

POLYCOPIE
DE CHIMIE DES
PRODUITS NATURELS

Spécialité CHIMIE APPLIQUÉE
Niveau MASTER II



Réalisé par
Dr Messaoudi Nadia épouse Ghali
Année universitaire 2020 /2021

Intitulé du Master: Chimie Appliquée

Intitulé de la matière: Chimie des produits naturels

Semestre: 3

Objectifs de l'enseignement :

Etudier les différents produits naturels, leurs synthèses, caractérisations et applications industrielles

Contenu de la matière :

Etude de la chimie fine

Procédés de synthèse

Caractérisation.

• CHAPITRE I : LES PRODUITS NATURELS	6
• 1) Définitions des substances naturelles	6
a. Les métabolites primaires :	9
b. Les métabolites secondaires :	10
• 2) Quelques produits naturels utilisés par l'homme	11
• 3) Classifications des métabolites secondaires :	11
3-1) Les Terpènes	12
3-1-1) Généralités et propriétés	12
3-1-2) Classification	12
b) Diterpènes	15
c) Triterpènes	16
d) Tétraterpènes	16
e) Polyterpènes	17
3-1-3) La biosynthèse des terpènes	17
3-2) Les composés phénoliques	18
3-2-1) composés phénoliques présents dans les plantes	19
a)-Les acides phénols	19
b -Les coumarines	19
c-Les Flavonoïdes	20
d-Les anthocyanes	22
e-Les Tannins	22
3-2-2) Synthèse des phénols	24
a)Hydroperoxydation du cumène (isopropylbenzène)	24
b) Hydrolyse des halogénures d'aryle	24
c) Fusion alcaline des acides sulfoniques	25
d) Diazotation des amines primaires benzéniques	25
3-3) Alcaloïdes et composés azoté	25
3-3-1) Classification des alcaloïdes	26
3-3-2) Les Alcaloïdes dans la plante	27
3-3-3) Synthèse des Alcaloïdes	28
• CHAPITRE II : EXTRACTIONS, PURIFICATION ET MOYENS DE CARACTERISATIONS DES PRODUITS NATURELS	32
• 1) Extraction	32
1-1) But et intérêt d'extraction	32
1-2) Méthodes d'extraction	33
1-3) Types d'extraction	33
1-3-1) L'enfleurage	33
1-3-2) L'extraction par solvant	33
1-3-2-1) Types d'extraction par solvant	34
1-3-3) Extraction par hydro-distillation (ou par entraînement à la vapeur d'eau)	35
1-3-4) Extraction des protéines	36
1-3-5) Extraction des acides nucléiques	36
• 2) Purification	37
2-1) Distillation fractionnée	37

2-2) Chromatographie préparatif	37
2-3) Recristallisation	38
2-4) Sublimation	39
2-5) Filtration	39
2-7) L'électrophorèse	41
• 3) <i>Caractérisation</i>	41
3-1) La chromatographie sur couche mince (CCM)	42
Plaque chromatographiques [10]	42
3-2) Spectroscopie infrarouge	43
3-3) Spectroscopie ultraviolette	43
3-4) Spectrométrie de masse	44
3-5) Résonance magnétique nucléaire	44
3-6) la chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP)	44
3-7) La chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC	45
3-8) Chromatographie en phase gazeuse	46
• <i>Schéma simplifié de la chromatographie en phase gazeuse [11]</i>	46
• CHAPITRE III: VALORISATION DES PRODUITS NATURELS (HUILE ESSENTIEL)	47
• 1) <i>Huile essentielle</i>	47
• 2) <i>Définitions</i>	48
a) Parfum	48
b) Fragrance	48
c) Cosmétique	48
d) Médicament	49
e) Concrète	49
f) Pommade florale	49
g) Résinoïde	49
h) Absolue	50
i) Épices	50
j) Arômes	50
• 3) <i>Applications</i>	51
a) En parfumerie	51
b) En pharmacologie	51
c) En pharmacie	52
d) En cosmétologie	52

e) En agroalimentaire	52
f) En agronomie	53
g) Dans l'industrie chimique	53
h) En tannage	53
• <i>Chapitre IV : Travaux pratiques</i>	54
• <i>TP 1 : Méthode d'extraction par Soxhlet</i>	54
• <i>TP2 : Technique de la chromatographie sur couche mince (C.C.M).</i>	57
• <i>TP3 : Etudes phytochimiques d'une substance naturelle</i>	60
• <i>TP4 : hydro-distillation de la lavande</i>	62
• <i>Références Des Photographies</i>	64
• <i>Références Bibliographiques</i>	65

CHAPITRE I : LES PRODUITS NATURELS

1) Définitions des substances naturelles

Un produit naturel est un composé chimique ou une substance produite par un organisme vivant, c'est-à-dire qui se trouve dans la nature. Au sens le plus large, un produit naturel est toute substance produite par la vie.

Ils peuvent être extraits de substances issues du :

➤ **Règne Minéral** : Maintien des équilibres ioniques, la vie cellulaire et le transport moléculaire, ex : **K, Na, Ca, Mg, F, Li, Fe, H₂O, O₂, NaCl**

➤ **Règne Végétales** :

Tel que la Morphine provient de la plante Pavot somnifère (*Papaver somniferum*), c'est un analgésique et l'Ergotamine Dérivés de l'ergot de seigle (traitement des crises de migraine) ainsi que le Digitoxine et digoxine cardiotonique extrait de digitale pourpre (*Digitalis purpurea*).



Papaver somniferum [1]



Ergot du seigle sur du [seigle](#)
(*Secale cereale*). [2]



Digitalis purpurea [3]

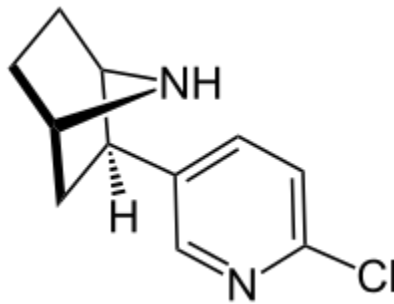
➤ **Règne Animal**

– **Venins** : antidote Un antivenin est une composition biologique utilisée en guise de traitement contre des piqûres ou morsures venimeuses



Extraction d'un venin de serpent. [4]

- Les **peptides antimicrobiens (PAM)**, (AMPs en anglais) également appelés **peptides de défense de l'hôte (HDPs)** en anglais), font partie de la réponse immunitaire innée trouvée dans toutes les classes de la vie.
- **Analgésique Épiбатidine** : L'**épiбатidine** est un alcaloïde naturellement présent dans la peau de plusieurs clades de grenouilles.



Épiбатidine

❖ **colorant rouge** de la cochenille



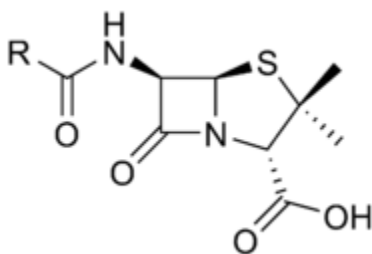
Cochenille sur un citronnier [5]

➤ **Le Monde Microbiologique m-organisme : bactéries et champignons**

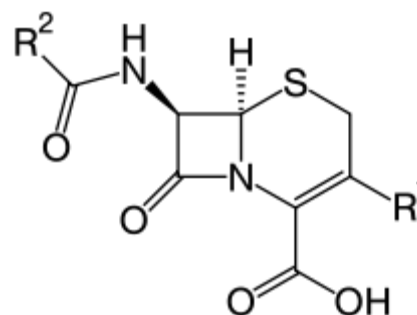
Substances antibactériennes et anticancéreuses (pénicillines, céphalosporines...)

-**Les pénicillines** sont des antibiotiques bêta-lactamines. La pénicilline est une toxine synthétisée par certaines espèces de moisissures du genre *Penicillium* et qui est inoffensive pour l'humain.

-**Les céphalosporines** sont une classe d'antibiotiques β -lactamines. Avec les céphamycines, ils forment le sous-groupe des céphems.



Structure générale des pénicillines



Noyau de base des céphalosporines

Les produits naturels peuvent également être préparés par synthèse chimique (semi-synthèse et synthèse totale) et ont joué un rôle central dans le développement du domaine de la chimie organique en fournissant des cibles synthétiques difficiles.

Le terme « produit naturel » a également été étendu à des fins commerciales pour désigner les cosmétiques, les compléments alimentaires et les aliments produits à partir de sources naturelles sans ingrédients artificiels ajoutés.



Aloe vera [6]

Les produits naturels ont parfois un effet thérapeutique bénéfique en tant que médicaments traditionnels pour le traitement des maladies, ce qui permet d'obtenir des connaissances pour en tirer des composants actifs en tant que composés tête de série pour la découverte de médicaments. Bien que les produits naturels aient inspiré beaucoup des médicaments approuvés par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux, leur mise au point à partir de sources naturelles a fait l'objet d'une attention décroissante de la part des entreprises pharmaceutiques, en partie en raison d'un accès et d'un approvisionnement peu fiables, de problèmes de propriété intellectuelle, de la variabilité saisonnière ou environnementale de la composition et de la perte des sources causées par le rythme croissant d'extinction des espèces.

a. Les métabolites primaires :

Les molécules constitutives ou permanentes. Sont directement impliqués dans les grande voies du métabolisme basal de la cellule, c'est à dire indispensables à la survie de la cellule.

- ❖ Les glucides, source d'énergie, paroi cellulaire ;
- ❖ Les lipides, source d'énergie, membranes cellulaires ;
- ❖ Les acides aminés, source primaire de construction des protéines.

b. Les métabolites secondaires :

Représentent toute substance présentes chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante par opposition aux métabolites primaires et dont la nature et la teneur peuvent être modifiées par des facteurs abiotiques, facteurs environnementaux spatiaux (exposition, altitude, climat, ...) ou temporels (saison, âge,...), et les molécules induites par des facteurs biotiques, telles les phytoalexines excitées par la présence d'un pathogène. Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent des dizaines de milliers de molécules différentes classées en familles chimiques telles que les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes etc. Outre leur très grande diversité chimique, ces métabolites secondaires se caractérisent généralement par de faibles concentrations dans les tissus végétaux ainsi que par leur stockage souvent réalisé dans des cellules ou organes spécialisés.

les métabolites secondaires lui procure un avantage sur d'autres organismes. Malgré tout, les métabolites secondaires ont des fonctions biologiques qui peuvent s'avérer essentiels. Exemples:

- les pigments isoprénoïdes et les parfums (isoprénoïdes volatils) des plantes attirent les insectes pollinisateurs (essentiels pour la reproduction)
- moyens de défense contre des agressions d'origines biotiques et abiotiques
- communication entre plantes, micro-organismes ou animaux (hormones, phéromones,...).

2) Quelques produits naturels utilisés par l'homme

Le tableau N°1 représente des produits naturels utilisés par l'homme :

Le plus ancien texte médical (Mésopotamie - vers 2600 avant JC) décrit environ 1000 substances d'origine végétale (huiles de cèdre, myrrhe - résine de <i>Commiphora Myrrha</i> , jus de la graine de <i>Papaver somniferum</i> (pavot), ...).			
Hippocrate de Cos (médecin grec - vers 460-377 avant JC) a recueilli plus de 400 agents naturels et décrit leur utilisation dans son " <i>Corpus Hippocraticum</i> ".			
Cannelle	<i>Cinnamomum verum</i>	cinnamaldéhyde, eugenol	phényl-propanoïdes
Thé	<i>Camellia sinensis</i>	caféine, théobromine,	phényl-propanoïdes, terpenes, alcaloïdes
Café	<i>Coffea arabica</i>	théophylline	
Tabac	<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotine	Alcaloïdes
Gingembre	<i>Zingiber officinale</i>	zingéron, zingérols	sesquiterpènes, monoterpènes
Acide acétylsalicylique (aspirine)	<i>Salix alba</i>	-----	phényl-propanoïdes
Pénicilline	<i>Penicillium</i>	-----	peptide non ribosomique
Lovastatine	<i>Pleurotus ostreatus</i>	-----	Polycétide
Caroténoïdes	algues, plantes, champignons et bactéries	-----	isoprénoïdes
On peut citer bien d'autres exemples parmi les milliers de produits naturels estimés à ce jour : acide acétylsalicylique (aspirine - <i>Salix</i>), dopamine (hormone, neurotransmetteur - plantes, animaux, ...), morphine (analgésique - <i>Papaver somniferum</i>), prostaglandine E1 (agents de signalisation - glandes de la prostate du mouton), érythromycine A (antibiotique - <i>Streptomyces erythreus</i>), benzyl-pénicilline (antibiotique - <i>Penicillium notatum</i>), tétrodontoxine (relaxant musculaire - Tétrodontiformes), chitine (applications industrielles, médicales - crustacés), octopamine (neurotransmetteur - Octopodes), quinine (anti-malaria - <i>Cinchona succirubra</i>), ginseng (diabète - <i>Panax ginseng</i>), ...			

3) Classifications des métabolites secondaires :

On estime à plusieurs centaines de milliers les métabolites secondaires, de structure et de fonction très diverses. Il existe donc un grand nombre de classification selon les sources. Il ressort que la classification la plus élémentaire des métabolites secondaires inclue trois groupes :

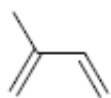
- Les terpènes (par exemple : les substances volatiles des plantes, les glycosides, les caroténoïdes, les stérols, ...)

- Les composés phénoliques (par exemple : les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins, la lignine, ...)
- Les alcaloïdes et composés azoté (par exemple : les alcaloïdes, les glucosinolates, ...)

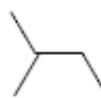
3-1) Les Terpènes

3-1-1) Généralités et propriétés

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures, Le nom de terpène vient de la térébenthine, La très grande majorité des terpènes est spécifique du règne végétal, en particulier les conifères, mais cette spécificité n'est pas absolue. Ils se rencontrent également chez les Métazoaires (Cnidaires, Spongiaires) et les Hexapodes. Leur squelette de carbone est constitué d'unités d'isoprène reliées entre elle. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles. Plus de 22 000 terpènes différents sont répertoriés, mais tous dérivent d'une même molécule simple à 5 atomes de carbone : l'isoprène ou 2-méthylbuta-1,3-diène (C₅H₈) ; on parle alors d'*unités isopréniques*.



isoprène



unité isoprénique

3-1-2) Classification

- Ces terpènes, de formule brute (C₁₀H₁₆)_n, sont biosynthétisés à la suite du couplage d'au moins deux entités isopréniques et classés en différentes catégories suivant le nombre d'atomes de carbones comme l'indique le tableau N°2.

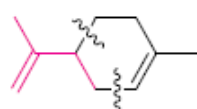
Tableau N°2 : Classification des terpènes

Classe	Nombre d'unités isoprènes	Nombre total de carbones
Hémiterpènes	1	5
Monoterpènes	2	10
Sesquiterpènes	3	15
Diterpènes	4	20
Triterpènes	6	30
Tétraterpènes	8	40

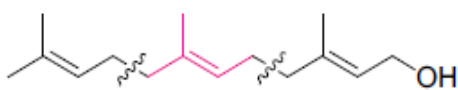
- C10 : **Monoterpènes** (2 unités isopréniques comme dans le limonène)
- C15 : **Sesquiterpènes** (3 unités isopréniques comme dans le farnésol ou l'humulène)
- C20 : **Diterpènes** (4 unités isopréniques)
- C30 : **Triterpènes** (6 unités isopréniques)
- C40 : **Tétraterpènes** (8 unités isopréniques)

Le limonène, un terpène de l'écorce des agrumes, présente un énantiomère dans l'écorce de citron et l'autre dans l'écorce d'orange, le farnésol est extrait de l'huile de néroli, tandis que l'humulène, extrait du houblon, donne son parfum à la bière.

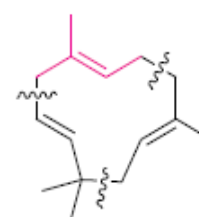
Le nom de terpène vient de la térébenthine, matière première de leur obtention et de la racine « ène » il s'agit de composés insaturés.



limonène

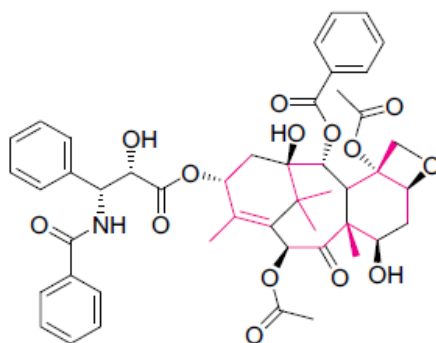


farnésol



humulène

Certains possèdent des propriétés aromatiques qui ont retenu l'attention de l'industrie des arômes, d'autres possèdent des propriétés pharmacologiques intéressantes, comme par exemple le taxol, anticancéreux puissant qui est un diterpène complexe.



Taxol

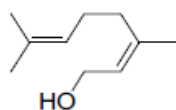
a) Monoterpènes et sesquiterpènes

Ce sont des composants des huiles essentielles particulièrement volatils car de petite masse molaire. Les principaux terpénoïdes des huiles essentielles sont compris dans la fraction volatile qui est responsable de l'odeur caractéristique de certaines plantes.

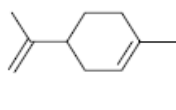
Les *terpénoïdes* désignent un ensemble de substances possédant le squelette des terpènes mais pas nécessairement leur degré d'insaturation et une ou plusieurs fonctions chimiques.

- **Les monoterpènes**

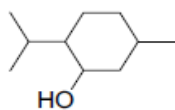
On distingue trois groupes selon qu'ils sont acycliques (nérol), monocycliques (limonène), bicycliques (α et β -pinène) ou tricycliques. À l'intérieur de chaque groupe, les monoterpènes peuvent être des hydrocarbures simples insaturés (limonène), ou avoir des groupes fonctionnels et être des alcools (menthol), des aldéhydes ou des cétones (camphre).



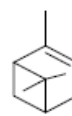
nérol (géranium)



limonène (citron)



menthol (menthe)

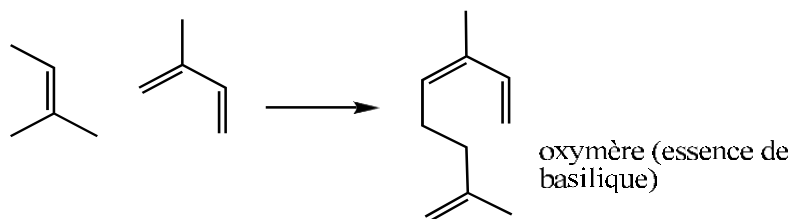


α -pinène (pin)



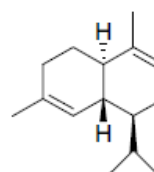
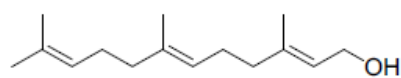
camphre

Le nérole utilisé en parfumerie pour son doux parfum de rose. Le limonène, un terpène de l'écorce des agrumes, présente un énantiomère dans l'écorce de citron et l'autre dans l'écorce d'orange.



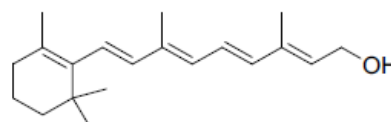
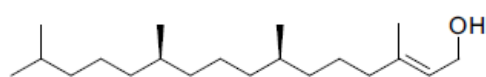
- **Les sesquiterpènes**

Ils se regroupent en fonction de leur squelette carboné et sont acycliques, monocycliques ou bicycliques, comme le farnésol, parfum à propriétés antiseptiques ou le cadinène, essence naturelle extraite du poivre.



b) Diterpènes

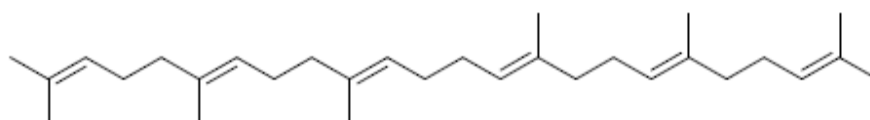
Les diterpènes comprennent un groupe de composés chimiquement hétérogènes, tous avec un squelette carboné en C₂₀, basé sur quatre unités d'isoprène. Ils sont moins volatils que les précédents. On y trouve le phytol, présent dans la chlorophylle et le rétinol ou vitamine A1.



La vitamine A résulte de la coupure d'un tétraterpène, le carotène.

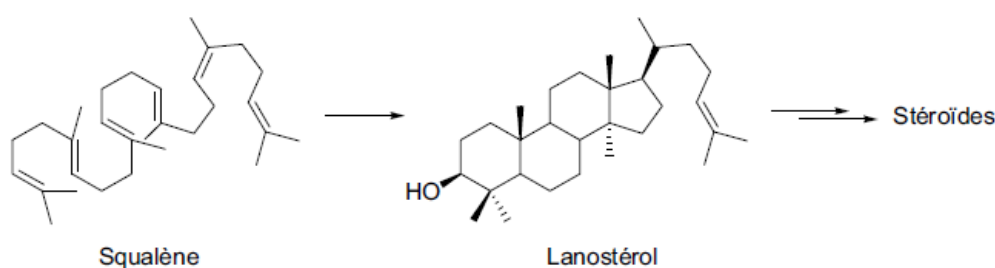
c) Triterpènes

Les triterpènes (C₃₀) ont un squelette carboné relativement complexe composé de six unités d'isoprène. Les triterpénoïdes peuvent être divisés en plusieurs groupes de composés dont les stéroïdes. Le squalène, triterpène surtout rencontré dans le règne animal, se trouve également dans les huiles végétales (olive, lin, arachide).



Squalène

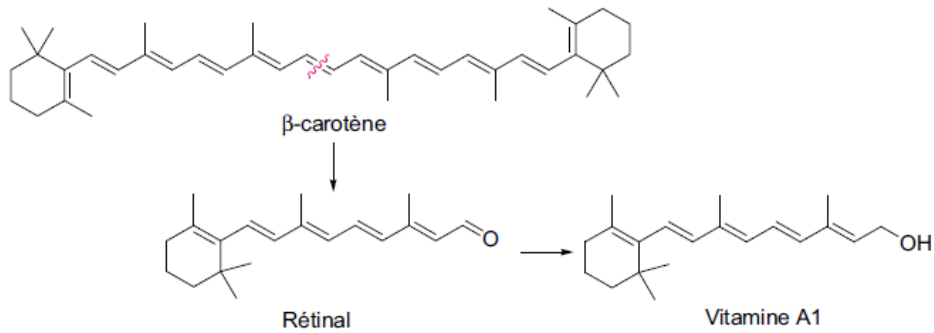
Le squalène (forme linéaire ci-dessus et forme repliée ci-dessous) est le précurseur du lanostérol (suint de mouton).



Le lanostérol est ensuite transformé en cholestérol faisant apparaître le lien entre les terpènes et les stéroïdes.

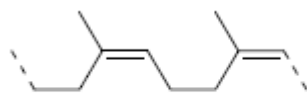
d) Tétraterpènes

Ce groupe de composés en C₄₀ (8 unités d'isoprène) est constitué par les caroténoïdes, pigments jaunes très répandus chez les animaux et les végétaux, possédant des propriétés particulières. Le β -carotène possède 11 doubles liaisons conjuguées, responsables de la couleur des carottes. Il joue un rôle essentiel dans la croissance et la vision, son oxydation provoque la coupure de la double liaison centrale et la formation de deux molécules d'un aldéhyde, le rétinol dont la réduction donne la vitamine A.

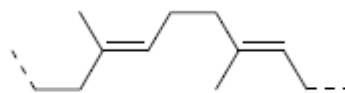


e) Polyterpènes

Ce sont des macromolécules, composées d'un grand nombre d'unités d'isoprène. Dans le règne végétal, on trouve le caoutchouc de poids moléculaire 150 000 environ, et la gutta-percha, de poids moléculaire 100 000 environ. Le caoutchouc naturel est un polymère de l'isoprène. Il est produit par la coagulation par la chaleur de la sève de l'hévéa. Toutes ses doubles liaisons sont de configuration *Z* et chaque molécule comporte de 1 000 à 5 000 motifs isopréniques. L'isomère où toutes les doubles liaisons sont de configuration *E* est la gutta-percha qui est une matière dure et cassante.



Caoutchouc



Gutta-percha

3-1-3) La biosynthèse des terpènes

La biosynthèse des terpènes est démontrée brièvement dans la figure 1.(biosynthèse simplifier des isoprénoïdes) D'abord, trois unités d'acétylcoenzyme A(CoA) se condensent pour donner l'acide mévalonique. Celui-ci est ensuite transformé en pyrophosphate d'isopentén-2-yle, lequel est condensé avec une autre unité isoprénique pour donner le géraniol, un terpène très utilisé en parfumerie et ayant une odeur de rose. Une autre unité isoprène peut être ajoutée par la suite pour générer le farnésol, un sesquiterpène qui est aussi très utilisé pour son odeur florale.

Cette séquence d'addition d'unités isoprènes se poursuit pour créer des diterpènes, triterpènes et tétraterpènes plus complexes. Lorsque la séquence est répétée un très grand nombre de fois, les latex et les caoutchoucs naturels sont obtenus. Le caoutchouc naturel est un polyisoprène

il est produit à partir du latex d'un arbre, l'hévéa. Le polyisoprène, appelé « gutta-percha », est aussi naturellement produit et présent dans le latex de certains arbres tropicaux.

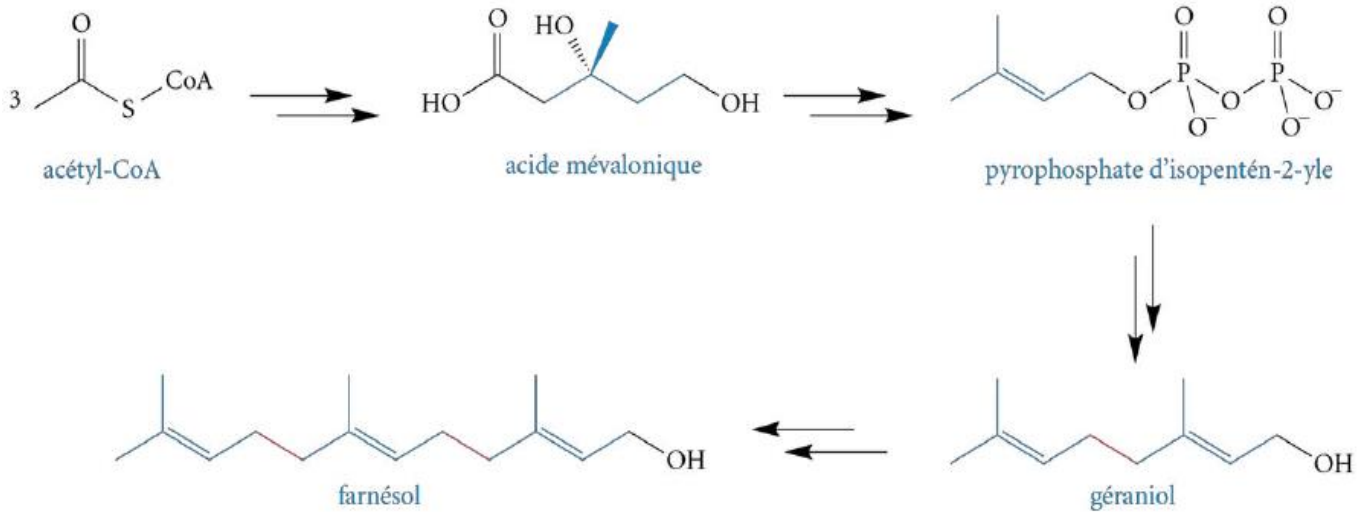


Figure 1 : biosynthèse simplifiée des isoprénoïdes

3-2) Les composés phénoliques

Au sens large, terme désignant des molécules aromatiques comportant au moins deux fonctions phénoliques. De façon restreinte, ce terme doit s'appliquer seulement en fonction de critères biosynthétiques et biologiques et il désigne un groupe de substances naturelles non azotées ayant en commun la présence de plusieurs cycles phénoliques, provenant de la voie biogénétique de l'acide shikimique et/ou de la voie des polyacétates

Les phénols sont des composés chimiques aromatiques dans lesquels le groupe $-OH$ est lié à un atome de carbone du cycle benzénique, alors que pour les alcools, le groupe $-OH$ est lié à un atome de carbone saturé hybridé sp^3 .

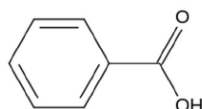
Les « polyphénols » ou « composés phénoliques » sont des métabolites secondaires d'un poids moléculaire élevé, largement distribués dans le règne végétal. Ils sont des molécules aromatiques constituées d'un groupement phényle (C_6) et d'un hydroxyle ($-OH$). Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes. On peut nommer dans cette famille **les acides phénoliques les flavonoïdes et les tanins**. La plupart de ces composés phénoliques dérivent d'acides aminés aromatiques: la tyrosine et la phénylalanine.

3-2-1) composés phénoliques présents dans les plantes

Dans les plantes, Il existe de très nombreux composés phénoliques présents (phénols simples, acides phénols, coumarines, flavonoïdes, anthocyanes, tanins...)

a)-Les acides phénols

Terme désignant en chimie organique toute molécule possédant au moins une fonction acide carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, terme réservé à des composés de squelette :



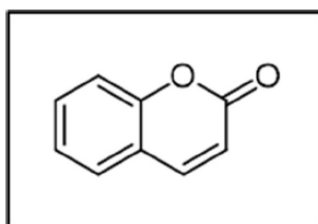
Structure de l'acide benzoïque, un acide phénol simple

d'une part en C6-C1 (acide benzoïque et ses dérivés : par exemple acide gallique, acide salicylique), très fréquents sous forme libre ou combinée à l'état d'esters (baumes, tanins hydrolysables...) ou d'hétérosides (monotropitose de la reine des prés) ;

- d'autre part en C6-C3 (acide cinnamique et ses dérivés : acide caféique, acide férulique...), très fréquents surtout sous forme d'esters (baumes, acide chlorogénique de l'artichaut).

b -Les coumarines

Le terme coumarine désigne la 2 H-1-benzopyran-2-one, substance naturelle d'origine phénylpropanique, d'odeur agréable (foin fraîchement coupé), isolée initialement de la fève tonka, également produite par synthèse.



Structure de coumarine

Par extension, la coumarine désigne les composés possédant ce squelette qui est présent dans des substances naturelles d'origine végétale (esculoside, scopolétole, ombelliférone, furocoumarines...).

Les coumarines de différents types (coumarines simples ou furanocoumarines) se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses.

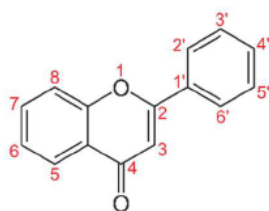
Environ 1000 coumarines décrites à ce jour réparties dans plusieurs familles botaniques mais surtout dans les Fabaceae, Asteraceae, Apiaceae, Rutaceae, Rubiaceae et les Poaceae.

Les plantes à coumarines simple comme le mélilot (*Melilotus officinalis* (L.) Lam., Fabaceae) et le marronnier d'inde (*Aesculus hippocastanum* L., Sapindaceae) ont des propriétés anti-inflammatoires à tropisme vasculaire souvent anti-agrégants plaquettaires et des propriétés veinotonique et vasculoprotecteur.

Les plantes à furanocoumarines provoquent une hyperpigmentation transitoire ou des dermatites aiguës s'il y a contact avec la plante puis exposition au soleil comme par exemple chez les Apiacées les berces, le panais, chez les Rutacées le genre Citrus (bergamotier, pamplemoussier).

c-Les Flavonoïdes

C'est un groupe de pigments polyphénoliques très répandus chez les végétaux. Ces flavonoïdes sont responsables de la coloration de la plupart des fleurs et fruits. Ils possèdent un squelette C6-C3-C6 dérivé du 1,3-diphénylpropane et ils proviennent biogénétiquement de la voie de l'acide shikimique et de celle des polyacétates.



Squelette de flavone

Ils peuvent être classés en deux groupes :

- Présence d'une fonction cétone sur la chaîne tricarbonée reliant les deux noyaux aromatiques : flavonoïdes sensu stricto.

Ce groupe regroupe les flavones et flavonols (squelette 2-phénylchromone) et les flavanones et dihydroflavonols (squelette 2-phénylchroman-4-one) ; en font également partie les chalcones (isomères des flavanones par ouverture de l'hétérocycle oxygéné), les dihydrochalcones, les aures et les biflavonoïdes résultant de la liaison de deux flavonoïdes entre eux.

- Absence d'une fonction cétone sur la chaîne tricarbonée reliant les deux noyaux aromatiques:

flavonoïdes sensu lato Ce groupe comprenant en plus les flavanols et les anthocyanes.

Les flavonoïdes existent à l'état libre (aglycones) ou le plus souvent sous forme d'hétérosides (O-hétérosides, parfois C-hétérosides).

Les flavonoïdes ont un intérêt pour les plantes qui en contiennent :

- Ce sont des pigments qui permettent d'attirer les insectes pollinisateurs,
- Ce sont des filtres solaires et anti-oxydants.

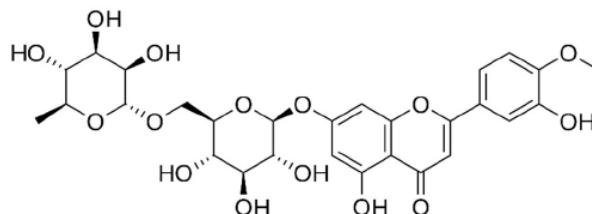
La principale propriété en phytothérapie de ces flavonoïdes est l'action veinotonique et vasculoprotectrice retrouvée avec des flavonoïdes naturels comme le rutoside ou la diosmine ou avec des flavonoïdes hémi-synthétiques comme la troxérutine ou l'héspéridine méthylchalcone. Les flavonoïdes sont présents dans plusieurs plantes par exemple dans les parties aériennes de passiflore ou dans les péricarpes des agrumes.

Ils sont employés pour traiter des problèmes en rapport avec l'insuffisance veineuse :

- ✓ Jambes lourdes,
- ✓ œdèmes des membres inférieurs,
- ✓ varices,
- ✓ des problèmes liés à la crise hémorroïdaire,
- ✓ des problèmes liés à la fragilité capillaire au niveau de la peau (purpura).

Pour certains groupes de flavonoïdes, on peut traiter certains troubles d'origine vasculaire en ophtalmologie comme la baisse d'acuité visuelle et les troubles du champ visuel.

Les flavonoïdes sont également de très bons piègeurs de radicaux libres, ils ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antiallergiques.

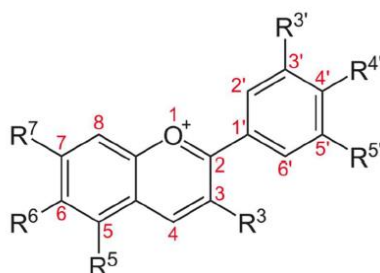


Structure du diosmine

d-Les anthocyanes

C'est un groupe de pigments polyphénoliques hydrosolubles responsables de la coloration rose à violette de la plupart des fleurs et fruits.

De structure dérivée du cation 2-phénylbenzopyrylium, synonyme flavylum, existent sous forme d'hétérosides (anthocyanosides) et de génines (anthocyanidols) et se rattachent au groupe des flavonoïdes au sens large. Propriétés classiquement revendiquées de piégeage de radicaux libres et de protection capillaro-veineuse « propriétés vitaminiques P ». Les principales plantes à anthocyanosides sont : myrtille, canneberge, cassis, sureau noir, vigne rouge. Leur couleur fait qu'ils sont utilisés comme des colorants alimentaires : Colorants E163 qui sont extraits de plantes comestibles comme la vigne rouge.



Cation flavylum (squelette de base de tous les anthocyanes)

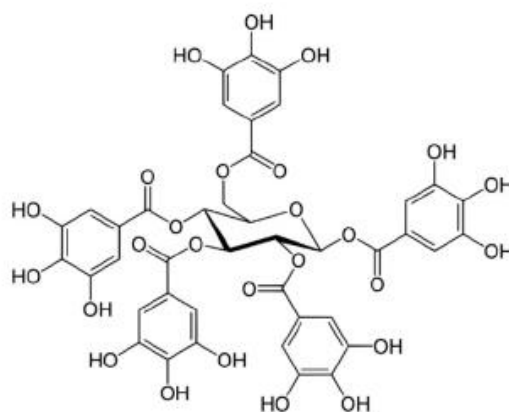
e-Les Tannins

Les tanins sont un vaste ensemble hétérogène de substances naturelles polyphénoliques d'origine végétale historiquement exploitées pour le tannage des peaux de bêtes (transformation de la peau en cuir imperméable et imputrescible).

Cette transformation résulte de l'établissement de liaisons entre le collagène, la principale protéine constitutive de la peau, et les tanins présents dans les végétaux.

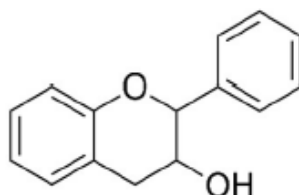
Les tanins sont des substances de masse moléculaire comprise entre environ 500 et 3000 Da, solubles dans l'eau et capables de précipiter alcaloïdes et protéines. Leurs structures sont le plus souvent très complexes et sont rattachées classiquement à deux groupes :

1. les tanins hydrolysables définis comme des oligo- ou des polyesters entre un sucre (généralement le glucose) et un nombre variable de molécules d'un acide-phénol, (l'acide gallique dans le cas des tanins dits galliques et l'acide hexahydroxydiphénique et ses dérivés d'oxydation dans le cas des tanins dits ellagiques).



Exemple de tanin hydrolysable, penta-O-galloyl-D-glucose

2. les tanins condensés, non hydrolysables, constitués d'unités flavan-3-ol (ces tanins dont les premiers termes correspondent aux oligomères proanthocyanidoliques se forment à partir d'unités de type flavan-3,4-diol très réactives).



Exemple de tanin hydrolysable, penta-O-galloyl-D-glucose

Le pouvoir de complexation des protéines par les tanins est à l'origine de leur astringence et de leurs principales propriétés pharmacologiques (antidiarrhéique, antiseptique, vasoconstrictrice) ainsi que de leur action inhibitrice de multiples systèmes enzymatiques.

La présence de nombreuses fonctions phénol explique leur activité antioxydante et de piégeage de radicaux libres. Dans le cas des tanins condensés, un effet de protection capillaro-veineuse est classiquement revendiqué.

Dans l'industrie du vin les tanins permettent de stabiliser la couleur rouge du vin (conservation du vin dans des tonneaux de chêne car riche en tanin) ils ont un effet antioxydant (d'où la notion de « french paradoxe » lors de la consommation de vin protecteur des maladies cardiovasculaires).

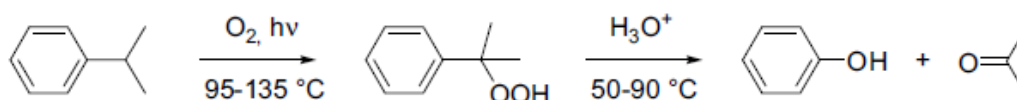
Les tanins sont concentrés dans les organes âgés tels que l'écorce ou les racines, on en retrouve dans les écorces de chêne (*Quercus robur* L., Fagaceae) et d'acacia (*Acacia catechu* (L.) Willd., Fabaceae) et de manière plus générale chez les Polygonaceae, les Fabaceae et les Rosaceae...)

3-2-2) Synthèse des phénols

Avec une production mondiale supérieure à trois millions de tonnes par an, le phénol est un composé chimique très important, utilisé pour la fabrication de produits tels que les résines synthétiques, les colorants, les produits pharmaceutiques (synthèse de l'aspirine par exemple), les pesticides, les parfums... , les principales synthèses industrielles du phénol :

a) Hydroperoxydation du cumène (isopropylbenzène)

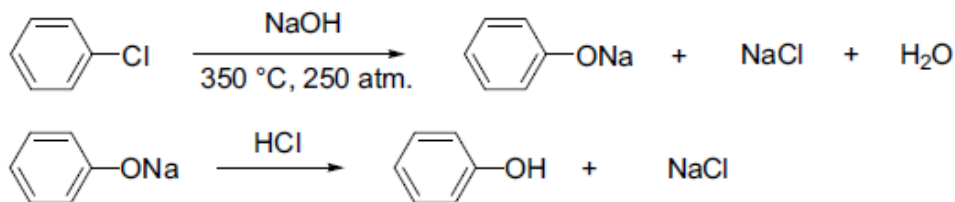
Cette méthode est utilisée actuellement pour la synthèse industrielle du phénol.



Le cumène se peroxyde facilement en présence d'un initiateur de radicaux et de dioxygène pour conduire au phénol, après une suite de transpositions et hydrolyse en milieu acide.

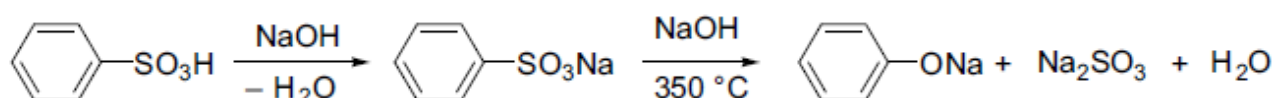
b) Hydrolyse des halogénures d'aryle

Par saponification industrielle d'un dérivé halogéné aromatique, le phénolate obtenu conduit au phénol après hydrolyse acide.



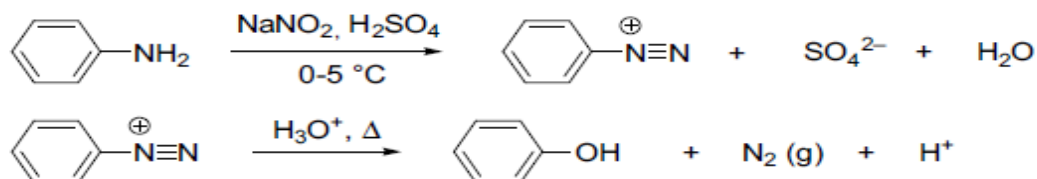
c) Fusion alcaline des acides sulfoniques

Après sulfonation du benzène, l'acide sulfonique obtenu subit une fusion en milieu basique pour conduire au phénolate, hydrolysé ensuite en phénol.



d) Diazotation des amines primaires benzéniques

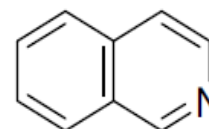
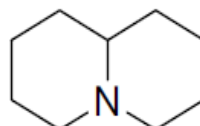
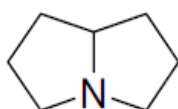
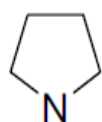
Les phénols peuvent également être obtenus à partir des sels d'arènediazonium. Le traitement d'une amine primaire par le nitrite de sodium en milieu acide conduit au sel de diazonium RN_2^+ instable, hydrolysé en milieu acide en phénol correspondant.



Cette méthode de synthèse est la réaction de base de l'industrie des colorants.

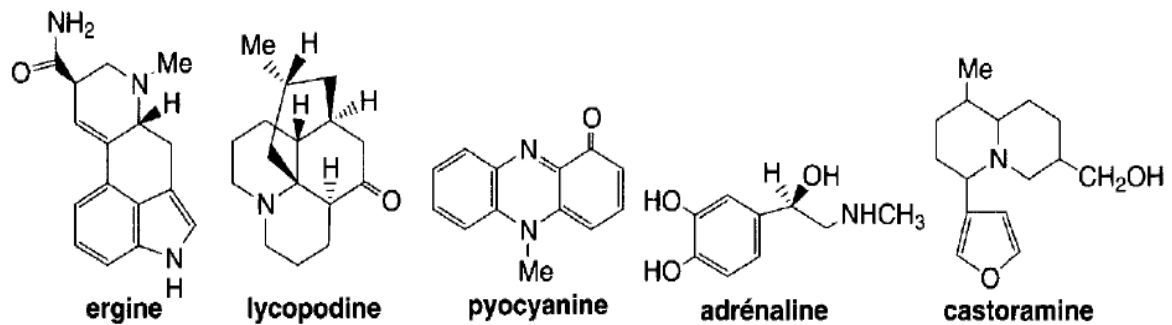
3-3) Alcaloïdes et composés azoté

Comme dans le cas des terpènes, les alcaloïdes représentent une grande classe de composés naturels aux structures très variées. Cependant, ce sont toutes des molécules organiques hétérocycliques azotées d'origine naturelle dont le squelette est parmi les suivants :



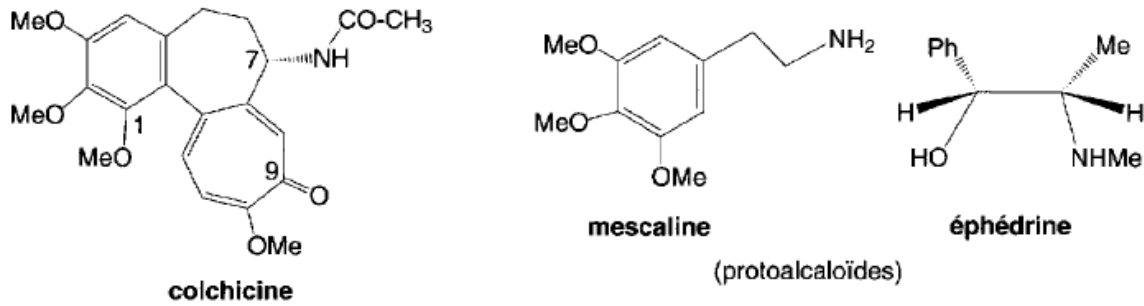
Bien qu'il soit difficile de donner une bonne définition des alcaloïdes, en raison de nombreux cas particuliers, on peut écrire que les alcaloïdes (littéralement « composés qui ressemblent à un alcali ») sont des composés d'origine naturelle azotés basiques à fortes activités biologiques, toxiques pour la plupart, qui sont extraits en majorité des plantes à fleurs (8,7 % des phanérogames, dicotylédones), mais aussi :

- des champignons (ex. : ergine de l'ergot du seigle) ;
- des mousses (ex. : lycopodine de *Lycopodium complanatum*) ;
- des bactéries (ex. : pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*) ;
- et des animaux supérieurs (ex. : adrénaline, castoramine du muse).

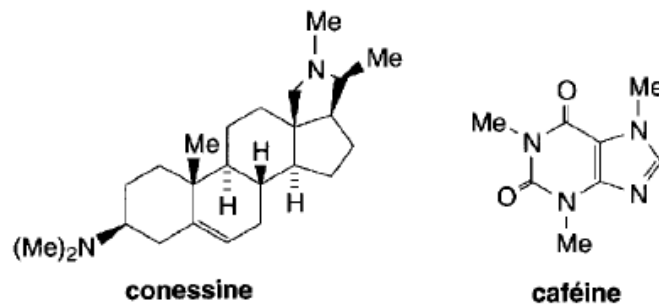


3-3-1) Classification des alcaloïdes

Ces composés peuvent être classés comme alcaloïdes vrais, protoalcaloïdes ou pseudoalcaloïdes selon la classification d'Hegnauer. *Les alcaloïdes vrais*, qui représentent le plus grand nombre, sont toxiques et ont un large spectre d'activités biologiques. Ils sont tous basiques. Leur basicité est due à un atome d'azote contenu dans un hétérocycle (sauf la colchicine isolée du colchique, qui n'est pas basique et ne possède pas d'azote hétérocyclique). Leur biosynthèse s'effectue à partir d'acides aminés. Ils sont sous forme de sels de divers acides dans les plantes. *Les protoalcaloïdes* sont des *amines simples*, l'atome d'azote ne faisant pas partie d'un hétérocycle. Ils dérivent d'acides aminés et sont souvent appelés « *amines biologiques* ». Ils sont solubles dans l'eau.



Les pseudoalcaloïdes ne dérivent pas d'acides aminés. Sont pour la plupart basiques. Les **alcaloïdes astéroïdaux** et les **purines** sont les représentants principaux de cette classe d'alcaloïdes.



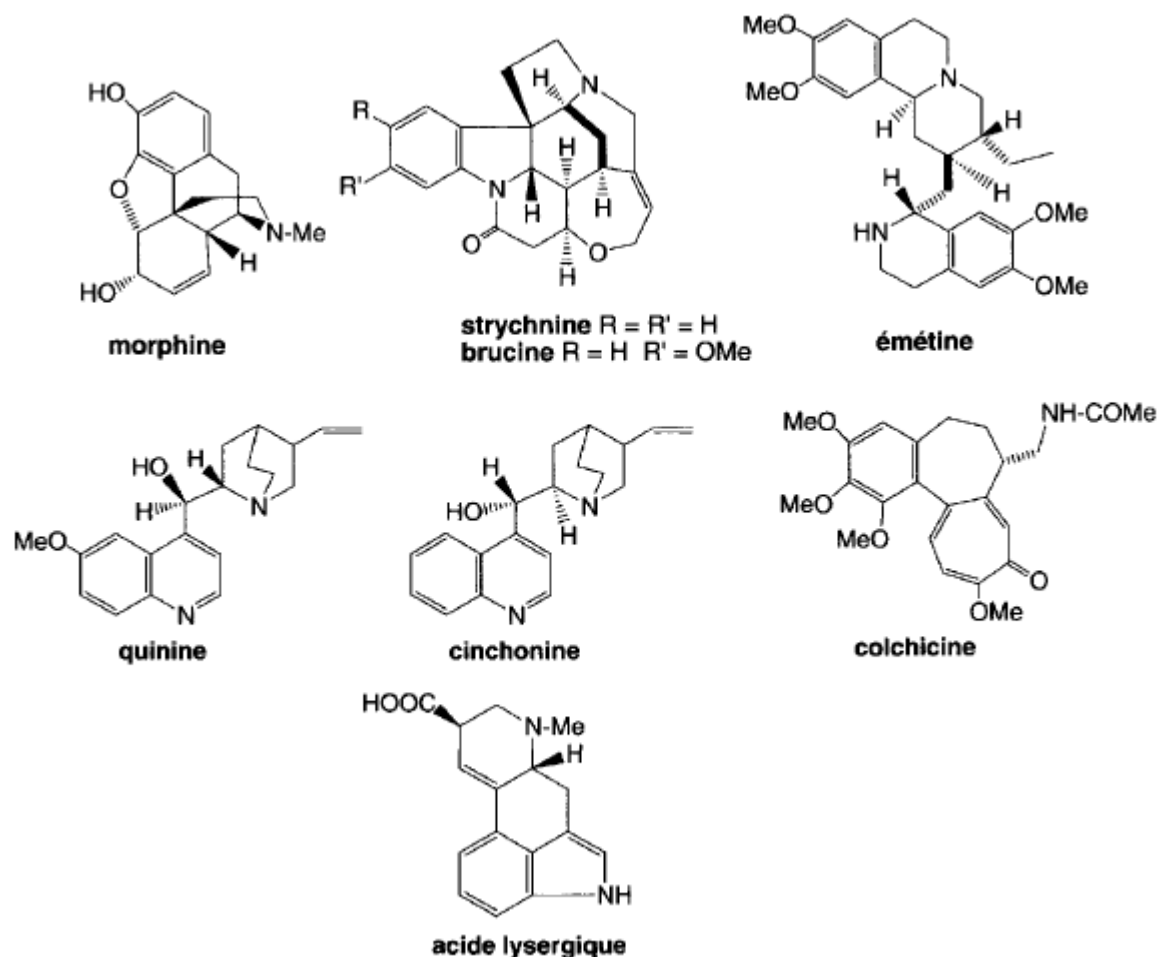
Diverses classifications en fonction des plantes dont sont extraits les alcaloïdes ou à partir de leurs structures chimiques de base sont possibles.

3-3-2) Les Alcaloïdes dans la plante

L'intérêt porté aux plantes a alcaloïdes tient à leurs activités biologiques diverses et souvent très puissantes, connues, pour certaines, depuis plus de 4 000 ans. En effet, ces plantes ont été utilisées par les hommes pour préparer des boissons comme le thé, des médicaments bienfaitrices (ex. : la rauwolfia dont l'alcaloïde principal est la réserpine), des substances hallucinogènes (ex. : le latex du pavot, l'opium, qui contient la morphine, ou le peyotl a mescaline utilise pour des rituels religieux), ou des poisons pour la chasse, comme la sève de certaines lianes qui secrètent des curares. Ce n'est qu'au début du XIXe siècle qu'Isolément des principes actifs des plantes dites médicinales, et en particulier les a alcaloïdes, a commencé. En **1803, Derosne**, un Français, a extrait le principe actif impur d'Opium qu'il a appelé **la narcotine**. **Sertiirner**, en 1805, a obtenu la base pure qu'il a nommée **morphine**.

Entre 1817 et 1820, **Pelletier et Caventou**, à Paris, ont isolé de diverses plantes, la **strychnine**, l'**emetine**, la **brucine**, la **quinine**, la **cinchonine** et la **colchicine**, puis en 1826,

la **coniine**, le poison secrète par la cigüe qui tua *Socrate* et qui fut aussi le premier alcaloïde à être synthétisé en 1886.



3-3-3) Synthèse des Alcaloïdes

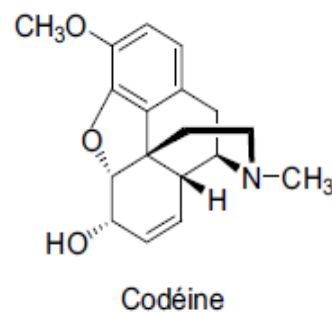
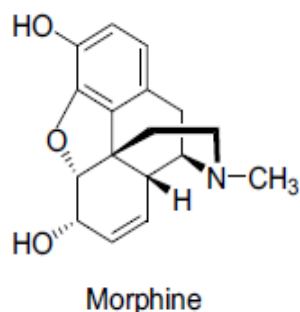
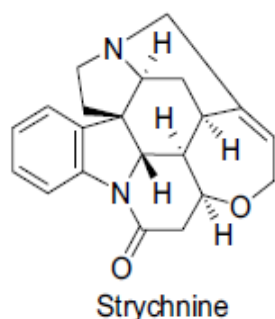
Depuis quelques décennies, un regain d'intérêt de l'industrie pharmaceutique se manifeste pour la recherche d'alcaloïdes inconnus, issus de plantes peu ou non étudiées rapportées lors d'expéditions dans certaines régions du globe restées à l'état sauvage, et utilisées par les indigènes pour se soigner. La complexité des structures moléculaires d'un grand nombre d'alcaloïdes n'a pas permis leur synthèse chimique avant une longue période. **Sir Robinson** a réalisé la synthèse de la **morphine** en 1946. Celle de l'**acide lysergique**, structure de base des alcaloïdes de l'ergot du seigle n'a été effectuée qu'en 1954 par **Woodward**. Actuellement, des milliers d'alcaloïdes sont connus, et leurs structures définies, d'environ 16 000 alcaloïdes est connue. Environ 20 % des espèces de plantes produisent des alcaloïdes. Grâce aux avancées

de la physicochimie du XXe siècle. De nombreux alcaloïdes peuvent être préparés par synthèse.

La complexité des structures de certains d'entre eux a nécessité des années de travail pour les définir. Les propriétés biologiques très variées qu'ils présentent en font des structures de bases pour la recherche de nouveaux médicaments.


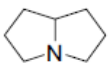
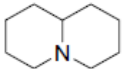
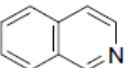
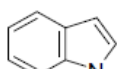
Les alcaloïdes ont en général une activité biologique et c'est la raison pour laquelle ils entrent dans la composition de nombreux médicaments comme principe actif.

Les plantes les utilisent dans leur système de défense contre les herbivores et les pathogènes car ces composés sont toxiques. Les alcaloïdes ont la propriété de former des sels et d'être amers. Bien que beaucoup d'alcaloïdes soient toxiques (comme la strychnine, extrait de la noix vomique, dont la dose létale est de 0,2 mg/kg), certains sont employés en médecine pour leurs propriétés analgésiques (comme la morphine ou la codéine pour supprimer la douleur).

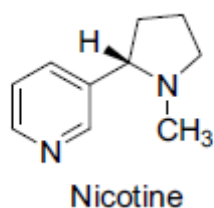


La plupart des alcaloïdes sont dérivés d'acides aminés tels que le tryptophane, l'ornithine, la lysine, et la tyrosine. Ces acides aminés sont décarboxylés en amines couplées à d'autres squelettes carbonés. Le tableau 2 donne quelques classes d'alcaloïdes, ainsi que les acides aminés qui en sont les précurseurs.

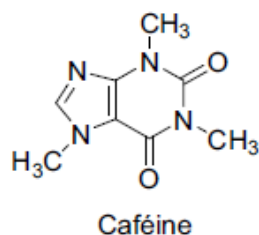
Tableau 2 : Classe d'alcaloïdes

Classe	Structure	Précurseur	Exemple
Pyrrolidine		Ornithine	Nicotine
Pyrrolizidine		Ornithine	Retrorsine
Quinolizidine		Lysine	Lupinine
Isoquinoline		Tyrosine	Codéine, morphine
Indole		Tryptophane	Strychnine

La nicotine est un alcaloïde contenu en grande concentration dans les feuilles de tabac (5 % du poids de la plante). La nicotine a été découverte en 1809 par Louis- Nicolas Vauquelin, professeur de chimie à l'École de médecine de Paris.



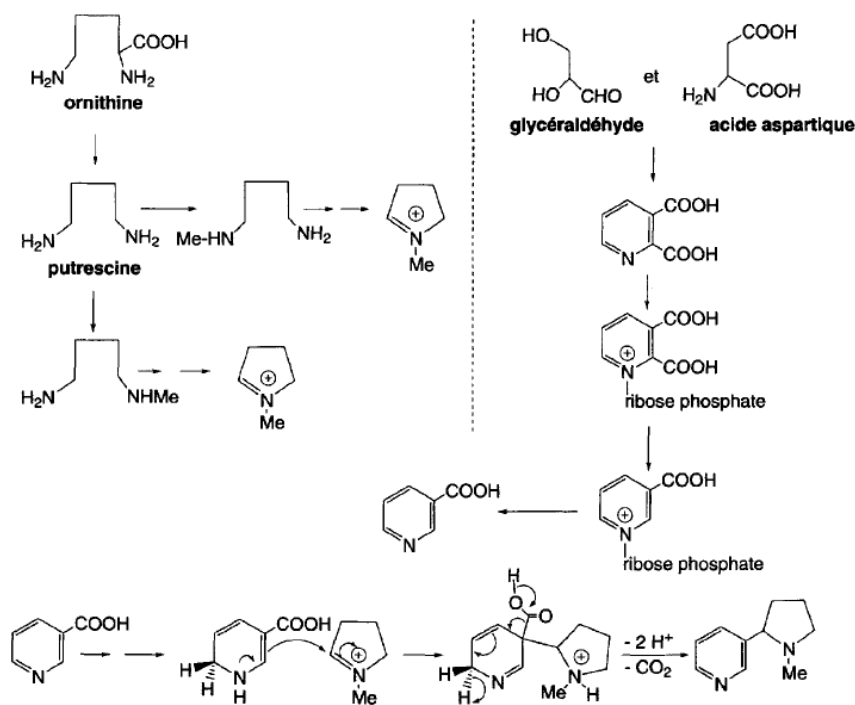
Comme la plupart des composés qui agissent sur le cerveau, la nicotine peut se révéler un poison neural (agit d'une manière nuisible sur le système nerveux). À faible concentration, elle conduit à une stimulation du système nerveux, mais devient nuisible à forte concentration. La caféine est un composé présent dans de nombreux aliments comme les grains de café, le thé, le cacao, la noix de kola... Elle est bien connue pour ses propriétés de stimulant du système nerveux central et du système cardio-vasculaire.



Exemple : biosynthèse de la nicotine

La biosynthèse de la nicotine est complexe. Elle correspond à la formation de chacun des deux cycles qui la constituent, puis à la création d'une liaison entre eux (voir schéma). Le cycle pyrrolidine dérive de l'ornithine *via* une décarboxylation en putrescine. L'un des deux groupes amino est ensuite méthyle. L'autre serait éliminé par une désamination oxydative qui formerait un aldéhyde permettant alors la formation de l'ion N-méthylpyrrolinium.

Par ailleurs, le cycle pyridinique est constitué à partir du glycéraldéhyde et d'acide aspartique. Dans une première étape, l'acide quinoléique est synthétisé. La mise en place d'un groupe ribose-phosphate permet la décarboxylation en position 2. Le retrait de ce groupe libère l'acide nicotinique, lequel est ensuite réduit en acide 1,2-dihydropyridine-5-carboxylique. Une attaque nucléophile du groupe amino de cet aminoacide sur l'ion N-méthylpyrrolinium est suivie d'une décarboxylation qui élimine l'hydrogène pro(K) en cède l'azote de la 2,5-dihydropyridine, ce qui produit la nicotine.



Biosynthèse de la nicotine

CHAPITRE II : EXTRACTIONS, PURIFICATION ET MOYENS DE CARACTERISATIONS DES PRODUITS NATURELS

1) Extraction

L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme selon diverses techniques. Dans les domaines de la chimie des substances naturelles et de la chimie thérapeutique, L'extraction des métabolites secondaires ciblent est une phase primordiale. Le choix de la méthode d'extraction est basé sur des données préalables sur les caractéristiques physicochimiques des métabolites à extraire. Mais, il est d'usage d'appliquer différentes procédés afin de savoir le plus adéquat

Ces techniques sont très anciennes. L'Homme a toujours cherché à extraire certaines espèces chimiques des matières premières présentes dans son environnement. Toutes ces techniques de séparation et d'extraction ont été perfectionnées et sont encore utilisées aujourd'hui.

Le procédé de séparation est une technique ou une technologie permettant de transformer un mélange de substances en deux ou plusieurs composants distincts. Les buts de ce type de procédé peuvent être divers

- Purification: des impuretés doivent être extraits du composé d'intérêt
- Concentration: élimination d'une partie du solvant
- Fractionnement: séparation d'un mélange complexe en plusieurs mélanges différents.

Le principe d'un procédé de séparation utilise une différence de propriétés entre le composé d'intérêt et le reste du mélange. Plus la différence de propriété sera grande, plus la séparation sera aisée. Ainsi le choix du procédé de séparation commence par une bonne connaissance de la composition du mélange et des propriétés des différents composants.

1-1) But et intérêt d'extraction

En Chimie l'extraction est une opération qui consiste à retirer d'une matière première un ensemble de produits qui constituent l'extrait.

L'extraction consiste à transférer un composé d'une phase à une autre:

- D'une phase liquide à une autre phase liquide.
- D'une phase solide à une phase liquide.

Le but de l'extraction est d'isoler une ou plusieurs molécules à partir d'un organisme.

C'est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme (animal ou végétal) selon diverses techniques.

1-2) Méthodes d'extraction

La nature, et notamment les végétaux (feuille, écorce, fruit, etc.), constitue une source précieuse de remèdes. En effet, certaines molécules d'origine végétale ont des propriétés spécifiques à caractère thérapeutique. Comme un végétal est un mélange de plusieurs milliers d'espèces chimiques, le chimiste doit savoir extraire et isoler les espèces chimiques afin de les analyser, d'étudier leur efficacité et éventuellement de les utiliser comme principe actif.

L'homme utilise des colorants, des parfums, des arômes, et des extraits de produits naturels depuis la haute Antiquité par différentes techniques.

1-3) Types d'extraction

1-3-1) L'enfleurage : Est une forme d'extraction utilisée en parfumerie. Cette méthode permet de récupérer des composés aromatiques de plantes fragiles en les déposants sur des graisses «absorbantes». Par exemple, les fleurs fragiles sont posées sur des cadres enduits de graisse animale très pure et inodore qui absorbe le parfum des fleurs au contact; en fin de séchage, les graisses sont imprégnées de substances odorantes.

1-3-2) L'extraction par solvant : Elle consiste à faire passer, par solubilisation, la substance à extraire dans un solvant. Celui-ci peut être de l'eau, mais généralement il s'agira d'un solvant organique: éthanol, cyclohexane, éther de pétrole, toluène, etc. Dans l'extraction par solvant, les plantes sont mélangées à un solvant. Les composés à extraire étant emprisonnés dans la cellule par la membrane cellulaire, il faudra donc des solvants capables de la traverser. En plus, il arrive que des traces de solvant soient présentes dans les molécules à extraire ou bien dans la matière végétale après traitement. L'extraction par solvant fait intervenir trois étapes.

- La mise en contact du solvant avec la substance contenant le composé à extraire: Elle peut se faire directement par le solvant d'extraction ou en faisant intervenir d'abord l'eau. On fait alors agir le solvant sur une décoction, une infusion ou une macération.
- La décantation: est réalisée à l'aide de l'ampoule à décanter. En fonction de la nature du solvant utilisé et en particulier de sa densité par rapport à celle de l'eau (1,00), la phase organique à récupérer se situera au-dessus ou en dessous.
- Le séchage et la filtration: Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant. On filtre ensuite pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau.

Généralement, on veut ensuite évaporer le solvant pour récupérer l'extrait seul, il faudra donc aussi que le solvant soit volatil (température d'ébullition faible).

Le choix du solvant obéit à trois critères et nécessite la connaissance d'un paramètre physique caractéristique de ce solvant.

- L'état physique du solvant: Le solvant doit être liquide à la température et à la pression où l'on réalise l'extraction.
- La miscibilité du solvant: Le solvant doit être non miscible à la phase qui contient initialement le composé à extraire.
- La solubilité: Le composé à extraire doit être très soluble dans le solvant. C'est-à-dire, beaucoup plus soluble dans le solvant que dans le milieu où il se trouve initialement (milieu aqueux en général).
- La densité du solvant: Il est nécessaire de connaître ce paramètre car c'est lui qui détermine si la phase organique, contenant le composé à extraire, se trouve au-dessus ou en dessous de la phase aqueuse dans l'ampoule à décanter.

Les solvants d'extraction doivent être aussi:

- Facilement éliminés après extraction et donc avoir un point d'ébullition bas. Leur point d'ébullition doit être le plus éloigné possible de celui des produits à extraire.
- Inertes chimiquement vis-à-vis de la solution à extraire.
- Peu toxiques que possible

1-3-2-1) Types d'extraction par solvant

Il existe plusieurs types d'extraction par solvant.

- **Extraction directe :** L'espèce chimique est extraite d'un produit naturel par macération puis par filtration.
- **Extraction liquide-liquide :** L'extraction liquide-liquide est l'une des techniques de préparation les plus anciennes. Cette technique permet d'extraire une substance dissoute dans un solvant, à l'aide d'un autre solvant, appelé solvant d'extraction, dans lequel elle est plus soluble. Sans transfert de chaleur. Le solvant initial et le solvant d'extraction ne doivent pas être miscibles. La séparation des phases s'obtient par décantation gravimétrique ou centrifuge.

Il existe deux types d'extraction liquide-liquide. Continue et discontinue.

- **Extraction solide-liquide :** L'extraction solide-liquide est un phénomène lent qui permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un

solvant liquide. On peut utiliser successivement des liquides dont le pouvoir solvant vis-à-vis des constituants de la phase solide est différent (dissolution fractionnée). La macération, l'infusion et la décoction sont des méthodes d'extraction solide-liquide. Pratiquement, il est impossible de dissoudre un seul composé, d'autres constituants de la phase solide ont été entraînés avec lui, quel que soit le solvant utilisé. En laboratoire de chimie organique, on utilise parfois des appareils plus efficaces, les extracteurs de Soxhlet et de Kumagawa, qui fonctionnent en continu

1-3-3) Extraction par hydro-distillation (ou par entraînement à la vapeur d'eau)

L'hydro-distillation consiste à distiller un composé par entraînement à la vapeur d'eau. C'est une méthode très utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. Elle montre ses limites lorsque les molécules à extraire sont fragiles et ne résisteront pas au chauffage. La vapeur d'eau produite va entraîner avec elle un composé donné selon un phénomène physique particulier: la création d'un azéotrope (mélange de deux liquides qui bout à température fixe et ne se distille pas en bouillant). Il s'agit en fait d'un mélange de composés, non miscibles, (l'eau et une molécule odorante). La vapeur d'eau chargée en molécules organiques est condensée puis récupérée. Le liquide obtenu est appelé distillat. Il y a donc séparation de deux phases: l'une aqueuse et l'autre organique, cette dernière contenant le composé à extraire. Pour récupérer l'huile essentielle, il faut procéder à une extraction liquide-liquide.

Thermomètre

Statif

Pinces

Noix

Un ballon

Chauffe-ballon

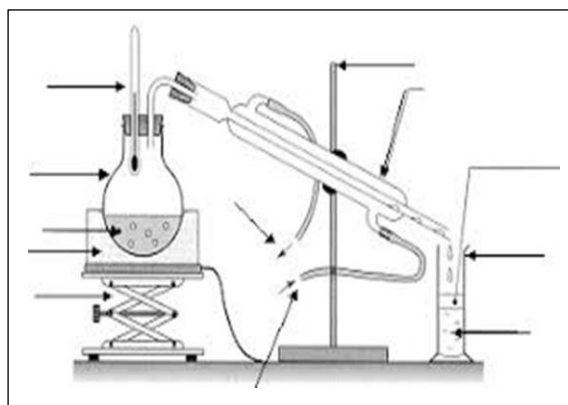
Support élévateur

Réfrigérant

Eprouvette

Entrée et sortie d'eau

Mélange réactionnel



Montage hydro-distillation [7]

L'hydro-distillation fait intervenir les étapes suivantes:

- ✓ L'entraînement à la vapeur: Consiste à bouillir un mélange d'eau et de substance naturelle contenant le composé à extraire (huile essentielle). La vapeur entraîne les huiles essentielles contenues dans le produit brut. Par la suite, ces vapeurs sont condensées à l'aide d'un réfrigérant.
- ✓ Le relargage: Consiste à rendre les huiles essentielles, qui sont des composés organiques en partie solubles dans l'eau, moins solubles par l'ajout du chlorure de sodium. De cette manière, il sera plus facile de récupérer ces huiles essentielles.
- ✓ La décantation: Est réalisée dans une ampoule à décanter, dans laquelle le mélange se sépare en deux phases non miscibles. Une phase aqueuse, plus dense, se situe dans la partie inférieure et une phase organique, de densité plus faible et contenant les huiles essentielles se situe au-dessus.
- ✓ Le séchage et la filtration: Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, il est important de faire agir un déshydratant (C'est le séchage). Pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau il faut réaliser une filtration.

1-3-4) Extraction des protéines

L'extraction d'une protéine à partir d'un tissu commence par la destruction de l'organisation cellulaire par des méthodes mécaniques, chimiques ou par l'action d'enzymes qui désorganisent les tissus. Le mélange résultant du matériel biologique ainsi brisé et du solvant est appelé extrait brut ou homogénat. Les débris cellulaires sont séparés par centrifugation: le matériel soluble est recueilli et dialysé pour éliminer les petites molécules. Diverses méthodes sont ensuite utilisées pour purifier une protéine particulière à partir du mélange.

1-3-5) Extraction des acides nucléiques

L'extraction de l'ADN consiste à isoler l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse. Les principales étapes de l'extraction de l'ADN sont:
La lyse cellulaire par des méthodes physiques ou chimiques permet d'accéder à l'ADN.

- L'élimination ou la séparation des lipides membranaires et des débris cellulaires se fait généralement à l'aide de détergents comme le sodium dodecyl sulfate et par centrifugation.
- L'élimination ou la dénaturation des protéines de l'extrait cellulaire est effectuée à l'aide d'une protéase.

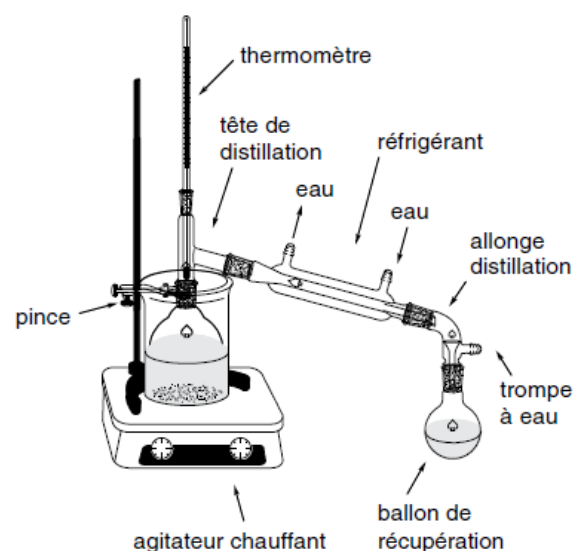
- L'élimination de l'ARN est effectuée par addition de RNase qui dégrade rapidement l'ARN en ribonucléotides.
- La précipitation/agrégation/élution de l'ADN.

2) Purification

Les produits, en fin de réaction, nécessitent une purification. La méthode de purification utilisée (voir schémas) dépend de l'état du composé organique et de la quantité de produit dont on dispose.

2-1) Distillation fractionnée

C'est une technique basée sur des différences de volatilité d'un mélange de produits. Admettons un mélange de deux composés **A** et **B** avec des points d'ébullition respectifs **TA** de 80 °C et **TB** de 110 °C. Le mélange est placé sous agitation dans un montage comme ci-contre et chauffé à une température de 90 °C. Seul le composé **A** atteint l'ébullition et se condense dans le ballon de récupération. Puis, en augmentant la température au-dessus de 110 °C, le composé **B** sera collecté. Très souvent, le point d'ébullition du composé à distiller est élevé et dans ce cas, la distillation nécessite des températures élevées avec le risque de dégradation. Pour éviter cela, le point d'ébullition est abaissé en travaillant à pression réduite. Ceci s'effectue en utilisant une trompe à eau ou une pompe à vide.



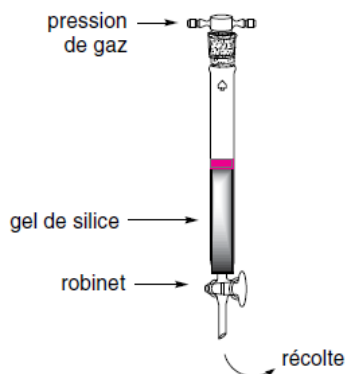
Montage Distillation fractionnée [8]

2-2) Chromatographie préparatif

La chromatographie préparatif est une technique qui permet de séparer les constituants d'un mélange. Le principe en est le suivant : le mélange est déposé sur un gel de silice. Puis il est « élué » c'est-à-dire entraîné par un solvant (éluant). Chaque constituant établit des interactions faibles avec la silice et l'éluant de sorte que les

Colonne

constituants du mélange se séparent sur la colonne selon leurs interactions avec la silice et l'éluant. Il suffit ainsi de récupérer les constituants dans des récipients différents, les produits les moins polaires étant moins retenus sur la silice.



Colonne de Chromatographie préparatif [8]

2-3) Recristallisation

La recristallisation est la technique de choix lorsqu'il s'agit de purifier un composé cristallin. Cette technique est basée sur des différences de solubilité du produit et d'impuretés, à différentes températures. Plus précisément, le composé à purifier est solubilisé dans un solvant à chaud (reflux). Les impuretés insolubles sont filtrées et éliminées ainsi. Lors du refroidissement de la solution, la solubilité du composé baisse, de sorte qu'il recristallise. Il est alors récupéré par filtration. Ainsi, on élimine des impuretés solubles à froid dans le solvant.

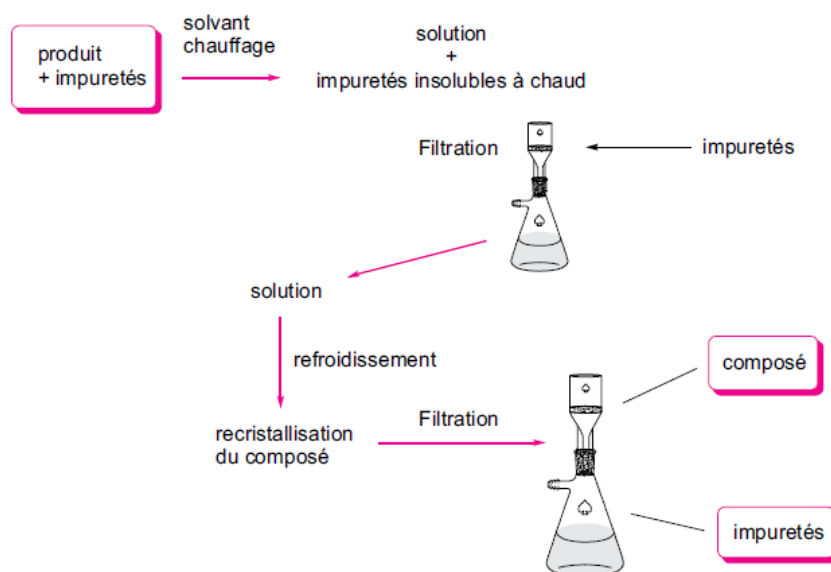


Schéma représentatif de recristallisation [8]

2-4) Sublimation

La sublimation est une technique de purification appliquée aux composés cristallins qui possèdent un point de sublimation bas (il s'agit du passage de l'état solide à l'état gazeux). Le principe en est le suivant : on place le composé à purifier dans un cristalliseur (voir schéma) surmonté d'un verre de montre. Celui-ci est rempli de glace pilée. Le cristalliseur est chauffé et lorsque la température est supérieure au point de sublimation du composé, celui-ci se vaporise et se condense sous le verre de montre. Les impuretés, elles, restent au fond du cristalliseur. Il suffit ensuite de gratter le verre de montre pour récupérer le composé purifié.

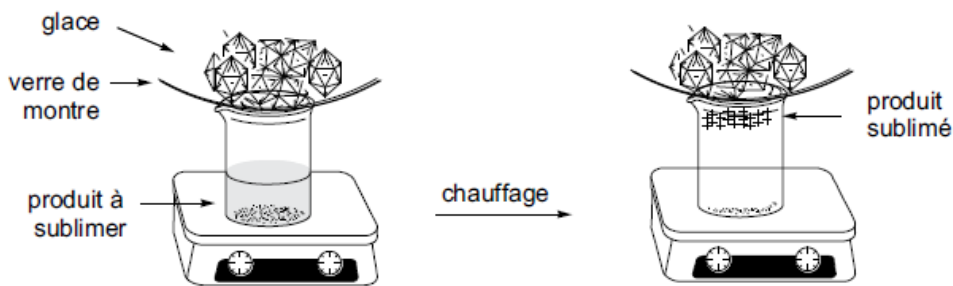


Schéma représentatif de sublimation [8]

2-5) Filtration

La filtration est un procédé de séparation permettant de séparer les constituants d'un mélange qui possède une phase liquide et une phase solide au travers d'un milieu poreux. C'est une technique très utilisée que ce soit dans le domaine de l'agro-alimentaire ou de la pharmacie ou par de nombreuses espèces animales, principalement aquatique. L'utilisation d'un filtre permet de retenir les particules du mélange hétérogène qui sont plus grosses que les trous du filtre (porosité). Le liquide ayant subi la filtration se nomme filtrat, et ce que le filtre retient se nomme un résidu (aussi communément appelé "gâteau" ou retentât).

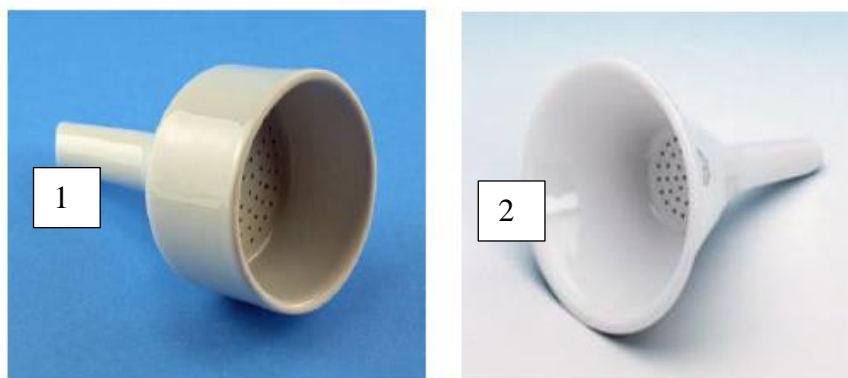
La microfiltration est une séparation de particules de l'ordre de micromètre.

La filtration stérilisante est un cas particulier, les particules étant des microorganismes.

Les applications de la filtration courante résultent de la séparation d'un solide dispersé dans un liquide pour obtenir:

- Un liquide clarifié, débarrassé des particules solides.

- Un solide essoré de l'excès de liquide.



Entonnoirs de BUCHNER (1) et de HIRSCH (2). [9]

La centrifugation est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur densité sous l'action d'une force centrifuge. Elle permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant. Le mélange à séparer peut être constitué de deux phases liquides ou de particules solides en suspension dans un liquide.

L'ultracentrifugation utilise des vitesses de rotation encore plus grandes (allant jusqu'à 75000 tours par minute) et permet la sédimentation de particules ultramicroscopiques.

La centrifugation permet de séparer des constituants de taille et de masse très différentes contenus dans un liquide. Les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à deux forces:

- La gravité: C'est la force qui s'exerce du haut vers le bas.
- La poussée d'Archimède: C'est la force qui s'exerce du bas vers le haut.

Pour une vitesse de rotation donnée, chaque rotor a une force relative de centrifugation en x.g (force de gravité relative ou accélération) qui peut être exprimée en vitesse de rotation en rotations par minute selon la formule mathématique de conversion. Celle-ci est:

$$g = 1.119 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot N^2$$

Où g est la force relative de centrifugation, r est le rayon de rotation du rotor (en cm) et N (rotations par minute: rpm) exprime la vitesse de rotation.



Centrifugeuse (photo prise au laboratoire STEVA)

2-7) L'électrophorèse

C'est une des nombreuses techniques de séparation et d'analyse de particules chargées par migration différentielles sous l'action d'un champ électrique.

Des particules chargées sont donc placées dans un champ électrique créé par une tension continue et se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge à une vitesse proportionnelle à cette charge. Si on dépose une espèce anionique (chargée négativement), elle migrera vers l'anode (+) et une espèce cationique (chargée positivement) du côté de la cathode (-).

Principe :

L'électrophorèse est une technique permettant de déplacer des ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective: Les anions migrent vers l'anode et les cations migrent vers la cathode.

Pour les molécules non chargées, il n'existe pas de migration. Du fait de leurs caractéristiques propres et des conditions de l'électrophorèse, la vitesse de migration et la distance parcourue dans la matrice par ces ions diffèrent, ce qui permet leur séparation.

3) Caractérisation

Les caractérisations physico- chimiques des molécules sont des étapes très importantes. Ces caractérisations vont permettre l'identification des molécules, de les quantifier et de s'assurer de leurs qualités finales.

L'identification des molécules dans les extraits (plantes ou animaux) permettrait la découverte de nouvelles molécules susceptibles d'avoir des potentiels thérapeutiques. Dans le domaine de l'environnement, elle permettrait le contrôle et la quantification des polluants organiques.

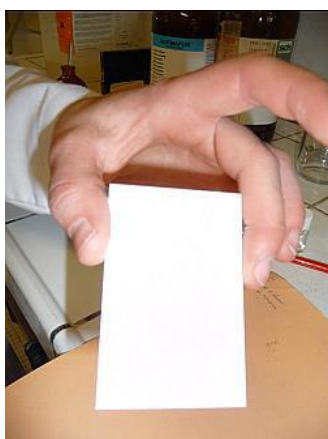
Plusieurs méthodes permettent d'accéder à la structure des molécules complètement ou partiellement. Les plus efficaces sont des méthodes de diffraction : diffraction des neutrons, électronique ou diffraction des rayons X. Mais les spectroscopies infrarouge, ultraviolette et la résonance magnétique nucléaire sont moins onéreuses.

Le principe des méthodes spectroscopiques est l'absorption d'énergie apportée par une onde électromagnétique, absorption qui conduit à des vibrations (spectroscopie vibrationnelle : IR), à des excitations d'électrons (spectroscopie électronique : UV), à des changements de l'état de spin des noyaux (spectroscopie de résonance magnétique nucléaire : RMN).

3-1) La chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode simple et efficace pour suivre l'avancement d'une réaction. Le principe est celui de toute chromatographie.

On dépose sur une plaque recouverte de silice et à l'aide d'un capillaire, une aliquote du milieu réactionnel. De la même manière, on dépose les références. La plaque est trempée dans un mélange de solvants (l'éluant). Celui-ci monte par capillarité le long de la plaque, entraînant plus ou moins les produits, retenus en partie par la silice polaire. Plus un composé est polaire, plus il est retenu par la silice et moins il migre. Ainsi, les mélanges réactionnels présentent plusieurs « taches » après révélation (mise en évidence des taches par des révélateurs spécifiques). Par comparaison avec les références, on détermine l'avancement de la réaction (disparition du réactif) et la qualité de la réaction (nombre de produits formés).



Plaque chromatographiques [10]

3-2) Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge IR est une méthode analytique utilisée en chimie organique pour l'identification des molécules et plus précisément, de leurs fonctions chimiques.

L'énergie apportée par l'onde électromagnétique permet le passage de la molécule, d'un état stable à un état excité. Lorsque l'énergie apportée correspond à l'énergie nécessaire au passage à l'état excité, la longueur d'onde est absorbée (quantification). Seules ces longueurs d'onde sont absorbées, les autres sont transmises ou ne sont pas retenues.

Il se trouve que l'énergie absorbée est corrélée à l'énergie de liaison ; l'énergie absorbée est spécifique des deux atomes liés et du type de la liaison. Autrement dit, on observe une absorption spécifique de la liaison A–B, différente de la liaison A=B et de la liaison A–C. On a pu établir des tables répertoriant les longueurs d'onde absorbées selon les fonctions chimiques

3-3) Spectroscopie ultraviolette

La spectroscopie ultra-violette est une méthode analytique utilisée pour identifier des fonctions chimiques chromophores de substances incolores. On distingue l'UV lointain ($\lambda < 200$ nm) et l'UV proche (λ comprises entre 200 et 400 nm).

La spectroscopie est basée sur le phénomène d'excitation par l'absorption d'énergie apportée par les photons. En effet, les photons ont à la fois un comportement ondulatoire et un comportement corpusculaire. Ce sont des paquets d'énergie définie par la relation des quantas : $\Delta E = h\nu = hc / \lambda$: où c 'est la célérité et h est la constante de Planck



Spectrophotomètre UV-visible (photo prise au laboratoire STEVA)

Lorsque cette énergie correspond à la différence d'énergie entre deux orbitales, l'électron passe au niveau supérieur. C'est un phénomène beaucoup plus rapide qu'une vibration.

3-4) Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse qui permet d'identifier une molécule par mesure du rapport masse molaire/charge, mais aussi d'avoir des informations structurales par analyse des différents fragments de la molécule.

Elle est utilisée dans un grand nombre de domaines scientifiques comme la chimie organique, la biologie, la médecine, la physique, l'astrophysique...

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

Il existe plusieurs techniques adaptées à la taille et aux propriétés physico-chimiques des molécules, mais la technique la plus couramment utilisée est celle de l'impact électronique (EI) dont le principe est présenté dans le paragraphe suivant. Toutes impliquent l'ionisation de la molécule étudiée, puis les ions sont transférés dans un analyseur. Celui-ci permet de les différencier, afin qu'ils soient détectés et identifiés.

3-5) Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire est une technique d'analyse de petites molécules. Elle permet d'accéder à des informations sur la structure développée mais aussi sur la stéréochimie de la molécule. Cette technique est aussi utilisée pour des études conformationnelles de plus grosses molécules comme les protéines. Son application la plus courante est l'imagerie par résonance magnétique IRM.

Comme dans toute méthode spectroscopique, le principe réside sur la perturbation (magnétique) d'un système (de noyaux) et l'observation de son retour à l'équilibre. Le signal, caractéristique du noyau observé, est ensuite transformé par une opération mathématique.

3-6) la chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP)

La CCMHP (appelée aussi nano chromatographie) a concerné des plaques plus petites (5 cm × 5 cm), avec une granulométrie très petite du gel de silice (environ 3 à 5 μm). La migration (distance parcourue inférieure à 45 mm), en position horizontale, est plus rapide par rapport à la CCM classique ; une meilleure résolution est observée pour une faible distance parcourue et avec moins de solvant utilisé. La prise d'essai est très faible (0,01 à 0,1 μL). La HPTLC (ou

High-Performance Thin Layer Chromatography) a été développée par la société CAMAG. La robotisation permet une meilleure reproductibilité des essais et une amélioration de l'analyse quantitative.

Cette nouvelle technique a de nombreuses applications dans beaucoup de domaines tels que la sante (analyses biochimiques et biologiques, produits pharmaceutiques et cosmétiques, médecine légale), l'agroalimentaire (aliments, plantes et extraits de plantes), l'environnement (pesticides, pollution des eaux et des sols), l'industrie chimique, mais également dans l'étude des huiles essentielles. Le système est constitué par un déposeur automatique assurant une bonne reproductibilité (par rapport au dépôt manuel) ainsi qu'une finesse des dépôts réguliers, sous forme de rectangle. Les plaques sont mises dans la chambre de développement automatique. La révélation peut se faire soit par des réactions de dérivation ou de coloration (après immersion ou atomisation du réactif). Ensuite, elles sont lues par un vidéo scan (évaluateur de la densitomètre) qui intègre les chromatogrammes (surface des pics) et calcule les pourcentages par comparaison avec la calibration des standards sur la même plaque. Le chromatogramme, avec l'intégration informatisée des pics, présente le même aspect qu'en CPG ou en CLHP et une précision des mesures comparable.

Actuellement, le couplage avec la spectrométrie de masse (investissement très élevé) peut être réalisable. L'extraction de la tache (par le méthanol ou tout autre solvant approprié) et son analyse par un SM ICPA (Ionisation Chimique à la Pression Atmosphérique ou *APCI*, en anglais) pour l'évaluation de la masse moléculaire permettront un nouvel élan à la chromatographie planaire robotisée, qui très longtemps, sous sa forme classique, a été négligée par les analystes.

3-7) La chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC

Parmi les techniques chromatographiques dont la phase mobile est un liquide, la chromatographie en phase liquide à haute performance (l'abréviation anglaise HPLC - High Performance Liquid Chromatography (CLHP) est la plus connue. Son champ d'application recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute celui de l'analyse des composés thermosensibles ou de masses moléculaires à la fois très grandes et même polaires. Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire. L'efficacité des colonnes est moindre qu'en CPG, mais l'utilisation de phases chirales ou des

nouvelles phases stationnaires opérant suivant plusieurs modes, les techniques par appariement d'ions ainsi que d'interaction hydrophobe accroissent encore plus les possibilités de la CLHP. Enfin la miniaturisation de la technique (nanochromatographie) a facilité son association avec la spectrométrie de masse.

L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide (appelée aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases – stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR etc.).

3-8) Chromatographie en phase gazeuse

Comme l'HPLC, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique permettant de séparer les composés d'un mélange. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La différence principale par rapport à l'HPLC vient du fait que dans la CPG la phase mobile est gazeuse.

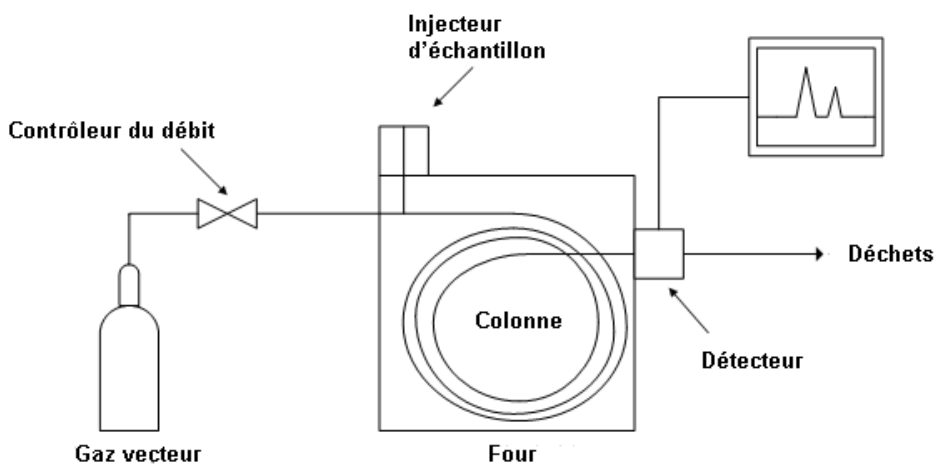


Schéma simplifié de la chromatographie en phase gazeuse [11]

CHAPITRE III: VALORISATION DES PRODUITS NATURELS (HUILE ESSENTIEL)

Les produits naturels ont été utilisés en alimentation et en pharmacologie depuis longtemps. Au fur et à mesure des développements industriels, il y a eu tendance à s'orienter vers les substances chimiques de synthèse. Cependant, il s'est avéré que ces derniers ne sont pas si bénéfiques pour la santé et l'environnement. Actuellement, on cherche à retourner aux produits naturels dans plusieurs domaines industriels.

1) Huile essentielle

L'huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir de matière première végétale botaniquement défini :

- soit par entraînement à la vapeur (le plus fréquent) ;
- soit par distillation sèche, (quelques cas, dont l'huile essentielle de cade utilisée en dermatologie) ;
- soit par un procédé mécanique appropriée sans chauffage des agrumes (uniquement pour le genre *Citrus*).

La matière première végétale utilisée peut être fraîche, sèche, entière, pulvérisée ou contuses (pulvérisée grossièrement), à l'exception des fruits du genre *Citrus* qui sont traités à l'état frais.

L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. Différents types d'huiles essentielles existent :

- huile essentielle déterpénée. C'est une huile essentielle partiellement ou totalement privée des hydrocarbures monoterpéniques ;
- huile essentielle déterpénée et de sesquiterpénée. C'est une huile essentielle partiellement ou totalement privée des hydrocarbures mono- et sesquiterpéniques ;
- huile essentielle rectifiée. C'est une huile essentielle qui a subi une distillation fractionnée, dans le but de supprimer des composants toxiques ou inintéressants ;
- huile essentielle privée de « X ». C'est une huile essentielle qui a subi une séparation partielle ou totale d'un composant « X », par un moyen physique (par exemple,

la cristallisation ou la distillation). Ainsi, l'huile essentielle de menthe (*Mentha arvensis*) riche en menthol peut être partiellement de mentholée, après un refroidissement entraînant la cristallisation, puis la filtration du menthol lévogyre. Ce dernier a de nombreuses applications. Des méthodes par extraction existent mais, dans ce cas, on parlera d'« extraits » et non d'huiles essentielles.

2) Définitions

Les définitions suivantes proviennent des pharmacopées (française et européenne), des normes (françaises AFNOR et internationales ISO), ainsi que de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) et du Code de la sante publique.

a)Parfum

Le parfum est un mélange odorant de composition complexe. Il est généralement composé d'huiles essentielles et/ou éventuellement de molécules de synthèse, puis dilué dans un alcool. Des milliers de combinaisons sont possibles, parmi lesquelles seules quelques-unes deviendront de grands succès internationaux en parfumerie.

b) Fragrance

Le terme fragrance est un terme très général qui caractérise tout composé volatil odorant. Souvent, ce terme est synonyme de « bonne odeur ». Les fragrances sont des additifs pour les médicaments, les cosmétiques, les savons, les détergents, les produits d'hygiène, les papiers de toilette, les bougies parfumées... Ils servent souvent à masquer une odeur désagréable.

c)Cosmétique

D'après le Code de la sante publique (Articles L. 5131 et L. 658.1), « on entend par produit cosmétique toute substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain, notamment l'épiderme, les systèmes pileux et capillaires, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes, ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles ». Le cosmétique est un produit du bien-être, avec des substances (huiles essentielles, molécules de synthèse) ou des solutions parfumées (aqueuses, solvants hydrophiles, solvants hydrophobes).

Les produits cosmétiques mis sur le marché ne doivent pas nuire à la santé humaine lorsqu'ils sont appliqués dans les conditions normales ou raisonnablement prévisibles d'utilisation compte tenu, notamment, de la présentation du produit, des mentions portées sur l'étiquetage ainsi que de toutes autres informations destinées aux consommateurs. Les incidents observés le plus souvent proviennent de mésusage, c'est-à-dire d'une mauvaise utilisation. Le produit cosmétique n'est pas un médicament.

d) Médicament

D'après le Code de la santé publique (Article L. 5111-1), « on entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques ». Le médicament doit disposer d'une autorisation de mise sur la marche (AMM) délivrée par les autorités sanitaires, après consultation d'un dossier très complet sur le produit.

e) Concrète

La concrète est un extrait végétal solide ou semi-solide, à odeur caractéristique, obtenu à partir de la matière première fraîche par extraction au moyen de solvant non aqueux (par exemple, l'hexane), suivie de l'élimination du solvant par un procédé physique, le plus souvent par volatilisation. Elle a l'aspect d'une cire opaque ou d'une pâte à modeler parfumée.

f) Pommade florale

C'est un corps gras parfumé, obtenu à partir des fleurs, soit par enfleurage à froid (diffusion des constituants odorants des fleurs dans les corps gras), soit par enfleurage à chaud (immersion des fleurs dans le corps gras fondu). À chaud, l'extraction est plus rapide, mais certains constituants thermolabiles peuvent se dégrader et des constituants non souhaités peuvent être extraits.

g) Résinoïde

C'est un extrait à odeur caractéristique, obtenu à partir de la matière sèche végétale (baumes, gommés...), par extraction au moyen de solvant non aqueux, suivie de l'élimination du solvant par un procédé physique. L'aspect physique est semblable à la concrète, il contient aussi bien des composés volatils que des composés peu ou pas volatils (cires, résines).

h) Absolue

L'absolue est le produit obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un résinoïde par extraction à l'éthanol, à température ambiante. L'alcool est éliminé par distillation.

Tous les termes définis, plus haut, correspondent à des produits qui entrent dans les domaines de la parfumerie, de la cosmétique et de la pharmacie. Pour l'agroalimentaire, on utilisera les termes d'épices et d'arômes qui sont des drogues à huiles essentielles utilisées pour leurs caractères organoleptiques.

i) Épices

Ce sont des produits végétaux naturels (ou leurs mélanges), utilisés pour donner de la saveur et de l'arôme et pour assaisonner les aliments (par exemple, le poivre et la cannelle). Les produits végétaux sont entiers ou en poudre.

j) Arômes

Les arômes sont des produits odorants qui émanent de substances naturelles, ou qui sont engendrés par un processus physique, chimique ou enzymatique. L'odeur caractéristique est due à la volatilisation de molécules spécifiques, par exemple à partir du fromage, du café au cours de sa torréfaction, de la viande et du poisson au cours de leur cuisson... Ces odeurs très agréables favorisent l'appétence et donc la consommation des produits alimentaires en renfermant. Le terme arôme est une notion plus large que l'huile essentielle. Mais l'arôme peut être d'origine purement synthétique. Rajoute à des produits manufacturés, il sera libéré lors du chauffage ultérieur des aliments.

3) Applications

a) En parfumerie

Les huiles essentielles, à l'état dilué, sont utilisées dans les parfums et les eaux de toilettes. Actuellement, ce sont davantage les molécules de synthèse qui entrent dans la composition très complexe et confidentielle mise au point par les grands parfumeurs. L'industrie des parfums se base sur les huiles essentielles. En principe, le jasmin, la lavande, le myrte, le girofle et les roses présentent un potentiel industriel pour des pays tels que la France et la Bulgarie.

Les premières synthèses organiques des arômes utilisés en parfumerie remontent à la première moitié du XIX^e siècle : 1833 - aldéhyde cinnamique (odeur caractéristique de la cannelle) ; 1866 - benzaldéhyde (imite l'odeur de l'amande amère) ; 1868 - coumarine, fougère ; 1869 - héliotropine ; 1876 - vanilline (pour les parfums chauds, doux et ambres) ; 1890-1900 - ionones, salicylate d'amyle, méthylionones, quinoléines ; 1903-1912 - aldéhydes et cétones spécifiques ; 1959 - cis-3-hexenol ; 1962 - dihydrojasmonate de méthyle (odeur caractéristique du jasmin) ; 1970 - damas cônes, dérivés de l'essence de cèdre et de la rose de Damas. L'avantage de matières premières de synthèse est qu'elles sont toujours disponibles, en n'importe quelle quantité et à des prix stables. En revanche, les matières premières d'origine naturelle restent onéreuses à cause, principalement, du prix élevé de la main-d'œuvre. Par ailleurs, la composition chimique des huiles essentielles dépend principalement de leurs conditions d'obtention et des variations de culture environnementales et climatiques.

b) En pharmacologie

L'ethnopharmacologie constitue la base de l'industrie pharmaceutique. Les métabolites secondaires constituent la fraction la plus active des composés chimiques des végétaux parfois même à faibles doses. On estime aujourd'hui qu'environ 1/3 des médicaments actuellement sur le marché contiennent au moins une substance végétale active ; antiparasitaire, antibiotique, anticancéreuse, immunosuppresseurs. Cette efficacité pharmacologique des métabolites secondaires s'est traduite par le développement de médicaments majeurs sur les 30 dernières années, tel que le **Taxol** et la **Morphine**, utilisées dans le traitement de certains cancers. Les drogues à huiles essentielles sont utilisées en nature, en particulier pour la préparation d'infusion (menthe, mélisse, verveine, fleurs d'oranger... etc.) et sous la forme de préparations galéniques simples et même pour l'aromatisation des formes médicamenteuses destinées à la voie orale.

c) En pharmacie

Le lecteur découvrira plus loin les propriétés pharmacologiques de quelques huiles essentielles utilisées en thérapeutique. Ce sont principalement les propriétés antiseptiques et antifongiques qui sont reconnues par les autorités sanitaires. Différentes spécialités pharmaceutiques sont sur le marché. La tendance actuelle serait l'utilisation bénéfique de cette activité antiseptique, notamment, pour purifier l'air atmosphérique dans les centres de soins (hôpitaux, clinique) et aussi dans les maisons individuelles par diffusion d'huiles essentielles dans l'air. Des travaux récents soulignent l'apport bénéfique des huiles essentielles face aux infections nosocomiales bactériennes dont les souches sont résistantes aux antibiotiques utilisés traditionnellement. Souvent, les huiles essentielles sont rajoutées dans la formulation des spécialités pharmaceutiques, pour masquer le mauvais goût des médicaments et pour donner un caractère plus agréable à leur consommation.

d) En cosmétologie

Les cosmétiques sont des produits du bien-être et non des médicaments. Ils ne nécessitent pas d'autorisation de mise sur le marché. Cependant, on peut constater des allégations excessives sur les bienfaits thérapeutiques des produits cosmétiques par la présence d'huiles essentielles incorporées. L'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire et des produits de santé) reste très vigilante sur cette pratique.

e) En agroalimentaire

Les métabolites secondaires forment les arômes, les épices, les conservateurs et les colorants alimentaires. Des huiles essentielles sont utilisées dans la conservation des plats préparés et dans les préparations surgelées industrielles. Certains extraits végétaux augmentent les qualités gustatives en confiserie (**Vanilline**), dans les produits laitiers (Extraits de fruits), les produits carnés, les sauces, les soupes, les produits de boulangerie, les boissons, sans oublier la nutrition animale.

Les huiles essentielles sont utilisées ici comme rehausseurs de goût et pour améliorer la saveur des produits alimentaires élaborés. Depuis peu, les industriels ont souhaité l'utilisation d'huiles essentielles comme conservateurs, au détriment des molécules de synthèse classiques couramment utilisées, telles que les parabènes.

f) En agronomie

Le rôle de ces composés dans la protection des cultures est connu (résistance aux maladies cryptogamiques, aux infections bactériennes, à certains insectes) en substituant l'usage chimique par des mécanismes de défense naturelle des plantes dans le but de la protection de l'environnement et de la santé humaine.

Des huiles essentielles, riches en **Limonène** (orange), en **Eugénol** (girofle), en **Carvone** (menthe) et en **Farnésène**, sont commercialisées comme pesticides.

g) Dans l'industrie chimique

L'huile essentielle est un mélange très complexe. Il est possible d'isoler des molécules d'intérêt, soit pour un usage ultérieur en tant que produit naturel présent sous une seule forme énantiomorphe, soit pour la réalisation d'hémisynthèses avec l'obtention finale de nouvelles molécules, économiquement plus rentables que la synthèse chimique classique qui présente des rendements faibles au bout de nombreuses étapes réactionnelles.

h) En tannage

Le tannage est un procédé chimique, consistant à transformer les peaux en cuir en les rendant plus durables et plus souples. Les tannins végétaux ont été employés depuis les temps les plus reculés, le tannage naturel végétal fut le premier moyen utilisé par les hommes pour rendre la peau imputrescible en lui conservant sa souplesse. Le tannage se fait par l'application de tannins de différentes provenances; écorce de Chêne (**Ellagitannins**), écorce de Mimosa, écorce de Sapin, le bois du Châtaignier et les noix de galles (**Gallotannins**).

Chapitre IV : Travaux pratiques

TP 1 : Méthode d'extraction par Soxhlet

Introduction

L'extracteur de Soxhlet est un appareil utilisé en chimie analytique qui permet de faire à chaud l'extraction par solvant d'un solide avec une grande efficacité. Cet appareil porte le nom de son inventeur: Franz Von Soxhlet

Description de l'appareil de Soxhlet

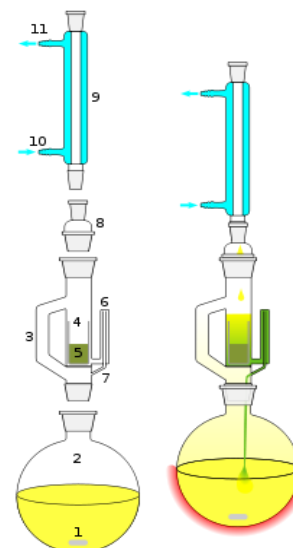
Il se compose d'un corps en verre (4) dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (5), d'un tube siphon (6-7) et d'un tube d'adduction (3). Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon (2) contenant le solvant d'extraction (1). Dans l'extracteur est insérée une cartouche dans laquelle est placé la poudre contenant l'espèce à extraire ; puis un réfrigérant (9-10-11) est adapté au-dessus de l'extracteur (il est également souhaitable d'utiliser un chauffe-ballon avec agitation magnétique intégrée, afin d'éviter des à-coups d'ébullition qui provoquent une remontée du liquide contenu dans le ballon et non de vapeurs de solvant pures. À défaut on peut placer des billes de verres dans le ballon).

Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant (chauffé par les vapeurs se trouvant en dessous). Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites, et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles.

Le solvant continue alors de s'évaporer, alors que les substances extraites restent dans le ballon (leur température d'ébullition doit être nettement supérieure à celle du solvant extracteur)

Appareil de Soxhlet [12]: Le Soxhlet est constitué d'un:

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



Appareil de Soxhlet [12]

Avantage :

Le cycle se répète indéfiniment. On peut ainsi épuiser complètement le solide en quelques cycles sans intervention. Le résultat est équivalent à une série de macérations successives.

Cette méthode requiert nettement moins de solvant que la méthode des macérations successives pour une même efficacité d'extraction. L'intérêt est donc également économique.

Inconvénient

L'extraction par Soxhlet peut présenter quelques inconvénients :

- La taille de la cartouche étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives avec plusieurs cartouches, ce qui peut prendre un temps considérable
- L'extraction à chaud peut dégrader certaines substances chimiques

Mode opératoire

- Il est important de rajouter quelques grains de carborundum (cristal de carbure de silicium SiC) ou de pierre ponce dans le mélange pour éviter une élévation de la température sans ébullition.

- Le bon fonctionnement du siphon nécessite un volume suffisant du solvant dans le ballon.
- Le solide est placé dans la cartouche, elle-même insérée dans l'extracteur.
- Le système de chauffage est mis en marche et réglé de façon à ce que les cycles remplissage/vidange de la cartouche se fassent de façon rapprochée.
- Le système peut être laissé sans surveillance particulière si la vidange est régulière.

- 1) Prendre 10g de la plante, après lavage à l'eau de robinet puis à l'eau distillée.
- 2) Introduire la plante dans la cartouche
- 3) Utiliser l'eau comme solvant.
- 4) Récupérer l'extrait par méthode de séparation.

Questions :

- a) Calculer le rendement de l'extraction
- b) Pourquoi le support élévateur est-il indispensable ? Choisir parmi les propositions suivantes :
 - 1- Pour ne pas mettre directement le chauffe ballon avec la paille.
 - 2- Pour pouvoir retirer le chauffe ballon dès que nécessaire.
 - 3- Pour avoir le mélange réactionnel au niveau des yeux.
- c) Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet
- d) Conclusion

TP2 : Technique de la chromatographie sur couche mince (C.C.M).

1)- Introduction.

La chromatographie permet de séparer les espèces chimiques présentes dans un mélange homogène.

Elle est basée sur la différence de solubilité d'une substance dans deux phases non miscibles : la phase stationnaire (ou fixe) et la phase mobile.

- La phase fixe : Il s'agit d'un adsorbant en poudre (alumine, silice, ...) déposé dans un gel en couche fine sur un support (plaque d'aluminium, verre, film plastique, ...).
- La phase mobile : C'est toujours un éluant liquide choisi en fonction de l'adsorbant et des composés à séparer.

2)- Mode opératoire :

a)- La plaque pour chromatographie :

- La couche d'adsorbant est fragile, éviter de mettre les doigts sur les plaques
- Pendre une plaque pour chromatographie 5 cm x 3 cm (environ).
- Tracer délicatement au crayon de papier un trait léger à 1 cm du bas de la feuille. (Figure 1)
- Les solutions avec lesquelles on va réaliser les dépôts doivent être des solutions diluées
- Déposer les gouttes de substance à analyser (colorant alimentaire) sur le trait à l'aide de piques en bois. (Figure 2)
- Chaque dépôt doit être espacé d'un cm au moins.
- Il faut déposer la solution pendant une durée très brève afin d'éviter l'étalement du dépôt.
- Ne pas trop appuyer, pour ne pas détériorer la couche d'adsorbant
- Repérer en haut de la feuille la position et la nature des différents dépôts.



Figure 1 [10]

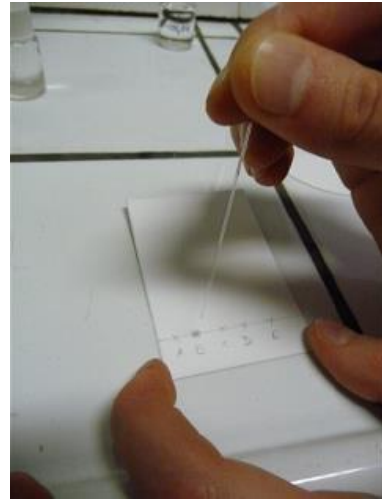


Figure 2 [10]

b)- L'éluant :

- Il est placé dans un bécher de 100 mL.
- La hauteur de l'éluant dans le bécher doit être faible afin de ne pas immerger les différents dépôts.
- Couvrir le bécher d'un verre de montre afin de saturer l'intérieur du bécher en vapeur d'éluant (figure3).

c)- Réalisation de la chromatographie :

- On place la plaque côté trait de crayon vers le bas dans le bécher et on recouvre du verre de montre.
- Laisser monter l'éluant jusqu'à 1 cm du haut de la plaque environ.
- Sortir la plaque délicatement et la laisser sécher.

d)- Préparation de l'éluant.

Prendre un bécher de 100 mL et verser 1 mL d'éthanol et 5 mL d'une solution aqueuse de chlorure de sodium à 40 g / L.

- Couvrir le bécher avec le verre de montre.

e)- Révélation :

- Elle peut se faire à la lumière naturelle ou sous éclairage U.V.



Figure 3 [10]

Si les constituants sont colorés, ils sont directement visibles sur la plaque.

- La révélation aux UV permet de mettre en évidence sous forme de taches sombres des substances qui absorbent les UV, elle nécessite l'emploi de plaques particulières comportant un révélateur UV.
- Les autres méthodes de révélation sont des méthodes chimiques : on met la plaque en contact avec un réactif plus ou moins spécifique de certaines fonctions, qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler. (MnO_4^- , I_2 , etc...)
- Mesurer les hauteurs h de migration des différentes tâches
- Identifier la (les) substance(s) par rapport au(x) authentique(s).

4)- Résultats

-Repérer avec un crayon de papier la position finale de l'éluant.

Observations. Remarques. Conclusions.

-Calculer le rapport frontal R_f pour chaque constituant.

-Qu'est-ce que la chromatographie ? À quoi sert-elle ?

TP3 : Etudes phytochimiques d'une substance naturelle

Ce sont des essais permettant d'avoir des informations sur la composition chimique des différentes substances naturelles. La phytochimie est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de la famille chimique présente dans une substance naturelle donnée. Bien entendu les tests de caractérisation phytochimique présentent des imprécisions, car ils sont basés en partie sur l'analyse qualitative.

Le principe est soit basé sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitations, soit sur la formation de complexe colorés en utilisant des réactions de coloration (conjugaison ou instauration dans molécule). Les résultats sont classés en :

Réaction très positive +++

Réaction moyennement positive ++

Réaction louche +

Réaction négative –

Préparation de la substance naturelle

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les extraits de la plante préparés par une :

Infusion :

On verse 150 ml de l'eau bouillante sur 25g de la substance végétale étudiée puis on laisse reposer la mixture pendant 15 min, le produit obtenu a été filtré avec du papier filtre.

Synthèse qualitative :

a) Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes, pigment quasiment universels des végétaux, constituent une grande famille de composés très souvent abondamment présent dans les plantes. Plusieurs tests de caractérisation permettant de mettre en évidence différents types de flavonoïdes

Nous avons introduit 5 ml de la solution préparée avec quelques gouttes d'HCl concentré en présence de trois ou quatre tournures de magnésium. Le changement de coloration est observé, virage au rouge (flavones), virage au rouge pourpre (flavonols), rouge violacée (flavanones et flavanols)

b) Les alcaloïdes :

La présence d'alcaloïdes est établie par la précipitation de sels et la révélation à l'aide du Réactif de Mayer et Wagner

1)- Réactif de Mayer :

Le Réactif de Mayer est constituée de deux solutions :

Solution A : 1,355g de chlorure de mercure dissoute dans 20 ml d'eau distillée.

Solution B : 5g d'iodure de potassium dissoute dans 20 ml d'eau distillée.

On mélange les deux solutions et on jauge jusqu'à 100 ml par d'eau distillée. La formation d'un précipité blanc après ajoute de quel que goutte du Réactif de Mayer, témoigne de la présence d'alcaloïdes.

2)- Réactif de Wagner :

C'est un mélange composé de 1,27g d'iode et 2 g d'iodure de potassium dissout dans 75 ml d'eau distillée. Ce mélange est jauge jusqu'à l'obtention de 100 ml de la solution.

S'il apparait un précipité brun montrant la présence d'alcaloïdes.

C) Anthraquinones libres :

Extrait chloroformique : 1g de poudre de la plante, ajouter 10 ml de chloroforme et chauffer prudemment au bain marie pendant 3min, filtrer et compléter a 10 ml si nécessaire Introduite 1ml d'extrait chloroformique, et ajoute 1ml de NH_4OH diluée puis agiter. Le virage de la couleur de la phase aqueuse au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libre.

D) Les tanins :

A 2ml d'extrait sont additionnées quelque goutte de FeCl_3 2% permet détecter la présence ou non de tanins, l'apparition d'une coloration bleu-noir ou vert- noir indique respectivement la présence de tanin.

E) Les saponines :

10 ml de l'extrait aqueux ont été versés dans un tube à essai, le tube agité pendant 15secondes et puis il a été laissé reposer durent 15 min, la hauteur de la mousse est mesurée. L'évaluation de présence des saponines est comme suite :

- Pas de mousse = test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de 1-2 cm = test positif
- Mousse plus de 2 cm = test très positif

TP4 : hydro-distillation de la lavande

I - Introduction

L'hydrodistillation permet d'extraire des espèces chimiques volatiles, très peu solubles dans l'eau, présentes dans les fleurs, les écorces, les fruits, etc. et d'obtenir des huiles essentielles.

Une espèce chimique volatile, non miscible à l'eau, peut être extraite par hydrodistillation.

Venue de l'ouest du bassin méditerranéen, la lavande était déjà utilisée par les Romains pour conserver le linge et parfumer les bains. En Provence, la lavande fut utilisée dès le Moyen Âge, pour la composition de parfums et celle des médicaments, mais c'est à partir du XIX siècle que la culture se développe.

L'essor de la production française d'huile essentielle de lavande fine est lié à l'implantation de parfumeries dans la région de Grasse. La mise en culture organisée systématique du lavandin, la lavande [13] dans les années 1950, prendra ensuite le relais.

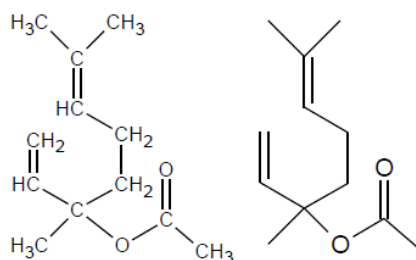


II - Montage

Pour extraire l'huile essentielle de la lavande ou du lavandin, on utilise une technique très ancienne : l'hydrodistillation.

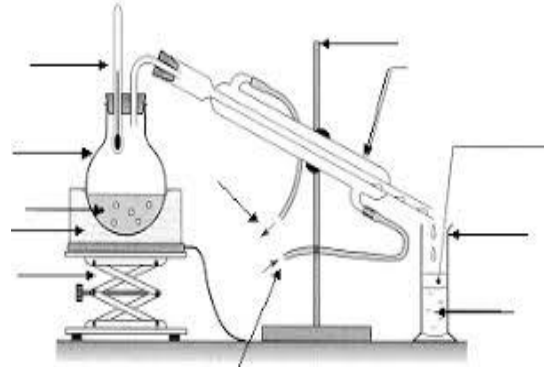
- On introduit dans le ballon 10 g de fleurs de lavande et 100 mL d'eau.
- On chauffe à ébullition le mélange jusqu'à obtenir environ 50 mL de distillat.

L'acétate de linalyle, composant de l'huile essentielle (formule semi-développée et formule topologique)



Questions relatives à l'hydro distillation

- a- Annoter le schéma ci-dessus.
- b- Indiquer sur le schéma l'arrivée et la sortie de l'eau du réfrigérant.
- c- À partir de quel moment va-t-on obtenir le distillat ?
- d- Expliquer le principe de la technique employée.
- e- Quel est l'aspect du distillat obtenu ?
- f- Recueille-t-on de l'huile essentielle ?



Montage hydro-distillation [7]

Questions relatives au relargage et à l'extraction

- a- Pourquoi ajoute-t-on du sel au distillat ?
- b- Pourquoi ajoute-t-on du cyclohexane ?
- c- Pourquoi faut-il agiter l'ampoule à décanter et la purger de temps en temps ?
- d- Faire le schéma de l'ampoule à décanter en précisant la nature des deux phases.
- e- Quelle phase faut-il recueillir ? Pourquoi ?

Références Des Photographies

- [1] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/18/Illustration_Papaver_somniferum0.jpg
- [2] <https://commons.wikimedia.org/wiki/User:Rasbak>
- [3] https://en.wikipedia.org/wiki/File:Digitalis_purpurea_LC0101.jpg
- [4] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Snake_Milking.jpg?uselang=fr
- [5] https://static.cotemaison.fr/medias_11334/w_1160,h_649,c_crop,x_152,y_446/w_2000,h_1125,c_fill,g_north/v1487595888/cochenille-1_5803409.jpg
- [6] <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSk9-BXbIvYm15FE2YWmF-CrVtkmKjUXv6gA&usqp=CAU>
- [7] https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTCHy7SGGzhBd2qax4sgrJ_30DwhAinh47Iw&usqp=CAU
- [8] ÉVELYNE CHELAIN, NADÈGE LUBIN-GERMAIN, JACQUES UZIEL Chimie organique 3e édition Dunod 201
- [9] https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CCG/product-images/10179630_GRP_A.JPG-650.jpg
- [10] http://thierry.col2.free.fr/restreint/exovideo_lycee/TP_seconde/tp13_chromatographie_colorants.pdf
- [11] <http://www.123bio.net/cours/chromato/gaz.html>
- [12] http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e0/Soxhlet_extractor.svg
- [13] Dr.Hans , W.Kothe ,1000 Plantes Aromatiques et médicinales, terres éditions, 2007

Références Bibliographiques

- 1) Jacques Augé et Marie-Christine Scherrmann Chimie verte Concepts et applications, SAVOIRS ACTUELS (EDP Sciences/CNRS Édition 2016)
- 2) Chimie organique 2 Isabelle Paquin, Dominique Thoraval, Azélie Arpin et Alain Lachapelle 2013 Chenelière Éducation inc
- 3) ÉVELYNE CHELAIN, NADÈGE LUBIN-GERMAIN, JACQUES UZIEL Chimie organique 3e édition Dunod 2015
- 4) Rene MILCENT, François CHAU (Chimie organique heterocyclique) EDP Sciences 2003
Francis Rouessac, Annick Rouessac ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes 6e édition avec la collaboration de Daniel Cruché DUNOD 2004
- 5) Sylvain Antoniotti Chimie verte chimie durable ellipses 2013
- 6) Jacques Kaloustian, Francis Hadji-Minaglou La connaissance des huiles essentielles : qualité et aromathérapie springer 2012
- 7) Annick Rouessac, Francis Rouessac Techniques instrumentales d'analyse chimique Dunod, Paris, ISBN 2011
- 8) Fedireco toninoli ; Victoire Meglioli , Huiles Essentielles L'encyclopédie JUDENA, 2013
- 9) Dr.Hans , W.Kothe ,1000 Plantes Aromatiques et médicinales, terres éditions, 2007
- 10) Guide de la chimie verte, Chimedite édition, 2015
- 11) Guitard Eugene-Humbert (1962) Les « Pen-ts'ao » source de la science pharmaceutique de l'Extrême-Orient : Dr Nguyen Tran huan, Archives intern, d'histoire des sciences, 1961, Revue d'histoire de la pharmacie, 50(172): 254
Url:http://www.persee.fr/web/revues/home/prescript/article/pharm_00352349_1962_num_50_172_9092_t1_0254_0000_2

12) Codex, Pharmacopée française (1837) chapitre 32, n° 350 « Vinaigre anti-sceptique (vinaigre des quatre voleurs) », Bechet Jeune Librairie – Editeur, Paris

13) René Maurice Gattefosse (1937) « Aromathérapie – Les Huiles Essentielles hormones Végétales », Librairie des Sciences, Girardot & Compagnie, Paris

14) « Grasse, invitation au voyage », office de tourisme de Grasse, http://www.grasseriviera.com/IMG/pdf/DP_2011_OTGRASSE.pdf

15) Huguenin-Dezot *et al.* (2018) "Trapping biosynthetic acyl-enzyme intermediates with encoded 2,3-diaminopropionic acid" *Nature* 565, 112 - 117

16) Luther *et al.* (2019) "Chimeric peptidomimetic antibiotics against Gram-negative bacteria" *Nature* 576, 452 - 458

17) Imai *et al.* (2019) "A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens" *Nature* 576, 459 - 464

18) Torres *et al.* (2020) "Animal biosynthesis of complex polyketides in a photosynthetic partnership" *Nat. Commun.* 11, 2882