

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
Département du Génie de l'Environnement



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté par :

AIT KACI Mohamed

Pour l'obtention du diplôme
d'Ingénieur d'état en Génie de l'Environnement

Thème :

Extraction et caractérisation d'une biomolécule à partir du
Maclura pomifera

Soutenu le 26 Juin 2012 devant le jury composé de:

Président :	M ^{me} N. ABDI	Professeur	ENP
Examinatrice :	M ^{me} O. KITOUS	M.M.A	ENP
Promoteurs :	M ^r N. MAMERI	Professeur	ENP
	M ^r M. KHERAT	Doctorant	ENP
Invité:	M ^{me} L. DJABRI	Professeur	UMMTO

Promotion : 2013

Ecole Nationale Polytechnique, 10 Av. Hassan Badi, El Harrach, Alger, Algérie.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire des biotechnologies environnementales et génie des procédés du département génie de l'environnement de l'école nationale polytechnique.

Je tiens à exprimer tout d'abord ma très vive reconnaissance envers mon promoteur, Monsieur N. MAMERI professeur à l'ENP, pour ses conseils, son aide, sa générosité et sa disponibilité tout au long de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères à mon co-promoteur Monsieur M.KHERAT, Doctorant au laboratoire BIOGEP, pour sa patience, ses conseils mais aussi pour sa générosité, ses qualités humaines sans lesquels ce travail n'aurait pas pu aboutir.

J'adresse mes respectueux remerciements à Madame N. ABDI, Professeur à l'E.N.P., pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury.

Je suis très honoré de compter parmi les membres du jury Madame O. KITOUS maître de assistante à l'ENP et Madame L.DJABRI, professeur à l'UMMTO qu'ils trouvent mes profonds remerciements.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Monsieur E. BEN YOUSSEF, professeur à l'ENP, ainsi qu'à Monsieur M. NABIEVE professeur à l'INH pour leur précieuse aide

Mes remerciements et profondes reconnaissances s'adressent également à tous mes collègues ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire notamment (Amar, Said, Saber, Imene, Hamza, Salim, Chawki), qui ont fait de leurs mieux pour que tout se passe dans une agréable ambiance.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de mes grands parents ;

A mes chers parents sans qui je ne serais pas ou j'en suis aujourd'hui ;

Je ne pourrais jamais assez vous remercier pour tout ce que vous faites pour moi et aussi pour tous les sacrifices et les efforts que vous avez faits pour mon éducation.

A mes sœurs : Sadia, Amel et Kahina.

A mon beau frère : Hocine

A mon neveu : Rayane.

A la famille Lekhbassen qui a été une seconde famille pour moi.

A mes amis : Amar, Ghiles, Amar N , Lakhdar, Salim, Musta, Hamza, Nabil....

Mohamed

Liste des figures

Figure I.4.1. : Aspect interne du Maclura Pomifera.....	5
Figure I.4.2. : Aspect externe du Maclura Pomifera.....	5
Figure II.1.3.1. : Effets biologiques des polyphénols.....	7
Figure II.2.2.1. : Structure de base et schéma simplifié des flavonoïdes.....	9
Figure II.2.3.1. : Structures des différentes classes de flavonoïdes.....	10
Figure IV.1.2.1. : Dispositif d'extraction.....	23
Figure IV.2.2.2. Schéma représentatif de la méthode d'extraction.....	25
Figure VI.2.1. : Spectromètre de masse.....	27
Figure II.1.1.1. : Formule topologique du phtalate.....	32
Figure II.3.1.1. : Formule topologique du Cyclotetrasiloxane, octamethyl.....	34
Figure II.4.1.1. : Formule topologique du 2(3H)-Furanone, 5-dodecyldihydro.....	35
Figure II.4.2.1. : Formule topologique du 9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.).....	35

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Verreries utilisés.....	20
Tableau N°2 : Liste des solvants utilisés.....	21
Tableau N°3 : DO en fonction des différentes concentrations.....	29
Tableau N°4 : Concentration de polyphénols (Extraits 1 ^{ère} méthode).....	29
Tableau N°5 : Concentration de polyphénols (Extraits 2 ^{ème} méthode).....	29
Tableau N°6 : Teneur en polyphénols des extraits du romarin.....	30
Tableau N°7 : Résultats de la CG-SM pour le premier extrait.....	31
Tableau N°8 : Résultats de la CG-SM pour le deuxième extrait.....	33
Tableau N°9 : Résultats de la CG-SM pour le troisième extrait.....	33
Tableau N°10 : Résultats de la CG-SM pour le quatrième extrait.....	34

Sommaire

Introduction générale.....1

PARTIE I : Etude bibliographique

I. La famille des *Moraceae*..... 3

I.1. Appareil végétatif3

I.2. Anatomie..... 3

I.3. *Maclura pomifera* 3

I.4. Fruit du *Maclura pomifera* 4

II. Biomolécules5

II.1. Les polyphénols..... 5

II.1.1. Classification..... 6

II.1.2. Biosynthèse 6

II.1.3. Effets biologiques des polyphénols..... 6

II.2. Les flavonoïdes8

II.2.1. Etymologie8

II.2.2. Structure chimique.....8

II.2.3. Classification..... 9

II.2.4. Dosage des flavonoïdes.....10

II.2.5. Paramètres affectant la stabilité des flavonoïdes.....10

II.2.6. Biodisponibilité des flavonoïdes.....11

II.2.7. Consommation des flavonoïdes.....	11
II.2.8. Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes.....	12
II.2.8.1. Solubilité des flavonoïdes.....	12
II.2.8.2. Absorption des rayonnements UV.....	12
II.2.9. Propriétés biologiques des flavonoïdes.....	13
II.2.9.1. Activité anti-oxydante	13
II.2.9.2. Activité anti tumorale.....	13
II.2.9.3. Protection neuronales.....	14
II.2.9.4. Effets cardiovasculaires.....	14
III. Extraction à partir des plantes et des fruits.....	15
III.1. Introduction sur les extractions.....	15
III.2. Définition de l'extraction solide-liquide.....	16
III.3. Facteurs influençant l'extraction.....	16
III.3.1. Influence du solide.....	16
III.3.2. Influence du soluté.....	16
III.3.3. Influence du solvant.....	17
III.3.4. Influence de contact liquide-solide ou temps d'extraction.....	17
III.3.5. Influence de la température d'extraction.....	17
III.3.6. Influence de l'humidité.....	18
III.3.7. Influence de l'agitation.....	18
III.4. Mécanisme de l'extraction par solvants	18

Partie II : Matériel et méthodes

I. Introduction.....	20
II. Matériel végétal.....	20
III. Matériel et réactifs utilisés.....	20
III.1. Verreries.....	20
III.2. Solvants.....	21
III.3. Réactifs.....	22
IV. Méthodes d'extraction.....	22
IV.1. Extraction par sohxlet.....	22
IV.1.1. Définition.....	22
IV.1.2. Mode opératoire.....	22
IV.2. Extraction avec plusieurs solvants.....	23
IV.2.1. Mode opératoire.....	23
V. Méthode de dosage.....	26
VI. Méthode d'analyse.....	26
VI.1. Principe d'une CPG.....	26
VI.2. Principe de fonctionnement d'un SM.....	26
VI.2.1. Ionisation.....	27
VI.2.2. Accélération.....	27
VI.2.3.Séparation.....	27
VI.2.4. Détection.....	27
VI.3. Couplage de la CPG a la SM.....	28

Partie III : Résultats et discussion

I. Dosage des polyphenols totaux.....	29
I.1. Courbe d'étalonnage.....	29
I.2. Extraits de la 1^{ère} Méthode d'extraction.....	29
I.3. Extraits de la 2^{ème} Méthode d'extraction.....	29
I.4. Discussion et interprétations des résultats.....	30
I.5. Comparaison des résultats.....	30
II. Caractérisation des Flavonoïdes par CG-SM.....	31
II.1. Résultat du 1^{er} extrait : Partie Aglycones du fruit.....	31
II.1.1. Les phtalates	31
II.2. Résultat du 2^{ème} extrait : Partie des Glycosides du fruit.....	32
II.3. Résultat du 3^{ème} extrait : Partie des Flavonoïdes polaires.....	33
II.3.1. Le Cyclotetrasiloxane, octamethyl.....	33
II.4. Résultat du 4^{ème} extrait : Partie extraite avec de l'hexane.....	34
II.4.1. 1^{ère} Molécule (2(3H)-Furanone, 5-dodecyldihydro-).....	35
II.4.2. 2^{ème} Molécule 9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.).....	35
Conclusion générale.....	37

Introduction Générale

Depuis toujours, les plantes médicinales sont utilisées pour prévenir ou soigner diverses maladies et les médicaments actuels ont, pour la majorité d'entre eux, une origine naturelle. La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques, toujours à la recherche de nouveaux composés actifs, se tournent de plus en plus vers l'identification et la caractérisation de molécules issues de matrices naturelles. Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser.

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives et l'industrie pharmaceutique s'inspire des structures moléculaires de ces dernières pour imaginer de nouveaux médicaments, car selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques.

Dans le cadre de notre travail nous nous sommes intéressé a un fruit qui n'est consommé ni par les humains ni par les animaux, c'est le fruit de *Maclura pomifera*, il est originaire de l'Amérique centrale et du sud, et il a souvent été utilisé en médecine traditionnels par les tribus indiennes.

De ce fait il serait intéressant d'essayer d'identifier les molécules qui pourraient avoir un intérêt biologique et aussi d'aller plus loin en essayant d'isoler ces molécules pour une éventuelle application thérapeutique. Afin de pouvoir atteindre cet objectif nous avons réalisé une série d'extraction afin de récupérer certaines fractions et on s'est intéressé particulièrement aux polyphenols et plus précisément les flavonoïdes car largement représentés dans la quasi-totalité des plantes et faisant partie intégrante de notre nourriture quotidienne. Ils possèdent potentiellement des activités biologiques, anti inflammatoires, anti-cancérigènes, antimicrobiennes et anti-oxydantes.

Les extraits ont été analysé par spectrométrie pour déterminer la quantité de polyphenols présent a l'intérieur et aussi et pas une technique chromatographique pour déterminer leur composition.

Introduction générale

Dans la première partie de ce travail nous allons commencer par donner des généralités concernant la plante et aussi de certaines biomolécules se trouvant à l'intérieur.

Dans la deuxième partie nous allons aborder la partie expérimentale dans laquelle nous parlerons du matériel et des méthodes qui ont été utilisées afin de réaliser les différentes extractions et analyses.

Et enfin, dans la 3ème partie nous exposerons et discuterons les résultats obtenues après analyses des extraits.

PARTIE I

Etude bibliographique

I. La famille des *Moraceae*

La famille des *Moraceae* est répandue dans toutes les régions tropicales ou subtropicales du monde entier, plus rarement dans les régions tempérées [10].

I.1. Appareil végétatif

Il s'agit d'arbres et d'arbustes persistants, plus exceptionnellement de plantes herbacées vivaces (*Dorstenia*). On trouve aussi des lianes, parfois épiphytes. Les feuilles sont alternes, plus rarement opposées ou pseudo-verticillées, elles possèdent des stipules parfois caduques, laissant alors une cicatrice annulaire caractéristique. Le limbe est simple ou digité (*Musanga*, *Cecropia*), et les marges sont entières, dentées ou encore lobées. L'hétérophylie est fréquente (*Broussonetia*) [10].

I.2. Anatomie

Un système de laticifères produit un latex limpide (*Morus*) ou laiteux (*Castilloa*) qui peut être consommé comme lait chez certaines espèces (*Brosimum galactodendron* du Venezuela). L'anatomie montre des fibres péricycliques longues et celluloses, des laticifères vrais situés dans le liber, le parenchyme cortical et la moelle, de l'oxalate de calcium en macles ou en prismes, un periderme superficiel, des poils tecteurs unicellulaires ou unisériés, parfois recourbés en crochet. Les concrétions cystolithiques sont fréquentes dans les poils tecteurs, les cellules de l'épiderme ou de l'hypoderme (*Ficus*) [10].

Et dans cette famille de végétaux, il y a le *Maclura Pomifera*, qu'on trouve entre autre à l'Ecole Nationale polytechnique d'Alger.

I.3. *Maclura pomifera*

Généralités sur le *Maclura pomifera* :

Originaire du sud des ETAT-UNIS, cet arbre caduc de 15m de hauteur pour 12m d'étalement, présente une écorce fissurée brun foncé. Les rameaux épineux forment une couronne ouverte irrégulière, aux feuilles ovales vert sombre.

Ses minuscules fleurs jaunes pures apparaissent en été, suivies de gros fruits ridés vert pales.

Son bois dur et flexible est utilisé pour la confection des arcs

On le trouve souvent dans les régions très ensoleillées et il est très tolérant à la sécheresse et peut croître dans un large éventail de types de sol et aussi des différentes conditions d'humidité. Cependant, il a une limite de pH ou il ne pourra plus croître c'est-à-dire à un PH du sol inférieure à 4,5. Il pousse mieux dans les sols bien drainés [1,2].

Les différentes parties des plantes de l'espèce du *Maclura pomifera* sont employées dans le monde entier dans la médecine traditionnelle. La décoction préparée à partir des racines du *Maclura pomifera* est employée pour le traitement des yeux endoloris par les Indiens Comanche en Amérique du Nord [2].

En Bolivie La sève de la plante est utilisée pour le traitement des douleurs des dents, et les écorces et les feuilles sont également utilisées pour traiter les hémorragies utérines et on a souvent rapporté que cette plante a été utilisée contre les rages de dents dans diverses populations vivant en Amérique du sud tel que les indigènes Kaiowa et Guarani au Brésil [4,5].

Actuellement, plusieurs activités biologiques du *Maclura pomifera* et de ses composants ont été rapportés telles que : l'effet antibactérien, antiviral, anti fongique, cytotoxique, anti tumoral, ostrogénique et anti malarique [6,7].

Par ailleurs, diverses études phytochimiques effectuées sur le *Maclura pomifera* montrent que la plante contient des lectines, triterpènes, les xanthones et des composés de type flavone.

Et une forte capacité antioxydante a été attribuée à des composants de type flavonoïdes, en particulier isoflavones, osajin et pomiferin [8,9].

I.4. Fruit du *Maclura pomifera*

D'abord verts, les fruits de *M. pomifera* deviennent jaune-orangé à l'automne. Ils contiennent de nombreuses graines ainsi qu'un latex blanc laiteux très amer qui les rend inconsommables, malgré leur douce odeur. Près de 10% de leur poids sec est constitué par des pigments flavonoïdes (molécules anti oxydantes), dont l'Osajine et la Pomiferine.

L'Oranger des Osages étant une espèce dioïque (plantes dont les fleurs mâles et les fleurs femelles sont sur des pieds différents), seuls les arbres femelles produisent des fruits.



Figure I.4.1. : Aspect interne du *Maclura pomifera*



Figure I.4.2. : Aspect externe du *Maclura pomifera*

II. Biomolécules

Une biomolécule est une molécule qui participe au processus métabolique et à l'entretien d'un organisme vivant, par exemple les glucides, les lipides, les protéines, et les acides nucléiques. On parle aussi de biomolécules pour des molécules identiques à celles trouvées dans le vivant, mais obtenues par d'autres moyens, par exemple dans les conditions qui prévalent dans l'espace (thème de l'exobiologie) ou dans des processus purement géophysiques.

Les molécules de grande taille peuvent être appelées macromolécules. Elles peuvent être classées en tant que biopolymères (lignine, cellulose,...) ou en tant que macromolécules naturelles (protéines, acides nucléiques,...). Ces macromolécules peuvent avoir une structure primaire, secondaire, tertiaire, quaternaire.

II.1. Les polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 8000 structures connues différentes [11], allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale [12].

Comme la majorité des composés secondaires, les polyphénols sont produits par les plantes afin d'accomplir des fonctions précises, les plus notoires étant :

- Défense contre les pathogènes ; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes.
- Dissuasion alimentaire. On parle du phénomène d'allélopathie : certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes.
- Attraction des pollinisateurs : les couleurs, mais aussi les odeurs attirent les insectes. Exemple : certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles.
- Protections contre les rayonnements UV.

- Molécules qui donnent des arômes et parfums aux plantes. Ce qui sert principalement à repousser les herbivores [29].

II.1.1. Classification

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes :

- Les flavonoïdes
- Les tanins
- Les stilbènes
- Les lignanes et les coumestanes
- Autres phytoestrogènes
- Les saponines (triterpénoïdes)
- Les phytostérols et les phytostanols

Bien qu'ils ne soient pas des polyphénols, on ajoute ordinairement à cette liste les isothiocyanates, qui dérivent de l'hydrolyse des glucosinolates [13].

II.1.2. Biosynthèse

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

- Celle de l'acide shikimique
- Celle issue de l'acétate

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes [12].

II.1.3. Effets biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques et interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques [11]. Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, anti-athérogènes,

anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux [14], anti-allergènes, vasodilatateurs [15] et antioxydants [16].

Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique. Ils sont regroupés dans la catégorie des veinotoniques et des vasculo-protecteurs. Parmi les veinotoniques, nous citerons le Relvenet ou le Cirkant renfermant du ruténoside, le Daflont ou le Diosmilt renfermant de la diosmine. Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également en étude clinique comme des anti-agrégant plaquettaire, ou hypotenseur sans résultats probants [12].

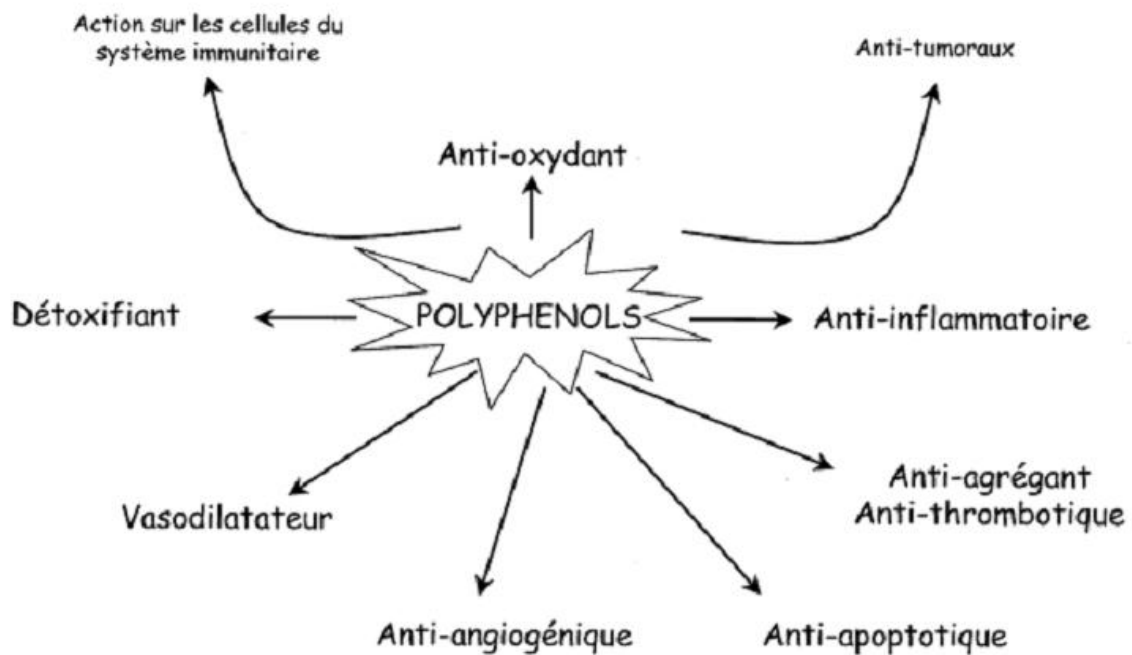


Figure II.1.3.1. : Effets biologiques des polyphénols

II.2. Les flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des polyphénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. On estime que 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes est converti en flavonoïdes [17].

Du fait de leurs propriétés anti oxydantes, liées à leur structure poly phénolique, les flavonoïdes ingérés avec nos aliments sont réputés protéger l'organisme contre les effets délétères des apports environnementaux oxydants [18].

Les flavonoïdes sont largement distribués dans le règne végétal où ils existent, le plus souvent sous la forme soluble d'hétérosides. Quasiment absents chez les Algues, ils apparaissent chez les Bryophytes.. Chez les Fougères et les Gymnospermes, ils sont présents mais leur variété structurale est faible. Ils sont par contre très largement représentés chez les Angiospermes où leur variété structurale est maximale [19].

II.2.1. Etymologie

L'expression flavonoïde a été introduite en 1952 par Geissman et Hinreiner pour désigner les pigments ayant un squelette (C₆-C₃-C₆), provenant du mot latin flavus qui signifie jaune [20].

II.2.2. Structure chimique

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques, caractérisés par une structure commune en C₆-C₃-C₆ dans laquelle deux cycles benzéniques sont reliés par un élément en C₃, différent selon la nature des flavonoïdes [21].

Constitué de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C [13], portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides [21].

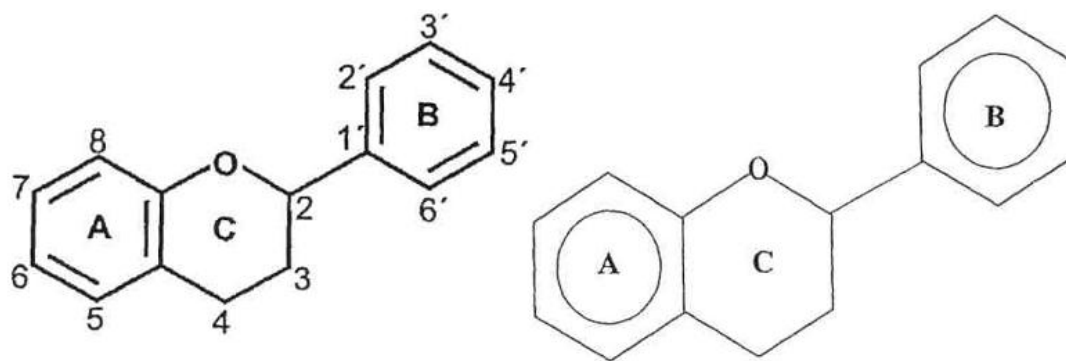


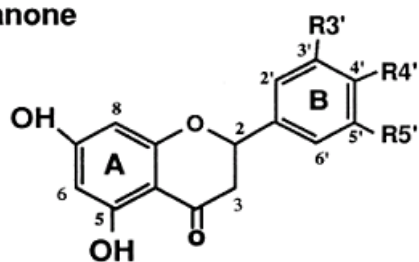
Figure II.2.2.1. : Structure de base des flavonoïdes et schéma simplifié des flavonoïdes.

II.2.3. Classification

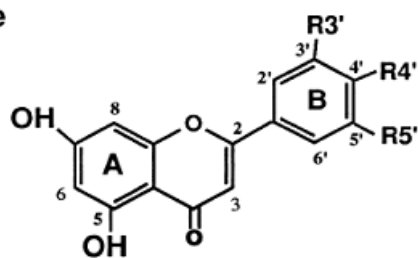
Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 (Figure.6).

- Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé Flavane.
- Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle la flavane est appelé Flavanone.
- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé Flavone
- Si le squelette est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle il est désigné par le nom de Flavonol.
- Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme Isoflavane [20].

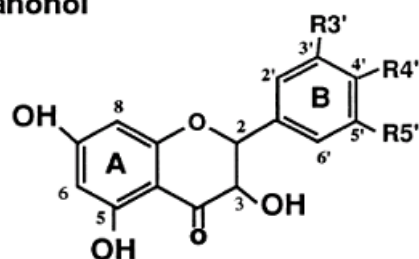
flavanone



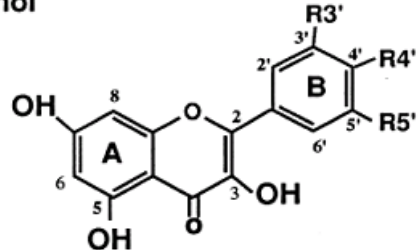
flavone



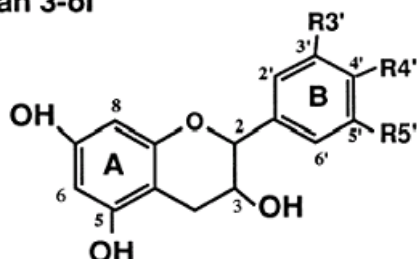
flavanonol



flavonol



flavan 3-ol



isoflavone

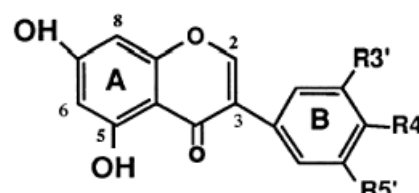


Figure II.2.3.1. : Structures des différentes classes de flavonoïdes.

II.2.4. Dosage des flavonoïdes

Les méthodes de dosage classiques sont le plus souvent, colorimétriques ou spectrophotométriques. L' HPLC offre maintenant la possibilité d'une estimation rapide et précise de tous les flavonoïdes [22].

II.2.5. Paramètres affectant la stabilité des flavonoïdes

Les paramètres qui peuvent agir sur la stabilité des flavonoïdes sont la lumière, le pH, la température, la nature du solvant, la présence d'enzyme, d'ion métallique ou non et d'oxydant. Ainsi, une élévation de la température et du pH, la présence d'ions métalliques favorisent la dégradation des flavonoïdes. En effet, la stabilité est plus faible à des pH

basiques en raison d'une augmentation de l'oxydation de ces molécules due soit à une déprotonation de ces composés (diminution du potentiel d'oxydation), soit à une stabilisation de l'oxydant (anion super oxyde). La nature du solvant affecte le mécanisme de dégradation des flavonoïdes. Et il y'a une amélioration de la stabilité en présence de cyclodextrines [34].

II.2.6. Biodisponibilité des flavonoïdes

L'organisme humain ne synthétise pas de flavonoïdes mais, de manière générale, elles sont largement rencontrées dans le règne végétal. Nous retrouvons les flavonoïdes dans notre alimentation quotidienne [27].

Les fruits (orange, raisin, etc.), les légumes (oignon, laitue, etc.), mais également les graines (fève, cacao) ou encore les racines des plantes sont, pour l'homme, des sources importantes de flavonoïdes. Les feuilles de thé sont également connues pour être riches en flavonoïdes. La quercétine est l'un des composés les plus représentatifs de cette famille en cela qu'elle est l'une des plus répandues dans les fruits et les légumes et qu'elle présente une activité plus ou moins importante dans la majeure partie des processus biologiques impliquant ces composés [28].

A de rares exceptions près, seules les plantes ont la capacité de bio synthétiser des flavonoïdes. Les flavonoïdes peuvent être présents dans toutes les parties des plantes. Dans la majorité des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et du mésophylle des feuilles, des parenchymes des tiges et racines. Les génines seules sont présentes dans les exsudats farineux de certaines plantes, dans les cuticules des feuilles, écorces et bourgeons ou sous forme de cristaux dans les cellules de certaines *Cactaceae* et plantes de régions arides [17].

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois feuilles. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigments [22].

II.2.7. Consommation des flavonoïdes

La prise moyenne quotidienne des flavonoïdes est 14.4 mg dont (35.2%) viennent des fruits, (19.1%) des légumes, (16.9%) du vin et (16.0%) du thé [24].

La quercétine est régulièrement consommée par l'homme car c'est le flavonoïde principal trouvé dans le régime alimentaire [25].

Leur ingestion est élevée comparativement à d'autres antioxydants diététiques comme les vitamines C et E [26].

II.2.8. Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes

II.2.8.1. Solubilité des flavonoïdes

En présence d'un solvant, la structure du flavonoïde pourrait être différente suite aux interactions suivantes [30] :

- des interactions de type hydrophobe avec les solvants apolaires concernant les cycles aromatiques (A et B) et les substituants carbonés aliphatiques ;
- des interactions dipolaires entre les solvants polaires et les groupes fonctionnels des flavonoïdes (carbonyle, éther, ester, hydroxyle) ;
- des liaisons hydrogènes entre le solvant (eau, alcool, amine) et les divers groupes donneurs ou accepteurs de ce type de liaison présent sur le flavonoïde ;
- des interactions de type électrostatique entre les groupes hydroxyles et carboxyliques ou pour les anthocyanes à certain pH.

Selon Saidman , le facteur principal influençant la solubilité de la flavone est sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec le solvant [31].

II.2.8.2. Absorption des rayonnements UV

Les rayonnements UV sont divisés en trois groupes. Les UVC de 200 à 290 nm sont des rayonnements à haute énergie et qui sont stoppés avant l'entrée dans l'atmosphère par la couche d'ozone. Les UVB (280-320 nm) sont nocifs pour la santé et n'atteignent que l'épiderme, alors que les UVA (320-400 nm) pénètrent plus profondément. La réponse biologique à ce stress peut être immédiate et passagère (inflammation, brûlure), retardée et chronique (vieillesse de la peau, cancer). L'accumulation de ce stress oxydant induit entre autre une augmentation des radicaux libres, qui dégradent les composants cellulaires : lipides, protéines, bases nucléiques...

Les flavonoïdes, suivant leur structure, présentent des maxima d'absorption dans la zone 270 à 350 nm, ce qui pourrait prévenir ou diminuer les dommages de la peau induits par

le stress oxydant en particulier ceux des radiations UVB [32] en modulant la réponse cellulaire et en piégeant les espèces radicalaires oxygénées. En effet, plusieurs brevets et publications ont revendiqué l'utilisation des flavonoïdes dans des préparations anti-UV [33].

II.2.9. Propriétés biologiques des flavonoïdes

La principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être "veino-actifs", c'est-à-dire capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance [22]. L'utilité thérapeutique de ces composés a été démontrée dans les hémorragies gastrointestinales, avortements habituels, ménorragies, cystites saignantes, tuberculose hémoptysie, la maladie de Meniere, épistaxis, rétinopathie, hémorroïdes et syndrome de Raynaud. Ils ont été fréquemment combinés avec la vitamine K et l'acide ascorbique. Récemment, les rutosides hydroxyéthylés sont avérés efficaces dans l'allègement des symptômes provoqués par l'insuffisance veineuse chronique des membres inférieurs, varicoses de grossesse et d'autres maladies veineuses. Le (+)-cyanidanol-3 a été de plus en plus employé dans le traitement de l'hépatite virale aiguë et diverses autres maladies du foie [23]. Une étude clinique a permis de montrer une activité anticancéreuse de la quercétine, administrée par voie intraveineuse chez des patients atteints du cancer. Le resveratrol est actuellement en phase I, d'étude clinique pour son utilisation dans le traitement du sida. Il est également en phase d'études préclinique et clinique pour son utilisation dans le traitement de divers cancers [12].

II.2.9.1. Activité anti-oxydante

Les flavonoïdes expriment les propriétés anti-oxydantes par : Le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), La suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques, impliqués dans leur production, La protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme [35].

II.2.9.2. Activité anti tumorale

La plupart des flavonoïdes sont *in vitro*, antimutagènes ; a contrario, quelques flavonols sont sur les mêmes modèles mutagènes et un petit nombre d'entre eux sont anti-cancérogènes et inhibiteurs de la croissance des cellules tumorales *in vitro* [22].

II.2.9.3. Protection neuronales

Les flavonoïdes sont en effet connus pour être des agents protecteurs contre la dégénérescence des neurones. Ce rôle a principalement été mis en évidence dans le cas de la maladie de Parkinson. De nombreuses études suggèrent que l'inflammation joue un rôle dans l'apparition de cette maladie. Des chercheurs ont évalué l'effet de la lutéoline, un flavonoïde possédant diverses activités et notamment des effets anti-inflammatoires, sur la diminution du captage de la dopamine et la perte de neurones dans les cultures mésencéphaliques gliales [36].

II.2.9.4. Effets cardiovasculaires

Récemment, beaucoup d'études se sont concentrées sur les effets cardiovasculaires des flavonoïdes. Les rapports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoïde [37].

Parmi les 17 flavonoïdes examinés, les agents de relaxation vasculaires les plus efficaces sont l'apigénine, lutéoline, kaempferol et la génisteine. Cette relaxation est attribuée à l'action directe des flavonoïdes sur le muscle lisse vasculaire

III. Extraction à partir des plantes et des fruits

III.1. Introduction sur les extractions

Depuis l'antiquité, l'homme a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et de soigner toutes sortes de maladies. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire [17].

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques [38].

Avec la demande croissante pour les produits à base de plantes médicinales, et des produits naturels pour les soins de santé partout dans le monde, les fabricants d'extraits de plantes médicinales et les producteurs d'huiles essentielles ont commencé à utiliser des technologies d'extraction les plus appropriées afin de produire des extraits et des huiles essentielles de qualité définie. Cette approche doit être adoptée par les pays en développement afin de répondre à l'exigence croissante des extraits de bonne qualité et d'huiles essentielles pour une meilleure génération de revenus dans le pays.

Les plantes médicinales sont des bioressources pour les médicaments, les compléments alimentaires, les produits pharmaceutiques intermédiaires et d'entités chimiques pour les drogues de synthèse. Les plantes aromatiques sont une source de parfums et saveurs pour les produits cosmétiques.

La transformation industrielle des PMA commence avec l'extraction des composants actifs à l'aide de différentes technologies. Les techniques générales de l'extraction de plantes médicinales comprennent macération, infusion, percolation, la digestion, décoction, l'extraction à chaud en continu (Soxhlet), extraction hydro-alcoolique par fermentation, l'extraction à contre-courant, l'extraction par micro-ondes, extraction à ultrasons, extraction par fluide supercritique et l'extraction photonique [39].

Et le principe fondamentale qu'utilisent toutes les technique citées ci-dessus c'est l'extraction a partir d'un solide a l'aide d'un solvant autrement dit, l'extraction solide-liquide.

III.2. Définition de l'extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire, de séparer ou de dissoudre soit par immersion soit par percolation dans un liquide, un ou plusieurs composants (solide ou liquide) mélangé à un solide.

C'est une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide (la matière à extraire) et une phase liquide (le solvant d'extraction) les constituants recherchés pouvant être soit le soluté, soit le résidu [40].

III.3. Facteurs influençant l'extraction

Les paramètres fondamentaux qui influent sur la qualité d'un extrait sont les parties de la plante utilisées comme matériau de départ, le solvant utilisé pour l'extraction, le procédé de fabrication (technologie d'extraction) utilisés avec le type d'équipement utilisé. L'utilisation d'une technologie appropriée d'extraction, de matériel végétal, de l'équipement de fabrication, de la méthode d'extraction et de solvant et le respect des bonnes pratiques de fabrication va certainement aider à produire un extrait de bonne qualité. De l'échelle laboratoire à l'échelle pilote, toutes les conditions et les paramètres peuvent être modélisés en utilisant la simulation de processus pour la réussite de la production à l'échelle industrielle [39].

III.3.1. Influence du solide

La taille et la structure de l'échantillon jouent un rôle important dans l'extraction. Plus la matière est divisée finement et plus la surface d'échange est grande rendant le contact solide/liquide meilleur. C'est pourquoi l'extraction des matières végétales est toujours précédée du broyage. Cependant, un broyage poussé peut dégrader les principes actifs sous l'effet de la chaleur dégagée par les frottements. Les particules trop petites peuvent aussi engendrer des problèmes d'imperméabilité du lit de filtration.

III.3.2. Influence du soluté

Le soluté à extraire contenu dans le corps solide influence considérablement la vitesse d'extraction de part sa taille, sa localisation, sa répartition et ses liaisons dans la matière végétale avec d'autres composés.

La vitesse de diffusion est inversement proportionnelle à la taille des particules du soluté ; elle diminue quand la taille de ces dernières augmente. Par exemple, les vitesses

d'extraction des composants hydrosolubles sont dans l'ordre croissant suivant : acide acétique > sucre > phénol > pectines [41]. Les substances à extraire, localisées à l'intérieur des cellules, se présentent sous forme libre alors que les celles qui participent à la structure sont liées à d'autres composés. Leurs concentrations varient selon les conditions climatiques de croissance, les conditions de récoltes, l'état de maturité et le conditionnement, c'est pourquoi elles varient beaucoup d'un lot à l'autre et au sein d'un même lot.

III.3.3. Influence du solvant

Dans l'industrie d'extraction des huiles végétales issues des graines oléagineuses et des tourteaux, le choix d'un solvant à faible viscosité et de masse volumique peu élevée est recommandé pour faciliter la diffusion dans le solvant, l'agitation et la séparation mécanique [42]. Le choix du solvant se fait selon plusieurs critères [43] :

- La solubilité des composants spécifiques dans le solvant ;
- La régénération du solvant si celui-ci doit être réemployé ;
- Il doit être non toxique, stable, non réactif, non inflammable, inoffensif pour l'environnement et peu couteux.

Dans l'industrie alimentaire ou pharmaceutique, le choix du solvant est très important. Les normes et les règles d'hygiène et de sécurité sont très strictes. Il ne doit pas en rester dans les produits finaux ou bien les traces doivent être suffisamment insignifiantes pour être inoffensives. De manière pratique, les ateliers disposent souvent d'un parc de solvant. Le choix est souvent restreint à ce groupe de solvant qui sont connus, maîtrisés et acceptables.

III.3.4. Influence de contact liquide-solide ou temps d'extraction

Le temps est un autre paramètre qui doit être pris en considération dans l'extraction de la matière végétale [44,45].

Généralement, l'augmentation du temps de contact augmente le rendement du produit extrait. Souvent 15-20 min sont suffisant. Parfois, il est nécessaire d'aller jusqu'à 60 min. il faut noter cependant qu'un temps prolongé peut causer la dégradation des extraits.

III.3.5. Influence de la température d'extraction

La température d'extraction a aussi une très grande importance dans le processus d'extraction [46,47]. Une augmentation de la température favorise la solubilité et la diffusion

du soluté et réduit sa viscosité et celle du solvant. Mais elle peut entraîner une diminution de la sélectivité suite à la perméabilité des parois cellulaires par dénaturation. Elle peut également dénaturer le produit à extraire comme elle augmente le risque de perte de solvant. Dans les huileries, on se limite à une température légèrement inférieure à 60°C lors de l'épuisement des tourteaux pour éviter le risque d'extraction des composés nuisible et pour la sécurité de l'installation [48].

III.3.6. Influence de l'humidité

En règle générale, les matières végétales sont séchées pour faciliter leur conditionnement et surtout leur stockage. Un surplus d'humidité des végétales peut détériorer le substrat. De plus, lors de l'utilisation de solvants hydrophobes, la diffusivité est inversement proportionnelle à la teneur en eau du solide [49]. Donc, l'étape de séchage est indispensable pour faciliter l'extraction et éviter la détérioration de la matière végétale.

Toutefois un séchage intense peut conduire à la contraction des membranes cellulaires rendant plus difficile le processus d'extraction. Il est donc admis que pour une extraction efficace, l'humidité de la phase solide doit être comprise entre 5 et 10 % [50].

III.3.7. Influence de l'agitation

L'agitation mécanique permet le maintien en suspension des particules dans le solvant et l'homogénéisation du milieu ; elle a donc une grande influence sur le transfert de matière à l'interface solide-liquide. Dans le cas de l'extraction des graines oléagineuse, la variation de la vitesse d'agitation ne semble pas avoir une grande influence sur le rendement d'extraction [51] ; en effet, l'huile à l'intérieur des cellules est difficilement accessible puisque les graines oléagineuses sont dotées de membranes très peu perméables, par conséquent une agitation même vigoureuse, a peu d'influence sur la vitesse d'extraction.

III.4. Mécanisme de l'extraction par solvants

Dans le cas typique de l'extraction des matières végétales, le soluté est localisé dans des cellules végétales à parois très peu perméables. L'extraction de ces matières par solvants, est un processus assez complexe, basé sur le phénomène de transfert de matière où le solvant pénètre en premier dans la cellule (solide), son rôle est de dissoudre le soluté s'y trouvant. Après la dissolution du soluté dans le solvant, ce dernier se trouve saturé en soluté ce qui va provoquer par diffusion un transfert de matière du soluté vers le solvant non saturé [52].

Ce processus peut être résumé en quatre étapes :

- pénétration du solvant dans le solide ;
- dissolution du soluté dans le solvant ;
- transfert de matière extraite à travers les membranes cellulaires ;
- diffusion de la matière extraite de la surface du végétal vers le solvant non saturé.

Les solvants utilisés sont généralement de nature organique, ils peuvent être purs ou mélangés (hexane, méthanol-eau, éthanol-eau,,,,,) [53].

L'extraction par solvant reste l'une des méthodes les plus utilisées dans les différentes industries qui font appel à des matières premières de nature végétale, on peut citer :

- L'industrie agro-alimentaire : Extraction du sucre à partir de la canne à sucre ou de la betterave sucrière, extraction de l'huile à partir du tournesol ;
- L'industrie pharmaceutique : Extraction des vitamines à partir des différents fruits, des antibiotiques et des alcaloïdes à partir des plantes ;
- L'industrie des parfums : Extraction des huiles essentielles à partir des plantes, fleurs et racines.

PARTIE II

Matériel et Méthodes

I. Introduction

Le but est d'essayer d'identifier les différents composés que comporte le fruit. Nous donnons dans cette partie une description générale du matériel et des méthodes utilisés durant nos manipulations.

II. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des trois parties du fruit, c'est-à-dire : les graines et la chaire du fruit lui-même.

L'arbre ou le fruit a été cueilli se trouve à l'école polytechnique d'Alger, et généralement le fruit pousse au mois de septembre, de ce fait ils ont été cueillis et conservés au congélateur pour éviter toute dégradation.

Et pour nos expériences, nous avons procédé à la découpe du fruit pour extraire et séparer les graines de la chaire puis nous avons mis les deux parties du fruit à l'étuve pendant 24h afin de sécher la matière végétale.

III. Matériel et réactifs utilisés

-Un **Bain Marie** a été utilisé afin de réguler la température d'extraction.

-Une **balance analytique** a été utilisée pour les différentes pesées.

III.1. Verreries : la verrerie utilisée est résumé dans le tableau ci-dessous :

Tableau N°1 : Verreries utilisés

Type	Volume	Marque et référence
Ballons	250 ml	SHUNU GG-17
Soxhlet	150 ml	SHUNU GG-17
Réfrigérant	/	SHUNU GG-17
Ampoule à décanter	500 ml	SHUNU GG 17
Béchers	150 ml	/
Tubes à essais	/	/
Pipettes	2 ml	TEKNIKCOM
Verre de montre	/	/

III.2. Solvants

Tableau N°2 : Liste des solvants utilisés

Caractéristiques	Méthanol	Hexane	Chloroforme	Butanol	Acétate d'éthyle	Oxyde de diéthyle
Formule brute	CH ₄ O	C ₆ H ₁₄	CHCl ₃	C ₄ H ₁₀ O	C ₄ H ₈ O ₂	C ₄ H ₁₀ O
Masse moléculaire (g/mole)	32,04	86,2	119,38	74,1	88,1	74,1
d ²⁰	0,79	0,66	1,49	0,81	0,9	0,71
Température de fusion (°c)	-97,6	-95,3	-63,5	-88,6	-80,9	-116,3
Température d'ébullition (°c)	64,5	68,7	61,2	117,7	170,5	34,4
Température d'auto inflammation (°C)	12	-26	/	36	59	-45
Indice de réfraction a 20°c	1,32	1,37	1,45	1,40	1,41	1,35
Pureté (%)	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9

III.3. Réactifs

-FOLIN CIOCALTEU

-CARBONATE DE SODIUM (Na_2CO_3)

IV. Méthodes d'extraction

Dans le but d'avoir un maximum d'information sur la composition du fruit qui est peu connue jusque la, nous avons procédé à deux différents protocoles d'extractions, c'est-à-dire : l'extraction par Soxhlet en utilisant l'hexane comme solvant et une autre méthode d'extraction faisant appel à différents solvants, dans le premier cas c'est pour extraire une large gamme de biomolécules qui seront analysées par CGSM et dans le deuxième, c'est une méthode qui permet d'isoler différents types de flavonoïdes.

IV.1. Extraction par Soxhlet

IV.1.1. Définition

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première.

IV.1.2. Mode opératoire

-Une quantité de la matière végétale a été mise à l'étuve pendant 24h, puis nous avons pesé 10g à partir de la matière sèche que nous avons mis dans une cartouche en cellulose. On met aussi 150ml d'hexane dans un ballon.

-La cartouche est mise à l'intérieur du Soxhlet et on raccorde les différentes parties du dispositif c'est-à-dire que le Soxhlet est mis au dessus du ballon et on le raccorde à un réfrigérant.

-Le ballon est immergé aux deux tiers de son volume à l'intérieur d'un bain Marie à une température de 80° C.

A partir de là, le processus d'extraction commence, et on a arrêté l'extraction au bout de 3 jours puis on a récupéré l'extrait qu'on a conservé au réfrigérateur à l'abri de la lumière.

On a refait les mêmes étapes pour les autres parties du fruit.

Le schéma du dispositif est représenté ci-dessous :

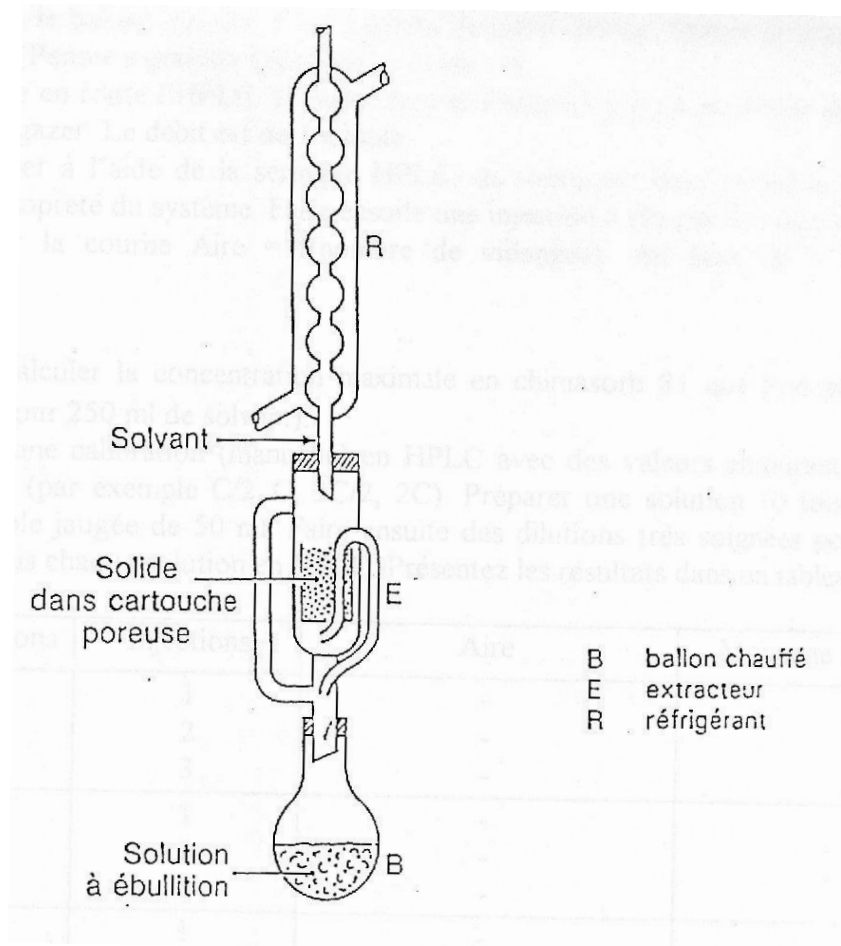


Figure IV.1.2.1. : Dispositif d'extraction.

IV.2. Extraction avec plusieurs solvants

IV.2.1. Mode opératoire

-Dans un ballon raccordé a un réfrigérant on met 5g d'échantillon sec auquel on rajoute 40ml de méthanol et 10ml d'eau, le tout est mis dans bain Marie a 85° pendant 15 min.

-On laisse refroidir puis on filtre l'extrait sur du papier filtre

-On rajoute 50ml d'eau chaude tout en mélangeant puis on laisse refroidir et on met le tout dans une ampoule à décantier.

-On rajoute 10ml de chloroforme, car cela va permettre d'éliminer les pigments et les lipides, (la phase du chloroforme va se trouver en bas) on récupère et on refait cette opération une deuxième fois

-On rajoute 10ml d'éther di éthylique à la phase aqueuse et on récupère les deux phases (la partie supérieure va contenir les aglycones et qui est notre premier extrait) on refait l'opération une deuxième fois.

-On rajoute 10ml d'acétate d'éthyle à la phase aqueuse et on récupère les deux phases (la partie supérieure va contenir les glycosides qui sera notre deuxième extrait) on refait l'opération une deuxième fois.

-On rajoute 10ml de butanol à la phase aqueuse (la partie supérieure va contenir les flavonoïdes polaires).

Le schéma du dispositif est résumé ci-dessous

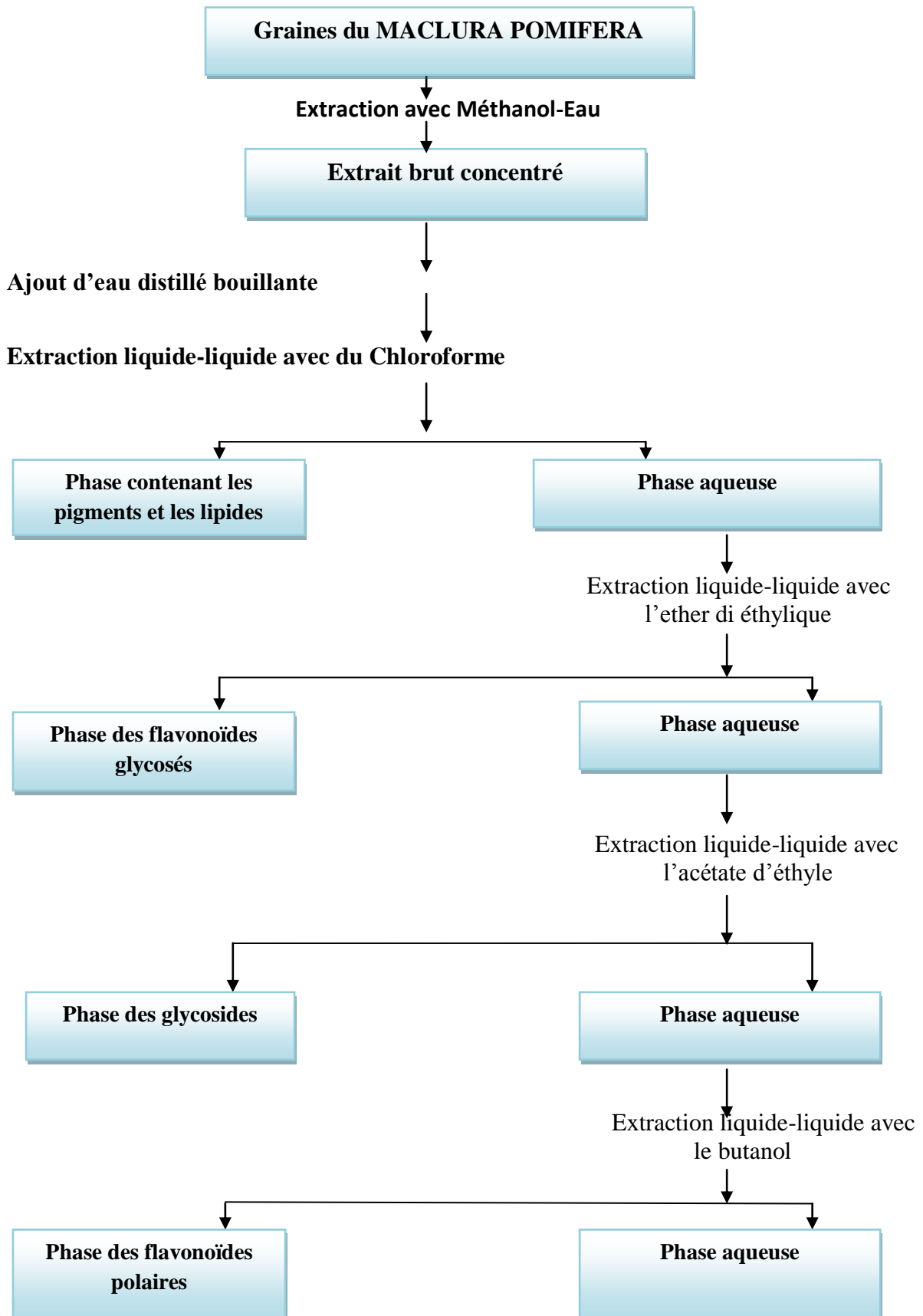


Figure IV.2.2.2. Schéma représentatif de la méthode d'extraction.

V. Méthode de dosage

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline (Vuorela, 2005).

Brièvement 200µ l de chaque extrait ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu et 20ml de la solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (75g /l). Le mélange final a été secoué puis mis dans le bain Marie à 70°C pendant 20 minutes.

L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre UV-visible de marque OPTIZEN à 760 nm.

VI. Méthode d'analyse

Dans le but d'identifier un maximum de biomolécules, nous nous sommes proposé d'analyser les échantillons avec une technique chromatographique qui est la CPG (chromatographie en phase gazeuse) couplée à la SM (spectrométrie de masse).

Les analyses ont été réalisées dans les laboratoires du CRAPC à l'aide d'un chromatographe de marque (**HP (Agilent technologies) 6890 plus**) et aussi d'un spectromètre de masse **HP (Agilent technologies) MSD 5973**.

VI.1. Principe d'une CPG

Un appareil de CPG réunit dans un bâti unique, outre les trois modules classiques, injecteur, colonne et détecteur, un four thermostaté qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée. La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé gaz vecteur. Les débits, contrôlés avec précision, permettent une grande répétabilité des temps de rétention [54].

VI.2. Principe de fonctionnement d'un SM

La spectrométrie de masse est basée sur la détermination des masses des molécules ou atomes présents dans l'échantillon étudié. Pour arriver à ce résultat, on commence par transformer une très petite quantité du composé à analyser en ions par un moyen adapté (bombardement avec des électrons, des atomes, des photons...). Ces ions sont alors soumis,

sous un très bon vide, à l'action d'un champ électrique et /ou magnétique selon les cas. Les forces qui s'exercent sur ces ions permettent de déterminer leur rapport masse /charge, donc éventuellement leur nature. Cela se résume en quatre étapes qui sont :

VI.2.1. Ionisation : l'échantillon porté sous forme de gaz ou de vapeur est ionisé dans la source de l'appareil. De nombreux procédés sont utilisables pour cette première étape. À ce stade, tout composé formé de molécules conduit à un mélange statistique d'ions de fragmentation.

VI.2.2. Accélération : aussitôt formés, les ions sont extraits de cette partie de l'appareil, focalisés et accélérés par des lentilles électroniques, pour accroître leur énergie cinétique.

VI.2.3. Séparation : les ions sont alors « filtrés » suivant leur rapport masse/charge par l'analyseur, certains appareils combinant plusieurs types d'analyseurs en série.

VI.2.4. Détection : après séparation, les ions terminent leur course en venant frapper le capteur d'un détecteur dont le signal est proportionnel aux charges des ions reçus [54].

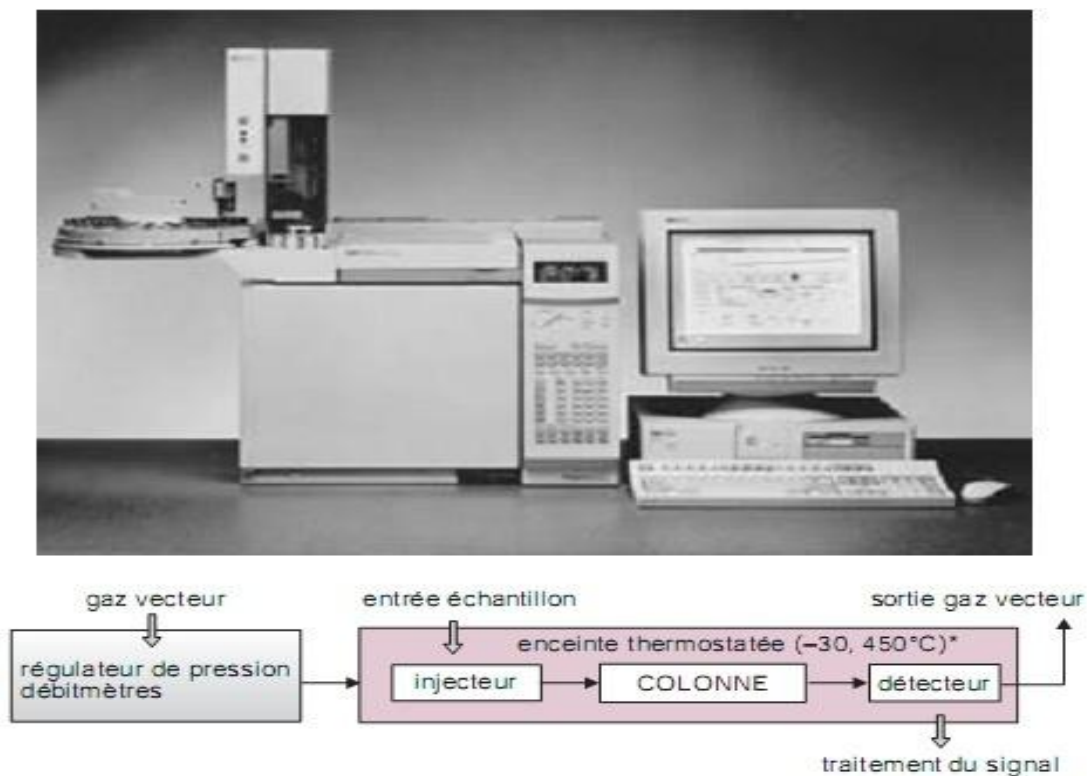


Figure VI.2.1. : Spectrometre de masse

VI.3. Couplage de la CPG a la SM

Une unité GC-MS est composée de deux blocs principaux: un chromatographe en phase gazeuse et un spectromètre de masse. Le chromatographe en phase gazeuse utilise une colonne capillaire qui dépend des dimensions de la colonne (longueur, diamètre, épaisseur du film) ainsi que les propriétés de la phase. La différence des propriétés chimiques entre les différentes molécules dans un échantillon les sépare quand celui-ci se déplace le long de la colonne. Les molécules prennent différents temps (appelé temps de rétention) pour sortir (éluer) du chromatographe en phase gazeuse, ce qui permet au spectromètre de masse en aval de capturer, ioniser, accélérer, dévier et de détecter les molécules ionisées séparément. Le spectromètre de masse brise pour cela chaque molécule en fragments ionisés et détecte ces fragments en fonction de leur rapport masse sur charge.

Ces deux composantes utilisées ensemble, permettent à un degré beaucoup plus fin, l'identification d'une substance que chaque unité utilisée séparément [55].

PARTIE III

Résultats et discussion

I. Dosage des polyphénols totaux

Ce dosage a été effectué afin d'estimer la quantité de polyphénols totaux présent dans les différentes parties du fruit, et cela va nous permettre dans le cas de notre étude, de savoir dans un premier temps si c'est une source intéressante de polyphénols qu'on pourrait exploiter par la suite.

Nous avons procédé au dosage de tous les extraits du fruit à l'aide de la méthode du Folin-Ciocalteu qui a mené à ces résultats :

I.1. Courbe d'étalonnage

Tableau N° 3 : DO en fonction des différentes concentrations

C (mg/l)	10	50	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
DO	0,009	0,058	0,107	0,191	0,272	0,366	0,43	0,564	0,6	0,69	0,728	0,813

I.2. Extraits de la 1^{ère} Méthode d'extraction

En se référant à la courbe d'étalonnage se trouvant en annexe on obtient les résultats suivants :

Tableau N°4 : Concentration de polyphénols (Extraits 1^{ère} méthode)

C (mg/l)	Graines	Fruit
Concentration en polyphénols totaux	17,5	150

I.3. Extraits de la 2^{ème} Méthode d'extraction

Tableau N°5 : Concentration de polyphénols (Extraits 2^{ème} méthode)

	Graines	Fruit
C (mg/l) Aglycones	146,25	138,75
C (mg/l) Flavonoïdes glucosés	53,75	117,5
C (mg/l) Flavonoïdes polaires	42,50	147,5

Remarque : Les Aglycone, les Flavonoïdes glucosés et les Flavonoïdes polaires sont tous issues de la famille des polyphénols.

I.4. Discussion et interprétations des résultats

-Dans le premier tableau on remarque que la quantité de polyphénols est plus élevée dans le fruit que celle dans les graines.

-Dans le deuxième tableau on voit que la concentration des polyphenols totaux dans la première partie (c'est-à-dire celle des Aglycones) est presque la même, par contre pour la deuxième et troisième partie (Glycosides et Flavonoïdes polaires), elle est plus élevée dans le fruit que dans les graines.

I.5. Comparaison des résultats

Dans le but d'avoir un ordre de grandeur des résultats obtenus, nous nous sommes proposé de comparer ces derniers avec la concentration des polyphénols totaux dans une autre plante étudié au préalable, et qui est le Romarin.

Tableau N°6 : Teneur en polyphénols des extraits du romarin [56]

Extraits	Concentration en polyphénols (mg/l)
1^{er} extrait (Methanol)	195,45
2^{eme} extait (Acétat d'éthyle)	541,82
3^{eme} extrait (Butanol)	539,39

A partir de ces résultats nous remarquons que malgré une concentration des polyphénols dans le *Maclura pomifera* plus faible que celle retrouvée dans le Romarin, il est quand même intéressant de considérer le *Malcura pomifera* comme étant une source non négligeable de polyphénols qui pourront être utilisés comme additifs alimentaire ou même dans l'industrie pharmaceutique. Et il n'existe pas de restriction quand à l'exploitation intensif de ce fruit du fait qu'il n'est consommé ni par les humains ni même par les animaux.

Et aussi afin d'extraire le maximum de polyphnols à partir du fruit il serait préférable de faire une extraction avec de l'hexane, par contre pour extraire le plus de polyphnols dans les graines, il faudrait mieux procéder a une extraction avec du méthanol puis une séparation avec le chloroforme pour éliminer les lipides et les chlorophylles.

II. Caractérisation des Flavonoïdes par CG-SM

Dans le but d'identifier une large gamme de Flavonoïdes présents dans le fruit de *Maclura pomifera*, les extraits du fruit ont été analysés via une technique chromatographique qui est la CG-SM

II.1. Résultat du 1^{er} extrait : Partie Aglycones du fruit

Le tableau ci-dessous résume les pics les plus représentatifs obtenus pour les différents temps de rétentions :

Tableau N°7 : Résultats de la CG-SM pour le premier extrait

Pics	T .R (min)	1 ^{er} scan	Max scan	Dernier scan	PK RY	Hauteur du pic	Corr. surface	Corr. % max	% of total
1	40,943	7747	7856	7857	BV2	4379800	471166016	20.07	14.000
2	41,530	7857	7978	7982	VV3	7969356	2347247659	100.00	69.747
3	41,603	7982	7993	8001	VV3	8212135	380869684	16.23	11.317

A partir des résultats de la spectrométrie de masse concernant la probabilité qu'un pic corresponde à une molécule bien déterminée, on voit que les 3 pics correspondent à la même famille de molécules, les phtalate,

II.1.1. Les phtalates :

Les **phtalates** sont un groupe de produits chimiques dérivés (sels ou esters) de l'acide phtalique. Ils sont donc composés d'un noyau benzénique et de deux groupements carboxylates placés en ortho et dont la taille de la chaîne alkyle peut varier. Les phtalates sont couramment utilisés comme plastifiants des matières plastiques (en particulier du PVC, pour former par exemple des plastisols) pour les rendre souples. Ils rentrent, sous la forme de téraphtalate, dans la composition du PET.

Comme tous les composés de la famille des phtalates, ils sont considérés comme étant des perturbateurs endocriniens qui diminuent la synthèse de la testostérone [57].

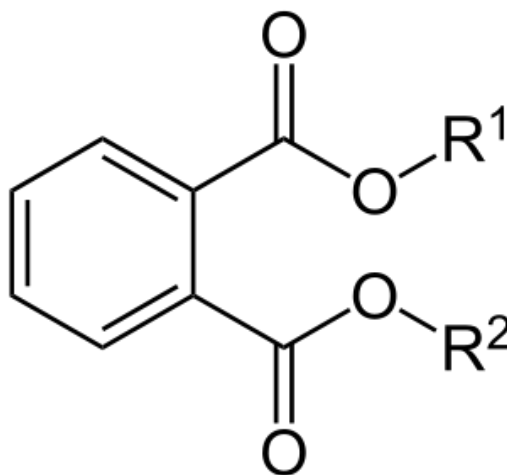


Figure II.1.1.1. : Formule topologique du phtalate

La présence des phtalates est pour la majeure partie due à l'équipement analytique ainsi qu'aux solvants utilisés durant les manipulations.

En effet, les couvercles (et les bouchons) des différents solvants ainsi que les gants en Latex, contiennent une proportion assez élevée de phtalate et ces derniers sont très toxiques et peuvent nuire à la santé de l'homme et aussi à l'environnement.

Par conséquent, il serait préférable de porter une attention assez particulière quant à la façon dont sont conservés les extraits, et aussi aux types de solvants organiques utilisés durant les extractions, car ces derniers ont pour effet de solubiliser ces groupes de composés (les phtalates) ce qui implique la contamination des extraits et donc qui sans doute va mener à des résultats inexploitable.

II.2. Résultat du 2^{ème} extrait : Partie des Glycosides du fruit

Le tableau ci-dessous résume les pics les plus représentatifs obtenus pour les différents temps de rétentions :

Tableau N°8 : Résultats de la CG-SM pour le deuxième extrait

Pics	T.R (min)	1 ^{er} scan	Max scan	Dernier scan	PK RY	Hauteur du pic	Corr. surface	Corr. % max	% of total
1	41,116	7850	7892	7893	VV	5458741	564886966	98	16,020
2	41,150	7893	7901	7901	VV2	5693715	135466517	23,50	3,842
3	41,266	7901	7933	7933	VV	6725275	576375954	100,00	16,346
4	41,478	7954	7969	7969	VV3	7540616	320970187	55,69	9,103

Comme pour l'extrait précédent, tous les pics correspondent aux phtalates.

II.3. Résultat du 3^{eme} extrait : Partie des Flavonoïdes polaires

Tableau N°9: Résultats de la CG-SM pour le troisième extrait

Pics	T.R (min)	1 ^{er} scan	Max scan	Dernier scan	PK RY	Hauteur du pic	Corr. surface	Corr. %max	% of total
1	3,907	145	170	VV	9512127	9512127	351013840	61.76	28.79
2	3,946	175	178	VV	9540687	9540687	568326651	100	46.61
3	5,387	465	477	VV	4501644	4501644	103537915	18.22	8.49

A partir des résultats de la spectrométrie de masse concernant la probabilité qu'un pic corresponde a une molécule bien déterminé, on voit que les 3 pics correspondent à la même molécule qui est le Cyclotetrasiloxane, octamethyl.

II.3.1. Le Cyclotetrasiloxane, octamethyl

Formule brute : C₈H₂₄O₄Si₄.

Densité : 0,956 et il est insoluble dans l'eau

Poids moléculaire : 296.6 g/mol

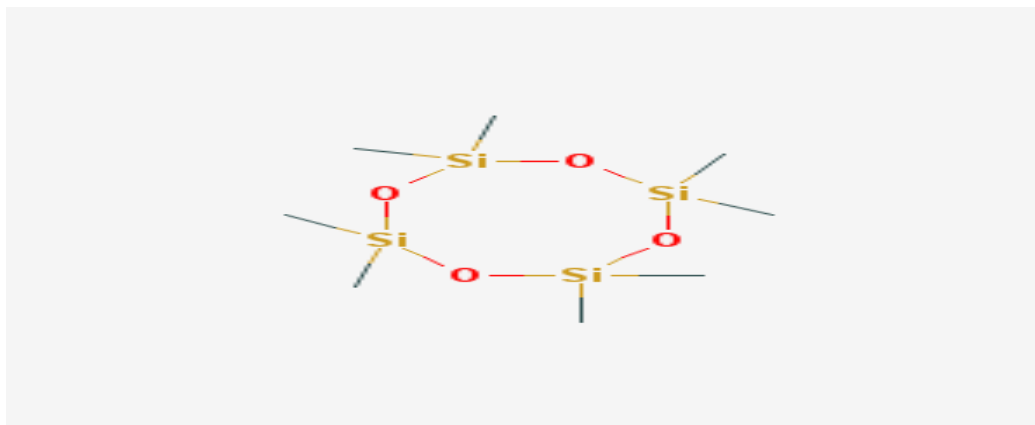


Figure II.3.1.1. : Formule topologique du Cyclotetrasiloxane, octamethyl

C'est une substance qui a le pouvoir d'augmenter, de stimuler, d'activer et même de moduler la réponse immunitaire au niveau cellulaire ou hormonale, et elle contient des antigènes bactériens Leur mode d'action est soit non spécifique, entraînant une augmentation de la réponse immunitaire à une grande variété d'antigènes, ou antigène spécifique, à savoir, affectant un type restreint de la réponse immunitaire à un groupe restreint d'antigènes [59].

A partir des résultats de la CG-SM, nous avons constaté que le *Maclura pomifera* est une bonne source de Cyclotetrasiloxane, octamethyl qui ont un effet thérapeutique très intéressant, et de multiples application dans le domaine médicale, et l'intérêt majeure réside dans le fait que c'est des molécules d'origine végétale et par conséquent, éviter d'aller vers la synthèse chimique de ces molécules.

II.4. Résultat du 4^{ème} extrait : Partie extraite avec de l'hexane

Tableau N°10 : Résultats de la CG-SM pour le quatrième extrait

Peak	R.T.(min)	First scan	Max scan	Last scan	PK RY	Peak height	Corr. area	Corr. % max	% of total
1	29.021	5328	5382	5402	BV 4	109777	5236226	30.51%	15.631%
3	59.792	11713	11768	11804	VV 8	190269	17161684	100.00%	51.232%

A partir des résultats de la spectromètre de masse concernant la probabilité qu'un pic corresponde à une molécule bien déterminé, on voit que le 1^{er} pic correspond au : **2(3H)-Furanone, 5-dodecyldihydro-** et que le 2^{eme} pic correspond au : **9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.)**.

II.4.1. 1^{ere} Molécule (2(3H)-Furanone, 5-dodecyldihydro-)

-Formule brute : C₁₆H₃₀O₂

-Poids moléculaire : 254.4 g/mole

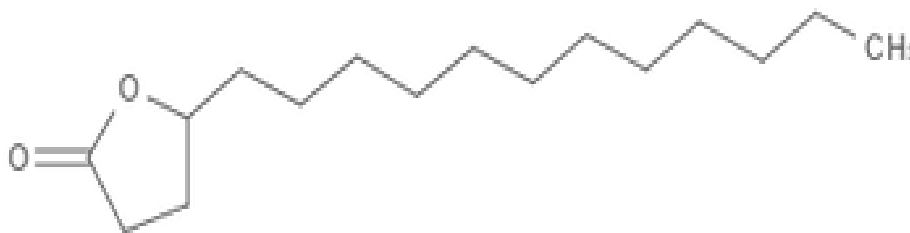


Figure II.4.1.1. : Formule topologique du 2(3H)-Furanone, 5-dodecyldihydro

Issues de la famille des Furanones, ils sont utilisés pour réguler la colonisation bactérienne et aussi comme inhibiteur de bactéries se sont aussi des anti-infectieux puissants et inhibent les phénotypes pathogènes chez les bactéries à Gram négatif et Gram positif comme il a été démontré *in vitro* en utilisant des puces de gènes, et *in-vivo* en utilisant des modèles de souris [59].

II.4.2. 2^{eme} Molécule 9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.)

-Formule brute : C₃₂H₅₂O₂.

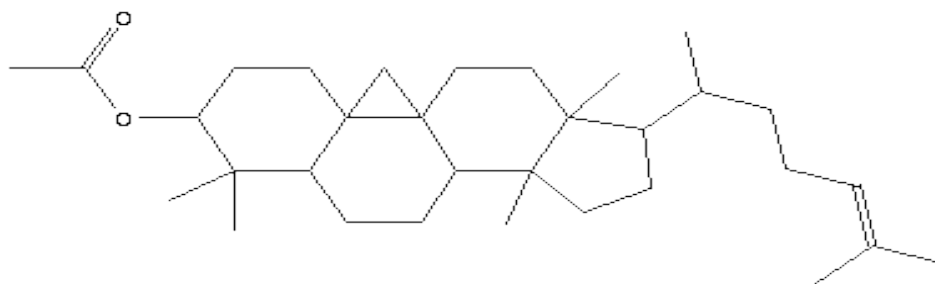


Figure II.4.2.1. : Formule topologique du 9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.)

Issues de la famille des stanols végétaux, ils permettent d'abaisser le taux de cholestérol sanguin en bloquant partiellement l'absorption de cholestérol dans l'intestin, et leurs effet se cumulent à celui d'autres stratégies comme un régime alimentaire pauvre en matière grasse.

D'autres études ont par ailleurs démontré qu'il était possible de faire baisser le cholestérol sanguin en ingérant 1 à 3g de stérols ou de stanols végétaux par jour [58].

Les résultats obtenus pour cet extrait sont très significatifs, car les différentes molécules obtenues ont une application dans le domaine de l'industrie (1^{ère} molécule) et une application thérapeutique et médicale (2^{ème} molécule), de ce fait on pourrait considérer le *Maclura Pomifera* comme étant une source assez intéressante de biomolécules qui peuvent être utilisés dans divers secteurs des biotechnologies.

Conclusion Générale

L'objectif de ce travail visait à extraire et à caractériser des biomolécules qui peuvent présenter un intérêt à partir des fruits du *Maclura pomifera*. On s'est intéressés plus précisément aux flavonoïdes qui sont des composés polyphénoliques

Les résultats obtenus concernant la teneur en polyphénols sont assez significatifs et en moyenne on a obtenue une teneur de 140mg de polyphénols/l dans le fruit c'est pour cela qu'il est intéressant de considérer le fruit du *Maclura pomifera* comme étant une bonne source de polyphénols naturels.

Par contre certains résultats de l'analyse par CG-SM ont révélé la présence de phtalates qui sont considérés comme étant des contaminants. Cela serait dû essentiellement aux conditions de conservation, et à la présence de matières plastiques dans les bouchons des flacons utilisés pour stocker les échantillons, et qui sont solubilisés par les solvants. Néanmoins un des extrait a donné des résultats exploitables, la CG-SM a mis en évidence la présence de trois biomolécules qui sont : **Le Cyclotetrasiloxane, octamethyl,**

Le 2(3H)-Furanone, 5-dodecyldihydro-

Le 9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.).

D'après la littérature, ces biomolécules ont des propriétés biologiques intéressantes. Le **Cyclotetrasiloxane, octamethyl** a le pouvoir de stimuler et même de moduler la réponse immunitaire, le **2(3H)-Furanone, 5-dodecyldihydro-** possède une activité antibactérienne.

Et en ce qui concerne le **9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.)** il a été prouvé que ce groupement de biomolécules avait la capacité d'abaisser le taux de cholestérol.

En conclusion, ce travail a montré l'intérêt que le fruit du *Maclura pomifera* pouvait présenter dans le domaine pharmaceutique.

Cependant il faudrait essayer de trouver d'autres méthodes d'extraction qui nécessitent pas l'utilisation de solvant organique qui sont des très forts polluants et nocifs à la santé humaine.

Cette étude, loin d'être achevée a permis d'avoir un aperçu concernant la composition en biomolécules du fruit du *Maclura pomifera*.

En outre, ce travail ouvre la voie à de futures recherches, dans le domaine de l'extraction de biomolécules et leurs utilisations dans le domaine pharmaceutique.

I. Dosage des polyphénols

Avant de commencer l'extraction solide-liquide, nous devons maitre au point une méthode de dosage des composés phénoliques. Nous avons choisi d'utiliser, une méthode colorimétrique de FOLIN CIOCALTEU citée dans tous les travaux et publications sur les composés phénoliques.

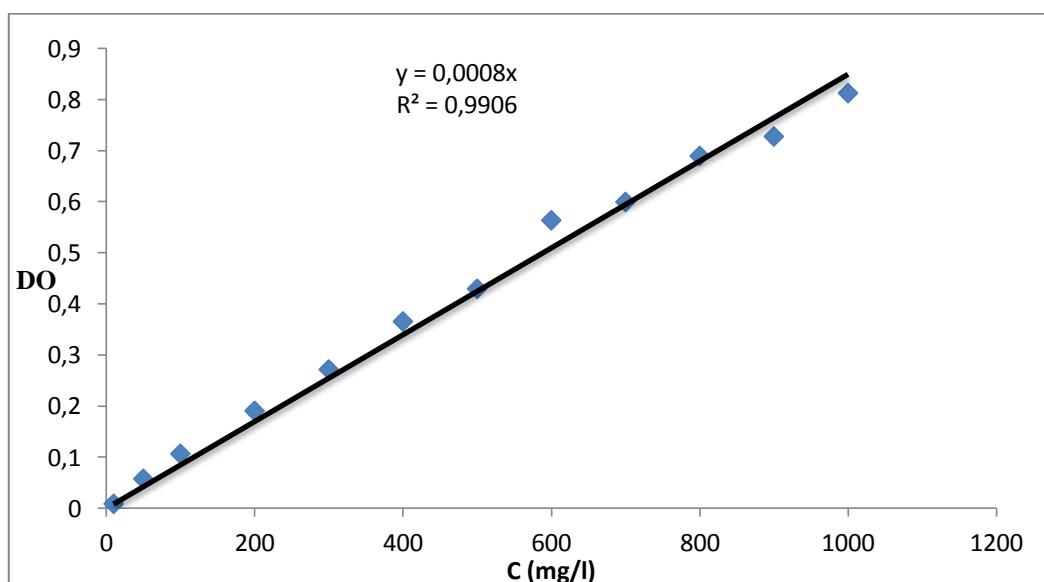
Réactifs employés :

1. Réactif de FOLIN-CIOCALTEU.
2. Na₂CO₃ 4.25%.

Mode opératoire :

1. On verse dans un erlenmeyer :
0.2 mL d'échantillon dilué autant de fois qu'il est nécessaire.
1 mL de réactif de FOLIN-CIOCALTEU.
20 mL Na₂CO₃ 4.25%
2. Agiter, verser dans un tube à essais.
3. Porter au bain-marie à 70°C pendant 20 mn.
4. Refroidir sous un courant d'eau froide.
5. Analyser au spectromètre à 760 nm par rapport à une solution témoin (eau distillée)

Courbe d'étalonnage :



II. Conditions opératoires GC/MS

Injecteur

Température : **250°C**

Mode d'injection : splitless (sans division)

Volume injecté : **1 ul**

Colonne

Type : hp-5MS

Dimensions : long 30m * D int 0,25 mm * épaisseur film 0.25 µm

Phase stationnaire : (5%-phenyl) méthylpolysiloxane

Température du four : 80 (2 min) palier 20°/min jusqu'à 170(15min) palier 4°/min jsq 280(15min).

Gaz vecteur : Hélium pur 99,9998 %

Débit GV : 1.0 ml/min

Spectromètre de masse

Mode d'analyse : SCAN (34-550)

Température de l'interface : 280 °c

Type d'ionisation : électronique

Intensité du filament : 70 év

Type de l'analyseur de masse : Quadripôle

Température du quadripôle : 150 °c

Température de la source : 230 °c

Vide : 39 m torr

- [1] **Wolfrom, M.L., Bhat, H.B., 1965.** Osage orange pigments—VII. 1,3,6,7-
- [2] Tetrahydroxyxanthone from the heartwood. *Phytochemistry* 4, 765–768.
- [3] : **Carlson, G.G., Volney, H.J., 1940.** Some notes on uses of plants by the Comanche Indians. *Papers of the Michigan Academy of Science, Arts and Letters* 25, 517–542.
- [4] : **Bourdy, G., de Michel, L.R.C., Roca-Coulhard, A., 2004.** Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceno–Guarani (Bolivian Chaco). *Journal of Ethnopharmacology* 91, 189–208.
- [5] **Elvin-Lewis, M., Hall, J.B., Adut-Tutu, M., Afful, Y., Asante-Appiah, K., Lieberman, D., 1980.** The dental health of chewing stick users in Southern Ghana: preliminary findings. *Journal of Preventive Dentistry* 6, 151–159.
- [6] **Peterson, C.F., Brockmeyer, E.W., 1953.** The antifungal activity of an aqueous extract of osage orangewood. *American Journal of Pharmaceutical Sciences for Support Public Health* 125, 303–310.
- [7] **Jones, J.M., Soderberg, F., 1979.** Cytotoxicity of lymphoid cells induced by *Maclura pomifera* (MP) lectin. *Cellular Immunology* 42, 319–326.
- [8] : **Wagner, J.G., Harris, L.E., 1952.** A phytochemical investigation of the fruit of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneider. III. Color tests, paper chromatography, and infrared spectra of lurenol, lupeol and their derivatives. *Journal of American Pharmacist Association (Baltin)* 41, 500–504.
- [9] **Ulevitch, R.J., Jones, J.M., Feldman, J.D., 1974.** Isolation and characterization of *Maclura pomifera* (MP) lectin. *Preparative Biochemistry* 4, 273–281.
- [10] http://www.plantes-botanique.org/famille_moraceae
- [11] **Bahorun, T. (1997)** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. *Food and agricultural research council, Réduit, Mauritius.* 83-94.
- [12] **Martin S., Andriantsitohaina R. (2002)** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l’endothélium. *Annales de cardiologie et d’angéiologie.* **51:** 304-315.
- [13] **Dacosta, E. (2003)** Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 317p.
- [14] **Babar Ali, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2007)** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules.* **12:** 607-621
- [15] **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008)** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies.* **331:** 372-379.

- [16] Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **41**: 1220-1234.
- [17] Lhuillier, A. (2007) Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Toulouse.
- [18] *Annales Pharmaceutiques Françaises*, Volume **69**, Issue 2, March 2011, Pages 78-90
J.-C. Stoclet, V. Schini-Kerth
- [19] Hattori, S., 1962 Glycosides of flavones and flavonols, in *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, Geissman, T.A., Ed., Pergamon Press, Oxford, 1962, chapter 11
- [20] Bouakaz, I., 2006. Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna.
- [21] Milane, H., (2004) La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg.
- [22] Bruneton, J. (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, 575p.
- [23] Parmar, N.S., Ghosh, M. N. (1980) Current trends in flavonoid research. *Ind. J. Pharmacol.*12:213-228.
- [24] Ramassamy, C., (2006) Emerging role of polyphenolic compounds in treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *European J Pharmacology*.545: 51-64
- [25] Tieppo, J., Vercelino, R., Dias, A.S., Silva Vaz, M.F., Silveira, T.R., Marroni, C.A., Marroni, N.P., Henriques, J.A.P., Picada, J.N. (2007) Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food and Chemical Toxicology*. 45: 1140-1146.
- [26] Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Golino, A., Mastellone, C., Oriano, P., Monaco, P. (2007) Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Flavone Glycosides from *Melilotus neapolitana*. *Molecules*. 12: 263-270.
- [27] Peterson, J.; Dwyer, J.1998 Flavonoids : dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr. Res*. 1998, 18(12), 1995-2018.
- [28] Formica, J.V.; Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol*. 1995, 33(12), 1061-1080.
- [29] Druyne T. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol*. 1999, 27 (4): 445-59.

- [30] **Mompon, B.; Lemaire, B.; Mengal, P.; Surbled, M.** In *Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle*, Polyphenols, Bordeaux, 15-18 juillet 1996, Bordeaux.
- [31] **Saidman, E.; Yurquina, A.; Rudyk, R.; Molina, M. A. A.; Ferretti, F. H.**, A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2002**, 585, (1-3), 1-13.
- [32] **Zhai, H.; Maibach, H.**, Skin antioxidants. *Cosmetics & Toiletries* **2002**, 117, 28-32.
- [33] **Saliou, C.; Kitazawa, M.; McLaughlin, L.; Yang, J.-P.; Lodge, J. K.; Tetsuka, T.; Iwasaki, K.; Cillard, J.; Okamoto, T.; Packer, L.**, Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, 26, (1-2), 174-183.
- [34] **Tommasini, S.; Raneri, D.; Ficarra, R.; Calabro, M. L.; Stancanelli, R.; Ficarra, P.**, Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with [beta]-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, 35, (2), 379-387.
- [35] **Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. (2002)** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*. **139**: 1-21.
- [36] **Chen HQ, Jin ZY, Wang XJ, Xu XM, Deng L, Zhao JW.** Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neurosci. Lett.* 2008, 448 (2): 175-9.
- [37] **Xu, Y.C., Leung, S.W.S., Yeung, D.K.Y., Hu, L.H., Chen, G.H., Che, C.M., Man, R.Y.K., (2007)** Structure- activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry*. **68**: 1179-1188.
- [38] **Bérubé-Gagnon, J. (2006)** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Quebec
- [39] **Sukhdev Swami Handa et [al] (2008)** *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International center for science and high technology*
- [40] **J. LEYBROOS et P. FREMEAUX.** « Extraction solide-liquide ». Technique de l'ingénieur. Paris. J 2780, 1990.
- [41] **A. LALOU.** Mise au point d'un procédé d'extraction des hémicellulose à partir d'un substrat végétal lingo-cellulosique : application au cas des coques de tournesol. Thèse de doctorat, Institut Nationale Polytechnique de Toulouse, 1995.
- [42] **J. LEYBROOS et P. FREMEAUX.** « Extraction solide-liquide ». Technique de l'ingénieur. Paris. J 2780, 1990

- [43] **J.M, AGUIERA ; 2003.** Solid-liquid extraction. Food Sciences and Technology, 128, pp 35-55.
- [44] **H,Iboukhoulef. S,Meziane. H, Kadi; 2006.** Influence du carbonate de sodium anhydre sur l'extraction de l'huile à partir d'un grignon d'olive humide. Déchets Sciences et technique, 42,29-31.
- [45] **S,Meziane. H, Kadi. O, Lamrous; 2006.** Kinetics study of oil extraction from olive; foot cake. Grasas Y Aceites, 57 (2), 175-179.
- [46] **S,Meziane. H, Kadi; 2008.** Kinetics and thermodynamivs of oil extraction from olive cake. J Am Oil Chem Soc, DOI 10.1007/s 11746-008-1205-2.
- [47].**W, Becker. A-G, Mckee; 1978.** Solvent extraction of soybeans IV. The effect of temperature on extraction rate. Journal of the American oil chemist's society, 55,754,761.
- [48] **D. C., Escil, I., Supérieure, É., & Industrielle, D. C. (n.d.).** Extraction solide-liquide Aspects théoriques. *Techniques*, 1-22.
- [49] **J. A-F, Ramos. L-J, Huesa; 1969.** Generalidades sobre la extraccion del aceite del orulo de aceituna mediante dissolventes. Grasas yaceites, 20(2), 85-94.
- [50] **J. A-F, Ramos. L-J, Huesa; 1970.** Generalidades sobre la extraccion del aceite del orulo de aceituna mediante dissolventes. Grasas yaceites, 20(2), 81-85.
- [51] **J.S, Kmiecziak. S, Meziane. H, Kadi. R, Moussaoui; 1991.** Oil extraction from olive foot cake with acide hexane. Grasas yaceites, 42(1), 246-249.
- [52] **P. TRAMBOUZ et J.P. WAUQUIER.** « Le développement des procédés de raffinage et pétrochimie ». Ed technip, 1975
- [53] **I. JULIEN et G. GAVEND.** « Le cuir origine et fabrication ». Centre technique de cuir, 1980
- [54] **Rouessac, F. ;Cruché, D. 2007.** *Analyse chimique, Methodes et techniques instrumentales modernes. Edition DUNOD.)*
- [55] **Roland S. Gohlke,** « *Time-of-Flight Mass Spectrometry and Gas-Liquid Partition Chromatography* », Analytical Chemistry, vol. 31, n° 4, avril 1959, p. 535-541 (ISSN 0003-2700)
- [56] **ATHAMENA, S., 2009.** Etude quantitative des flavonoides des graines de cumin *Cuminum cyminum* et les feuilles de *rosmarinus officinalis* et l'évaluation de la l'activité biologique. Mémoire de magister. Batna.

Références bibliographiques

[57] Les phtalates : état des connaissances sur la toxicité et l'exposition de la population générale [archive communiqué de veille toxicologique, Institut national de santé publique du Québec, 7 janvier 2004.

[58] **De Jong, Plat, J and Mensink, RP (2003)** Metabolic effects of plant sterols and stanols (review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14: 362-9.

[59] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

ملخص

البحث عن جزيئات حيوية جديدة و توظيفها في مجال الصناعات الدوائية و اللتي هي في تطور مستمر و الهدف من عملنا هو استخراج و وصف الجزيئات حيوية من ثمرة ماكلورا بوميفيرا و سنهتم خاصة البونيفينول و الفلافونويد في المخبر اجرينا التجارب الاستخراج بمذيبات مختلفة تليها جرعة من مادة البونيفينول باستخدام طرق التلوين و تحديد وصف الجزيئات الحيوية الموجودة عن طريق اللوني للغاز بالإضافة الي مطياف الكتلة التحليلات كشفت عن وجود الجزيئات الحيوية اللتي قد تكون ذات فائدة في مجال الصناعات الدوائية و كذلك تركيزات مثيرة للاهتمام من مادة البونيفينول

كلمات جوهرية

جزيئات حيوية من ثمرة ماكلورا بوميفيرا البونيفينول و الفلافونويد

Résumé :

La recherche de nouvelles biomolécules et la synthèse de celles-ci en vue de leurs applications dans le domaine pharmaceutique est un secteur en plein essors.

Le but de notre travail consiste à extraire et caractériser des biomolécules à partir du fruit du *Maclura pomifera*, et plus précisément les polyphénols et les flavonoïdes, pour ce fait, nous avons procédé à des extractions avec différents solvant suivies d'un dosage des polyphenols à l'aide d'une méthode colorimétrique et d'une identification des biomolécules présentes à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS). Les analyses ont révélé la présence de biomolécules qui peuvent présenter un intérêt dans le domaine pharmaceutique, ainsi que des concentrations intéressantes en polyphenols.

Mots clés : Biomolécules, *Maclura Pomifera*, Polyphénols, Flavonoïdes.

Abstracts:

The search for new molecules and the synthesis for their applications in the pharmaceutical industry is a rapidly booms. The aim of our work is to extract and characterize a biomolecule from *Maclura pomifera*, specifically polyphenols and flavonoids, in fact, we conducted two extraction technics with different solvent, The characterization was made using a colorimetric method (Folin Ciocalteu) and a gas phase chromatographic method coupled to mass spectrometry

Keywords: Biomoleculs, *Maclura pomifera*, Polyphenols, Flavonoids,