les extraits sont plus efficaces que la vitamine C contre l'oxydation des lipides dans la membrane d'érythrocyte.

Parmi les différentes parties de l'arbre, les fruits ont montré un pouvoir protecteur le plus efficace contre la lyse du sang, alors que c'est la partie la moins riche en polyphénols. Ceci nous indique que la structure chimique des composés phénoliques est à la base de cette activité, ce qui rejoint la même constatation faite en analysant les résultats du test chimique.

Par ailleurs, l'efficacité des anti-oxydants des extraits testés par méthode biologique suit un ordre différent de celle testée par méthode chimique. Cet ordre est comme suit :

- Test biologique : fruit > feuilles > gales > champignon
- Test chimique : feuilles > gales > fruit > champignon

Cette différence de classement du pouvoir anti-oxydant des extraits entre les deux tests chimique et biologique est due probablement à la différence des milieux réactifs et à la différence d'activité chimique des composés phénoliques individuels constituant les extraits.

La comparaison entre les résultats des deux tests suscités nécessite une étude profonde sur la relation structure chimique et activité anti-oxydantes des composés phénoliques purs.

11.7. Caractérisation des composés responsable de l'activité anti-oxydante

Il résulte des résultats précédents, que les extraits des différentes parties du Pistachier de l'Atlas possèdent une activité anti-oxydante particulièrement importante. Le dosage quantitative par colorimétrie des phénols totaux, la séparation par CLHP de ces composés phénoliques individuels et la détermination de leur pouvoir anti-oxydant nous ont permis en effet de mettre en évidence des composés majoritaires dans les extraits.

Compte tenu de la quantité des phénols totaux et leurs structures chimiques, le protocole d'extraction et de l'isolement change d'une partie de la plante à l'autre. Nous décrivons par la suite une méthodologie d'extraction et de purification des composés majoritaires pour chaque partie étudiée de l'arbre.

11.7.1. Isolement et identification des composés phénoliques dans les fruits et les feuilles

➤ Composés phénoliques de fruits

Une quantité de 5 g de tourteaux du fruit de Pistachier de l'Atlas sont traité à reflux au soxhlet pendant 6 heures en utilisant l'hexane comme solvant afin d'éliminer toute les traces des lipides. Après filtration, le résidu est traité par macération à froid, sous agitation magnétique, par 2x50 ml de méthanol pendant 1 heure. Les deux extraits sont filtrés puis combinés. Le méthanol est évaporé sous pression réduite à une température de 40°C. L'extrait méthanolique, poudre visqueuse de couleur jaune, est pesé ensuite pour déterminer le taux de l'extraction. La masse de l'extrait est 96 mg. Cette quantité est ensuite solubilisée dans 5 ml de méthanol. Une quantité de 10 µl est spotée sur une plaque analytique de gel de silice 60 F₂₅₄ puis développée dans un système de solvant n-Butanol : Acide acétique : eau (3 : 1 : 1v/v/v). Les spots sont visualisés par la lumière UV Visible. Le chromatogramme obtenu montre l'existence de quatre spots dont l'une à R_f=0.95 est très

intense. Ce spot donne un test positif après révélation par une solution méthanolique de 2% de chlorure d'aluminium ce qui indique la présence d'une structure de type flavonoïde possédant deux groupements OH en ortho. L'extrait méthanolique est en suite purifié à travers une colonne ouverte en utilisant le gel de silice (40-60 μ m) comme phase stationnaire et un mélange d'acétate d'éthyle :méthanol (99 :1 v/v) comme éluant. Des fractions de 8 ml sont collectées. Elles sont examinées et contrôlées par CCM en utilisant le même solvant. Les fractions possédant les même valeurs de R_f (tube 3 à 9) sont regroupées et le solvant est évaporé sous pression réduite à 40°C. Nous obtenons un résidu de couleur jaune claire, de poids 48 mg. Le spectre UV dans le méthanol du composé montre deux bandes d'absorption à des longueurs d'ondes λ_{max} 254 et 348 nm caractéristiques d'un squelette flavonodique. Le spectre IR du composé isolé présente des bandes d'absorptions intenses à 3393 cm^{-1} (OH), 1660 cm^{-1} (CO) et 1446-1611 cm^{-1} (C-C) caractéristiques d'un noyau aromatique. Sur le spectre 1H -RMN du produit dans le CD_3OD (figure 11.6), les pics des protons du noyau aromatique B apparaissent à δ 7.41(1H,d, H-2'), δ 6.93 (1H,d, H-5'), δ 7.44 (1H, t, H-6'), tandis que ceux du noyau A, ils apparaissent à δ 6.57(1H, s, H-3), δ 6.21 (1H,d, H-6) δ 6.47 (1H, d, H-8) successivement. Le spectre 1H -RMN du composé dans l'acétone deutérié met en évidence la présence d'un proton phénolique singulier à δ 13.02 ppm. Le spectre ^{13}C -RMN du composé isolé (figure 11.7) montre la présence d'un groupement carbonyle à δ 186.4 ppm, de six -CH carbones aromatiques et de huit carbones aromatiques quaternaire. Sur le spectre de masse du produit purifié (figure 11.8), on note la présence des fragments suivants: un pic correspond à l'ion moléculaire à $m/z=286[M^+]$, deux ions résultent d'un rétro-arrangement de Diels-Alder à $m/z=153[A^++H]$ et $m/z=134[B^+]$ avec la présence de deux groupements hydroxyles dans noyau A et B.

La valeur du R_f est de 0.95 dans un système de solvant Butanol :Acide acétique :Eau (3 :1 :1v/v/v), UV, λ_{max} (MeOH) nm :254,348, IR(KBr) (cm^{-1}): 3393(OH), 1660(CO),1446-1611(C-C), 1H -RMN(CD_3OD ,300 MHz): δ 6.21(1H,d, H-6), δ 6.47(1H,d,H-8), δ 6.57(1H,s,H-3), δ 6.93(1H,d,H-5'), δ 7.41(1H,d,H-2'), δ 7.44(1H,t,H-6'). ^{13}C -RMN(CD_3OD ,300MHz): δ 96.4(C-8), 101.6(C-6), 105.6(C-3), 106.8(C-4a), 116(C-2'), 118.4(C-5'),122(C-6'), 124.8(C-1'), 148(C-3'),152(C-4'), 161(C-8a),164.4(C-5), 166.8 (C-7), 167.2(C-2),186.8(C-4).MSEI M/Z:286(100%)[M^+], masse moléculaire du composé de formule brute $C_{15}H_{10}O_6$,258(16%), 229(13%), 153(25%) et 134(16%).

Ces informations nous ont permis de proposer la structure chimique du composé isolé de l'extrait méthanolique (Fig 11.5).

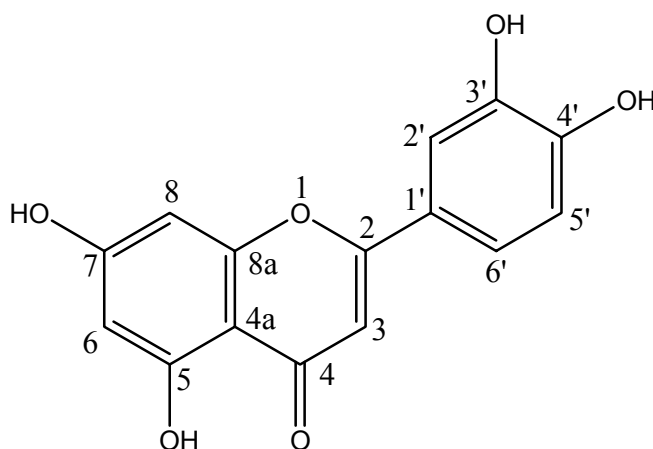


Figure 11.5 : Structure chimique de la lutéoline

Luteoline25 juin 2004

Imported from UXNMR.

Acquisition Time (sec)	5.2953	Comment	Imported from UXNMR.		Date	29/06/2004 09:02:18	
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Temperature (grad C)	0.000			Sweep Width (Hz)	6188.12		

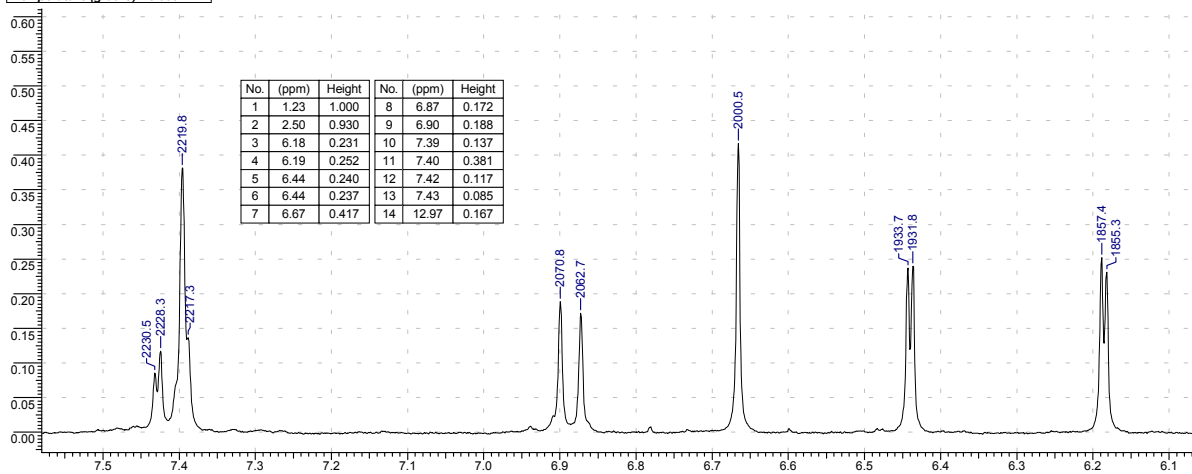


Figure 11.6 : Spectre RMN du proton de la lutéoline

Figure 11.7 : Spectre RMN du carbone de la lutéoline

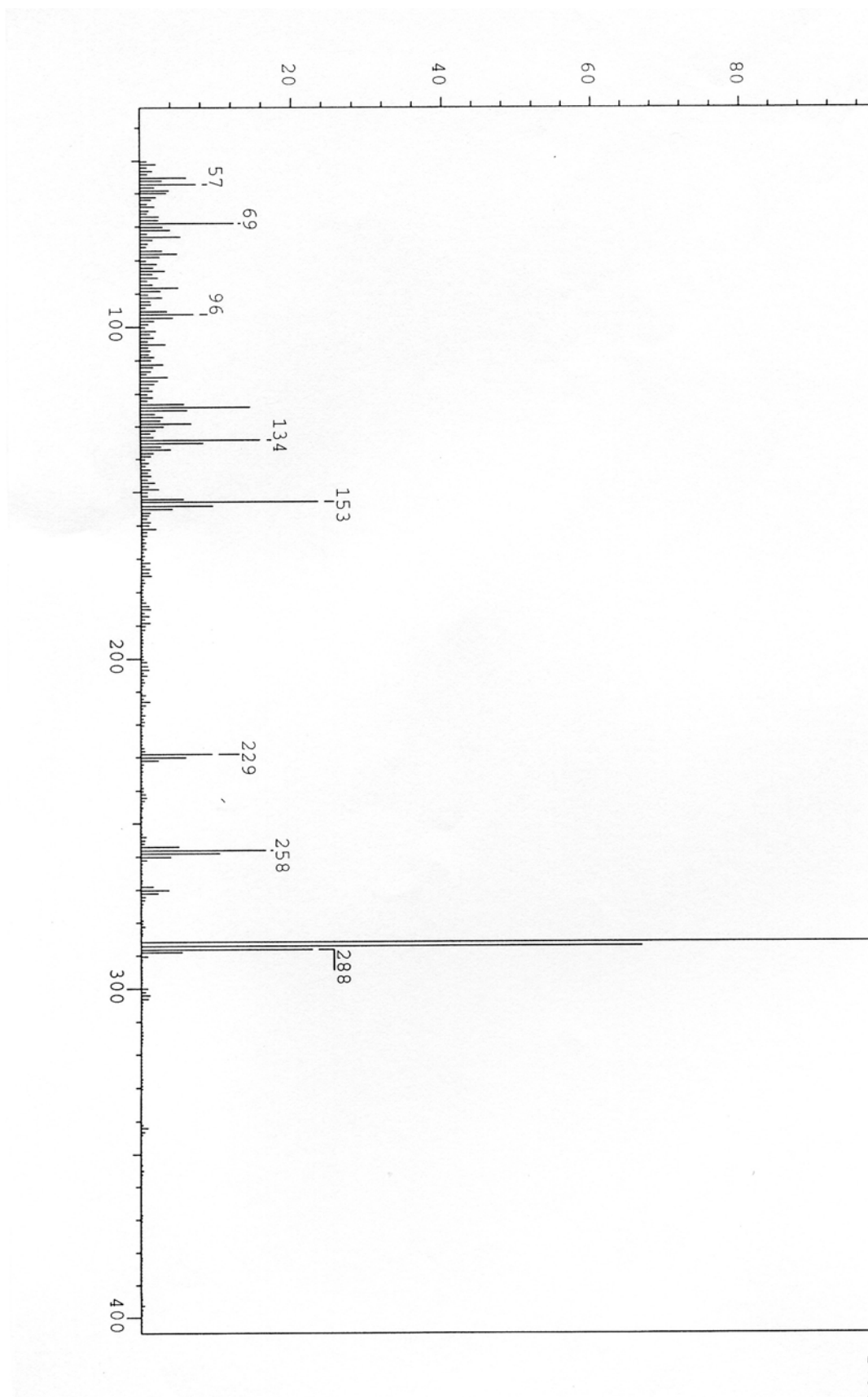


Figure 11.8 : Spectre de masse (IE) de la lutéoline

➤ Composés phénoliques des feuilles

Le mode opératoire d'extraction utilisé est le même que celui adopté lors de l'extraction des phénols dans les fruits.

A partir des tests de séparation par CCM, on a pu trouver le système de solvant acétate d'éthyle: dichlorométhane (7 :3 v/v) comme un bon éluant. Deux produits ont été bien séparés par cette méthode. Ces deux composés sont purifiés par chromatographie sur colonne ouverte de silice (230-400 mesh), en utilisant le même éluant.

A partir de 500 mg de l'extrait acétate, on a obtenu 46 mg d'un composé 1 et 18.3 mg d'un autre composé 2. Il faut noter ici que l'extrait acétate d'éthyle de feuilles contient d'autres produits plus polaires qu'on a pas pu les isoler et les purifier sur colonne de silice.

L'identification des structures chimiques de ces deux composés a été facilement élucidée par RMN du proton et du carbone 13. Les spectres RMN-¹³C sont représentés dans les figures 11.9 et 11.10. Egalement, les deux structures ont été confirmées par une co-injection des composés étalons par CLHP.

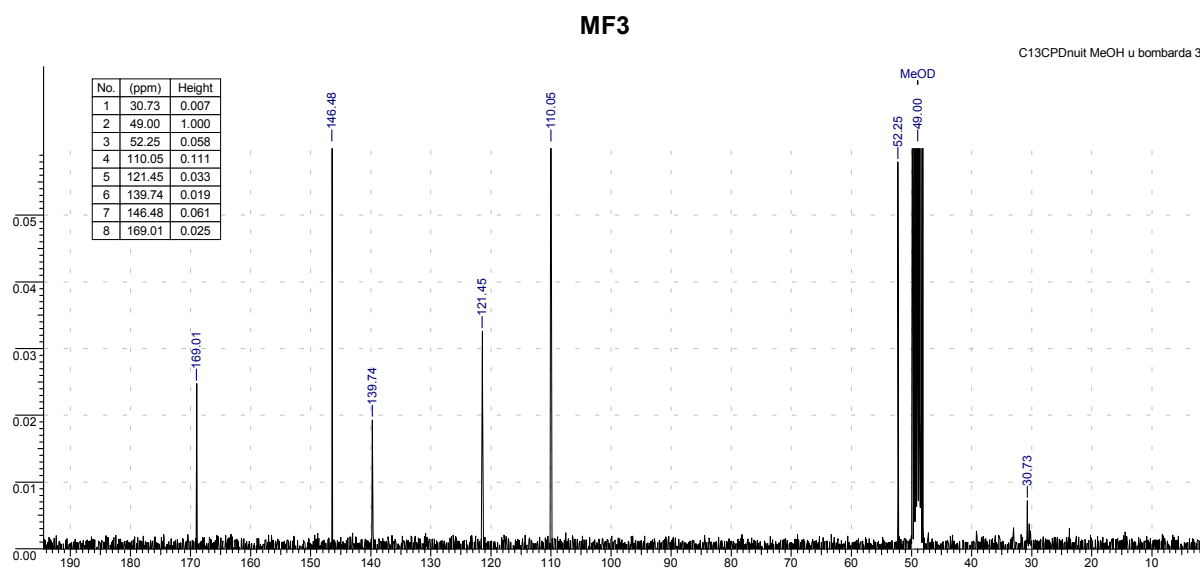


Figure 11.9 : Spectre RMN-¹³C du gallate de méthyle

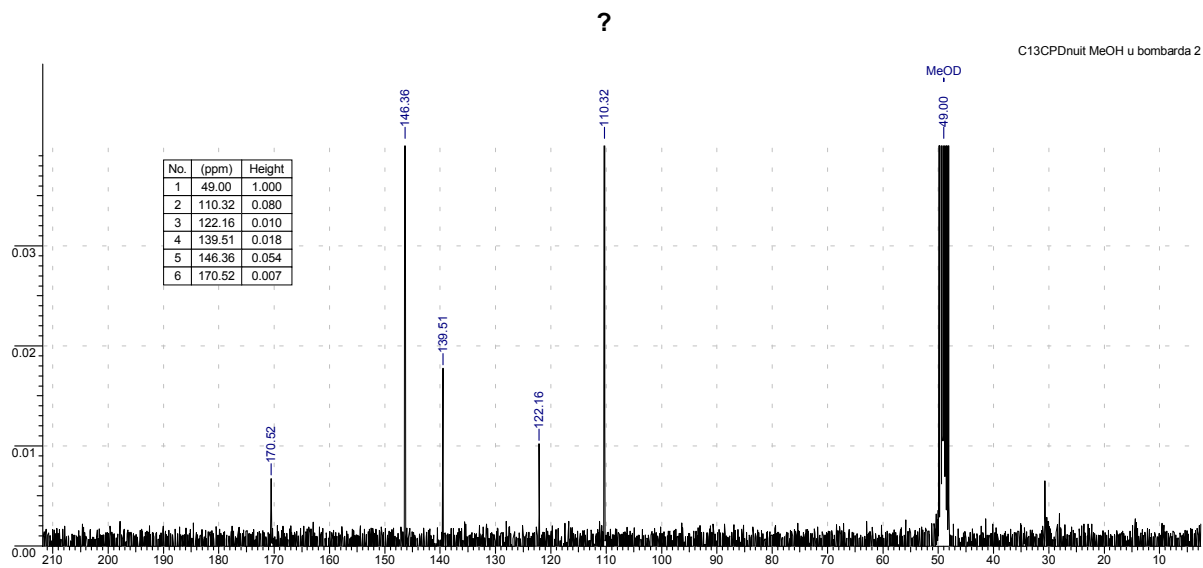
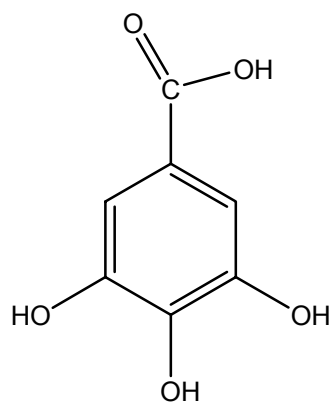
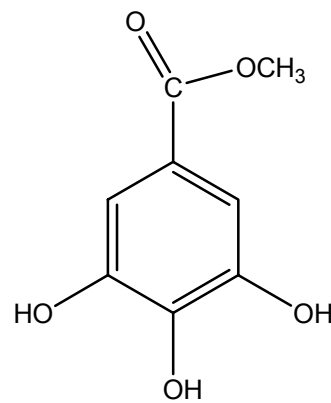


Figure 11.10 : Spectre RMN- ^{13}C de l'acide gallique



Acide gallique



Gallate de méthyle

Figure 11.11 : Structure chimique de l'acide gallique et le gallate de méthyle

➤ Composés phénoliques des galles et champignon

Protocole d'extraction

Le protocole expérimental que nous avons suivi pour les galles et le champignon est schématisé dans la figure 11.12.

Il consiste en une extraction par un mélange méthanol/eau des poudres des deux parties étudiées, suivi d'une extraction liquide-liquide en trois étapes : la première par l'éther de pétrole pour éliminer tous les pigments et les lipides, la deuxième par le chloroforme pour extraire les anti-oxydants peu polaires et enfin par l'acétate d'éthyle pour extraire les anti-oxydants polaires.

Les extraits de chloroformique et l'acétate d'éthyle sont fractionnés sur colonne de silice. L'identification est effectuée au moyen de méthodes spectroscopiques.

11.7.2. Molécules identifiées dans les galles et champignons

En suivant le protocole décrit ci-dessous, nous avons isolé à partir de l'extrait chloroformique de gales l'acide gallique. Trois produits phénoliques dérivés d'hydrocinnamiques ont été isolés de l'extrait de champignon, parmi ces trois produits, le produit 3 a été isolé pour la première fois du Pistachier de l'Atlas.

Pour les galles, on a pu isoler qu'un seul produit de l'extrait chloroformique sur une colonne de silice, à savoir l'acide gallique déjà isolé de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles. L'éluant utilisé est le système de solvant diéthyléther : pentane (8:2 v/v), la quantité obtenue est de 148,2 mg à partir de 247 mg d'extrait chloroformique, soit un rendement de 60%.

Pour les champignons, l'extraction est réalisée à partir des quantités important de matière végétale sèche. A partir de 14 g de poudre de chaque partie, nous avons utilisé l'extraction par macération sous agitation à froid avec renouvellement du solvant jusqu'à épuisement des constituants des parties étudiées.

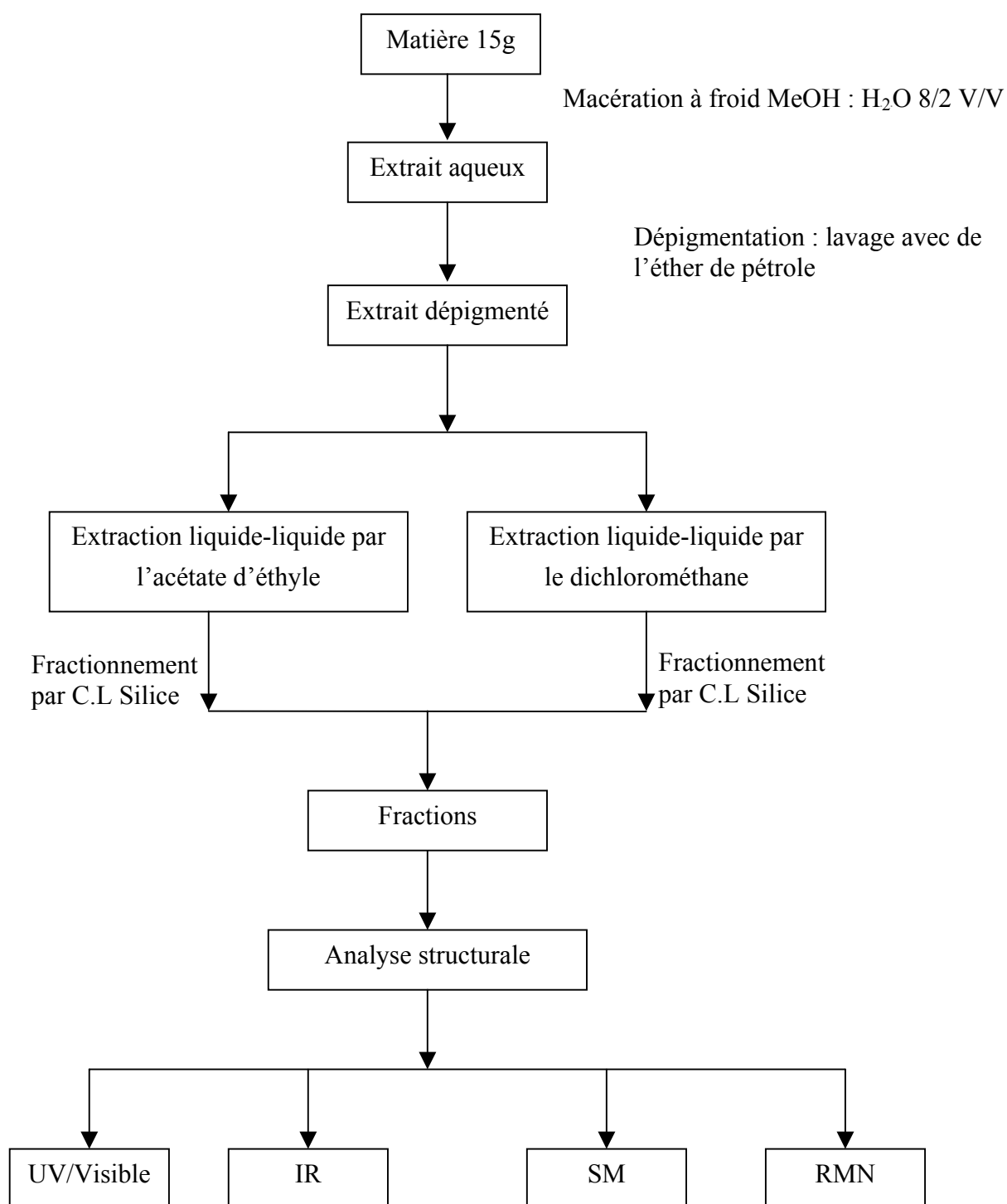


Figure 11.12 : Protocole isolement et identification des composés anti-oxydant

Une quantité de 15g de la matière première (champignon) est bien broyée puis traitée par 300 ml de pentane à reflux au soxhlet pendant 12 heures afin d'éliminer tout composé apolaire (lipide, carotène, chlorophyle...). Le résidu délipidé est ensuite extrait à température ambiante et sous agitation magnétique pendant 24 heures par une solution méthanolique 80% (MeOH: eau 80 :20 v/v). L'opération est répétée trois fois. Les extraits sont filtrés puis combinés. Le méthanol est ensuite évaporé à 40°C à pression réduite. L'extrait aqueux est obtenu premièrement par le chloroforme (3x300ml), puis par l'acétate d'éthyle (3x300ml). Les deux extraits obtenus sont desséchés par du sulfate de sodium anhydre Na_2SO_4 . Après filtration et évaporation on récupère 140 mg et 1 g respectivement.

En utilisant plusieurs systèmes de solvant comme éluant, l'examen de l'extrait chloroformique par CCM sur gel de silice nous a amené à trouver le meilleur éluant (n-pentane: diéthyléther:5 :5 v/v) pour séparer deux produits phénoliques (fig.11.13). Afin d'isoler ces deux produits, nous avons procédé à des fractionnements sur colonne ouverte de silice (silica gel 60 F₂₅₄ 230-400 mesh, Merck, 10x2 cm), en éluant avec le système (n-pentane :diéthyléther :5 :5 v/v). Les fractions sont collectées dans des tubes puis contrôlées par CCM, en utilisant le système (n-pentane :diéthyléther :1 :9 v/v) comme éluant. Les fractions ayant les mêmes valeurs de R_f sont combinées puis filtrées. Deux produits sont isolés :

- composé 1 de $R_f = 0.43$: Le produit est visqueux de couleur jaune-orangé. La masse récupérée est de 17,3 mg.
- composé 2 de $R_f = 0.56$: produit sous forme de poudre jaune claire. La masse récupérée est de 77,8 mg.

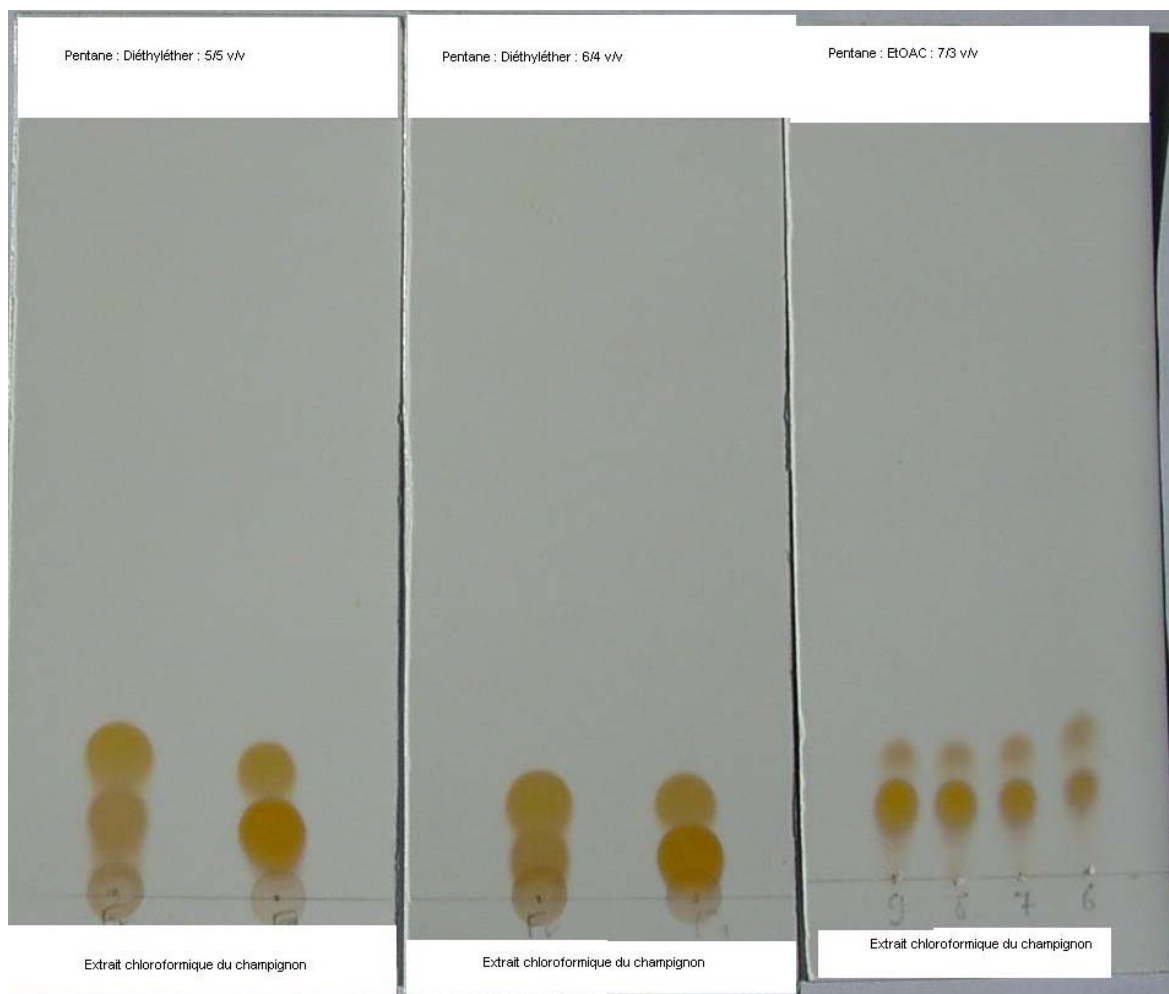


Figure 11.13 : CCM de l'extrait chloroformique du champignon

En utilisant le système acétate d'éthyle :dichlorométhane (5 :5 v/v) comme éluant, l'examen chimique de l'extrait acétate d'éthyle par CCM sur gel de silice met en évidence la présence d'une fraction majoritaire de R_f égal à 0.25. L'extrait d'acétate d'éthyle(500 mg) est ensuite purifié par chromatographie sur colonne ouverte de silice (silica gel 60 F₂₅₄ 230-400 mesh, Merck, 10x2 cm), en utilisant une quantité de 200 ml d'éluant acétate d'éthyle :dichlorométhane (5 :5 v/v). Après évaporation du solvant, nous obtenons des cristaux jaune de masse 84 mg (composé 3).

L'identification des trois composés isolés, a été réalisée par les spectrophotométries IR et UV et par le couplage chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (CG/SM) et enfin par la résonance magnétique nucléaire du proton (RMN-¹H) et du carbone 13 (RMN-¹³C). Les résultats des analyses par UV, IR, SM, RMN-¹H et RMN-¹³C du composé 2 sont en accord avec ceux cités dans la littérature [381]. Si l'on compare les

spectres RMN du proton avec ceux du carbone 13 pour chacun des deux composés 1 et 2, nous remarquons une très grande similitude. Dans les deux spectres RMN- ^1H et RMN- ^{13}C (figures 11.14, 11.15, 11.16 et 11.17), on note la présence de trois protons aromatiques et deux protons oléfiniques en trans. Les signaux ($\delta=5.88$ ppm et $\delta=101.4$ ppm) respectivement dans les spectres RMN- ^1H et RMN- ^{13}C du composé 1 sont caractéristiques d'un proton oléfinique. Par contre, les déplacements chimiques ($\delta=3.55$ ppm et $\delta=52.9$ ppm) sont caractéristique d'un groupement méthoxyle (figure 11.17). Selon les spectres de masse (IE-SM) (figure 11.18 et 11.19) des deux produits 1 et 2. L'ion moléculaire du composé 2 est à $M/Z=236$. De ce fait, le signal restant à $\delta=168.8$ ppm devrait être affecté au groupement hydroxyle pour compléter la composition élémentaire de la formule $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$. La disparition des deux signaux en RMN- ^1H et ^{13}C ($\delta=5.88$ ppm et $\delta=101.4$ ppm) dans le méthanol- d_4 est due à l'échange H/D des isomères céto-énol ce qui favorise la proposition de la forme énolique pour le composé 1. De plus, aucun signal caractéristique de l'isomère cétonique n'a été détecté.

S1purifie 10 mars 2004

Imported from UXNMR.

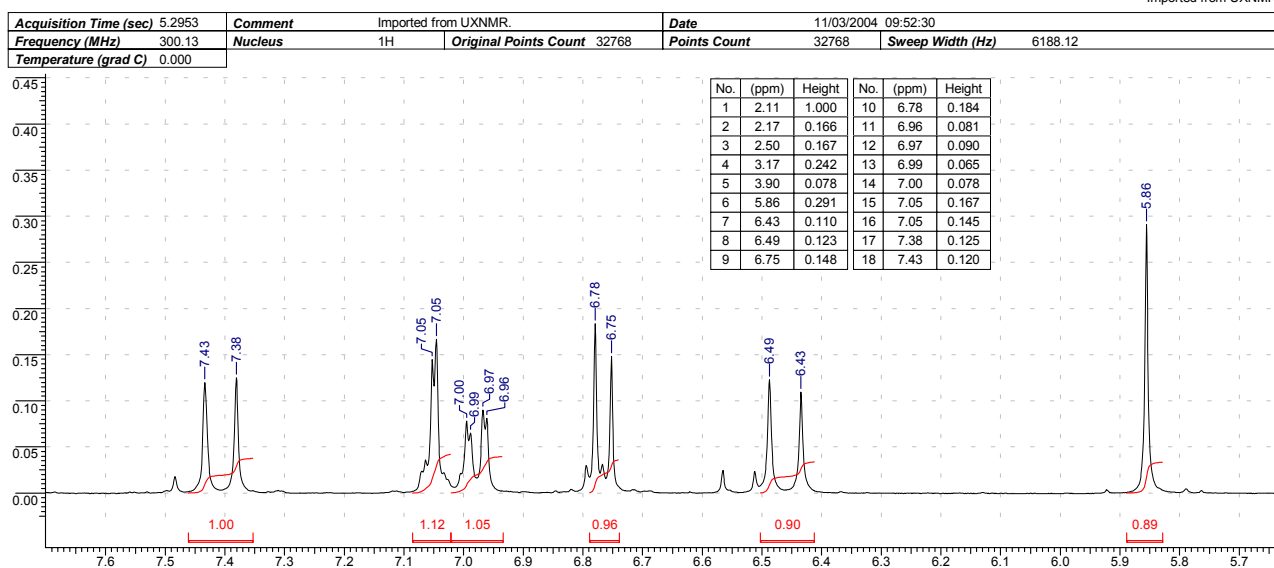


Figure 11.14 : Spectre RMN du proton composé 1

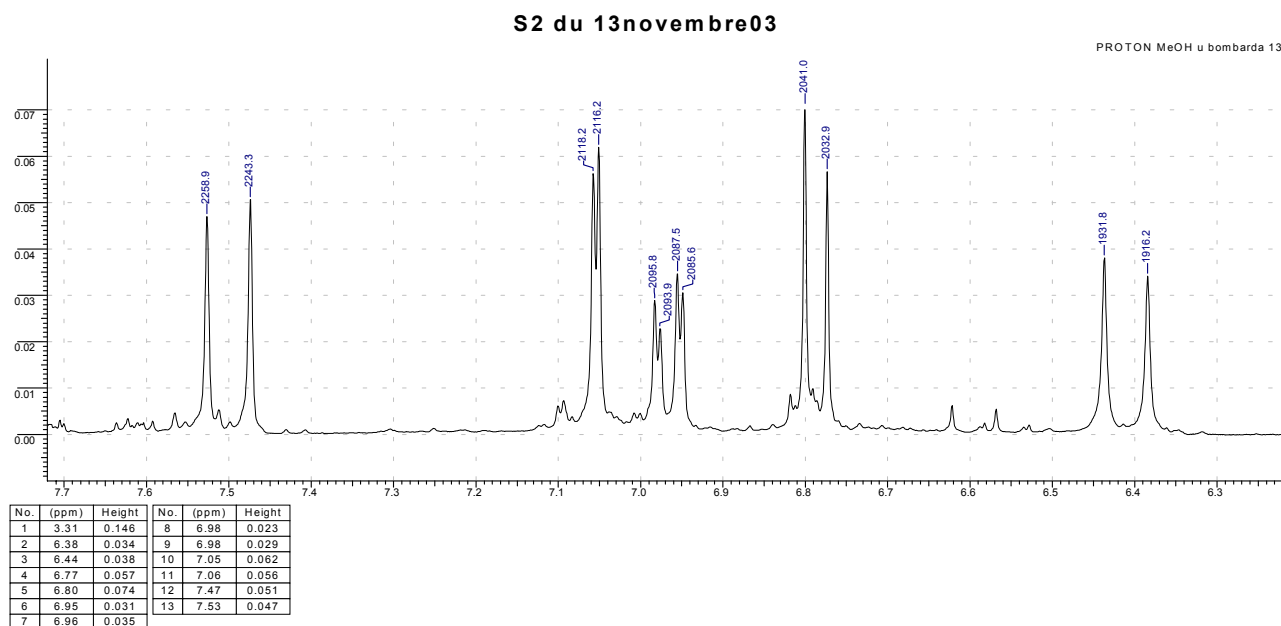


Figure 11.15 : Spectre RMN du proton composé 2

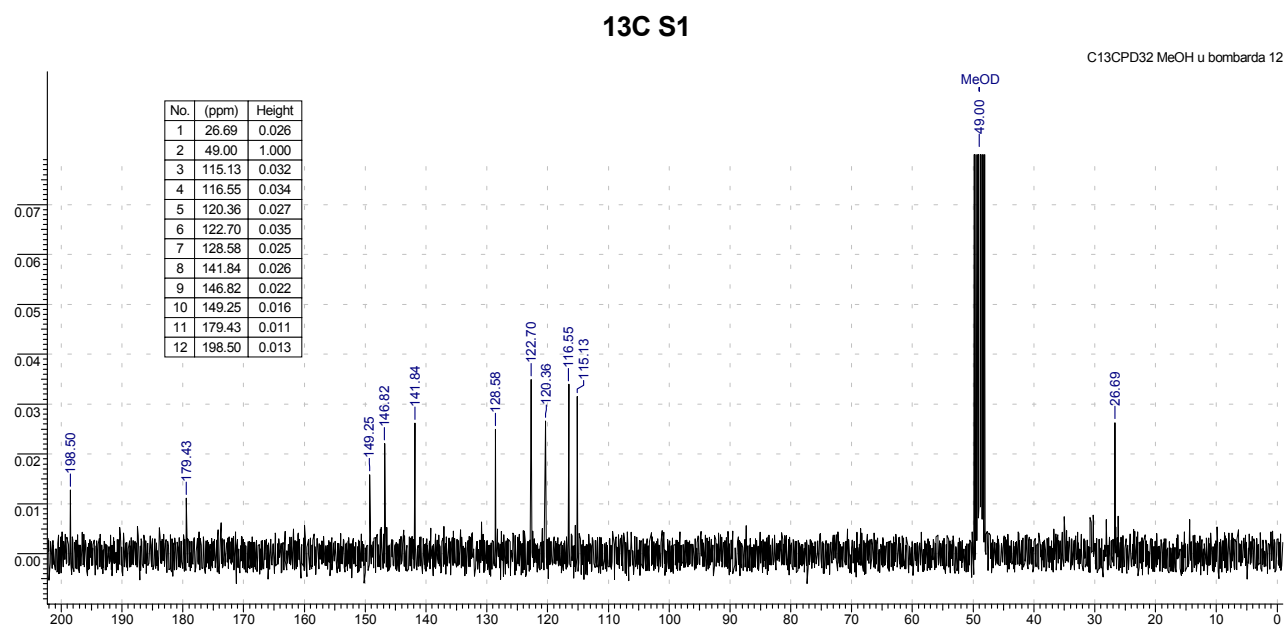
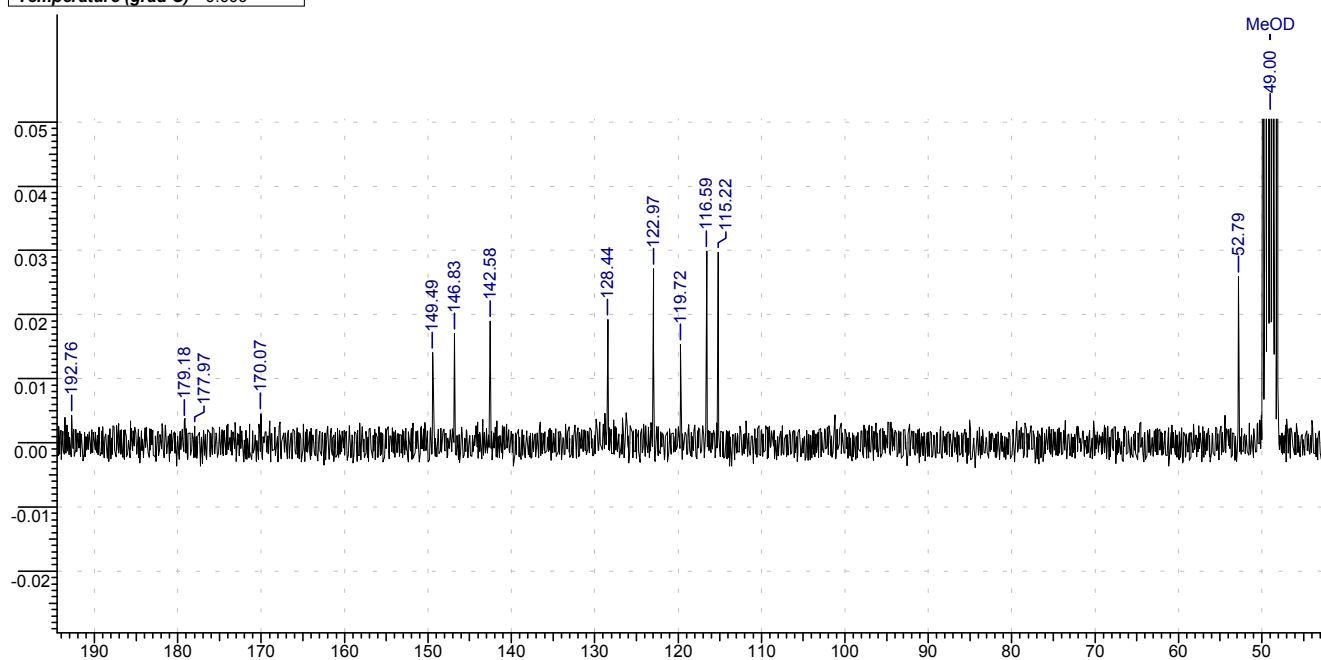


Figure 11.16 : Spectre RMN du carbone composé 1

NS2 du 26 novembre 2003

Acquisition Time (sec)	1.7433	Comment	C13CPDnuit MeOH u bombardata 2		Date	27/11/2003 09:25:58	
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Temperature (grad C)	0.000					Sweep Width (Hz)	



No.	(ppm)	Height	No.	(ppm)	Height
1	49.00	1.000	8	142.58	0.019
2	52.79	0.026	9	146.83	0.017
3	115.22	0.030	10	149.49	0.014
4	116.59	0.030	11	170.07	0.005
5	119.72	0.015	12	177.97	0.003
6	122.97	0.027	13	179.18	0.004
7	128.44	0.019	14	192.76	0.004

Figure 11.17 : Spectre RMN du carbone composé 2

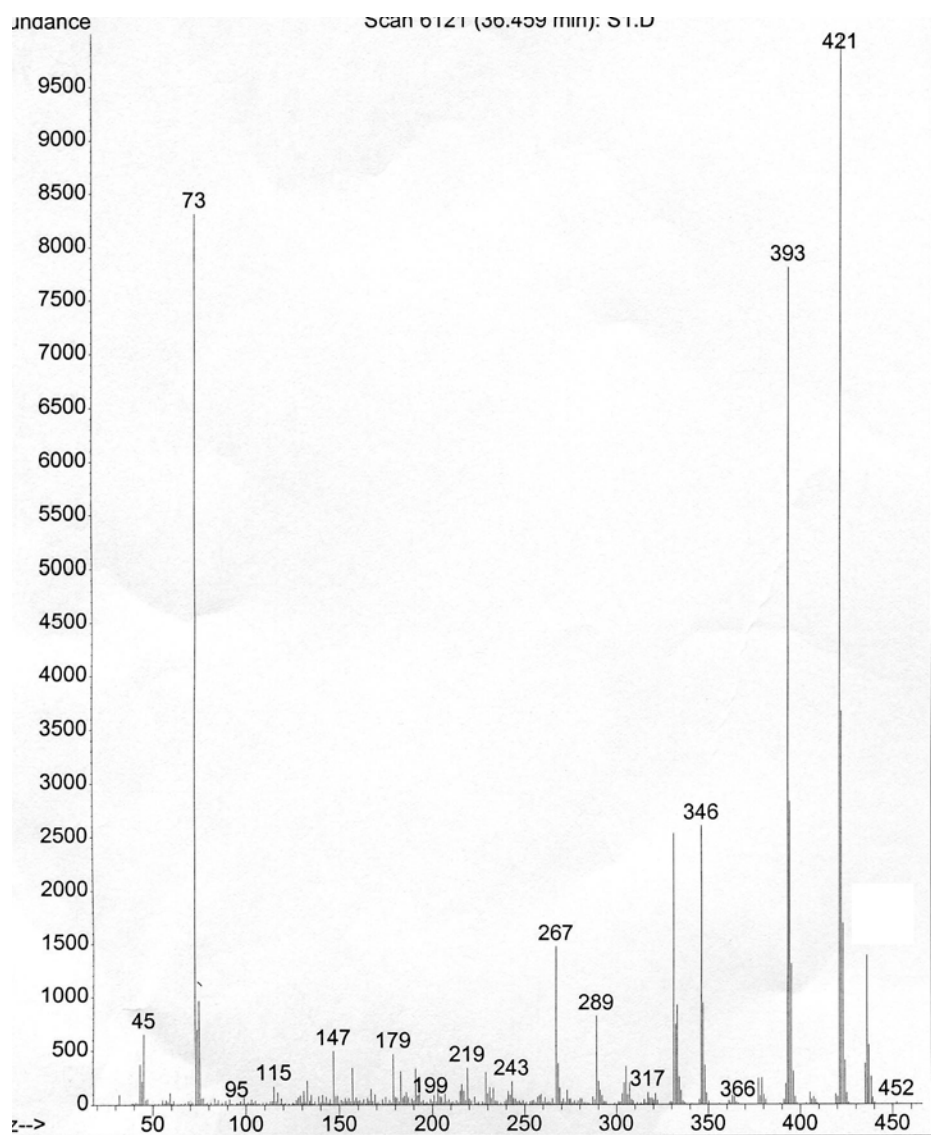


Figure 11.19 : Spectre de masse du composé 2

Le composé 3 est le produit majoritaire de la fraction d'acétate d'éthyle et qui représente 18.2% de ce composé. Son spectre UV dans le méthanol est caractéristique des composés flavonodiques correspondant à deux longueurs d'ondes d'absorption à $\lambda_{\max}=251$ et 372 nm. Le spectre RMN- ^1H du composé 3 (figure 11.20) dans le DMSO montre l'existence de trois protons aromatiques à $\delta=7.02$ (H-10), 6.76(H-13) et 6.94 ppm (H-14), et deux protons oléfiniques –trans à $\delta=6.67$ (H-7) et $\delta=7.13$ (H-8). On note aussi l'existence dans le spectre deux protons énoliques à $\delta=5.27$ (H-3) et $\delta=6.15$ ppm (H-5). La disparition des deux signaux $\delta=5.27$ ppm et $\delta=88.6$ ppm respectivement dans les deux spectre RMN- ^1H et ^{13}C dans le méthanol- d_4 est due à l'échange H/D des isomères céto-énol du proton H-3 est en faveur de l'isomère énol. Le spectre RMN- ^{13}C (figure 11.21)

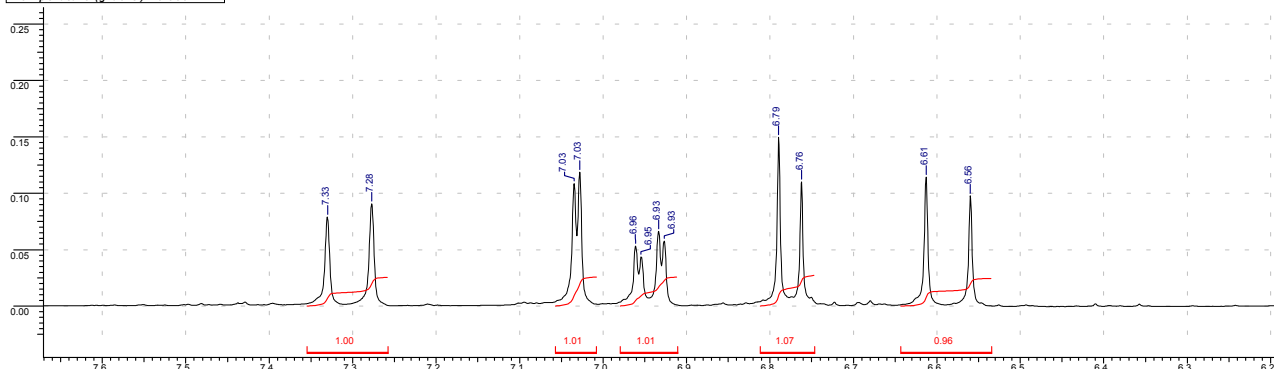
dans le DMSO met en évidence l'existence d'un groupement carbonyle à $\delta = 169.7$ ppm, de trois carbones aromatiques C-H, de quatre carbones oléfiniques et de six atomes de carbone quaternaire. L'identification du composé 3 a été confirmée par l'analyse bidimensionnelle (2D-RMN) à 500 MHz. A partir du spectre HMQC du composé 3 (figure 11.22), les deux protons oléfiniques sont facilement identifiés car ces deux protons résonnent à $\delta = 6.15$ et $\delta = 5.07$ ppm et corrélient respectivement avec les atomes de carbone de déplacements chimiques $\delta = 99.9$ et $\delta = 88.6$ ppm. Une autre information pour le composé 3 est aussi déduite de son spectre HMBC (figure 11.23), car on observe une corrélation entre le proton oléfinique H-5 ($\delta = 6.15$ ppm) et C-3 ($\delta = 88.6$ ppm) et entre le proton H-3 ($\delta = 5.27$ ppm) et C-5 ($\delta = 99.9$ ppm). Ces deux observations appuient l'existence du composé 3 sous la forme énolique. Les deux signaux de H-5 dans le méthanol- d_4 sont toujours présents dans les spectres RMN- ^1H et ^{13}C ce qui exclue l'échange H/D.

Le spectre de masse ESI⁺ (figure 11.24) montre l'existence d'un pseudo-ion moléculaire à $m/z = 247$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ et d'autres fragments caractéristiques à $m/z = 264$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ et $m/z = 279$ $[\text{M}+\text{H}+\text{CH}_3\text{OH}]^+$ qui sont en faveur de proposer au composé 3 la formule chimique générale $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_5$.

S3 du 16 mars 2004

Imported from UXMNR.

Acquisition Time (sec)	5.2953	Comment	Imported from UXMNR.	Date	17/03/2004 15:13:46
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H	Original Points Count	32768
Temperature (grad C)	0.000			Points Count	32768
				Sweep Width (Hz)	6188.12



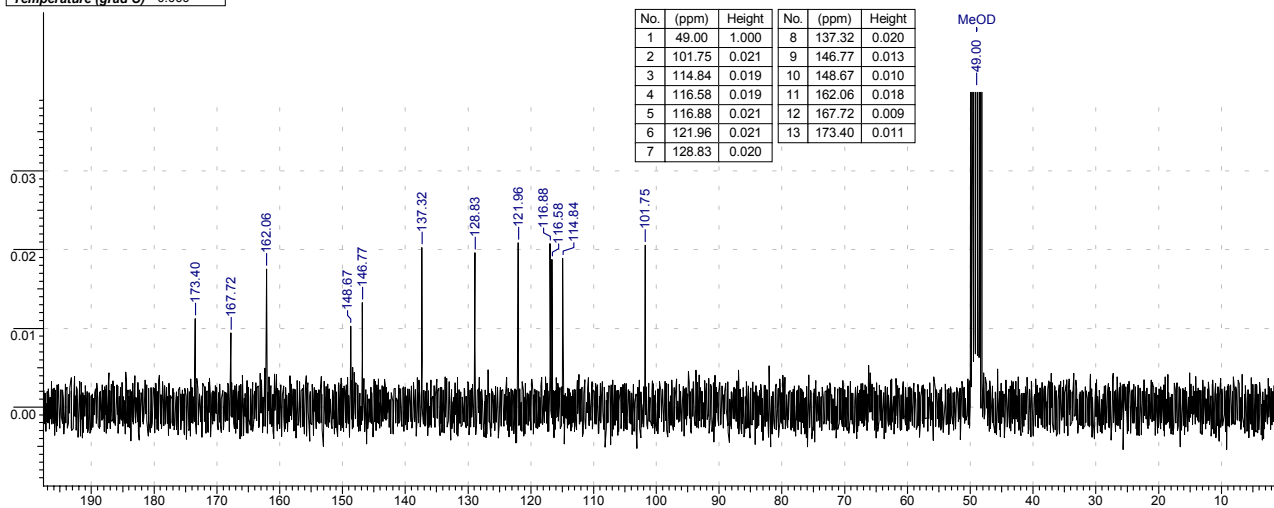
No.	(ppm)	Height	No.	(ppm)	Height
1	2.01	0.062	10	6.79	0.150
2	2.12	0.017	11	6.93	0.058
3	2.15	0.008	12	6.93	0.066
4	3.31	0.266	13	6.95	0.044
5	3.35	0.181	14	6.96	0.053
6	6.11	0.205	15	7.03	0.119
7	6.56	0.098	16	7.03	0.109
8	6.61	0.114	17	7.28	0.091
9	6.76	0.110	18	7.33	0.079

Figure 11.20 : Spectre RMN du proton du composé 3

S3 du 16 mars 2004

Imported from UXMNR.

Acquisition Time (sec)	1.8219	Comment	Imported from UXMNR.	Date	17/03/2004 15:13:22
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	¹³ C	Original Points Count	32768
Temperature (grad C)	0.000			Points Count	32768
				Sweep Width (Hz)	17985.61



No.	(ppm)	Height	No.	(ppm)	Height
1	49.00	1.000	8	137.32	0.020
2	101.75	0.021	9	146.77	0.013
3	114.84	0.019	10	148.67	0.010
4	116.58	0.019	11	162.06	0.018
5	116.88	0.021	12	167.72	0.009
6	121.96	0.021	13	173.40	0.011
7	128.83	0.020			

Figure 11.21 : Spectre RMN du carbone du composé 3

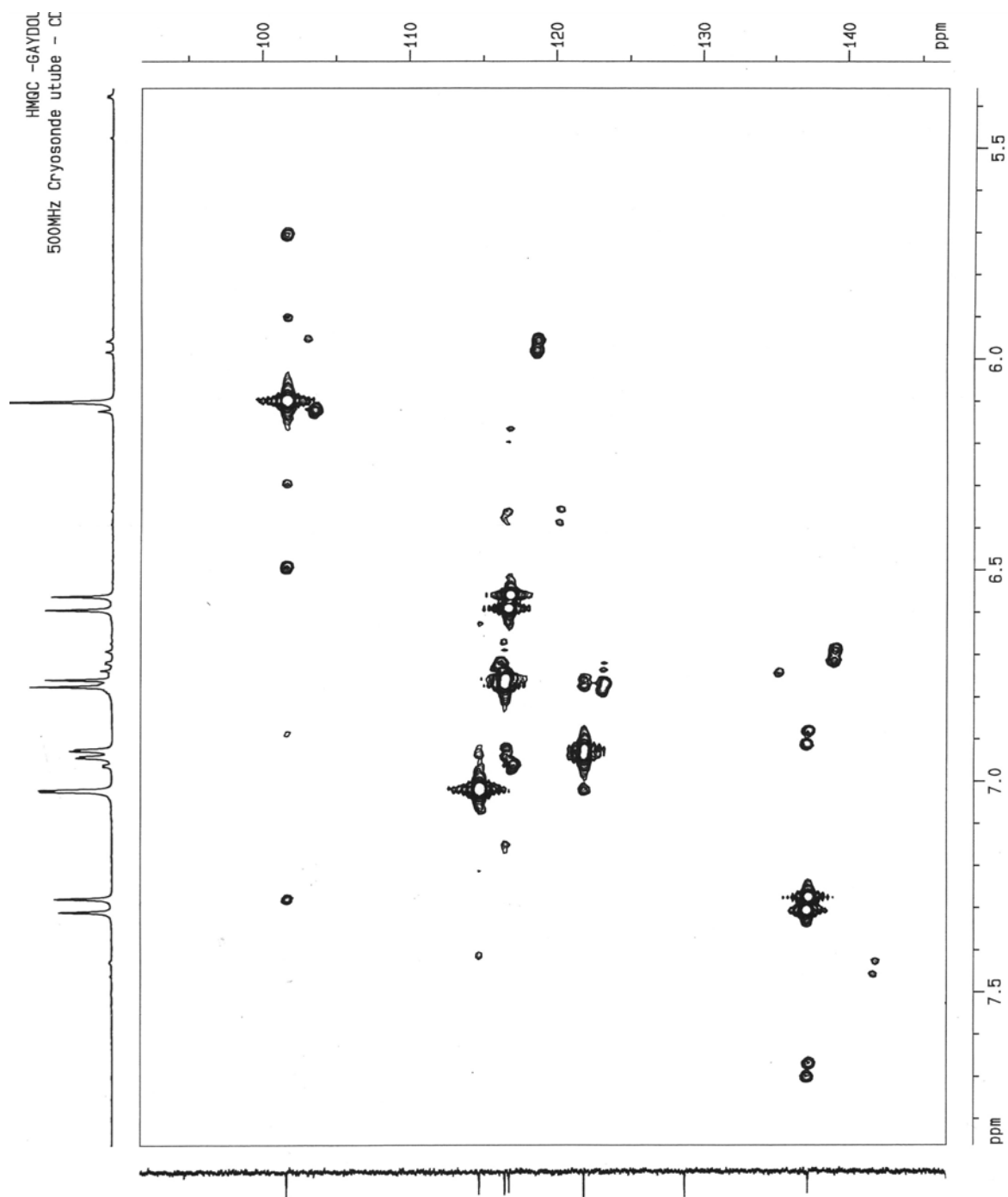


Figure 11.22 : Spectre RMN 2D HMQC du composé 3

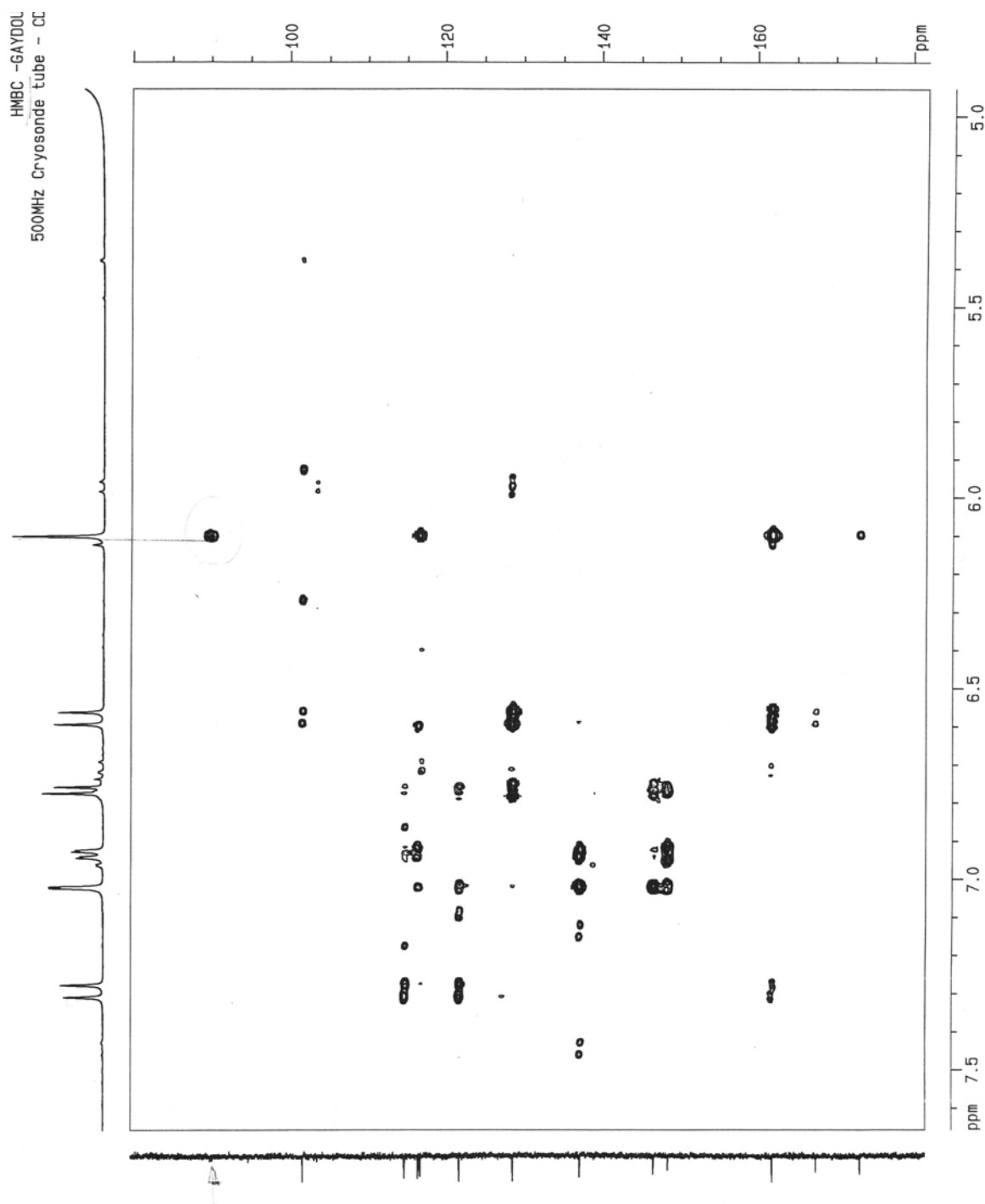


Figure 11.23 : Spectre RMN 2D HMBC du composé 3

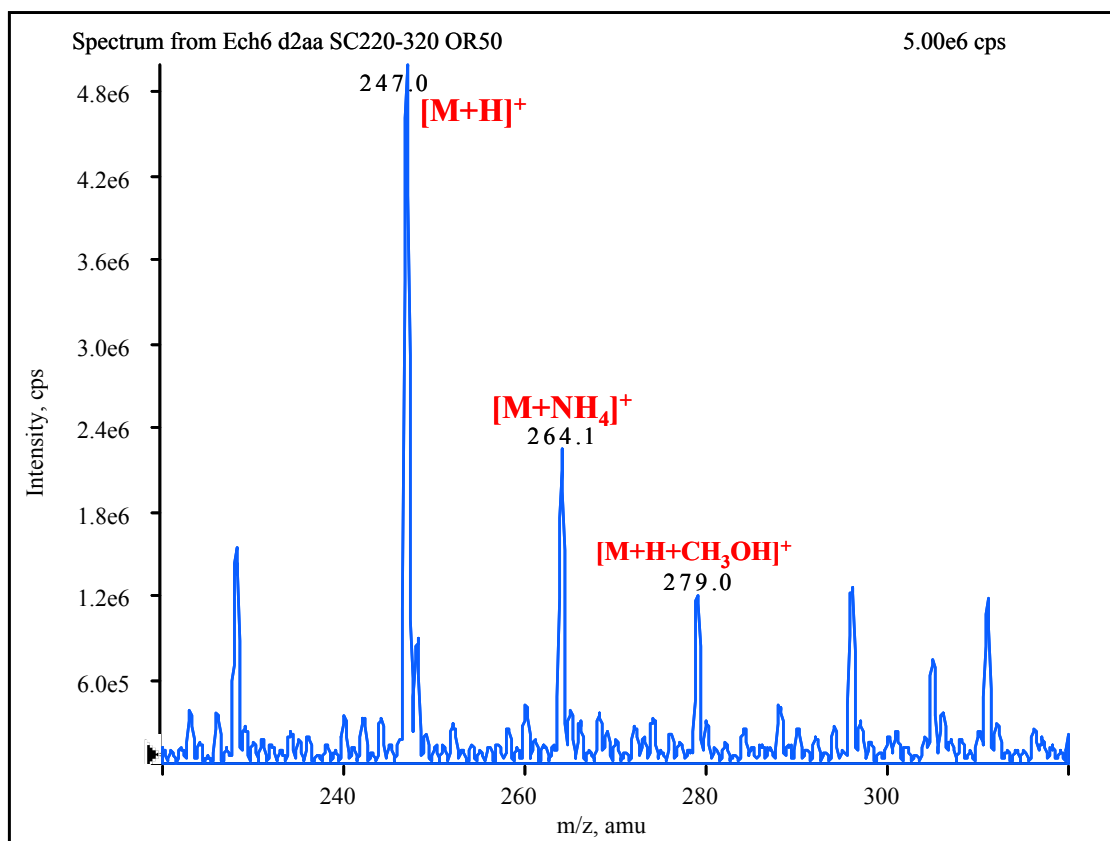
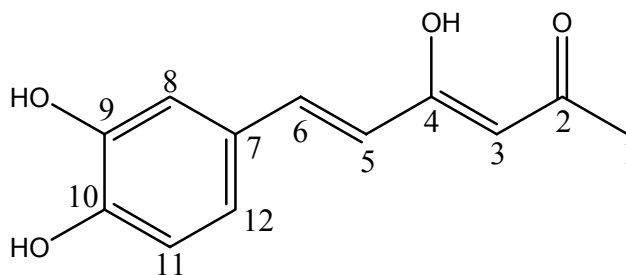


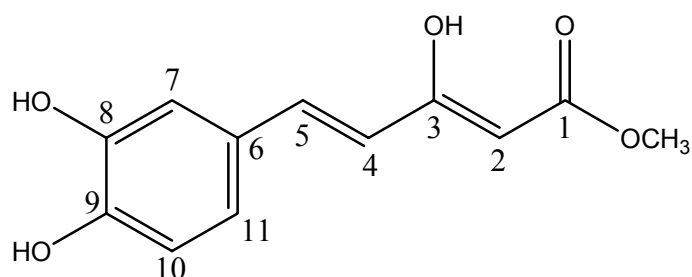
Figure 11.24 : Spectre RMN du carbone du composé 3

Composé 1 UV (MeOH) λ_{max} 257 et 373 nm; ^1H NMR (DMSO-*d*₆), 300MHz): δ 7.41 (1H, d, $J = 15.8$, H-6), 7.05 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.98 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-12), 6.77 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-11), 6.46 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-5), 5.86 (1H, s, H-3), 2.11 (3H, s, H-1); ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 300MHz): 196.7 (C, C-2), 178.5 (CH, C-4), 148.5 (C, C-10), 145.8 (C, C-9), 140.6 (CH, C-6), 126.5 (C, C-7), 121.6 (CH, C-12), 119.4 (CH, C-5), 116.0 (CH, C-11), 114.8 (CH, C-8), 100.7 (CH, C-3), 26.6 (CH₃, C-1); EIMS m/z [M+TMS]⁺ 436 (10), 421 (90), 393 (84), 346 (30), 331 (32), 289 (8), 267 (12), 73 (100).



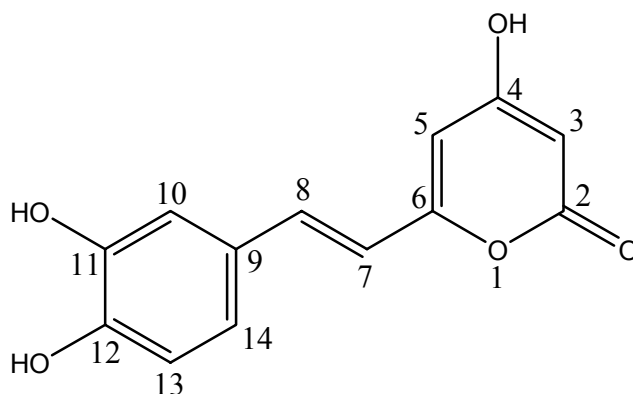
Composé 1

Composé 2 : UV (MeOH λ_{\max} 257 et 379 nm, IR λ_{\max} 257, 379 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO-*d*6, 300MHz) δ 7.50 (1H, d, J = 15.9Hz, H-5), 7.05 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-7), 6.97 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-11), 6.78 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-10), 6.41 (1H, d, J = 15.9Hz, H-4), 5.88 (1H, s, H-2), 3.55 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (DMSO-*d*6, 300MHz): 192.9 (C, C-1), 168.8 (CH, C-3), 149.4 (C, C-9), 146.5 (C, C-8), 141.9 (CH, C-5), 127.1 (C, C-6), 122.4 (CH, C-11), 119.5 (CH, C-4), 116.7 (CH, C-10), 115.6 (CH, C-7), 101.4 (CH, C-2), 52.9 (OCH₃); EIMS m/z [M+TMS]⁺ 452 (5), 437 (?), 393 (84), 346 (31), 289 (10), 267 (15), 73 (90).



Composé 2

Composé 3 : UV (MeOH): λ_{\max} 251 et 372 nm; IR λ_{\max} 251, 372 cm^{-1} ; ^1H NMR (MeOH-*d*4, 300MHz) δ 7.30 (1H, d, J = 15.8Hz, H-8), 7.03 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-10), 6.94 (1H, dd, J = 7.9, 1.9 Hz, H-14), 6.77 (1H, d, J = 7.9 Hz, H-13), 6.58 (1H, d, J = 15.8Hz, H-7), 6.11 (1H, s, H-5); ^1H NMR (DMSO-*d*6, 300MHz) δ 9.07 (OH); 9.44 (OH); 7.13 (1H, d, J = 16.1Hz, H-8), 7.02 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-10), 6.94 (1H, dd, J = 7.9, 1.9 Hz, H-14), 6.76 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-13), 6.67 (1H, d, J = 16.1Hz, H-7), 6.15 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-5), 5.27 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-3); ^{13}C NMR (DMSO-*d*6, 300MHz) 169.7 (C, C-2), 162.4 (CH, C-4), 159.2 (C, C-6), 146.7 (C, C-12), 144.9 (C, C-11), 134.0 (CH, C-8), 126.1 (C, C-9), 119.7 (CH, C-14), 115.7 (CH, C-13), 115.1 (CH, C-7), 113.4 (CH, C-10), 99.9 (CH, C-5), 88.6 (C, C-3); ^{13}C NMR (MeOH-*d*4, 300MHz) 173.4 (C, C-2), 167.7 (CH, C-4), 162.1 (C, C-6), 148.7 (C, C-12), 146.8 (C, C-11), 137.3 (CH, C-8), 128.8 (C, C-9), 122.0 (CH, C-14), 116.9 (CH, C-13), 116.6 (CH, C-7), 114.8 (CH, C-10), 101.7 (CH, C-5), 94.8 (C, C-3).



Composé 3

11.8. Effet inhibiteur des extraits phénoliques

11.8.1 Introduction

Les cellules vivantes exécutent une multitude de réactions chimiques très rapidement en raison de la participation des enzymes [382]. Les enzymes sont les catalyseurs biologiques, conçus par la nature pour augmenter les vitesses des réactions chimiques nécessaires pour la vie. Elles sont également employées dans plusieurs industries pour la production des produits [383]. Plusieurs enzymes du métabolisme des xénobiotiques participent aux processus de détoxification ou activation des précancérogènes chimiques [384].

Dans la présente étude on s'intéresse à l'évaluation des capacités d'agents phénoliques de nos extraits pour l'inhibition d'activité de la carboxylesterase. Cet enzyme joue un rôle dans le procédé d'invasion des sporozoïtes de *falciparum* de P. dans les hépatocytes humains *in vitro* [385]. Les carboxylesterase humains de foie catalysent l'hydrolyse de la drogue apolaire ou des esters xénobiotiques dans des produits plus solubles d'acide et d'alcool pour l'élimination [386, 387]. Elles convertissent la prodrogue Irinotecan *in vivo* en Sn-38 (7-éthyle-10-hydroxy-camptothecin), le métabolite actif qui cause la mort de cellules [388]. De même, les Carboxylesterases hydrolysent de nombreux composés endogènes et étrangers avec les structures diverses [389]. Ces enzymes sont des causes déterminantes principales du comportement pharmacocinétique de la plupart des agents thérapeutiques contenant des liens d'ester ou d'amide [390].

On peut détecter les activités enzymatiques des individus résistants en utilisant des méthodes spectrophométriques classiques. Cette technique se base sur la mesure de la capacité inhibitrice des polyphénols vis-à-vis l'activité catalytique des enzymes de détoxification.

11.8.2. Estimation de l'activité inhibitrice des polyphénols sur carboxylesterase

Dans notre étude, on s'intéresse à étudier l'effet inhibiteur des polyphénols sur la carboxylesterase (CER). L'activité enzymatique de la CER est dosée sur le substrat para-nitrophényl acétate (PNPA). La CER hydrolyse ce substrat et libère le p-nitrophénol.

Le milieu réactionnel (250 μ l) incubé à 37°C contient 10 μ l de substrat de concentration finale (10 mg/ml) et 200 μ l du tampon Tris (PH = 8). La cinétique enzymatique (t = 3 min) débute par addition de 20 μ l d'enzyme CER de concentration de 10mg / ml diluée 200 fois et son évolution est mesuré à 410 nm. Le coefficient d'extinction du p-nitrophényl acétate est de 18400 M⁻¹.cm⁻¹. L'activité inhibitrice des polyphénols est mesurée comme décrit précédemment en introduisant 20 μ l pour des concentrations variables en polyphénols. La représentation graphique $1/V = f ([\text{polyphénols}])$, nous renseigne sur le type d'inhibition et permet de déterminer les constantes cinétiques en présence de chaque extraits.

11.8.3 Résultats

L'activité enzymatique de la CER a été mesurée à l'aide du substrat para - nitrophényl acétate (PNPA). Nous avons néanmoins choisi le PNPA comme substrat essentiellement pour la commodité de réaliser les dosages par les méthodes photométriques. Les paramètres cinétiques de l'enzyme, déterminés selon l'hypothèse d'une cinétique Michaelienne à l'aide de l'équation en double inverse de Lineweaver Burk.

Nous avons donc étudié l'effet des extraits phénoliques sur l'activité de la CER. Nous avons ainsi déterminé les constantes d'inhibition de chaque échantillon en considérant une masse molaire moyenne des polyphénols de 500g.

Parmi les extraits phénoliques testés, on retrouve que l'extrait du fruit du Pistachier de l'Atlas qui possède la capacité d'inhiber l'activité estérasique de la CER sur le PNPA, mais comparativement à la valeur d'inhibition observée pour le Thénoylhiuoroacétone inhibiteur de synthèse classé comme meilleur inhibiteur, on constate que notre extrait une inhibition cinq fois moins que celle d'inhibiteur étalon.

Dans le cas d'un inhibiteur non compétitif, les droites représentant $1/V$ en fonction de la concentration des polyphénols, pour les trois concentrations [S1], [S2] et [S3] en substrat, se rencontrent en un point sur l'axe des abscisses, à la valeur de la constante d'inhibition K_i . Dans le cas d'un inhibiteur compétitif, le point de rencontre des droites se situe au dessus de l'axe des abscisses. K_i représente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse réactionnelle de 50%. Une valeur de K_i toute seule ne permet pas de conclusions mécanistiques, mais peut être utilisée comme un indice d'efficacité d'inhibition par rapport à d'autres inhibiteurs. Dans le cas où l'extrait présente une inhibition compétitive, le composé inhibiteur semble entrer en compétition avec le substrat au niveau de fixation de l'enzyme.

Il est intéressant de noter que l'extrait phénolique du fruit du Pistachier de l'Atlas se comporte comme inhibiteur compétitif (figure 11.25) avec un K_i de l'ordre de 150 micros molaires.

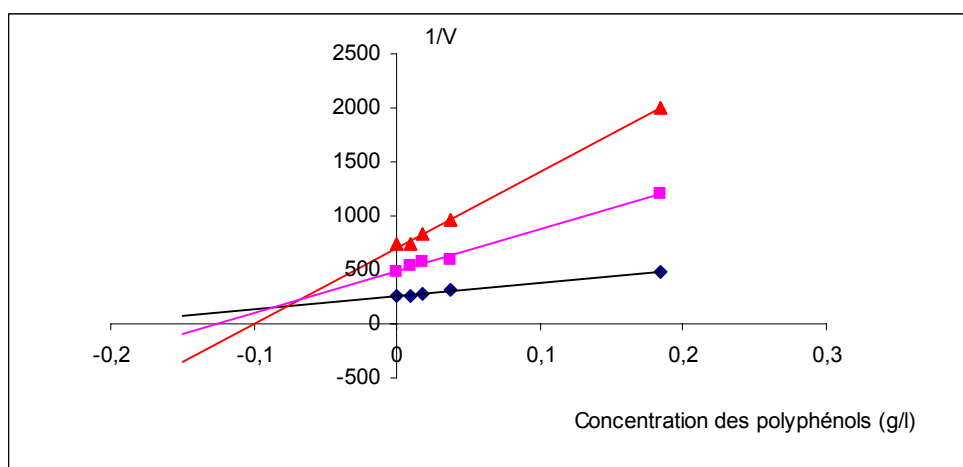


Figure 11.25 : représentation graphique $1/V = f([\text{polyphénols}])$ de l'activité enzymatique de la CER en fonction de la concentration de polyphénols de l'extrait du fruit du Pistachier de l'Atlas

La compréhension du mode d'action de certains inhibiteurs est utile pour la détermination propositionnelle de la nature moléculaire de cet inhibiteur. Puisque chaque enzyme catalyse des réactions spécifiques, c'est à dire il attaque seulement des substrats bien définis, et à partir des résultats de nos essais, on peut alors conclure ou proposer une telle structure seulement pour l'extrait présentant une inhibition compétitive. Alors cet extrait peut comporter dans sa structure des fonctions esters tel que l'extrait du fruit du Pistachier de l'Atlas qui présente la bonne activité et qui possède bien qu'il renferme un taux de polyphénols relativement faible par rapport aux autres parties étudiées.

On peut dire que l'inhibition de la carboxylestérase par les extraits phénoliques dépend seulement de la structure chimique des composés phénoliques présentant cette activité inhibitrice.

Récemment, une carboxylestérase humaine a été cristallisée avec un inhibiteur possédant trois cycles aromatiques, la Tacrine [391], qui présente de fortes similitudes structurales avec certains polyphénols. Cette observation peut être corrélée avec l'affinité que montre le site catalytique de la CER pour certains composée phénoliques.

CONCLUSION

Le travail présenté nous a permis d'approfondir la connaissance de quelques constituants chimiques des différentes parties de l'arbre de Pistachier de l'Atlas de la famille des anacardiées par l'étude détaillée des principaux composés des fractions glycéridiques et insaponifiable du fruit, comme il nous a permis d'identifier certaines molécules bio-actives des fractions phénoliques des différentes parties de l'arbre.

Nous avons déterminé les principaux indices physico-chimiques de l'huile extraite du fruit. Les valeurs de ces indices sont très proches de celle d'autres huiles végétales alimentaires à part l'indice d'acides qui est un peu élevé. Ceci peut s'expliquer par la proportion élevée des acides gras saturés.

La fraction glycéridique est caractérisée par la présence d'acides gras habituels connus dans le règne végétal. L'huile du fruit est riche en acides gras insaturés (73%) représentés essentiellement par les acides oléique et linoléique. Également, cette huile renferme une quantité importante d'acides gras saturés (24% de palmitique et 1.8% de stéarique).

La digestion enzymatique ménagée des TAG par la lipase pancréatique de porc, nous indique que l'acide oléique contribue auprès de 57.7% à l'estérification de la position Sn-2 de la molécule de glycérol, l'acide linoléique y prend part pour 34.6%.

L'identification par CLHP et l'hydrolyse enzymatique des différentes combinaisons triglycéridiques met en évidence dans l'huile de fruit l'existence des TAG composés des acides gras oléique, linoléique et palmitique. Nous retrouvons systématiquement quatre espèces moléculaires majoritaires : POO, PLO, OOL, OOO, LLO et PPO.

L'étude de la fraction insaponifiable a été abordée par l'analyse qualitative et quantitative des tocophérols, particulièrement intéressant à les déterminer pour leurs

aspects vitaminique E et antioxydant. La valeur en tocophérols totaux est peu élevée (600mg/kg) d'huile.

Du point de vue composition qualitative, nous avons observé une composition équivalente entre les deux isomères α et δ tocophérols, ce qui laisse prévoir une bonne résistance aux phénomènes d'oxydation et de bonnes propriétés vitaminiques E.

Six stérols ont pu être identifiés par combinaison des méthodes chromatographiques CCM sur silice et CPG et le couplage GC/MS. Les stérols identifiés sont : cholestérol, campestérol, béta-sitostérol, stigmastanol, $\Delta 5$ -avénastérolet $\Delta 7$ -stigmastérol.

A notre connaissance, aucun travail de recherche n'a été publié sur la fraction insaponifiable de l'huile du fruit de Pistachier de l'Atlas.

En ce qui concerne l'extraction et la quantification des phénols totaux et flavonoïdes, ainsi que l'étude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques et l'identification et caractérisation des principales molécules responsables de cette activité par des méthodes chromatographiques et spectroscopiques, nous avons déterminé tout d'abord la teneur en phénols totaux qui nous a permis de confirmer que les parties étudiées de l'arbre sont des sources très prometteuses de composés phénoliques. En parallèle, l'analyse quantitative du contenu en flavonoïdes nous a conforté dans l'idée que le fruit de l'arbre était en possession d'un matériel riche en flavonoïdes.

Au travers des résultats des tests d'activité antioxydante effectués, nous avons obtenu une réponse inhibitrice du cation radical proportionnel à la concentration des antioxydants. Ainsi, les valeurs de TEAC obtenues 320 à 660 mM peuvent être interprétés comme teneurs des antioxydants hydrophiles. La contribution principale des composés phénoliques peut être également confirmée par la corrélation positive entre le TEAC des extraits et la teneur des composés phénoliques totaux ($R^2=0.86$). Les résultats confirment que le niveau de l'activité antioxydante (AAO) dans nos extraits change avec les matières premières de chaque partie étudiée de la plante. De même, AAO dépend de la capacité antioxydante variable des composés phénoliques individuels dans un groupe de composés.

Comparativement au test chimique, le test biologique a montré sa fiabilité, sa simplicité et son efficacité relative en pouvoir antioxydant. Ce test a permis d'évaluer l'effet protecteur des extraits phénoliques et le Trolox contre la lyse du sang. En ce basant

sur les concentrations utilisées, nous avons constaté que nos extraits sont plus efficaces que le Trolox contre l'oxydation des lipides de la membrane d'érythrocyte. D'après l'ensemble des résultats obtenus, on peut constater que l'extrait du fruit possède une puissante activité anti-oxydante, malgré sa concentration relativement faible en polyphénols par rapport aux autres parties. A notre avis, cette forte activité est due essentiellement à la richesse de cet extrait en flavonoïdes et notamment la lutéoline flavone connue par sa forte activité antioxydante.

D'après les profils chromatographiques des polyphénols effectués par chromatographie liquide à haute performance, comparés avec les temps de rétention et spectres d'UV-Visible des polyphénols de référence, nous avons mis en évidence la présence de l'acide gallique en proportion importante dans les extraits des fruits, feuilles et gales. La majorité des phénols de l'extrait de fruit sont identifiés à savoir : l'acide chlorogénique, la lutéoline, lutéoline 7-glycoside, le kampférol, naringine et naringine 7-glycoside.

L'acide gallique et le gallate de méthyle ont été isolés des extraits de feuilles, de gales et de fruits sur colonne de silice. L'élucidation de leurs structures chimiques a été faite par des méthodes spectroscopiques IR, UV, RMN du proton et du carbone 13 et spectrométrie de masse.

La lutéoline flavone, connue par sa forte activité antioxydante et anti-radicalaire, et aussi par son activité anticancéreuse et anti-HIV a été aussi isolée du fruit avec un rendement important près de 0,8%. Trois produits de dérivés hydrocinnamiques ont été aussi isolés du champignon de l'arbre dont deux sont déjà connus par leurs activités antioxydante et antibactérienne. En revanche, le troisième composé a été pour la première fois isolé.

Un des résultats importants obtenus consiste dans le fait que l'extrait phénolique du fruit du Pistachier de l'Atlas peut être un bon inhibiteur vis-à-vis à l'activité enzymatique de la carboxylestérase, bien qu'il montre un taux en polyphénols totaux inférieur par rapport aux autres parties étudiées de l'arbre. Une explication possible pour ce résultat résulte dans l'effet inhibiteur d'enzyme est dû à l'existence des phénols de structure flavonoïdique dans l'extrait du fruit.

L'ensemble de ce travail contribue à une meilleure connaissance de la composition chimique de différentes parties de l'arbre de Pistachier de l'Atlas, de même à la connaissance des ressources de la flore locale en substances d'intérêt biologique et notamment les composés phénoliques. Dans ce sens, l'esprit reste fondamental. On ne peut cependant nier la portée économique des résultats que nous avons obtenus dans la mesure où les antioxydants naturels se rencontrent rarement en telle quantité dans une matrice qui n'a que peu de valeur. La végétation des régions steppiques et l'Atlas saharien fournit des dizaines de tonnes de feuilles et fruits du Pistachier de l'Atlas. A notre considération, au lieu de voir cette biomasse partir en fumée, il est plus bénéfique d'envisager une valorisation industrielle en vue des produits nobles que renferme cet arbre notamment en phénols et flavonoïdes.

APPENDICE A**LISTE DES ABREVIATIONS**

AAO : activité antioxydante

AAPH : dichlorate – 2,2-azobisamidinopropane

ABTS : 2,2-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate)

AFNOR : agence française de normalisation

AG : acide gras

AGCE : acide gras cyclopropénique

AGE : acide gras essentiel

AGEP : acide gras époxydique

AGL : acide gras libre

AGPE : acide gras polyinsaturé

AOCS : american oil chemists' society

BHA : tertio buthylhydroxyanizole

BHT : tertio buthylhydroxytoluène

C 16 :0 : acide palmitique

C16 : 1 acide palmitéolique

C18 :0 acide stéarique

C18 :1 acide oléique

C18 :2 acide linoléique

C18 :3 acide linoléinique

CCM: chromatographie sur couche mince

CL : chromatographie liquide

CLHP : chromatographie liquide à haute performance

CP : chromatographie de papier

CPG : chromatographie en phase gazeuse
DMCs : diméthylchlorosilane
DMG : ditriacylglycérol
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
EMAG : ester méthilique d'acide gras
HMBC : heteronuclear multiple bond correlation
HMDS : hexaméthylidisilane
HMQC : heteronuclear multiple-quantum coherence
HSQC : heteronuclear single-quantum coherence
IA : indice d'acide
IE : impact électrinique
II : indice d'iode
IR : infra rouge
IRTF : infra rouge à transformée de fourrier
IS : indice de saponification
IUPAC : international of pure and applied chemistry
J : constante de coulage
LCE: longueur de chaîne équivalente
LLL : trilinoléine
LnLnLn : trilinoléine
MAG : monotriacylglycérol
 M^{AG} : masse moléculaire moyenne des acides gras
MDA : malondialdéhyde
MI : matière insaponifiable
 M^{TAG} : masse moléculaire moyenne des triacylglycérols
NCE: nombre de carbone équivalent
NI : nombre d'insaturation
NOESY : nuclear overhauser and exchange spectroscopy
NP : nombre de partition
OOO : trioléine

PPP : tripalmitine

RDA : réarrangement de diel-alder

R_f : facteur de rétention

RMN : résonance magnétique nucléaire

RMN 2D : résonance magnétique nucléaire à deux dimensions

ROESY : rotational nuclear overhauser effect spectroscopy

Rp- 18 : colonne à phase inverse

RPE : résonance paramagnétique électronique

SM : spectrométrie de masse

SSS : tristéarine

TAG : triacylglycérol

TBA : acide thiobarbiturique

TBHQ : tertio butylhydroxyquinone

TEAC : trolox equivalent antioxidant capacity

TMCs : triméthylchlorosilane

TMS : triméthylsilane

TR : temps de rétention

TRR : temps de rétention relatif

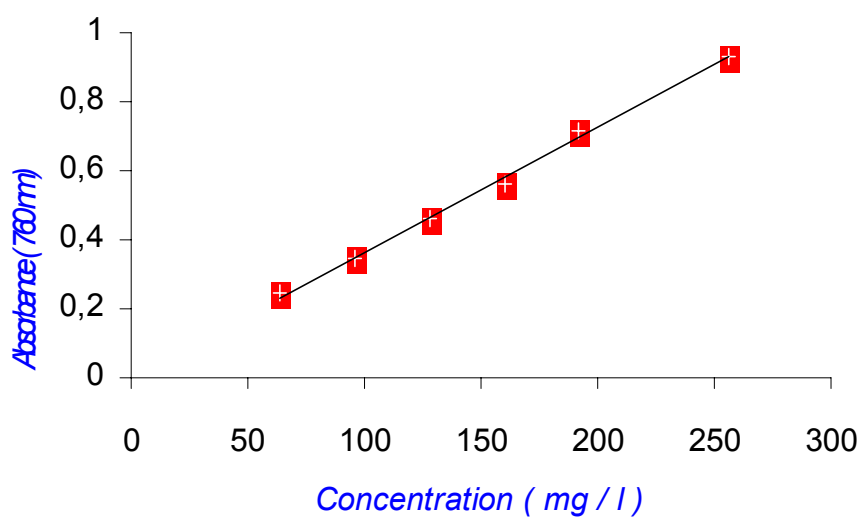
UV : ultra violet

δ : déplacement chimique

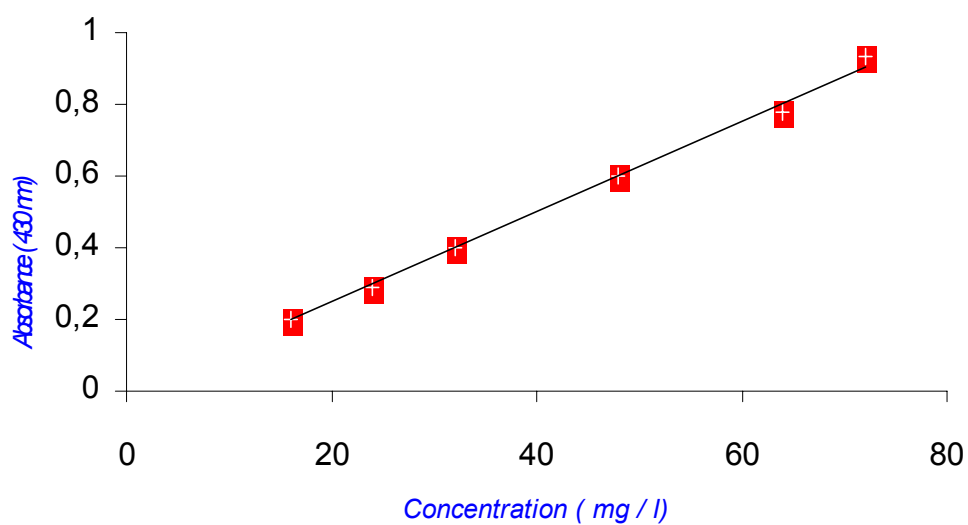
λ_{\max} : longueur d'onde d'absorption maximale

APPENDICE B

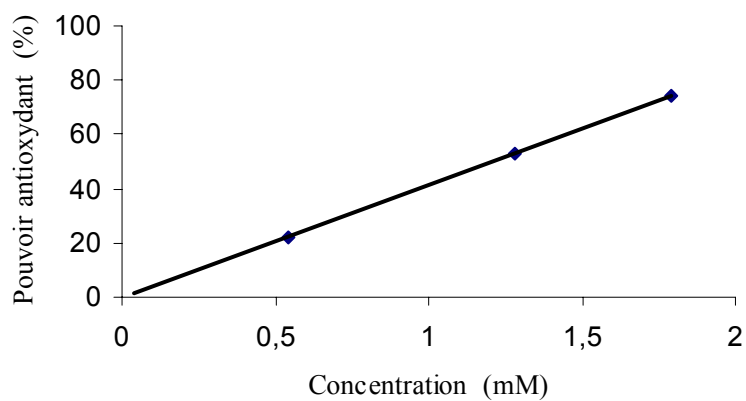
COURBES, FORMULES CHIMIQUES, SPECTRES DE MASSE



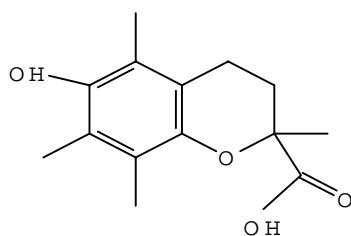
Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



Courbe d'étalonnage de la rutine

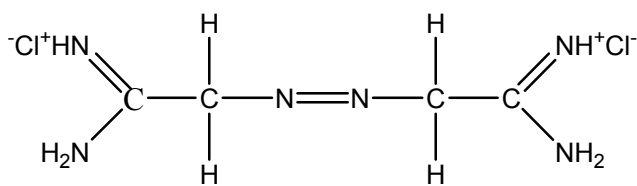


Courbe d'étalonnage du Trolox

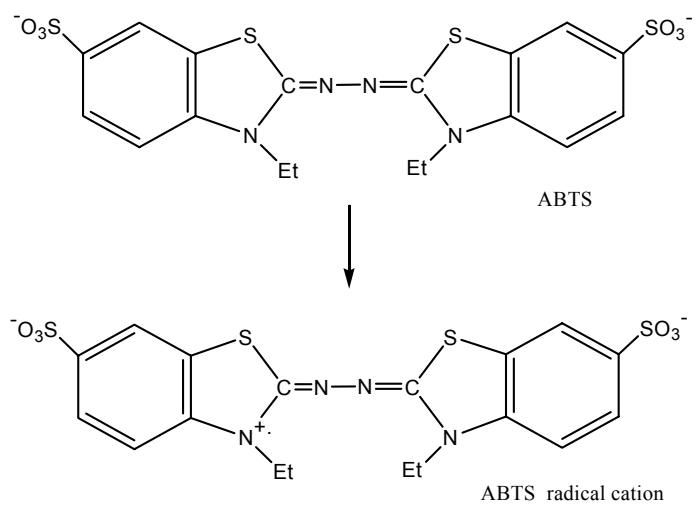


TROLOX

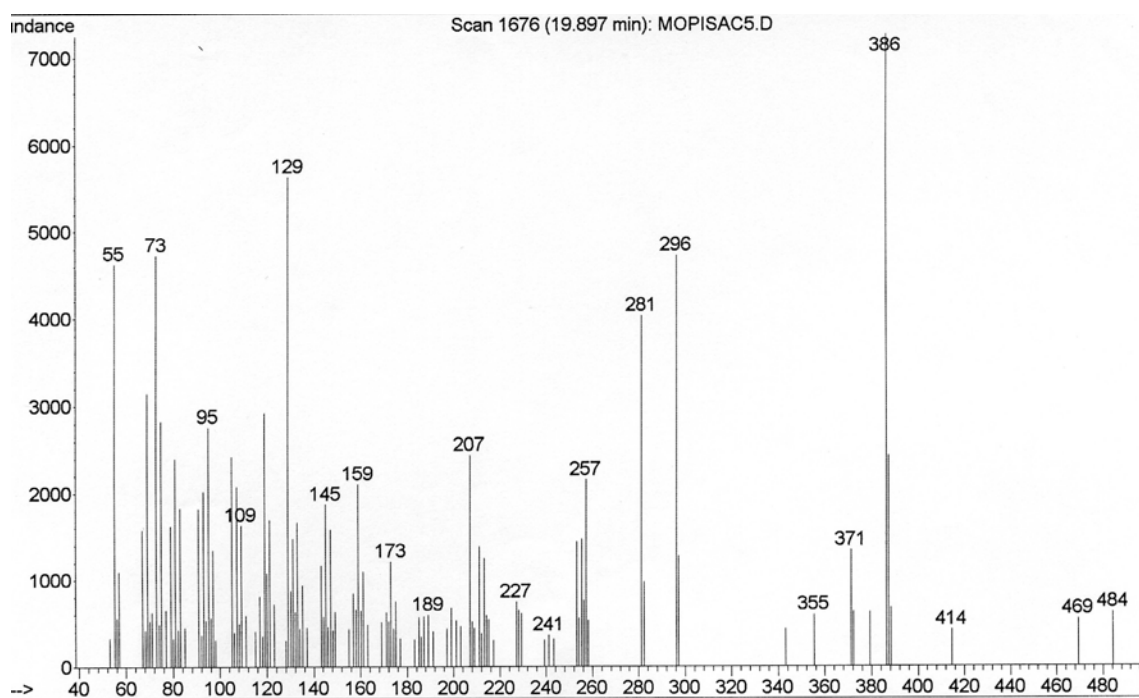
Acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8
tetraméthylchromane-2-carboxylique



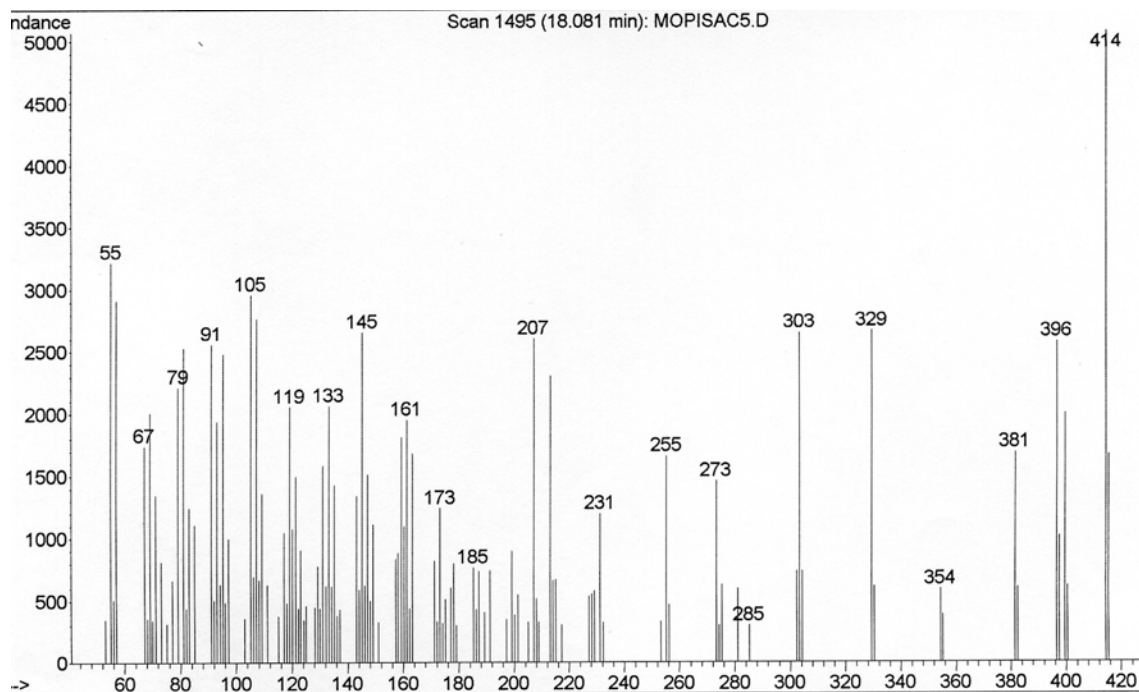
AAPH : Dichlorate de 2,2'-azobis amidinopropane



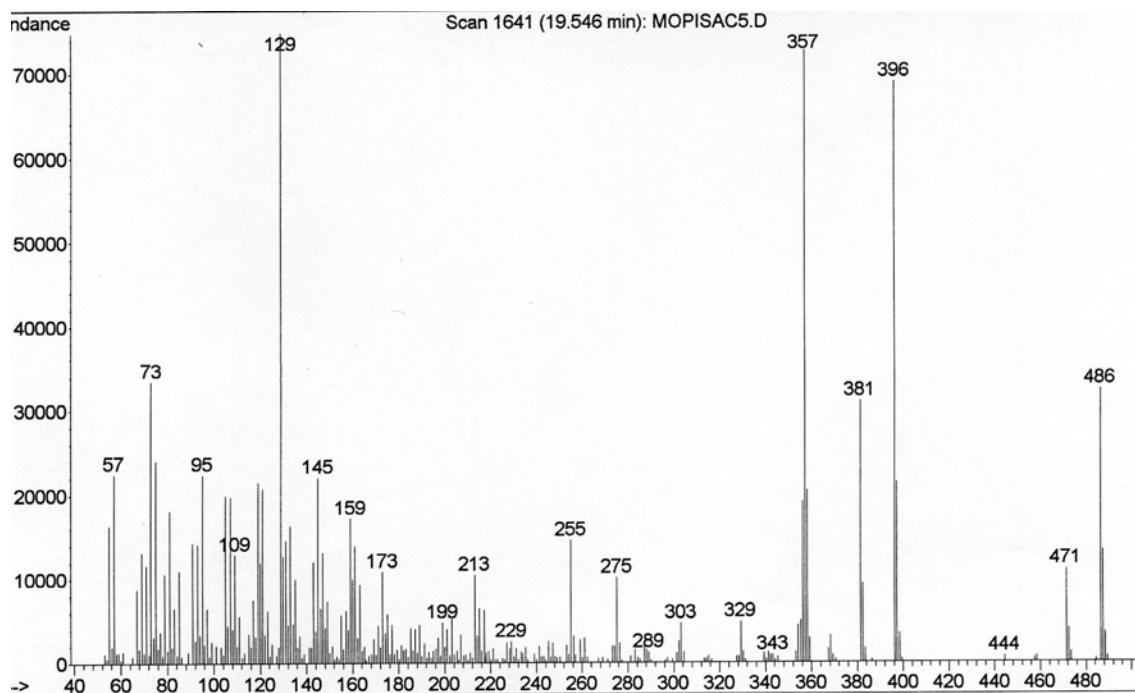
Structure de l'ABTS et son radical



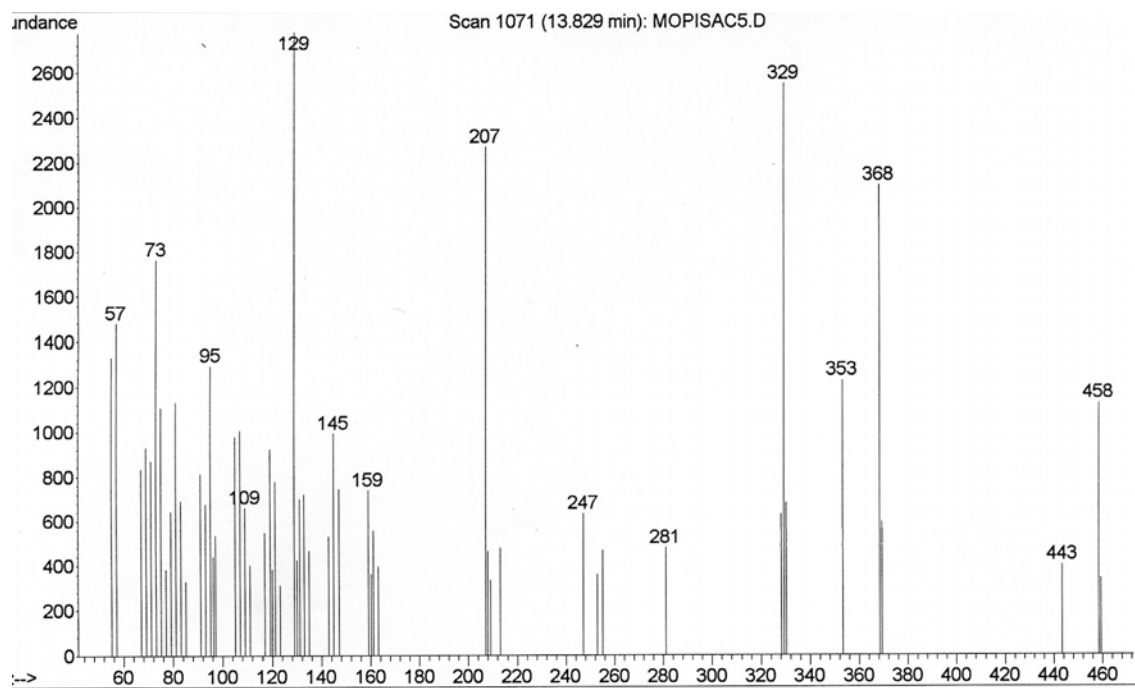
Spectre de masse du stérol S3



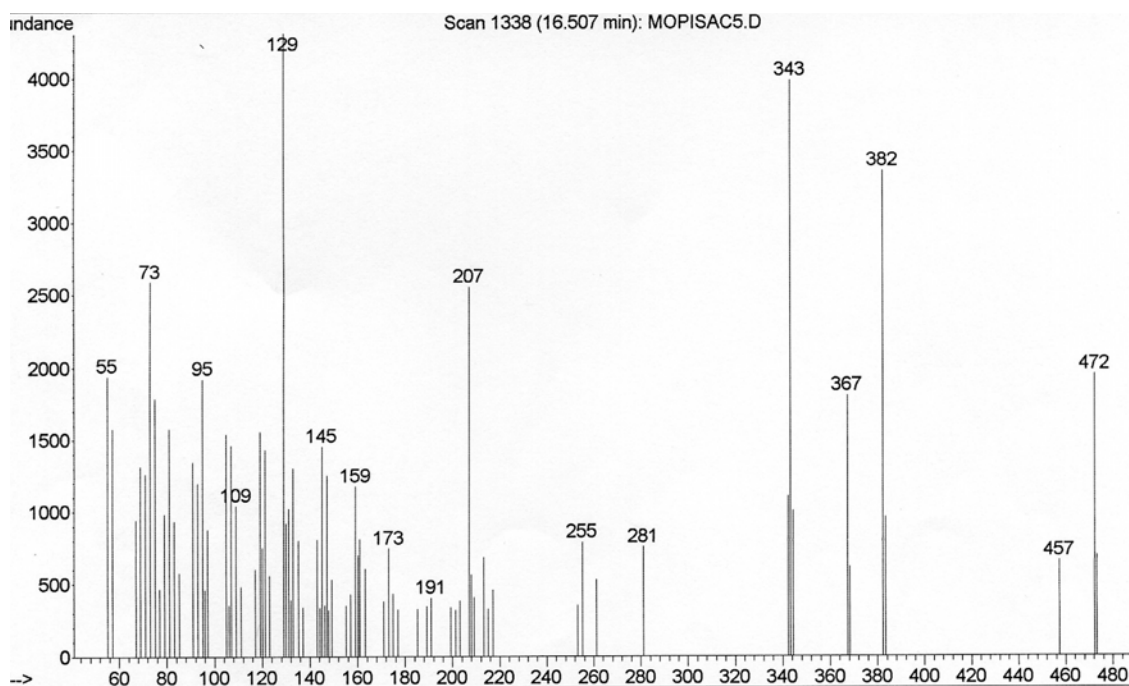
Spectre de masse du stérol S4 non silylé



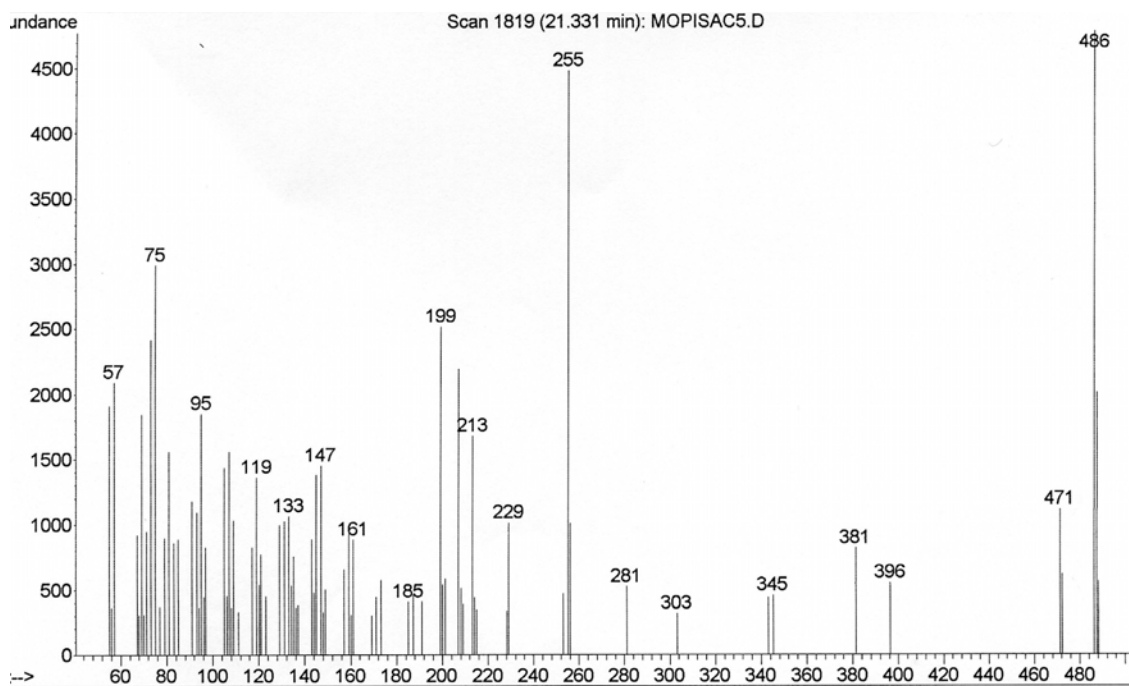
Spectre de masse du stérol S5



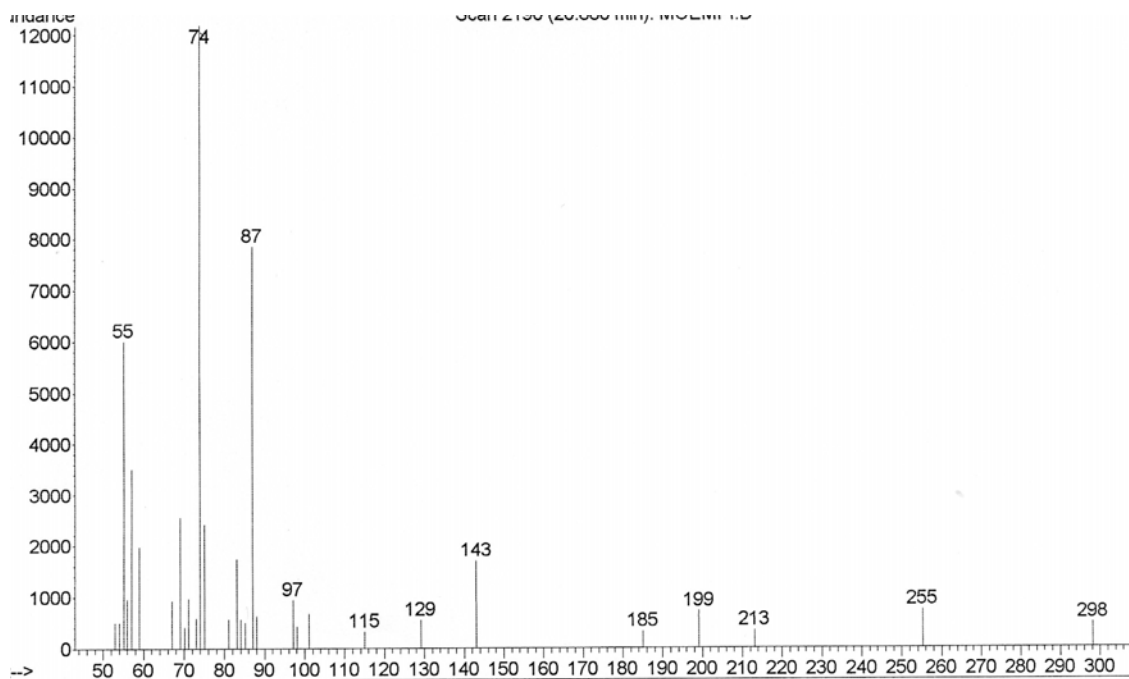
Spectre de masse du stérol S1



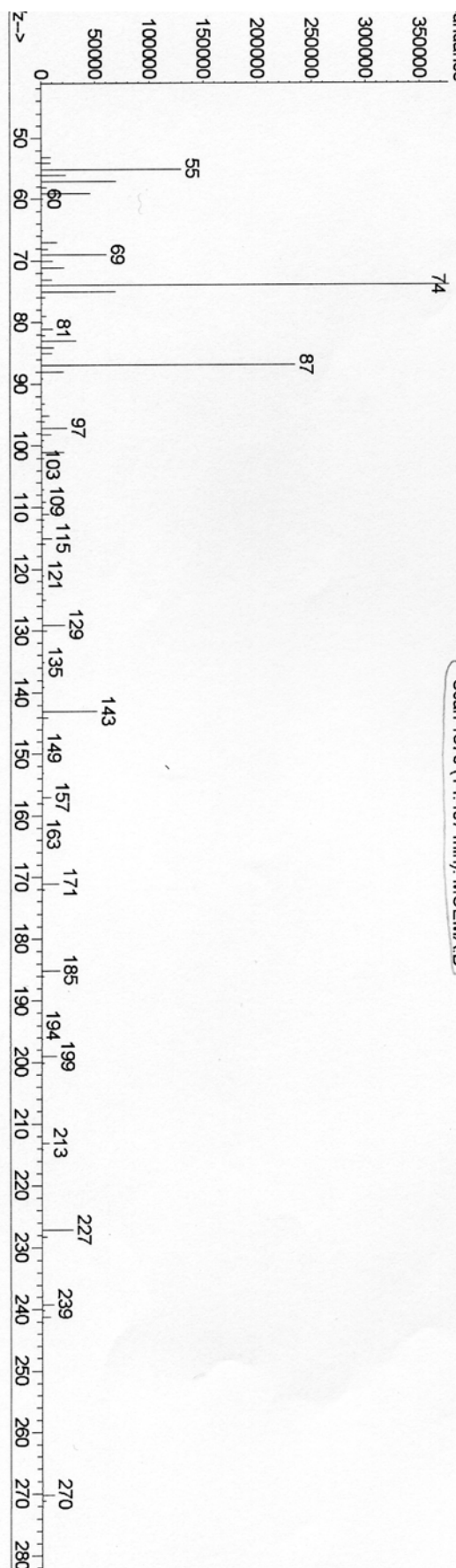
Spectre de masse du stérol S2



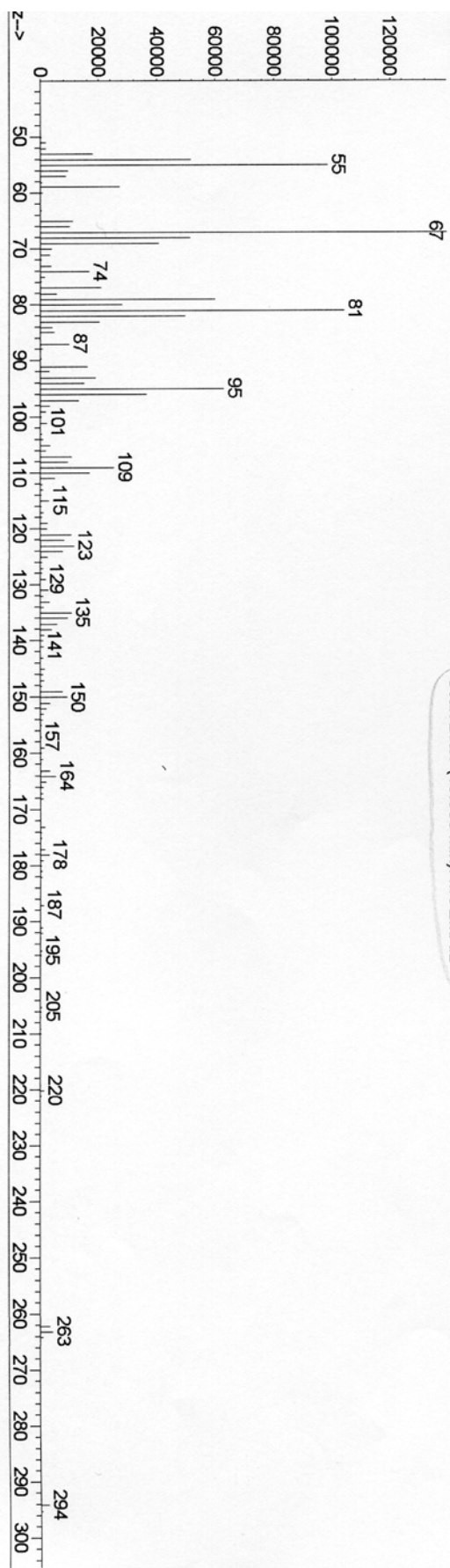
Spectre de masse du stérol S4



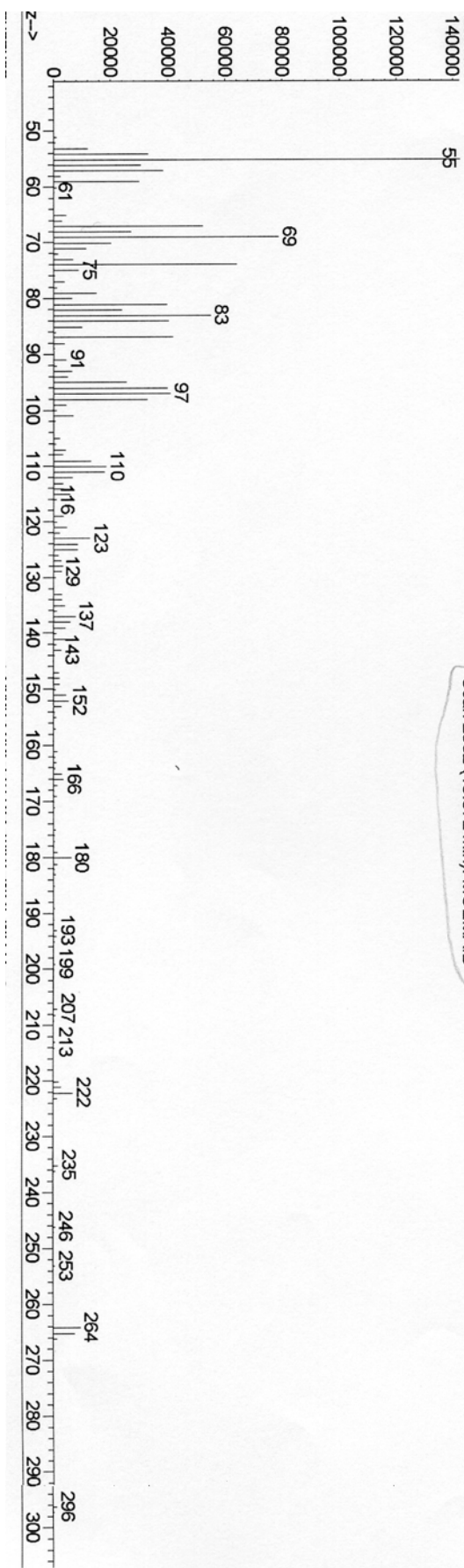
Spectre de masse de l'EMAG de l'acide stéarique



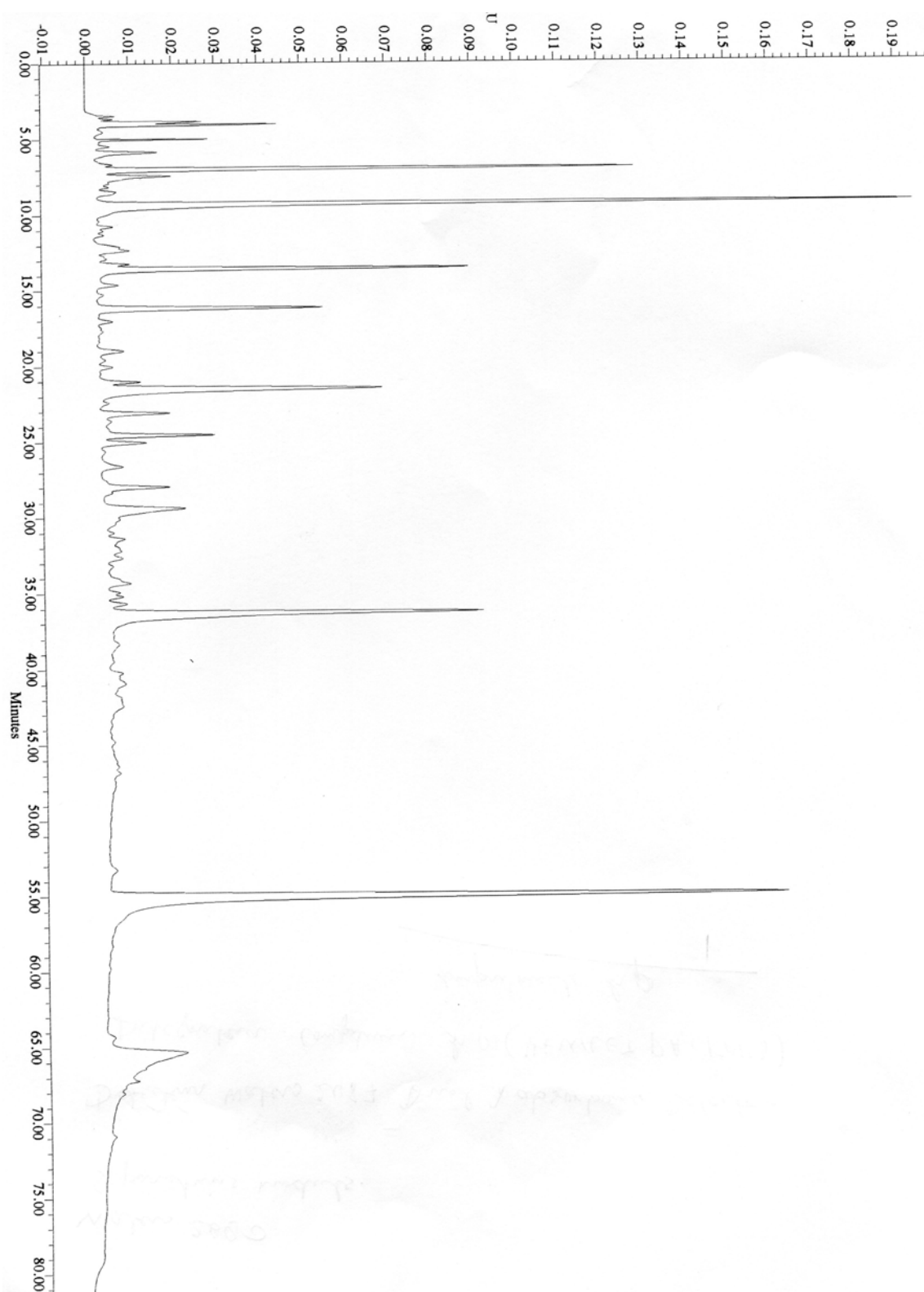
Spectre de masse de l'EMAG de l'acide palmitique



Spectre de masse de l'EMAG de l'acide linoléique



Spectre de masse de l'EMAG de l'acide oléique



Chromatogramme CLHP des phénols du fruit de Pistachier de l'Atlas

APENDICE C

EXPERIMENTALE

1. Extraction De L'huile

Les fruits de Pistachier de l'Atlas sont préalablement séchés à l'étuve à 60°C puis broyés très finement de façon à obtenir une farine homogène. Celle-ci est extraite par de l'hexane par macération à froid avec agitation pendant 24 heures. Après filtration et évaporation sous pression réduite du solvant, on obtient l'huile brute avec un rendement de 45 %.

2. Fraction saponifiable et insaponifiable

2.1. Saponification d'huile

Une quantité de 5 g d'huile en solution dans 100 ml d'une solution hydroalcoolique de potasse 1N est chauffée à reflux pendant 1h 30mn dans un ballon de 250 ml. Après ajout de 200 ml d'eau distillée, on sépare les fractions saponifiable et insaponifiable.

2.2. Traitement de la phase aqueuse

Les acides gras, sous forme de sels de potassium dissous dans la phase hydroalcoolique, sont régénérés par addition d'une solution d'acide chlorhydrique à 30%. Ils sont ensuite extraits par 3 fois 50 ml d'hexane. La phase hexanique est neutralisée par de l'eau distillée, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée puis évaporée sous pression réduite. On obtient ainsi les acides gras.

2.3. Traitement de la phase organique

La phase hydroalcoolique basique est extraite par 3 fois 50 ml d'éther, séchée sur Na_2SO_4 , filtrée puis évaporée sous pression réduite. On obtient ainsi l'insaponifiable.

3. Etude de la fraction glycéridique

3.1. Obtention des esters méthyliques d'acides gras (EMAG)

Les EMAG sont obtenus de deux façons différentes selon le matériel de départ :

- a. Par estérification acido-catalysée : après saponification, 100 mg d'acides gras sont mis en solution dans 5 ml d'une solution de trifluorure de bore à 10 %. L'ensemble est porté à reflux pendant 10 min. Après avoir laissé reposer 5 minutes on ajoute 20 ml d'eau distillée. Après décantation, les esters méthyliques sont extraits 3 fois 20 ml d'hexane. La phase hexanique est lavée plusieurs fois par de l'eau distillée jusqu'à neutralisation, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Les esters méthyliques sont conservés au réfrigérateur à 6°C.
- b. Par estérification baso-catalysée : 100 mg d'huile brute ou de triacylglycérols sont dissous dans 1 ml de pentane. On ajoute 5 ml d'une solution méthanolique de méthylate de sodium 0,2 N. L'ensemble est porté à reflux pendant 10 minutes. Les composés minéraux sont dissous par addition de 5 ml d'eau distillée. Après décantation, la phase organique contenant les esters méthyliques est extraite par 3 fois 10 ml d'hexane. La phase hexanique est ensuite neutralisée par lavage à l'eau distillée, séchée sur Na_2SO_4 , filtrée puis évaporée sous pression réduite.

3.2. Analyse des EMAG par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les EMAG sont solubilisés dans de l'hexane anhydre de qualité analytique à raison de 0,5 mg/ml et 1 μl de cette solution sont injectés. Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- Chromatographe de type PERKIN-ELMER Auto-System gas-chromatography muni d'un détecteur à ionisation de flamme FID.
- Colonne capillaire Carbowax 60 M.
- Programmation de température de 160°C à 220°C à raison de 1°C par minute.
- Température de l'injecteur à 240°C.
- Température de détecteur à 250°C.
- l'azote est le gaz vecteur à la pression de 34 kPa.

3.3. Composition de l'huile en acides gras libres

3.3.1. Préparation de la résine ambérlite A-26

Une quantité de 20 g de résine utilisée pour la fixation des acides gras libres est activée par agitation pendant une heure avec 100 mL d'une solution aqueuse de soude 1N, ensuite lavée par trois fois 100 mL d'eau distillée, puis ensuite rincée par trois fois de méthanol. La résine est conservée dans le méthanol et utilisée dans 24 heures qui suivent sa préparation.

3.3.2. Préparation in situ des esters méthyliques des acides gras

Dans un ballon de 100 mL, on solubilise 1 g d'huile dans 20 mL d'éther. On ajoute 5 g de résine ambérlite A-26 déjà préparée. Le mélange est recouvert par le papier d'aluminium et agité à température ambiante pendant une heure. On filtre la résine et on lave par 10 mL d'éther et 20 mL de méthanol distillé. La résine est ensuite séchée sous courant continu d'azote, et introduite dans un flacon à sertir, on ajoute 2 mL d'une solution méthanolique de trifluorure de bore à 10%. Le flacon serti est porté pendant une heure au bain d'huile à 70°C. Les esters méthyliques sont extraits trois fois par 20 mL d'hexane, puis séchés sur sulfate de sodium anhydre. Après filtration et évaporation du solvant sous pression réduite à 40°C, les esters méthyliques sont repris dans 2 mL d'hexane et on analyse 1 µL de la solution par chromatographie en phase gazeuse avec les conditions précédentes celles utilisées pour les acides gras totaux.

4. Etude des triacylglycérols

4.1. Purification des triacylglycérols

Les triacylglycérols purifiés sont obtenus par chromatographie de l'huile brute sur colonne ouverte de silice. 5 g de silice sont mis en suspension dans l'éther de pétrole anhydre puis transvasés dans une colonne en verre de 1 cm de diamètre interne. Environ 100 mg d'huile sont dissous dans un minimum de chloroforme et déposée en tête de colonne. L'éluion est réalisée par 60 mL de benzène anhydre. Les triacylglycérols purifiés sont obtenus après avoir évaporé le solvant sous pression réduite.

4.2. Chromatographie liquide à haute performance de triacylglycérols

Les triacylglycérols sont dissous dans le chloroforme afin d'obtenir une solution à 100 mg/ml. La chromatographie s'effectue selon les conditions expérimentales suivantes :

- Colonne :RP 18 Lichrospher 100(5 μ m) de 25 cm de long et de 4 mm de diamètre interne, munie d'une précolonne de même type.
- Eluant :acétone /acétonitrile dans le rapport 75/25 v/v
- Débit :1 ml/min
- Détection :réfractométrie différentielle
- Température de four :30°C
- Injection :20 μ L.

5. Analyse des acides gras en position sn-2 du glycérol

5.1. Digestion enzymatique

Une quantité de 500 mg de triacylglycérols, préalablement purifiée sur colonne ouverte de silice, est placée dans un tube à centrifuger à vis de 100 ml en présence de 2,5 ml de cholate de sodium (émulsifiant) et de 10 ml de chlorure de calcium à 22% (les ions de Ca : cofacteur de la lipase pancréatique). L'ensemble est placé dans un bain marie thermostaté à 40°C sous agitation magnétique pendant 10 min afin que l'équilibre thermique se réalise.

Au temps $t=0$, on ajoute 10 ml d'une suspension de lipase à 60mg/ml dans du tris 1M à pH =8.

La réaction se déroule pendant 10 min puis on agite au vibreur pendant 5 min. On provoque l'arrêt de la réaction par ajout de 1 ml d'HCl 6 N.

Les produits d'hydrolyse ainsi obtenus sont extraits par trois fois 20ml d'éther. Les trois fractions sont ensuite rassemblées dans une ampoule à décanter et lavées trois fois par de l'eau distillée, séchées sur sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées sous pression réduite à 40°C.

5.2. Traitement des produits de digestion

Les produits de la digestion sont séparés par chromatographie préparative sur couche mince de silice (Kieselgel Si 60 F₂₅₄ de 20 cm de côté et de 0,2 mm d'épaisseur). Le développement de la plaque se fait dans un système de solvant anhydre hexane/éther /acide formique (70 :30 :1-v/v). Deux migrations successives sont nécessaires. La mise en évidence des différentes fractions se fait par la visualisation des spots à l'aide d'une lampe UV. Les monoacylglycérols ($R_f=0,29$) sont récupérées et désorbés par 100 ml d'un mélange de solvant anhydre chloroforme/méthanol (90 :10-v/v) à froid sous agitation magnétique pendant 2 heures. L'extrait est ensuite filtré et évaporé sous vide partiel. Les acides gras des monoacylglycérols sont transformés en esters méthyliques par transestérification baso-catalysée.

5.3. Analyse des esters méthyliques des acides gras en position sn-2 du glycérol

Les esters méthyliques des acides gras en position sn-2 du glycérol sont analysés par chromatographie en phase gazeuse en utilisant les mêmes conditions précédentes. Après identification des acides gras en position sn-2, les acides gras en position [1+3] sont calculés grâce à la relation suivante :

$$AG[1+3]= 3(AG_{tot\%})-(AG \text{ en sn } -2\%)/3$$

6. Etude de la fraction insaponifiable

6.1. Obtention de l'insaponifiable

On lave la phase étherée obtenues lors de la saponification par de l'eau distillée jusqu'à pH neutre, on sèche sur sulfate de sodium anhydre, on filtre et on évapore le solvant sous pression réduite, on obtient l'insaponifiable, on sèche le résidu à l'étuve réglée à 103°C jusqu'à poids constant, on obtient ainsi la teneur en insaponifiable de l'huile.

6.2. Analyse de l'insaponifiable par chromatographie sur couche mince :

On utilise des plaques de silice 60F₂₅₄ de 1 mm d'épaisseur, après avoir lavé la plaque à l'éther, on la sèche et on l'active par passage à l'étuve à 60°C. On dépose dans une gorge de 16 cm de long, environ 100 mg d'insaponifiable dissous dans 1 ml de chloroforme. La migration se fait dans une cuve chromatographique saturée par un mélange hexane/éther (7 :3-v/v), on réalise deux migrations successives, on sèche la plaque. On visualise les différents spots correspondants aux différentes classes de constituants de l'insaponifiable. L'utilisation de témoins comme le tocophérol, le lanostérol, le cholestérol permet de localiser respectivement les classes tocophérol, alcools triterpéniques, Δ_5 -stérols. Par polarité croissante, on observe les hydrocarbures et pigments très peu polaires avec un R_f proche de l'unité, on identifie ensuite les tocophérols, les alcools triterpéniques, les méthyls 4-stérols, les Δ_5 -stérols, et les Δ_7 stérols.

6.3. Analyse des stérols

a. Préparation de la plaque : on utilise les mêmes plaques que celles employées lors de l'analyse de l'insaponifiable. On gratte les bandes correspondantes à celles des stérols, on désorbe la silice par trois fois 100 ml de chloroforme à reflux pendant 20 min, après filtration et évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient les composés stéroliques libres.

b. Préparation des dérivés silylés : l'analyse des stérols par chromatographie en phase gazeuse nécessite une silylation préalable. Les composés stéroliques sont mis dans un

erlen meyer et on ajoute 2 ml d'un mélange de hexaméthylsilane (HMDS) et triméthylchlorosilane(TMS) de proportion (8 :2 v/v). Le mélange est chauffé à 50°C pendant 10 min. On additionne au mélange réactionnel 10 ml d'eau distillée et on extrait les stérols silylés par trois fois 10 ml de dichlorométhane. On lave la phase organique successivement par 10 ml d'eau distillée. On sèche sur sulfate de sodium anhydre, on filtre et on évapore le solvant sous pression réduite.

c. Analyse des stérols silylés : l'étude des composés stéroliques silylés est faite sur un chromatographe Perkin Elmer Auto system équipé d'une colonne capillaire DB.5 (30 mX0, 25 mm) et 0,25 µm d'épaisseur du film couplé à un détecteur de masse HP-5973 (Hewlett-packard,Palo Alto,CA USA) ; les conditions d'analyse sont les suivantes :

- température du four avec programmation de 50°C à 190°C à raison de 20°C/min, isotherme à 190°C pendant 14 min, et une croissance à 230°C à raison de 20°C/min, isotherme à 230°C pour 10 min, puis jusqu'à 270°C à raison de 20°C/min et en fin isotherme à 270°C pendant 8 min.
- température de l'injecteur est de 280°C
- débit du gaz vecteur (hélium) est 1 ml/min
- les conditions de détecteur de masse sont : sources d'ions 230°C, énergie d'impact électronique est 70 eV.

7. Dosage et analyse des tocophérols

7.1. Dosage des tocophérols totaux

La quantification des tocophérols totaux est réalisée selon la méthode D'Emmerie-Engel modifiée par le comité des Méthodes Analytiques de la « Vitamine E Panel Society ». Le dosage est effectué sur l'huile brute. 100 mg d'huile sont solubilisées par le benzène dans une fiole jaugée de 50 ml jusqu'au trait de jauge. 5 ml de cette solution sont prélevées et introduites dans une fiole de 10 ml avec 0,5 ml d'une solution alcoolique d'orthophénantroline à 0,4% et 0,5 ml d'une solution alcoolique de chlorure ferrique à 0,12%. On ajuste à 10 ml avec l'alcool éthylique absolu.

La densité optique de cette solution est lue à 510 nm contre l'éthanol absolu. Un blanc est effectué en remplaçant les 5 ml de solution de tocophérols par 5 ml de benzène. Une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution benzénique d' α -tocophérol commercial permet de déterminer la teneur en tocophérols de l'huile étudiée.

7.2. Identification des tocophérols individuels par CLHP :

L'analyse est réalisée aussi sur l'huile brute. Une quantité de 500 mg d'huile est solubilisée dans 500 μ l d'éthanol de qualité analytique. L'analyse est effectuée sur un chromatographe de type WATERS 2690, équipé d'une colonne apolaire (RP18) 25 cm de long et de 4,6 mm de diamètre interne, la phase mobile est un solvant isocratique d'un mélange de méthanol :acétonitrile de proportion 70 :30 v/v, le débit est de 1 ml/min. La détection est effectuée par fluorescence (longueur d'onde d'excitation 298 nm et celle de l'émission est de 330 nm).

L'identification des tocophérols présents dans l'huile est réalisée à l'aide des chromatogrammes des solutions standards des tocophérols injectés dans les mêmes conditions. La quantification des tocophérols individuels est réalisée par la méthode d'étalonnage externe.

8. Méthode d'extraction des composés phénoliques

L'objectif de l'étape de l'extraction est de séparer les substances phénoliques de la poudre solide et de les faire passer en solution. Cette étape comporte trois sous étapes :

8.1. Extraction des phénols

Une quantité de 5 g de chaque partie est broyée très finement. La poudre obtenue est macérée avec 100 ml d'un mélange de méthanol :eau (8 :2 v/v). L'ensemble est agité à froid pendant 24 heures .L'extrait est filtré et le résidu est repris deux fois avec un volume de 50 ml de même solvant. Les trois extraits sont rassemblés, on obtient alors un extrait hydro-alcoolique brut.

8.2. Dépigmentation

On évapore le méthanol sous pression réduite à 40°C. La phase aqueuse est lavée plusieurs fois avec demi volume d'éther de pétrole jusqu'à l'épuisement des pigments.

8.3. Purification

La phase aqueuse est ensuite extraite trois fois à l'acétate d'éthyle, après adjonction des solutions aqueuses de 20 % de sulfate d'ammonium et 2% d'acide ortho-phosphorique qui facilitent le passage des composés phénoliques dans la phase organique. Les extraits organiques sont regroupés et séchés en ajoutant une quantité suffisante du sulfate de sodium anhydre. L'extrait est alors évaporé sous pression réduite à 40°C. Le résidu est repris par 5 ml dans le méthanol donnant ainsi l'extrait phénolique purifié qui est conservé à une température de 6°C.

9. Dosage des phénols totaux

Le contenu phénolique de chaque partie a été déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu en utilisant l'acide gallique comme étalon. Une courbe d'étalonnage a été obtenue par des solutions d'acide gallique de concentration allant de 0,064 à 0,256 mg/ml. 100 µl de chaque solution ont été introduits dans des tubes à essai de 200X25 ml, suivis de l'addition de 0,5 ml d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 10 fois dans l'eau distillée et 1,5 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 20 % et 1 ml d'eau distillée. Les solutions ont été secouées immédiatement et bien homogénéisées, puis elles sont maintenues à l'obscurité pendant deux heures à la température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 755 nm contre un blanc (même solution précédente à l'exception de l'acide gallique). Les extraits phénoliques des différentes parties sont traités de la même façon et qui à la place de 100µl de la solution d'acide gallique on prend 100 µl d'extrait.

10. Quantification des flavonoïdes

La méthode de quantification des flavonoïdes est basée sur la complexation des flavonoïdes avec le chlorure d'aluminium. Des solutions étalons ont été préparées d'une solution mère de la rutine de concentration de 0,2 mg/ml (solution méthanolique). 1 ml de chaque solution est mélangé avec 1 ml d'une solution méthanolique de 2 % de chlorure d'aluminium. Après incubation à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 min, l'absorbance du mélange est déterminée à 430 nm contre un blanc de méthanol. On trace la courbe d'étalonnage de la rutine. Pour les extraits des différentes parties étudiées et après des dilutions faites on suit les mêmes étapes. A partir des valeurs d'absorbance mesurées on calcule la quantité des flavonoïdes dans partie de la plante étudiée.

11. Analyse des extraits par CLHP

L'analyse de la chromatographie liquide à haute performance a été effectuée à l'aide d'un chromatographe équipé d'une colonne RP18 et un détecteur à barrette de diode (Agilent 1100). Deux mélanges de solvants ont été utilisés pour l'élution : A = H₂O : H₃PO₄ (0.05%) et B = CH₃CN. Le profil du gradient est le suivant :

Le débit est de 1 ml/min, la température est de 30°C. La détection a été effectuée de 200 à 800 nm. La quantité injectée est 20 µl. Quelques phénols standards ont été injectés dans les mêmes conditions afin d'identifier les phénols existants dans nos échantillons.

12. Détermination du pouvoir antioxydant

12.1. Test chimique

Le radical ABTS est produit en réagissant 10 ml d'une solution d'ABTS [2,2'-azinobis-(3-éthylbenzthiazoline-6-sulphonique)] de concentration de 20 mM avec 100 µl d'une solution de persulfate de potassium K₂S₂O₈, le mélange est gardé à l'obscurité pendant 24 heures à la température ambiante. 1 ml de cette solution est diluée par 25 ml d'une solution tampon phosphatée à pH=7.4. La solution tampon est préparée en

mélangeant 1.7907 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0.78 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et 9.0 g de NaCl dans un litre d'eau distillée.

La solution du radical préparée est incubée pendant 15 min dans un bain marie à 30°C. La densité optique de cette solution à la longueur d'onde de 734 nm doit être égale à 0.70 +/- 0.02 nm.

Une quantité de 10 µl de chaque extrait phénolique dilué est ajoutée à une cuvette contenant 1 ml de la solution du radical ABTS pour avoir une inhibition d'absorbance de 20 à 80%. La valeur de TEAC (Capacité Antioxydante Equivalente de Trolox) de chaque extrait est calculée en traçant une courbe d'étalonnage du pourcentage d'inhibition I% du radical ABTS en présence du Trolox en fonction de la concentration C (mM).

12.2. Test biologique

Pour réaliser ce test, le sang est récupéré sur un anticoagulant EDTA quarante huit heures au maximum avant la réalisation du test. La réaction a lieu dans une plaque multi puits ou 100 µl dilués 50 fois dans l'eau physiologique sont mélangés avec 85 µl d'une solution AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropane) chloride] de concentration 20 mg/ml et 85 µl de l'extrait phénolique à différentes concentrations. La plaque est alors agitée pour homogénéiser le milieu réactionnel puis immédiatement lue dans spectrophotomètre IEMS(LABSYSTEMS), pour évaluer la variation de la densité optique due à l'hémoglobine relarguée dans le milieu. La longueur d'onde du spectrophotomètre est fixée à 450 nm.

13. Estimation de l'activité inhibitrice des extraits sur la carboxylesterase

L'activité enzymatique de la carboxylesterase (CER) est dosée sur le substrat para-nitrophényl acétate (PNPA). La CER hydrolyse ce substrat et libère le para-nitrophénol. Le milieu réactionnel de volume 250µl incubé à 37 °C contient 10 µl de substrat de concentration finale 10 mg/ml et 200 µl d'une solution tampon de pH=8. La cinétique enzymatique débute par addition de 20 µl d'enzyme CER de concentration 10 mg/ml

diluée 200 fois dans la solution tampon et son évolution est suivie par spectrophotométrie à 410 nm. L'activité inhibitrice des extraits phénoliques est étudiée en introduisant 20 μ l d'extrait à différentes concentrations. La représentation graphique de la relation $1/V=f([\text{phénols}])$, nous permis de connaître le type de l'inhibition et de calculer les constantes cinétiques K_i en présence de chaque extrait.

REFERENCES

1. Zohary M., "A Monographical Study of the Genus Pistacia", Palestine Journal Bot.J. V.5,1952 ,187-228.
2. Ansar, M., "En Pleine Coeur du Sahara les Arbres Secrets des Touaregs", SYFIA, V.84, (janvier 1996).
3. Chierf, "Les Plantes Médicinales", Ed. Solar, (1982), 235.
4. Kordali, S., Cakir, A., Zengin, H., Duru, M.E., "Antifungal activities of the leaves of three Pistacia species grown in Turkey", Fitoterapia, V.74, (2003), 164-167.
5. Tuzlaci, E., Aymaz, P.E., "Turkish folk medicinal plants, Part IV: Gonen (Balikesir)", Fitoterapia, V.74, n°4, (2001), 323.
6. Duru, M.E., Cakir, A., Kardali, S., Zengin, H., "Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three Pistacia species", Fitoterapia, V.74, (2003), 170-176.
7. Sana, J., Al-Meri, H., "Evaluation of hepatoprotective effect of Pistacia lentiscus, Phillyrea latifolia and Nicotiana glauca", Journal of Ethnopharmacology, V 83, (2002), 135-138.
8. Serafino, G., Letizia, B., Laura, D., Pietro, M., "Phytochemical Studies of Pistachio Species", The American Journal of Gastroenterology, V .96, (2001), 549.
9. Vincent Castola, Ange Bighelli, Joseph Casanova, "Intraspecific chemical variability of the essential oil of Pistacia lentiscus L. from Corsica", Biochemical Systematics and Ecology, V.28, (2000), 79-88.
10. Anila Demo, Christos Petrakis, Panagrotis Kefalas, Dinitrios Boskou, "Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves", Food Research International, V.31, (1998), 351-354.

11. Chrysoula, C., Tassou, G.J.E., Nychas, "Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram positive and Gram négative bacteria in broth and in Model Food System" *International Biodeterioration and Biodégradation*, V.36, (1995), 411-420.
12. Pinellim P., Galardi, C, Mulinacci, N., Tahini, M., "Polyphenols of *Pistacia Lentiscus* Leaves", *Phytochemical Analysis*, V.13, n°2, (2002), 79-86.
13. Fernandez Ana, Camacho Ana, Fernandez Carlos, Altarejos Jouquin, Ferez Pilar, Essential oil of *Pistacia Lentiscus* Leaves, *Journal of Essential Oil Research*, V.12, n°1, (2000), 19-23.
14. Horgen, F.D., Madulid, D.A., Angerhofer, C.K., "Isolation of gallic acid esters as antiplasmodial constituents of *Swintonia foxworthyi* (Anacardiaceae)", *Phytomedecine*, V.4, n°4, (1997), 353-356.
15. Caputo Romulado, Mangoni Corenzo, Monaco Pietro, Palumbo Giovanni, "Triterpenes from the galls of *Pistaciapalestina*", *Phytochemistry*, V.18, n°5, (1979), 896-898.
16. Kaurashty, S.A., Mocharrafe, S.A.M., El Gibali, M. and Saleh, N.A.M., "The flavonoids of four *Pistacia* species in Egypt", *Biochemical Systematics and Ecology*, V.28, n°9 (2000), 915-917.
17. Mustafa, Y., Tùrcan Gürcan, S. and Ôzdeni, M., "Fatty acids and Steroils of *Pistacia Vera*", *Fett/Lipid*, V.3, (1998), 84-86.
18. Daneshard, A., Aynechi, Y., J., Fatty acids of *Pistacia Atlantica* ib Iran, *J. Am. Oil Chem. Soc*, V.57, (1980), 248-249.
19. Yousfi, M., Thèse de Magister, Etude de la composition triglycéridique de quelques graines oléagineuses locales : Pistachier de l'Atlas, Noyau d'Abricots et Arachides, ENS - Kouba - Alger (1996).
20. Saffarzadeh, A., Vincze, L., Sapo, J.C., Determination of the Chemical Composition of Acorn, *Pistacia Atlantica* and *Pistacia Khinjuk* Seeds , *Acta Agraria Kaposvariensis*, V.3, (1999), 59-69.
21. Wolf, J.P., *Manuel des Corps Gras*, Azoulay Paris, (1968), 245-255.
22. Karleskind, A., *Manuel des Corps Gras*, Lavoisier, Tec et Doc., Paris, V.1, (1992).79-93.

23. Dymock, P., "La quinzième conférence internationale sur le tournesol", *Oléagineux. Corps grAs. Lipides*, V.3, n°7, (2000), 237-242.
24. Basset, F., *Propriétés Biochimiques des Corps Gras, Parfums Cosmétiques Arômes*, V.2, (1993), 111-56.
25. Bourre, J.M., "Nature, rôle, and origin of brain fatty acids, and the dietary importance of fatty acids. Requirements for α -linolenic (and linoleic) acid for the correct structure and functioning of the brain, and a comparison with other organs", *Rev. Fr. Corps. Gras*, V.29, (1989), 413.
26. Helme, J.P., "The essential fatty acids: the importance of the long-chain-polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 families *Revue Française des Corps Gras*", *Rev. Fr. Corps. Gras*, 33(3), (1986), 107-14.
27. Blond, J.P., "Essential fatty acids and skin properties". *Revue Française des Corps Gras*, 40(3-4), (1993), 113-20.
28. Guiland, J.C., Lequeu, B., *Les Vitamines du Nutriment au Médicament*, Edition Médicinale Internationale, Paris, (1992), 25-28.
29. Vergnant, G., *Propriétés Pharmacologiques de l'huile d'Olive*, *Rev. Fr. Corps. Gras*, V. 11, (1993), 157.
30. Rancurel, A., "Avocado: its unsaponifiable oil. Cosmetic use". *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, 61, (1985), 91-5.
31. Rastoin, J., *Fatty Acids and Health, Parfums Cosmétiques Arômes*, (1985), 61-91.
32. Rastoin, J., "Treatment of fats and oils: hydrogénation, fractionation and interesterification". *Revue Française des Corps Gras*, V.33 n°3, (1985), 97-102.
33. Duterte, R., "Manufacture, analysis, and characteristics of refined, interesterified, and esterified fats and oils used in pharmacy and cosmetology", *Revue Française des Corps Gras*, V. 40(1-2), (1993),
34. Brute, J.N., *Le Bon Jardinier*, Ed. Rustique, (1992), 2276-2277.
35. Monjauze, A., *Répartition et Ecologie de Pistacia Atlantica en Algérie*, *Bull. Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du nord*, V.60, (1968), 5-31.
36. AFNOR NFT 60-204. *recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés*. Ed. AFNOR, Paris (1984), 58-64

37. Luissa Mannina, Claudio Luchirat, Maurizio Patuni, "Concentration Dependence of ^{13}C NMR Spectra of Triglycérides Implication for the NMR Analysis of Olive Oils", *Magnetic Résonance in Chemistry*, V.38, (2000), 886-890.
38. Luissa Mannina, Claudio Luchirat, Maria Carmela Enanel, Annalaura Serge, "Acyl Positional Distribution of Glycerol Tri-Esters in Vegetable Oils ^{13}C NMR Study, *Chemistry and Physics of Lipids*", V.103, (1999), 47-55.
39. Gunstone, F.D., "High Resolution ^{13}C NMR. A Technique for the Study of Lipid Structure and Composition", *Progress in lipid research*, 33(1-2), (1994), 19-28.
40. Guingnard, J.L., *Abrégé de Phytochimie*, Ed. Masson, Paris (1985), 25-29. ,
41. Gunstone, F.D., "Information on the composition of fats from their high-resolution carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(4), (1993), 361-6.
42. Cocallemen, S., Farines, M., *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, V.70, (1993), 1139.
43. Guingnard, J.L., Cosson, L., Henry, M., "Abrégé de Phytochimie", Ed. Masson, Paris, (1985), 100.
44. Helme, J.P., Chirouze, J., "Les Acides Gras Polyinsaturés a Longue chaîne, Application en Cosmétologie", *Association Française de Cosmétologie, Symposium Bordeaux*, (1984), 107.
45. Cocallemen, S., Farines M.; Faill H., Soulier, J.; Morin O., "Study of the seed oil of eggplant, *Solanum melongena* (L), Solanaceae", *Revue Française des Corps Gras*, 35(3), (1988), 105-10.
46. Kuksis, A., "Hand Book of Lipid Research: Fatty Acids and Glycerides", Ed. Plénum Press, New York and London, V.1, (1978), 1.
47. Paqout, C., Hautfenne, A., "Standards Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives", *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 7th Revised and Enlarged Edition, Ed. Black Well Scientific Publication, Oxford, (1987), 123.
48. Hamilton, R.J., Hamilton, S., "Lipid Anlysis: A Pratical Aproach", Ed. IRL Press, Oxford, (1992), 47.
49. Cecchi, G., Biasini, S., Castano, "Rapid methanolysis of oils in solvent médium.", *Rev. Fr. Corps Gras*, V.32(4), (1985), 163.

50. Hamilton, R.J., Rossel, J.B., "Analysis of Oils and Fats", Ed. Elsevier Applied Science Publisher, Londres, V.A, (1986), 155.
51. Hamilton, R.J., Rossel, J.B., "Analysis of Oils and Fats", Ed. Elsevier Applied Science Publisher, Londres, V.B, (1986), 250.
52. Ucciani, E., Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales. Composition en Acides Gras., Tec et Doc, Lavoisier. Paris, (1995) 125-128.
53. Monseigny, A., Vigneron, P.Y., Levaq, M., Zwobada, F., "Quantitative chromatographic analysis of triglycérides in glass capillary tubes", Rev. Fr. Corps Gras, V.26, (1979), 107-120.
54. Goiffon, J.P., Reminiac, Claude; Olle, M. "High performance liquid chromatography application for fat triglycéride analysis. I. Search for the best operating conditions for soybean oil", Revue Française des Corps Gras, 28(4), (1981), 167-170.
55. Goiffon J.P., Reminiac C., Olle M., "High-performance liquid chromatography application for fatty triglycérides analysis. II. Rétention values of triglycérides". Rev. Fr. Corps Gras, V.28, (1981), 199-207.
56. Brockerhoff H., "Stereospecific analysis of triglycérides", Lipids, V.6, (1971), 942-956.
57. Brockerhoff H., J. "Stereospecific analysis of triglycérides: an alternative method", Lipids. Res., V.8, (1967), 167-169.
58. Well, J.H., Biochimie Générale, Masson, (1972).
59. Gargouri, Y., Bensalah, A., Verger, R., "Rôle of human gastric lipase in the digestion of dietary lipids", Rev. Fr. Corps Gras, V.18, (1992), 207-213.
60. Luddy, F.E., Barford, R.A., Herb, S.F., Magidman, P., Riemenschneider, R.W., "Pancreatic lipase hydrolysis of triglycérides by a semimicro technique" J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.41, (1964), 693-696.
61. Quinlin, P., Herman, J., Weiser, J.R., ., J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.7, n°35 , (1958), 325-327.
62. Bilyk, A., Piazza, G.J., Bistline, R.G., Hass, M.J., Lipids, V.26, (1991), 405.
63. Vandewal, R.J., Calculation of the Distribution of the Unsaturated and Saturated Acyl Groups in Fats from Pancreatic Lipase Hydrolysis Data, J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.37, (1960), 18.

64. Gunstone, F.D., The Distribution of Fatty Acids in Natural Glycerides of Vegetable Origin, Chem. and Ind., (1962), 1214-1223.
65. Youngs, C.G., "Glyceride structure of fats", J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.36, (1959), 665-667.
66. Mattsson, F.H., Volpenheine, R.A., "The specific distribution of unsaturated fatty acids in the triglycerides of plants", J. of lipid Research, V.4, (1963), 392-396.
67. Mattsson, F.H., Volpenheine, R.A., "Specific distribution of fatty acids in the glycerides of vegetable fats", J. Biol. Chem., V.236, (1961), 1891-1894.
68. Brockerhoff, H., "Stereospecific analysis of triglycerides", J. Lipids. Res., V.6, (1971), 942-956.
69. Takagi, T., Ando, Y., The Distribution of Fatty Acids between the Tree Position Of Glycerol Molecule, Lipids, V.26, (1991), 542.
70. Christie, W.W., Nicolovo-Damyanova, B., Laakso, P., Herslof, B., J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.68, (1990), 695.
71. Laakso, P., Christie, W.W., "Chromatographic resolution of chiral diacylglycerol derivatives: potential in the Stereospecific analysis of triacyl-sn-glycerols", Lipids, V.25, (1990), 349-953.
72. Bus, J., Lok, C.M., Groenewegen, A., "Détermination of enantiomeric purity of glycerides with a chiral PMR shift reagent", Chem. Phys. Lipids, V.16, (1976), 123-132.
73. Coleman, M.H., Fulture, W.C., Enzyme of Lipids Metabolism, P. Deswelle, V.127, (1961).
74. Coleman, M.H., "Further studies on the pancreatic hydrolysis of some natural fats", J. Amer. Oil. Chem. Soc, V.38, (1961), 685-688.
75. Coleman, M.H., "The pancreatic hydrolysis of natural fats. III. The influence of the extent of hydrolysis on monoglyceride composition", J. Amer. Oil. Chem. Soc., V.40, (1963), 568.
76. Christie, W.W., High Performance Liquid Chromatography and Lipids, A Pratical Guide, Ed. Pergamon Press, Oxford, (1987).
77. Perrin, J.L., Naudet, M., "Identification and détermination of triglycerides of natural fatty substances by HPLC", Rev. Fr. Corps Gras, V.30, (1983), 280.

78. Wolf, J.P., Mordret, F.X., Dieffenbacher, A., *Pure and Applied Chemistry*, V.30, (1991), 841.
79. Maurin, R., Fellat-Zarrouck, K., Ksir, M., "Positional analysis and détermination of triacylglycerol structure of *Argania spinosa* seed oil", *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, V.69 , (1992), 141-145.
80. Mordret, F., Thèse d'Université, Eude DE l'Insaponifiable de l'Huile de Tournesol, paris, (1971).
81. Capella, P., Dezotti, G., Ricca, G.S., Valentini, A.F., Jacini, G., "Chromatography on silicic acid of the unsaponifiable matter of fats", *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, V.37 , (1960), 564-567.
82. Cortesi, S., Pedeli, E., *Riv. Irai. Sost. Grasse*, V.57, (1980), 16.
83. latrides, M.C., Arthaud, J., Derbezy, M., "Automated préparations by liquid Chromatography on analytical columns. Application to natural substances: anethole, vanillin, and sterols", *Analisis*, V.12, (1984), 205.
84. Maille, M.L., thèse de pharmacie, Effet des Acides Gras Insaturés, Clermont-Ferrand, (1981).
85. Veris, Effet Bénéfique Potentiel des anti-oxydants dans F infection par le virus Hiv et le Sida, *Vitamin E Research Summary*, Dusseldorf, Août, (1995).
86. Emmerie, A., Engel, C., "Colorimetric détermination of tocopherol (vitamin E). II. Adsorption experiments" *Rec. Trav. Chim*, V.58, (1939), 283-289.
87. Paquot, C., Mercier, J., Mathieu, A., Lefort, D., Perron, R., *Méthodes Analytiques des Lipides Naturels*, Ed. CNRS, paris, (1962).
88. Flanzy, M., Dubois, P., "The détermination of total tocopherols. Application to grape seed oil", *Technol. Agric.*, V.13, (1964), 67.
89. Mordret, F., Laurent, A.M., "Application of gas-phase Chromatography on capillary glass column to the analysis of tocopherols", *Rev. Fr. Corps Gras*, V.25, (1978), 245-50.
90. Meijboom, P.W., Jongenoter, B.A., "A quantitative détermination of tocotrienols and tocopherols in palm oil by TLC-GLC". *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, V.56, (1979), 33-35.
91. Vataressy, G.T., Nayrad, V.R., Hagen, D.F., *J. Chromatog*, V.161, (1978), 299.

92. Deldime, P., Lefebvre, G., Cadin, Y., Wibau, M., "Analysis of tocopherols in vegetable oils by high performance liquid chromatography", *Rev. Fr. Corps Gras*, V.27, (1980), 279-282.
93. A.J.C. dans "Refining of Oils and Fats of Edible Purpose", Ed. P.W. William Pergamon Press, Oxford, ((1962).
94. Farines, M., Soulier, J., Charrouf, M. et Cave, A., "Etude de l'Huile des Graines d'Argania Spinosa (L), Sapotaceae, II. Stérols, alcools tritérpiniques et méthylstérols de l'Huile d'Argon", *Rev. Fr. Corps Gras*, V.31, (1984), 443.
95. Xu, S., Paterson, G.W., "Sterol Composition of the Phytococcaeae and Closely Related Families", *Lipids*, V.25, (1990), 230.
96. Akihisa, T., Thakur, S., Frosenstein, U. et Matsumoto, T., "Stérols of Cucurbitaceae: The Configuration at C-24 of 24-Alkyl . 5-, . 7- and . 8- Stérols", *Lipids*, V.21, (1986), 39.
97. Itoh, T., Tamura, T. et Matsumoto, T., "Stérols", "Méthylstérols and Triterpene Alcools in Three Theaceae and Some Other Vegetable Oils", *Lipids*, V.9, (1974), 173.
98. Xu, S., Paterson, G.W., Lusby, W.R., Schmid, K.M. et Sait, T.A., "The Distribution and Phylogenic Significance of Desmethyl Stérols in Chenopodium and Atriplex: Coexistence of . 7- and . 5- Stérols", *Lipids*, V.25, (1990), 61.
99. Hugel, M.F., Vetter, W., Audier, H., Barbier, M. et Lederer, E., "Analysis of Pollen Stérols by Mass Spectrometry", *Phytochemistry*, V.3, (1964), 7.
100. Dupéron, P., Vetter, W. et Barbier, M., "The Insaponifiable Fraction of Spores of the Fern *Dryopteris Filix-Mass*", *Phytochemistry*, V.3, (1964), 89.
101. Johnson, D.F., Bennet, R.D. et Heftman, E., "Cholestérol in Higher Plants", *Science*, V.140, (1963), 198.
102. Frega, N., Bocci, F., Conte, L.S. et Tetsa, T., "Chemical Composition of Tobacco Seeds (*Nicotiana Tabacus. L.*)", *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, V.68, (1991), 29.
103. Fedeli, E., Lanzani, A., Capella, P., et Jacini, C, "Triterpene Alcools and Stérols of Vegetable Oils", *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, V.43, (1966), 254.
104. Itoh, T., Tamura, T. et Matsumoto, T., "Sterol Composition of 19 Vegetable Oils", *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, V.50, (1973), 122.

105. Noda, M., Tanaka, M., Seto, Y., Aiba, T. et Oku, C., "Occurrence of Cholestérol as Major Sterol Component in Leaf Surface Lipid", *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, V.23, (1988), 439.
106. Kritchevsky, D., "Sterols, Bile Acids and Steroids - Comprehensive Biochemistry", Ed. M. Flarkin et E.H. Stotz, Elsevier Publishing Company, New York, V.10, (1963), 1.
107. Penner, O.P., Patterson, G.W. et Koines, P.M., "Sterol Composition During The Life Cycle of Soybean and Squash", *Lipids*, V.21, (1986), 48.
108. Nés, R.N., "Rôle of Sterols in Membranes", *Lipids*, V.9, (1974), 596.
109. Heftmann, E., "Functions of Sterol in Plants", *Lipids*, V.6, (1971), 128.
110. Billheimer, J.T., Avart, S. et Milani, B., "Séparation of Steryl Esters by Reversed Phase Liquid Chromatography", *J. Lipid Res.*, V.24, (1983), 1646.
111. Sims, R.J., Fioroti, J.A. et Kanuk, J., "Sterol Additive as Polymerization Inhibitors for Frying Oils", *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, V.49, (1972), 298.
112. Fenner, O.P., Patterson, G.W. et Lusby, W.R., "Developmental Régulation of Sterol Biosynthesis in *Curcubita Maximal*", *Lipids*, V.24, (1989), 271.
113. Harper, H.A., "Les Lipides dans Précis de Biochimie", 4^{ème} Ed.Fr., Ed. Les Press de l'Université Laval, Québec, (1977), 21.
114. Kafleskind, A. et Audian, F., "Etudes des Sterols par Chromatographie en Phase Gazeuse", *Rev. Fr. Corps Gras*, V.12, (1965), 399.
115. Hennig, S., Guelz, G. et Hangst, K., "Organ Spécifique Composition of Epicuticular Waxes of *Cistus Albidus* L. (Cistaceae)", *Chem. Abstr.*, V.110, (1989), 151325a.
116. Naturforsh, Z., Biosci, C., AFNOR, V.43, (1988), 806.
117. Sonntag, N.O.V., "Structure and Composition of Fats and Oils in Bailey's Industrial Oil and Fat Products", Ed. Diel Swern, New-York, V.1, (1979), 45.
118. Naudet, N. et Hautfenne, A., "Méthode Normalisée pour la Détermination des Sterols Totaux dans les Huiles Et Graisses", *Rev. Fr. Corps Gras*, V.33, (1986), 167.
119. Pioch, D., Lozano, P., Frater, C. et Graille, J., "Méthode Rapide de Dosage des Sterols dans des Milieux Complexes", *Rev. Fr. Corps Gras*, V.38, (1991), 381.

120. Norcia, L.N. et Rosenthal, B.E., "Sterols Content of Some Plants Oils; Further Observations on Fast Reaching Streols", *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, V.43, (1966), 168.
121. Akihisa, T., Ghosh, P. Thakur, S., Rosenstein, F.U. et Matsunoto, T., "Sterol Composition of Seeds and Mature Plants of Family Cucurbitaceae", *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, V.63, (1986), 653.
122. Brooks, C.J.W., Horning, B.C. et Young, J.S., "Characterization of Sterols by Chromatography-Mass Spectrometry of the Trimethylsilylethers", *Lipids*, V.3, (1968), 391.
123. Elliott, W.H., "Identification of Sterols and Bile Acids by Computerised Gas Chromatography-Mass Spectrometry", *Lipids*, V.15, (1980), 764.
124. Dumazer, M., Farines, M. et Soulier, J., « Identification des Sterols par Spectrométrie de Masse », *Rev. Fr. Corps Gras*, V.33, (1986), 151.
125. Matsumoto, T., Shimizu, N., Itoh, T., Iida, T. et Nishioka, A., "Carbon-13 NMR Spectroscopic Analysis of 24-Methyl-, 5, 22-Streols in Râpe and Mustard Seed Oils", *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, V.59, (1982), 521.
126. Thompson, M.J., Patterson, G.W., Dutky, S.R., Svoboda, J.A. et Kaplanis, J.N., "Techniques for the Isolation and Identification of Steroids in Insects and Algae", *Lipids*, V.15, (1980), 719.
127. Dumazer, M., Farines, M. et Soulier, J., "Sterol identification by mass Spectrometry", *Rev. Fr. Corps Gras*, V.33, (1986), 151-156.
128. Partridge, L.G. et Djerrasi, C., "Mass Spectrometry in structural and stereochemical problems. Characteristic fragmentations of cholestérol acétate", *J. Org. Chem.*, V.42, (1977), 2799-2805.
129. Wyllie, S.G., Amos, B. et Tokes, L., "Electron impact induced fragmentation of cholestérol and related C-5 unsaturated steroids", *J. Org. Chem.*, V.42, (1977), 752-732.
130. Riberau Gayon, P., "Les Composés Phénoliques des Végétaux", Dunod, Paris, (1968), 254.
131. Forget Richard, F.C., Rouet Mayer, M.A., Goupy, P.M., Philippon, J. et Nicolas, J., "Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins and 4-Methylcatechol in Model Solution by Apple Polyphenol Oxidase", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V.40, (1992), 2114-2122.

132. Forget Richard, F.C. et Gaillard, F.A., "Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins and 4-Methylcatechol in Model Solution by Combinations of Pear (*Pyrus Communis* Cv. Williams) Polyphenol Oxidase and Peroxidase : A Possible Involvement of Peroxidase in Enzymatic Browning", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V.45, (1997), 2472-2476.
133. Kader, F., Rovel, B., Girardin, M. et Metche, M., "Mechanism of Browning in Fresh High Bush Blue Berry Fruit (*Vaccinium Corymbosum* L), Rôle of Blue Berry Polyphenol Oxidase, Chlorogenic Acid and Anthocyanins", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V.74, (1997), 31-34.
134. , Macheix, J.J., Fleuriet, A. et Billot, J., "Fruits Phenolics -I-", CRS Press, Boca, (1990), 378.
135. Fankel, E.N., Waterhouse, A.L. and Kinsella, J.E., "Inhibition of Human LDL Oxidation by Resveratrol", *The Lancet*, V.341, (1993), 1103-1104.
136. Jang, M., Cai, L. and Vdeani, G.O., "Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, A Natural Product Derived from Grapes", *Science*, V.275, (1997), 218-220.
137. Harborne, J.B., "The Flavonoids", Mabry, T.M., Mabry H. (Eds), Chapman and Hall, London., (1975).
138. Heller, W. et Geiger, H., "The Flavonoids Advances in Research Since 1980, Harborne", J.B.(Eds), Chapman and Hall, London., (1988), 399.
139. Swain, T., "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments", Goodwin, T.W. (Ed), 2^{ème} Edition, Académie Press, London, V.1, (1976), 425.
140. Harborne, J.B., "The Flavonoids Advances in Research Since 1980", Harborne, J.B.(Eds), Chapman and Hall, London., (1988).
141. Markham, K.R., "Method in Plant Biochemistry", Académie Press Limited, (1989), 198.
142. Roberts, E.A.H., *Nature*, London, V.185, (1960), 536.
143. Lee, S.J., Son, K.H., Chang, H.W., Do, J.C., Jung, K.Y., Kang, S.S. et Kim, H.P., *Arch. Pharm. Res.*, V.16, n°1, (1993), 25.
144. Williamson, G., Pabum, G., Uda, Y., Price, K. et Rhodes, M., "Dietary quercetin glycosides: antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in HepalclcV cells", *Carcinogenesis*, V.17, n°11, (1996), 2385-2387.

145. Swain, T., "The Flavonoids", Harborne, J.B., Mabry, T.M., Mabry H. (Eds), Chapman and Hall, London., (1975), 1096-1129.
146. Harborne, J.B., "The Flavonoids Advances in Research Since 1986", Harborne, J.B.(Eds), Chapman and Hall, London., (1993).
147. Kühnan, J., *World Rev. Nutr. Diet.*, V.24, (1976), 117.
148. Swent Gyargyi, A., *Hoppe Seylers - Z - Physiol. Chem.*, V.225, (1938), 126.
149. Cantley, L.C. et Hammes, G.G., "Characterization of sulfhydryl groups on chloroplast coupling factor 1 exposed by heat activation", *Biochemistry*, V.15, (1976), 9-14.
150. Mukohata, Y., Nakadayashi, S. et Higashida, M., "Quercetin, an energy transfer , inhibitor in photophosphorylation", *FEBS Lett.*, V.85, (1978), 215-218.
151. Smith, D.A. et Banks, S.W., "Plant Flavonoids in Biology and Médecine: Biochemical, Pharmalogical and Structure Activity Relationships", Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B. (Eds), Liss A.R., New York, (1986), 113-124.
152. Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M. et Rolfe, B.C., *EMBOJ.*, V.5, (1987), 1173.
153. Firmin, J. L., Wilson, K.E., Rossen, L. et Johuston, A.W.B., "Flavonoid activation of nodulation gènes in Rhizobium reversed by other compounds présent in plants", *Nature*, V.234, (1986), 90-92.
154. Peters, N.K., Frost, J.W. et Long, S.R., "A plant flavone, luteolin, induces expression of Rhizobium meliloti nodulation gènes", *Science*, V.223, (1986), 978-980.
155. Zaat, S.A.J., Wijffelman, C.A., Spaink, H.P., Van Brussel, A.A.N., Okker, R.J.H. et Lugtenberg, B.J.J., *Bacteriol.*, V.169, (1987), 198.
156. Hamanura, Y., Hayashiya, K., Naito, K.I., Matsuura, K. et Nishida, J., *Nature*, V.194, (1962), 754.
157. Barbier, M., "Encyclopedia Universalis: Pigments et Pigmentations", V.13, (1980), **66**.
158. Lejeune, B., Vernat, B., Regerat, F., Gardelle, D., Foucher, D. et Fourrât, A., "Propolis: extracts and uses in shampoos and lotions", *Parfums Cosmétiques Arômes*, V.56, (1984), 6568.
159. Arthurson, G. et Jonson, C.E., *Prostaglandines*, V.10, (1975), 941.

160. Hughes, R.E. et Wilson, H.K., "Flavonoids: some physiological and nutritional considerations", *Prog. Med. Chem.*, V.14, (1977), 285.
161. Hope, W.C., Welton, A.F., Nagy, C.F. et Coffrey, J.W., *Fed. Proc.*, V.40, (1981), 4488.
162. Hope, W.C., Welton, A.F., Nagy, C.F. et Bernards, C.F., "In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity by quercetin", *Biochem. Pharmacol.*, V.32, (1983), 367-371.
163. Kimura, Y., Okuda, H. et Arichi, S., "Effects of flavonoids and related compounds from mulberry tree on arachidonate metabolism in rat platelet homogenates", *Chem. Pharm. Bull.*, V.34, n°5, (1986), 1223-1227.
164. Landolfi, R., Mower, R.L. et Steiner, M., "Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations", *Biochem. Pharmacol.*, V.33, (1984), 1525-1530.
165. Mower, R.L., Landolfi, R. et Steiner, M., "Inhibition in vitro of platelet aggregation and arachidonic acid metabolism by flavone", *Biochem. Pharmacol.*, V.33, (1984), 357-363.
166. Ptainen, J. et Vaapatala, H., *Trans. Pharmacol. Sci.*, (1983), 379.
167. Dembinska Kiec, A., Simmet, T. et Peskar, B.A., "Release and vasoconstrictor effect of leukotriene C-like immunoreactive material in the anaphylactic guinea-pig mesenteric vascular bed", *Eur. J. Pharmacol.*, V.101, (1984), 259-262.
168. Pathak, D., Pathak, K. et Singla, A.K., "Flavonoids as medicinal agents - récent advances", *Fitoterapia*, V.LXII, n°5, (1991), 371-389.
169. Havsteen, B., *Z. Lebesm. Unters. Forsch.*, "Spontaneous spatio-temporal organization in yeast cell suspension", *Journal of Cell Science* V.43, (1980), 367-377.
170. Fewtrell, C.M.S. et Gompert, B.D., "Effect of flavone inhibitors of transport ATPases on histamine sécrétion from rat mast cells", *Nature*, V.265, (1977), 635-636.
171. Kayoks, S., Shuichi, M., Michis, F., Sachiks, E. et Naohide, K., *Carcinogenesis*, V.15, n°11, (1994), 2669.
172. Beretz, A., Cazenave, J.P. et Anton, R., "Inhibition of aggregation and sécrétion of human platelets by quercetin and other flavonoids: structure-activity relationships", *Agents Actions*, V.12, (1982), 382-387.

173. Kaul, T.N., Middleton, E. et Ogra, P.L., "Antiviral effect of flavonoids on human viruses", *J. Med. Virol.*, V.15, (1985), 71-79.
174. Parmar, N.S. et Hennings, G., "The gastric antisecretory activity of 3-methoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan (ME) - a spécifique histidine decarboxylase inhibitor in rats", *Agents Actions*, V.15, (1984), 143-145.
175. Varma, S.V., *Plant Flavonoids in Biology and Médecine: Biochemical, Pharmalogical and Structure Activity Relationships*, Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B. (Eds), Liss A.R., New York, (1986), 343-358.
176. Havsteen, B., "Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency", *Biochem. Pharmol.*, V.32, (1983), 1141-1148.
177. Nishizuka, Y., "Studies and perspectives of protein kinase C", *Science*, V.233, (1986), 305-312.
178. Gschwendt, M., Horn, F., Kittstein, W. et Marks, F., "Inhibition of the calcium- and phospholipid-dependent protein kinase activity from mouse brain cytosol by quercetin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, V. 117, (1983), 444-447.
179. Kamei, H., Kojima, T., Koide, T., Hasegawa, M., Umeda, T., Teraba, K. et Hashimots, Y., *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, V.II, n°4, (1996), 247.
180. Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takaki, N. et Fugumoto, M., *Agric. Biol. Chem.*, V.49, n° 7, (1985), 2173.
181. Costantino, L., Rastellis, G. et Ab Albasini, A., "Inhibitory activity of flavonols towards the xanthine oxidase enzyme", *Int. J. Phar.*, V.86, (1992), 17-23.
182. Herto, M.G.L., *Proceeding of the Nutrition Society*, V.55, (1996), 385.
183. Fernandez Band, B.S., Goitia, M.T, Monters, M. et Allan, A.L., "Electrophoretic séparations of inorganic ions. Détermination of manganèse in steel by densitometry", *Boletin De La Sociedad Quimica Del Peru*, V.52, (1986), 19-31.
184. Sekhon, B.S., Kaushal, G.P. et Bhatia, I.S., "Use of zirconium(IV) and antimony(III) for structural investigation of flavonoids", *Mikrochimica Acta*, V.2, n° 5-6, (1983), 421-427.
185. D'mello, J.P.F., *Hand Book of Plant and Fungal Toxicants*, C.R.C. Boca Raton, New York, (1997), 99.

186. Baumann, J., Wurm, G.V. et Bruchhausen, F., "Prostaglandin synthetase inhibition by flavonoids and phenolic compounds in relation to their O₂-scavenging properties (author's transi)", *Arch. Pharm*, V.313, (1980), 330-337.
187. Cavallini, L., Bindoli, A. et Siliprandi, N., "Comparative évaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids", *Pharmacol. Res. Comm.*, V.10, (1978), 133-136.
188. Naim, M. Gestetner, B., Bondi, A. et Brik, Y., "Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V.24, (1976), 1174-1177.
189. Thompson, M. et Williams, C.R., "Stability of flavonoid complexes of copper(II) and flavonoid antioxidant activity", *Anal. Chim. Acta.*, V.85, (1976), 375-381.
190. Younes, M. et Siegers, C.P., "Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion", *Planta. Medi.*, V.43, (1981), 240-244.
191. Morton, A.D., "Phenolic compounds of black currant juice and their protective effect on ascorbic acid. I. Characterization and estimation of phenolic compounds m black currant juice", *J. Fd. Technol.*, V.3, (1968), 269-675.
192. Shrikhande, A.G. et Francis, F.J., "Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model Systems", *J. Fd. Sci.*, V.39, (1974), 904-906.
193. Krewson, G.F. et Couch, J.F., "Préparation of water-soluble métal complexes of rutin and related flavonols", *Journal of the American Pharmaceutical Association*, V.41, (1952), 83-86.
194. Bruneton, J., "Pharmacognosie, Photochimie, Plantes Médicinales", Tec et Doc , Lavoisier (Ed), Paris, (1993), 915.
195. Vlietinck, A.J., De Bruyne, T., Apers, S. et Pieters, L.A., "Plant Derived Leading Aompounds for Chemoterapy of Human Immunodeficiency Virus (Hiv) Infection", *Planta. Medica.*, V.64, (1997), 79-109.
196. Chen Lui, K.C.S., Lee, S.S., Chiou, J.F., Ren , S. et Lien, E.J., "Antiviral Tanins from Two Phyllantus Species", *Planta. Medica.*, V.65, (1999), 43-46.
197. Guignard, J.L., "Biochimie Végétale », Edition Masson, Paris, (1996), 255.

198. Takechi, M., Tanaka, Y., Takehara, M., Nonaka, G.I. et Nishioka, I., "Structure and Antiherpetic Activity Among the Tanins", *Phytochemistry*, V.24, n° 10, (1985), 2245-2250.
199. Quideau, S. et Feldman, K.S., "Ellagitanin Chemistry", *Chemical Reviews*, V.96, n°1, (1996), 475-503.
200. Veroffa, L., Dell'agli, M., Giolito, A., Guerini, M., Cabalion, P. et Basisio, E., "In Vitro Antiplasmodial Activity of Tristrianopsis Species And Identification of the Active Constituents: Ellagic Acid and 3, 4, 5-Trimethoxyphenyl -(6-O-Galloyl)-O-B-D-Glucopyranoside", *Journal of Natural Product*, V.64, (2001), 603-607.
201. Mazza, G. et Miniati, E., "Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains", C. Press, Boca Raton, (1993), 362.
202. Pecklet, R.C. et Small, G.J., "Location and Development of Anthocyanoplasts", *Phytochemistry*, V.19, (1980), 2571.
203. Jurd, L., "Some Advances in the Chemistry of Anthocyanin - Type Plant Pigments. In : Chichester C.O., *The Chemistry of Plant Pigments*", Académie Press, New York, (1970), 218.
204. Mueller Harvey, J., Reed, J.D. et Hatley, R.D., *J. Sci. Food Agric.*, V.39, n°1, (1987), 1.
205. Ohta, N. et Yagishita, A.K., *Agric. Biol. Chem.*, V.34, (1970), 900.
206. Dreyer, David L., Bertelli, Domenick J., "Structure of zapotin", *Tetrahedron* (1967), 23(12), 4607-12..
207. Barberan, F. A. T., Nunez, J. M., Tomas, F., "An HPLC study of flavones from some Spanish *Sideritis* species", *Phytochemistry (Elsevier)* (1985), 24(6), 1285-8.
208. Mizuno, M., Matoba, Y., Tanaka, T., Tachibana, H. et Inuma, M.J., *J. Nat. Prod.*, V.50, n°4, (1987), 751.
209. Voirin, Bernard. "Chemotaxonomic research on the vascular plants. XXV. Distribution of polyphenolic compounds in the Lycopodiaceae", *Phytochemistry (Elsevier)* (1972), 11(1), 257-62..
210. Meier, W., Fuerst, A., "Digicitrin, a new flavone from the leaves of the red foxglove", *Helvetica Chimica Acta* (1962), 45 232-9.

211. Markham Ken, R., "Isolation Techniques for Flavonoids in Flavonoids", U.K, Austrin, U.S.A, (1974), 2.
212. Gonnet, J. F.; Jay, M., "Chemotaxonomic research on vascular plants. XXVII. Flavonoid aglycon of *Anthyllis vulneraria*", *Phytochemistry* (Elsevier) (1972), 11(7), 2313-16.
213. Ulubelen, A., Kerr, K.M. et Mabry, T.J., *Phytochemistry*, V.19, (1980), 1761.
214. Star, A.E. et Mabry, T.T., *Phytochemistry*, V.10, (1971), 2817.
215. Jay, Maurice, Gonnet, Jean F.; Wollenweber, Eckhard; Voirin, B., "Qualitative analysis of flavonoid aglycones from a chemotaxonomic point of view", *Phytochemistry* (Elsevier) (1975), 14(7), 1605-12.
216. Jay, Maurice; Gonnet, Jean F.; Wollenweber, Eckhard; Voirin, Bernard, "Qualitative analysis of flavonoid aglycones from a chemotaxonomic point of view", *Phytochemistry* (Elsevier) (1975), 14(7), 1605-12.
217. Reichling, J.; Becker, H.; Exner, J.; Draeger, P. D., "Comparative studies of various commercial samples of *Matricaria* flowers. Essential oil, flavonoids, coumarins, phenolic acids and plant protectant residues", *Pharmazeutische Zeitung* (1979), 124(41), 1998-2005.
218. Mues, Ruediger; Timmermann, Barbara N.; Ohno, Nobuo; Mabry, Tom J., "6-Methoxyflavonoids from *Brickellia californica*", *Phytochemistry* (Elsevier) (1979), 18(8), 1379-83.
219. Charriere, Y. et Tissut, M., *Phytochemistry*, V.12, (1975), 1443.
220. Barberan, F. A. T.; Ferreres, F.; Tomas, F., "TLC, UV and acidic treatment in the differentiation of 5,6- and 5,8-dihydroxyflavones, 3-methoxyflavones and flavonols", *Tetrahedron* (1985), 41(23), 5733-40..
221. Adzet, T.; Martinez-Verges, F., "The methyl flavones of *Thymus baeticus* Boiss. ex lacaita (*Labiatae*)", *Plantas Medicinales et Phytoterapie* (1980), 14(1), 8-19.
222. Egger, K., *Thin Layer Chromatography- A Laboratory Hand Book*, Ed. E. Stall, Springer Verlag Berlin, (1969), 687.

223. Markham, K. R.; Porter, L. J., "Flavonoids of the primitive liverwort *Takakia* and their taxonomic and phylogenetic significance", *Phytochemistry* (Elsevier) (1979), 18(4), 611-15.
224. Markham, Kenneth R.; Wallace, James W., "The chemotaxonomy of the Hymenophyllaceae. Part 1. C-glycosylxanthone and flavonoid variation within the filmy-ferns (Hymenophyllaceae)", *Phytochemistry* (Elsevier) (1980), 19(3), 415-20.
225. Jangaard, N.O.J., *Chromatogr.*, V.50, (1970), 148.
226. Gupta, S.B.J., *Chromatogr.*, V.36, (1968), 258.
227. Tatum, James H.; Hearn, C. Jack; Berry, Robert E. Characterization of citrus cultivars by chemical differentiation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* (1978), 103(4), 492-6..
228. Hoerhammer, L.; Wagner, H.; Hein, K., "Thin layer chromatography of flavonoids on silica gel", *Journal of Chromatography* (1964), 13(1), 235-7..
229. Neu, Richard; Hagedorn, Paul., "Color reaction of flavone bodies with antimony trichloride. III", *Naturwissenschaften* (1953), 40 411-12.
230. Neu, Richard., "Aromatic boron compounds. IX. Chelates of diarylboronic acids with aliphatic hydroxy aminés as reagents for détection of hydroxyphenylbenzo-g -pyrones", *Naturwissenschaften* (1957), 44 181-2..
231. Seikel, M.K., In "the Chemistry of Flavonoid Compound", Ed. T. K. Geissman, Perganon Press, New York, (1962), 34.
232. Mabry, T.J., Markham, K.R. et Thomas, M.B., "The Systematic Identification of Flavonoids", Springer, Verlay, Berlin, (1970).
233. Lebreton, Philippe; Markham, K. R.; Swift, W. T., III; Oung-Boran; Mabry, Tom J., "Flavonoids of *Baptisia australis*", *Phytochemistry* (Elsevier) (1967), 6(12), 1675-^80. .
234. Govindachari, Tuticorin R.; Pai, B. R.; Srinivasan, M.; Kalyanaraman, P. S., "Investigation of *Andrographis paniculata*", *Indian Journal of Chemistry* (1969), 7(3), 306.
235. Thomas, Michael Barrie; Mabry, Tom J., "Isolation, structure and synthesis of scaposin, a new flavone from *Hymenoxys scaposa*", *Tetrahedron* (1968), 24(9), 3675-9. .

236. Kupchan, S.M., Siegel, C.W., Hemingway, R.S., Knox, J.R. et Udayamurthy, M.S., *Tetrahedron*, V.25, (1969), 1603.
237. Farkas, L., Nogcadi, M., Sudarsanana, V. et Herz, W., *J. Org. Chem.*, V.31, (1966), 3228.
238. Bhutani, S. P.; Chibber, Shyam S.; Seshadri, Tiruvenkata R., "Components of the roots of *Pueraria tuberosa*: isolation of a new isoflavone C-glycoside (di-O-acetylpuerarin)", *Indian Journal of Chemistry* (1969), 7(3), 210-12..
239. Mizelle, J. W., Dunlap, W. J., Hagen, R. E., Wender, S. H., Lime, B. J., Albach, R. F., Griffiths, F. P., "Isolation and identification of some flavanone rutinosides of the grapefruit", *Analytical Biochemistry* (1965), 12(2), 316-24.
240. Abdel Baset, W.M.E.H., Phd. Dissertation, University of Texas et Austin, U.S.A., (1973).
241. Linuma, M., Matsuur, A.S., Kurogochi, K. et Tanaka, T, *Chem. Pharm. Bull.*, V.28, n°3, (1980), 717.
242. Nordstrom, C. G.; Kroneld, T., "Gas-liquid chromatography of flavone ethers", *Acta Chemica Scandinavica* (1947-1973) (1972), 26(6), 2237-40.
243. Narasimhachari, N.; Rudloff, E. V., "Gas-liquid chromatography of some flavonoid compounds and hydroxybiphenyls", *Canadian Journal of Chemistry* (1962), 40 1123-9.
244. Klebe, J. F., Finkbeiner, H., White, D. M., "Silylations with bis(trimethylsilyl)acetamide, a highly reactive silyl donor", *Journal of the American Chemical Society* (1966), 88(14), 3390-5..
245. Hemingway, Richard William; Hillis, W. E., "Microanalytical method for the détermination of dihydroquercetin in wood", *Journal of Chromatography* (1969), 43(2), 250-2.
246. Gehrke, Charles W., Stalling, David L., "Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide", U.S. (1968), 1 p. CODEN: USXXAM US 3415864 19681210 CAN 70:57999 AN 1969:57999.
247. Katagi, Toyoshi; Horii, Akiko; Oomura, Yoshiko; Miyakawa, Hisayo; Kyu, Tamako; Ikeda, Yoko; Isoi, Koichiro; Makita, Masami. "Gas chromatography of flavonoids", *Journal of Chromatography* (1973), 79 45-56.
248. Vande Castele, K., De Pooter, H., Van Sumere, C. F., "Gas chromatographic séparation and analysis of trimethylsilyl derivatives of some naturally occurring

- nonvolatile phenolic compounds and related substances", *Journal of Chromatography* (1976), 121(1), 49-63.
249. Narasimhachari, N.; Rudloff, E. V., "Gas-liquid chromatography of some flavonoid compounds and hydroxybiphenyls", *Canadian Journal of Chemistry* (1962), 40 1123-9.
250. Furuyat, T.T., *J. Chromatogr.*, V.19, (1965), 607.
251. Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F. R., "The analysis of bud exudate of *Populus euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry" *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* (1987), 232(1268), 249-72..
252. Pellizzari, Edo D.; Chuang, Chien-Mei; Kuc, Joseph; Williams, Edwin Bruce., "Gas chromatography and mass spectroscopy of plant phenolics and related compounds", *Journal of Chromatography* (1969), 40(2), 285-8..
253. Adersen, R.A. et Vaughn, T.H., *J. Chromatogr.*, V.52, (1970), 52.
254. Vanhalen, M. et Vanhaelen Fastre, R., *J. Chromatogr.*, V.187, n°1, (1980), 255.
255. Crezar, C.S., Koupay Abyazani, M.R. et Stephenson, G.R., V.478, n°2, (1989), 415.
256. Angerosa, F., D'alessandro, N., Konstantinon, P. et Di Giacinto, L., "GC-MS Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil", *J. Agric. Food Chem.*, V.43, (1995), 1802-1807.
257. Angerosa, F., D'alessandro, N., Coran, F. et Mellirio, G., "Characterization of Phenolic and Secoiridoid Aglycons Présent in Virgin Oil by Gas Chromatography-Chemical Ionization Mass Spectrometry", *J. Chromatogr.*, V.736, (1996), 195-203.
258. Owen R. W., Giacosa A., Hull W. E., Hubner R., Wurtele G. et al. "Olive Oil Conception and Health: The Possible rôle of antioxydant", *Lancet Oncol.* VI, (2000), 107-112.
259. Engelhardt, H, "High Performance Liquid Chromatography", Springer- Verlag, Heidelberg, (1979).
260. Syder, L.R. et Kirkland, J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", Ed. J. Willey. Sons., New York, (1974).
261. Ward, Robert S.; Pelter, Andrew, "Analysis of mixtures of closely related naturally occurring organic compounds using high performance liquid chromatography", *Journal of Chromatographic Science* (1974), 12(10), 570-4.

262. Bianchini, J. P.; Gaydou, E. M., "Séparation of polymethoxylated flavones by straight-phase high-performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography* (1980), 190(1), 233-6. .
263. Dondi, F.; Blo, G.; Kahie, Y. D.; Lodi, G.; Pietrogrande, C.; Reschiglian, P., "Chromatographic behavior of flavonoid compounds in reversed-phase HPLC Systems", *Chromatographia* (1988), 25(5), 423-9.
264. Lenherr, A.; Meier, B.; Sticher, O., "Modern HPLC as a tool for chemotaxonomical investigations: iridoid glucosides and acetylated flavonoids in the group of *Stachys recta*", *Planta Medica* (1984), 50(5), 403-9.
265. Smith, D.M. et Patterson, R., *Biochem. Syst., Ecol.*, V.9, (1981), 149.
266. Villas, A., Jimenez, A. et Manez, S., *Pharm.*, V.40, (1985), 40.
267. Harborne, G.R., Boardley, M. et Linder, H.P., *Phytochemistry*, V.24, (1985), 273.
268. Hosteffmann, K., Domdon, B., Schaufelberger, D. et Hosteffmann, M., "On Line High Performance Liquid Chromatography Ultra Violet-Visible Spectroscopy of Phenolic Compounds in Plant Extracts Using Post-Column Derivatization", *Journal of Chromatography*, V.283, (1984), 137-147.
269. Bailey, R.G., Me Dowell, I. et Nursten, H.E., "Use of HPLC Photodiode-Array-Detection in Study of the Nature of Black Tea Liqueur", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V.52, (1990), 509-523.
270. Kajiwama, K., Ohno, Y., Ochiai, T., Hiraga, Y. et Takahashi, K.J., *J. Chromatogr.*, V.362, (1986), 132.
271. Baldi, A., Romani, A., Mulinacci, N., Vincierri, F.F. et Casette, B., "HPLC/ MS Application to Anthocyanins of *Vitis Vinefera L.*", *J. Agric. Food Chem.*, V.43, (1995), 2104-2109.
272. Le Tran Masson, M.P., "Purification et Caractérisation de Deux . -D-Glycosidases d'*Aspergillus Niger*, Détermination de Leurs Activités sur des Substrats Représentatifs des Traitements Enzymatiques des Jus de Fruits et des Vins", Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires de Nancy, (1998), 247.
273. Harris, P.J., Henry, R.J., Blakeney, A.B. et Stone, B.A., "An Improved Procédure for the Methylation Analusis of Oligisaccharides and Polysaccharides", *Carbohydrate Research*, V.127, (1984), 59-73.

274. Bote Smith, B.C., "Phytochemistry of Proanthocyanidins", *Phytochemistry*, V.14, (1975), 1107-1113.
275. Porter, L.J., Tannins In: Harborne, J.B., "The Flavonoids Advances in Research Since 1980", Harborne, J.B.(Eds), Chapman and Hall, London., (1989), 621.
276. Laks, P.E., "Condensed Tannins, Structure of the Phenolic Acids", *Holzforshung*, V.41, (1987), 287-292.
277. Matthews, S., Mila, I., Scalbert, A., Follet, B., Lapiene, C., Hervé Du Penhoat, C.L.M., Rolande, C. et Donelley, D.M.X., "Method for Estimation of Proanthocyanidins Based on Their Acid Depolymerisation in the Presnce of Nucleophils", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, V.45, (1997), 1195-1201.
278. Rigaud, J., Ferez Ilzarbe, J., Ricardo Da Silva, J.M. et Cheynier, V., "Micromethod of the Identification of Proanthocyanidins Using Thiolysis Monitored by High Performance Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography*, V.540, (1991), 401-405.
279. Himingway, R.W., Tobiason, F.L., Me Graw, G.W. et Steynberg, J.P., "Conformation and Complexation of Tannins: NMR Spectra and Molecular Search Modling of Flavan-3-Ols", *Magnetic Résonance in Chemistry*, V.34, (1996), 424-433.
280. Foo, L.Y. et Karchery, J.J., "Procyanidn Dimers and Trimers from Douglas Fir Inner Bark", *Phytochemistry*, V.28, n°6, (1989), 1743-1747.
281. Blade, A.M., Pieters, LA., Gergely, A., Koldziej, H., Clayes, .M. et Vlietinck, A.J., "A Type Proanthocyanidins from Steam Bark of Pavetta Owariensis", *Phytochemistry*, V.30, n°1, (1991), 337-342.
282. Blade, A.M., Pieters, L.A., Gergely, A., Koldziej, H., Clayes, .M. et Vlietinck, A.J., "Dimeric and Trimeric Proanthocyanidins Possessing A Doubly Linhed Structure from Pavette Owariensis", *Phytochemistry*, V.30, n°12, (1991), 4129-4135.
283. Wolfender, J.L., Maollard, M., Marston, A. et Hostehman, K., "Mass Spectroscopy of Underivatized Naturally Occuring Glycosides", *Phytochemical Analysis*, V.3, (1992), 193-214.
284. Yashuchi, E., Ruchiro, U. et Takashi, K., "Antioxidant Effect Chlorophyll and Pheophytin on the Autoxidation Of Oils in the Dark. Comparison of Inhibitory Effects", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.62, (1985), 1375-78.

285. Knox, J.P. et Dodge, A.D., "Singlet Oxygen and Plant", *Phytochemistry*, V.24, (1985), 889-96.
286. Morelle, J., "Peroxydes Lipidiques, Radicaux Libres, Vieillessement et Lipoaminoacide", *Parf. Cosm. Arômes*, V.80, (1988), 91-904.
287. Marcuse, R., "The Effect of Some Aminoacids on the Oxidation of Linoleic Acid and Its Methyl Ester", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.39, (1962), 97-103.
288. Murase, H., Nagao, A. et Terao, J., "Antioxidant and Antiemulsifying Activity of N -(Long Chain Acyl)-Histidine and N-(Long Chain Acyl)-Carnosine", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, V.41, (1993), 1601-04.
289. Vanela, A., Pinturo, E., Tirolò, P., D'Urso, G., Rizza, V., Di Silvestro, I., Grimaldi, R. et Brai, M., "Scavenger Effect of Spermine on Superoxide Anion: Preliminary ESR Data", *IRCS Med. Sci. Biochem.*, V.8, (1980), 940-46.
290. Gorman, A.A., Hamblett, L, Smith, K. et Standen, M.C., "Strychnine: A Fast Physical Auencher of Singlet Oxygen (*. g)", *Tetrahedron Lett.*, V.25, (1984), 581-84.
291. Saito, H. et Ishihara, K., "Antioxidant Activity and Actives Sites of Phospholipids as Antioxydants", *J. Am. OU Chem. Soc.*, V.74, (1997), 1531-36.
292. Tanizawa, H., Todos, S., Sazuka, Y., Tanizawa, T., Hayashi, T., Arishi, S. et Takino, Y., "Natural Antioxidant. Antioxidative Components of Tea Leaf (*Thea Sinensis L.*)", *Chem. Pharm. Bull.*, V.32, (1984), 2011-14.
293. Naudet, M., "Problèmes et Techniques", *Labo. Pharma.*, V. 215, (1972), 61.
294. Torel, J., Cillard, J. et Cillard, P., "Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical", *Phytochemistry*, V.25, n°2, (1986), 383-5.
295. Dziezak, J.D., "Preservatives: antimicrobial agents", *Food Technology*, V.40, (1986), 104-111.
296. Niki, E., *Chem. Phys. Lipids*, "Antioxidants in relation to lipid peroxidation", V.40, (1987), 227-253.
297. Chazan, J.B. et Szulc, M., "Free radicals and vitamin E", *Cah. Nutr. Diet.*, V.22, (1987), 66-70.
298. Cillard, J. et Cillard, S.T.P., "Phenolic compounds and free radicals", *Pharma*, V.4,

(1988), S92.-6.

299. Sherwin, E.R., "Antioxidants for vegetable oils", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.53, (1976), 430-6.
300. Pascal, G., "Food antioxidants: technological, regulatory, toxicological, and nutritional aspects", *Cah. Nutr. Diet.*, V.14, n°4, (1979), 271-290.
301. Waters, W.A., "Kinetics and mechanism of metal-catalyzed autoxidation", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.48, (1971), 427-33.
302. Deby, C., "New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases", *Biochem. Pharmacol.*, V.39, (1990), 399-405.
303. Morelle, J., "Lipid peroxides, free radicals, aging and lipoamino acids", *Parf. Cosm. Arômes*, V.80, (1988), 91-104.
304. Fridovich, L., *Bioscience*, V.27, (1977), 462.???
305. Fraga, C.G. et Martine, V.S., Martino, Virginia S.; Ferraro, Graciela E.; Coussio, Jorge D.; Boveris A., "Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence", *Biochemical Pharmacology* (1987), 36(5), 717-20.
306. Faure, M., Lissi, E., Torres, R. et Videla, L.A., "Antioxidant activities of lignans and flavonoids", *Phytochemistry*, V.29, n°12, (1990), 3773.-5.
307. Younes, M. et Siegers, C.P., "Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion", *Planta Med.*, V.43, (1981), 240-4.
308. Ferrandiz, M.L., Ramachandran Nair, A.G. et Alcaraz, M.J., "Inhibition of sheep platelet arachidonate metabolism by flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs", *Pharmazie*, V.45, (1990), 206-8.
309. Ferrandiz, M.L., Ramachandrannair, A.G. et Alcaraz, M.J., "Effect of flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs on arachidonate metabolism in rat peritoneal leukocytes", *Pharmazie*, V.45, (1990), 444-5.
310. Baumann, J., Bruchhausenn, F.V. et Wurm, G., "Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation", *Prostaglandins*, 1980,20,4, 627-639
311. Caldwell M.M., Robbercht, R. et Flint, S.D., "Internai filters: prospects for UV-acclimation in higher plants", *Physiol. Plant*, V.58, (1983), 445-50.

312. Thompson, M. et Williams, C.R., "Stability of flavonoid complexes of copper(II) and flavonoid antioxidant activity", *Anal. Chim. Acta.*, V.85, (1976), 375-81.
313. Lectan, A., *J. Food. Sci.*, V.31, (1966), 395.
314. Clemetson, C.A.B. et Andersen, L., "Plant polyphenols as antioxidants for ascorbic acid", *Am. N. Y. Acad. Sci.*, V.123, (1966), 369-376.
315. Das, M. et Prasanta, K.R., *Biochem. Inter.*, V.17, n°12, (1988), 203.
316. Bors, W., Heller, W., Michel, C. et Saran, M., "Flavonoids as antioxidants: Determination of Radical-Scavenging Efficiencies", *Methods Enzymol.*, V.186, (1990), 343-55.
317. Lea, C.H. et Swoboda, P.A.T., "Antioxidant activity of the flavonols, gossypetin and quercetagenin", *Chem. Ind.*, (1956), 1426-8.
318. Pratt, D.E. et Watts, B.M., "Antioxidant activity of vegetable extracts. I. Flavone aglycons", *J. Food. Sci.*, V.29, (1964), 27-33.
319. Miura, K. et Nakatani, N., "Antioxidative activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L.)", *Agric. Biol. Chem.*, V.53, n°11, (1989), 3043-5.
320. Cholbi, M.R., Paya, M. et Alcara, M.J., "Inhibitory effects of phenolic compounds on carbon tetrachloride-induced microsomal lipid peroxidation", *Experientia*, V.47, (1991), 195-9.
321. Pratt, D.E., "Lipid antioxidants in plant tissue", *J. Food. Sci.*, V.30, (1965), 737-41.
322. Taga, S.M., Miller, E.E. et Pratt D.E., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.61, n° 5, (1984), 928.
323. Takagi, T. et Iida, T., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.57, (1980), 326.
324. Pratt, E. et Biral, P.M., *J. Food. Sci.*, V.44, (1979), 1720.
325. Ecole, J. "Antioxidants. Rôles and use", *Parf. Cosm. Arômes*, V.65, (1985), 87-9.
326. Kramer, R.E., "Antioxidants in clove", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.62, (1985), 111-113.
327. Yen, G.C. et Chen, H.Y., "Antioxidant Activity of Various Tea Extract in Relation to Their Antimutagenicity", *J. Agric. Food. Chem.*, V.43, (1995), 27-32.
328. Cotellet, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Fomney, J., Wallet, J.C. et Gaydou, E.M., "Antioxidant Properties of Hydroxyflavones Free Radical", *Biol. and médecine*, V.20, (1996), 35-43.

329. Bors, W., Relier, W., Michel, C. et Stettmarier, K., "Electron Paramagnetic Résonance Studis of Flavonoids Compounds, Free Radical: From Basic Science to Médecine", Editions Birhauser Verlag Basel Zurich, (1993).
330. Rosen, G.M. et Halpern, H.J., "Spin Traping Biological Generated Free Radical: Correlating Formation With Cellular Injury", *Methods In Enzymol.*, V.186, ^N, (1990), 611-621.
331. Pou, S., Hasset, D.J., Britigan, B.E., Calen, ,M.C. et Rosen, G.M., "Problems Associated With Spin Trapping Oxygen Centered Free Radical in Biological System", *Anal. Biochem.*, V.105, (1984), 198-209.
332. Zhao, B., Li, X., Me, R., Chengs, S. et Wenjuan, X., "Scavenging Effect of Extracts of Green Tea and Natural Antioxidants on Active Oxygen Radicals", *Cell. Biophys.*, V.14, (1989), 175-85.
333. Rosen, H. et Klebaniff, S.J., "Formation of Singlet Oxygen by the Myeloperoxydase Mediated Antimicrobiol System", *J. Biol. chem.*, V.252, (1977), 4803-10.
334. Tournaire, C., Croux, S., Mourette, M.T. , Bech, I., Hocquaux, M., Braun, M.A. et Oliveros, E., "Antioxidant Activity of Flavonoid Efficiency of Singlet Oxygen (1. g) Quenching", *J. Photochem. Photbiol. (B)*, V.19, (1993), 205-15.
335. Faure, M., Lissi, E., Torres, R. et Videla, L.A., "Antioxidant Activity of Liguands And Flavonoids", *Phytochem*, V.29, (1990), 3773-76.
336. Miyasawa, T., Suzuki, T. et Fujimoko, K., "Age Dépendent Accumulation of Phosphotidyl-Chaline Hydroperoxide in the Brain and the Liver of the Rat", *Lipids*, V.28, (1993), 789-93.
337. Miyasawa, T., Suzuki, T. et Fujimoko, K., "Rapid Estimation of Peroxide Content of Soy Bean Oil by Measuring Thermoliminescence", *J. Am. OU Chem. Soc*, V.71, (1994), 343-45.
338. Yoshida, L.S., Miyasawa, T., Fujimoko, K. et kaneda, T., "Liver Phosphotidyl-Chaline Hydroperoxidation Provoked by Ethionine Chaline Déficient Diet in Mice", *Lipids*, V.25, (1990), 565-69.
339. Combe, N., « Les Techniques d^x Analyse de TOxydation Lipidique », *OCL*, V.3, (1996), 200-204.

340. Beauchamp, C. et Fridovich, I., "A Mechanism for the Production of Ethylene from Methional. The Generation of Hydroxyl Radical by Xanthine Oxidase", *J. Biol. Chem.*, V.245, (1970), 4641-48.
341. Fossey, J., Lefort, D. et Sorba, J., "Les Radicaux Libres en Chimie Organiques", Editions Masson, Paris, (1993).
342. Fiedler, U., "A Colorimetric Method for the Determination of Low Peroxide Values of Fats and Oils", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.51, (1974), 101-103.
343. Silberg, L.S., "Peroxide XI: Iodometric Analysis of Dialkyl and Dicumenyl Peroxide", *Analyst*, V.117, (1992), 745-49.
344. Asakawa, T. et Matsushita, S., "A Colorimetric Micro-Determination of Peroxide Value Utilizing Aluminum Chloride as the Catalyst", *Lipids*, V.15, (1980), 965-67.
345. Asakawa, T. et Matsushita, S., "A Colorimetric Determination of Peroxide Value with potassium iodide silica gel reagent", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.55, (1978), 619-20.
346. Gray, J.I., "Measurement of Lipid Oxidation: A Review", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.55, (1978), 539-46.
347. Marco, G.J., "A Rapid Method of Evaluation of Antioxidants", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.45, (1968), 594-98.
348. Chevalleau, S., Debal, A. et Vcciani, E., "Détermination de l'Activité Antioxydante d'Extraits Végétaux", *Rev. Fr. corps. Gras*, V.39, (1992), 3-8.
349. Kikuzawa, K., Nakahara, T. et Tanaka, M., "A Sensitive Test to Evaluate Antioxidant in Oils and Fatty Ester", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.64, (1987), 862-64.
350. Allen, G.C., Farag, R.S. et Crook, E.M., "The Metal Catalyzed Oxidation of Emulsion of Linoleic Acid and Triolein", *J. Appl. Biochem.*, V.1, (1979), 1-15.
351. Vossen, R.C.R.M., Van Dam Mieras, M.C.E. et Zwaalm R.F.A., "Continuous Monitoring of Lipid Peroxidation by Measuring Conjugated Diene Formation in an Aqueous Liposome Suspension", *Lipids*, V.28, (1993), 857-61.
352. Yamada, K., Terao, J. et Matsushita, S., "Electrochemical Detection of Phospholipid Hydroperoxide in Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography", *Lipids*, V.22, (1987), 125-28.

353. Foghia, T.A., Silbert, L.S. et Vail, P.D., "Gas Liquid and High Performance Liquid Chromatography Analysis of Aliphatic Hydroperoxides and Dialkyl Peroxyde", *J. Chromatog.*, V.637, (1993), 157-65.
354. Christensen, T.C. et Hólmer, G., "Lipid Oxidation Détermination in Butter and Dairy Spreads by HPLC", *J. Food Sci.*, V.61, (1996), 486-89.
355. Nakamura, T. et Macda, H., "A Simple Assay for Lipid Hydroperoxides Based on Triphenyl-Phosphine Oxidation and High Performance Liquid Chromatography", *Lipids*, V.26, (1991), 765-68.
356. Van Devoort, F.R., Ismaïl, A.A., Sedman, J., Dubois, J. et Nicodemo, T., "The Détermination of Peroxide Value by Fourier Transform Infrared Spectroscopy", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.71, (1994), 921-26.
357. Ma, K., Van Devoort, F.R., Sedman, J. et Ismaïl, A.A., "Stoichiometric Détermination of Hdroperoxides in Fats and Oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.74, (1997), 897-906.
358. O'Connar, A.T., "Application of IR Spectrophotometry of Edible Oil by Fourier Transform Infrared Spectroscopy", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.71, (1994), 1-15.
359. Van Devoort, F.R., Ismaïl, A.A., Sedman, J., et Emo, G. , "Monitoring the Antioxidation of Edible Oil by Fourier Transform Infrared Spectroscopy", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.51, (1974), 243-53.
360. HENICK, A.S., Benca, M.F. et Mitchell, J.H., "Estimating Carbonyl Compounds in Rancid Fats and Foods", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.51, (1974), 17-21.
361. List, G.R., Evans, C.D., Kwolek, W.F., Warner, K., Boundy, B.K. et Cowan, J.C., "Oxidation and Quality of Soy Bean Oil, A Preliminary Study of the Anisidine Test", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.51, (1974), 17-21.
362. Ohkawa, H., Ohishi, N. et Yagi, K., "Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by TBA Reaction", *Anal. Biochem.*, V.95, (1979), 351-58.
363. Tarhadgis, B.G., Watts, B.M., Younathan, M.T. et Dugan, L.Jr., "A Distillation Method of the Quantitative Détermination of Malonaldehyde in Rancid Foods", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.37, (1960), 44-48.
364. Tatun, V.L., Changchit, C. et Chow, C.K., "Measurement of Malondialdehyde by HPLC with Fluorescence Détection", *Lipids*, V.25, (1990), 226-29.

365. Chaudière, J. et Gérard Mounier, D., "Measurement of Lipid Peroxidation: A Critical Review Paraquat Poisoning", Editions Bismuth C. and Hall A.H., New York, (1995).
366. Espinosa-Mansilla, A., Munoz De La Pena, A., Salinas, F., Alanon, A. et Murillo, J.A., "Kinetic-Fluoremetric Détermination of Malonaldehyde Based on the Hantzsh Reaction: Application to Olive Oil Analysis", *J. Agric, Food Chem.*, V.45, (1997), 172-177.
367. Fioriti, J.A., Bentz, A.P. et Sims, R.J., "The Reaction of Picric Acid with Epoxides I : A Colorimetric Method", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.43, (1966), 37-41.
368. Fioriti, J.A., Bentz, A.P. et Sims, R.J., "The Reaction of Picric Acid with Epoxides II : the détection of epoxide of heated oils", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.43, (1966), 487-90.
369. Hamberg, M., "A Method for Détermination of the Absolute Stereochemistry of the . -. Epoxy Alcohols Derivated from Fatty Acid Hydroperoxides", *Lipids*, V.27, (1992), 1042-46.
370. Hamberg, M., "Trihydroxy Octadecnoic Acids in B  er: Qualitative and Quantitative Analysis", *J. Agric, Food Chem.*, V.39, (1991), 1568-72.
371. Vivas, N., Bourgeois, G., Glories, Y. et Vitry, C., "Sur F Identification par Spectrométrie de Masse des Produits Formés par TAutoxydation de L'Acide Linoléique En Milieu Hydro-Alcoolique", *Sci. des Alim.*, V.15, (1987), 49-58.
372. Mordret, F., Morin, O. et Coustille, J.L., "Détermination des Flavours des Corps Gras", *Rev. Fr. Corps Gras*, V.32, (1987), 193-200.
373. Frankel, E.N. et Tappel, A.F., "Rapid Headspace Gas Chromatography of Hexanal as A Measure of Lipid Peroxidation in Biological Samples", *Lipids*, V.24, (1989), 976-81.
374. Loliger, J., "Méthodes Instrumentales pour l'Analyse de TEtat d'Oxydation des Produits Alimentaires", *Rev. Fr. Corps Gras*, V.36, (1989), 301-08.
375. Topallar, H., Bayrak, Y. et Iscan, M., "A Kinetic Study on the Autoxidation of Sun Flower Seed Oil", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, V.74, (1997), 1325-27.
376. Boukquet, A., *Plantes médicinales du Congo-Brazaville. Travaux et documents de LORSTROM*, (1972), 13, 8-10.
377. Paris, R., Nothis, A., *Sur quelques plantes de Nouvelle-Calédonie. Plantes médicinales et Phytothérapie III*, (1969), 4, 274-287.

378. Singleton, V.L, Ross, J.A, Quantification of Phenolic Compounds in Extract Am. J. Enol. Vitic, V.16,(1965), , 144-158.
379. Quettier-Deleu. C, Phenolic compounds and Antioxidant Activities of Buckwheat Hulls And Flour, ,Journal of Ethnopharmacology, V.72, (2000), 35-42.
380. Pellegrini, R. Re, Proteggente, N., Pannala, A., Yany, M., Rice-Evans, C., “Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay”, Free Radical Biologie and Medecine, V.26,(1999), 1231-7.
381. Ali, N. N. A., Jansen, R., Pilgrin, H., Liberra, K., Lindequist, U., Phytochemistry (1996), V.41, 927-9
382. Chen-Lu Tsou, “The Role of Active Site Flexibility in Enzyme Catalysis”, Biochemistry , V.63, (1998), 253-300.
383. Bjurlin Marc. A, Bloomer. S, Haas. Michael. J, Identification of the carboxylesterase complements of commrecial triacylglycerol acylhydrolase preparations, TEKTRAN-United States Department of Agriculture Agricultural Research Service 12 Fevrier 2002.
384. Benhamou. S, Demenais. F, Dupret. J-M, Haguenoer. J-M , Leszkowicz. A, Stucker. I, Susceptibilités génétiques et expositions professionnelles Editions INSERM, 2001, 143.
385. Van Pelt. JF, Moshage. HJ, Depla. E, Verhave. JP, Yap. SH, J.Hepatol.,V 27,(1997), 688-698.
386. Zhang. J, Burnell. JC, Dumauual. N, Bosron .WF, Identification of Human Liver Carboxylesterase as one of the Proteins Involved In Plasmodium Falciparum Malaria Sporozoite Invasion in primary Cultures Of Human Hepatocytes, J Pharmacol Exp Ther, V 290, (1999), 308-314.
387. Pindel. EV, Kedishvili. NY, Abraham. TL, Brzezinski. MR, Zhang. J, Dean. RA, Bosron. W, Purification and Cloning of broad Substrate Specificity Human Liver Carboxylesterase that Catalyzes the hydrolysis of Cocaine and heroin, J Biol Chem, V .272, (1997) , 14769.-75
388. Xu. G, Zhang. W, Ma. MK, McLeod. HL, Human Carboxylesterase 2 in commonly Expressed in Tumor Tissue and is Correlated with Activation of Irinotecan, Clin Cancer Res, (2002) V .8 (1997), 11-26.
389. Xie. M, Yang. D, Liu. L, Xue. B, Yan. B, Human and Rodent Carboxylesterase Immunorelatednes, Overlapping Substrate Specificity, Differential Sensitivity to Serine Enzyme Inhibito, and Tumor-Related Expression, Drug Metab Dispos, V .30, (2002), 541-7.

390. Satoh. T, Hosokawa. M, The Mamalian carboxylesterase from molecules to Functions, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, V. 38, (1998) 257-88.
391. Bencharit. S, Morton. C. L, Hyatt. J. L, Kuhn. P, Danks. M. K, Potter. P. M and. Redinbo. M. R, Crystal Structure of Human Carboxylesterase 1Complexed with the Alzheimer's Drug Tarcine From Binding Promiscuity to Selective Inhibition, *Chem. Biol*, , V. 10 ,(2003), 341