

75 147874

-UNIVERSITE DE METZ-

ECOLE DOCTORALE
-BIOLOGIE, SANTE, ENVIRONNEMENT-

THESE

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	20030125
Date	S/MZ 03/04
Loc	

Présentée pour l'obtention du

Diplôme DE DOCTORAT

Mention : Sciences de la vie

par

Farid KHALLOUKI

Titulaire du Diplôme des études supérieures
de 3^{ème} Cycle de chimie

**RECHERCHE DE SUBSTANCES NATURELLES AUX VERTUS
CHIMIOPROTECTRICES
CONTRIBUTION A L'ETUDE ETHNOBOTANIQUE ET
PHYTOCHIMIQUE DE TROIS PLANTES MEDICINALES
AFRICAINES A PROFILS ANTIRADICALAIRES**

Soutenu publiquement le : 27 Mai 2003

Devant le Jury composé de :

H. BECKER	Professeur	Université Saarlande	Allemagne	Rapporteur et Président
R. VERPOORTE	Professeur	Université Leiden,	Pays bas	Rapporteur
R. W. OWEN	Docteur	German Cancer Research Center	Allemagne	Examinateur
A. DICKO	Professeur	Université Metz	France	Examinateur
Z. CHARROUF	Professeur	Université Rabat	Maroc	Examinateur
R. SOULIMANI	Docteur	Université Metz	France	Co-Encadrant
C. YOUNOS	Professeur	Université Metz	France	Directeur de thèse

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 486031 0



AVERTISSEMENT

Cette thèse est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et disponible à l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Elle est soumise à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation, de référencement dans la rédaction de tous vos documents.

D'autre part, toutes contrefaçons, plagiat, reproductions illicites entraînent une poursuite pénale. Enfin, l'autorisation de diffusion a été accordée jusqu'à nouvel ordre.

➤ **Contact SCD Metz** : daniel.michel@scd.univ-metz.fr

CPI articles L 122. 4

CPI articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecrire au du doctorant : prénom.nom@.....fr

-UNIVERSITE DE METZ-
ECOLE DOCTORALE
-BIOLOGIE, SANTE, ENVIRONNEMENT-

THESE

Présentée pour l'obtention du

Diplôme DE DOCTORAT

Mention : Sciences de la vie

par

Farid KHALLOUKI

Titulaire du Diplôme des études supérieures
de 3^{ème} Cycle de chimie

**RECHERCHE DE SUBSTANCES NATURELLES AUX VERTUS
CHIMIOPROTECTRICES
CONTRIBUTION A L'ETUDE ETHNOBOTANIQUE ET
PHYTOCHIMIQUE DE TROIS PLANTES MEDICINALES
AFRICAINES A PROFILS ANTIRADICALAIRES**

Soutenu publiquement le : 27 Mai 2003

Devant le Jury composé de :

H. BECKER	Professeur	Université Saarlande	Allemagne	Rapporteur et Président
R. VERPOORTE	Professeur	Université Leiden,	Pays bas	Rapporteur
R. W. OWEN	Docteur	German Cancer Research Center	Allemagne	Examineur
A. DICKO	Professeur	Université Metz	France	Examineur
Z. CHARROUF	Professeur	Université Rabat	Maroc	Examineur
R. SOULIMANI	Docteur	Université Metz	France	Co-Encadrant
C. YOUNOS	Professeur	Université Metz	France	Directeur de thèse

Je dédie ce Travail

➤ A mes Chers Parents,
pour leurs sacrifices et leur patience

➤ A mes Chers Frères,
pour leur soutien moral.

➤ A mes Chers Amis.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe "Ethnobotanique et Pharmacologie" du Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et de Biochimie Pharmacologique de l'Université de Metz, sous la direction du professeur Chaffique Younos et de M. Rachid Soulimani.

J'aimerais tout d'abord remercier le professeur Younos pour m'avoir accepté dans son groupe et de m'avoir offert l'opportunité d'élargir mes connaissances en ethnobotanique. Il m'a aussi laissé la possibilité de créer des collaborations étroites qui ont permis la réalisation de ce travail.

J'aimerais également remercier le Dr Rachid Soulimani pour ses connaissances riches dans le domaine pharmacologique, pour son savoir-faire et sa bonne humeur.

Je tiens également à remercier :

Les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail :

Monsieur le professeur Hans Becker de l'Université de Saarbrücken en Allemagne. Vous nous faites l'honneur de juger ce travail, qu'il nous soit permis de vous exprimer notre profonde gratitude.

Monsieur le professeur Robert Verpoorte de l'Université de Leiden au Pays-Bas. Nous sommes heureux de soumettre ce travail à votre jugement, nous vous remercions d'avoir accepté de le juger. Veuillez trouver ici le témoignage de notre grande estime.

Monsieur le professeur Amadou Dicko de l'Université de Metz. Nous vous remercions de nous faire l'honneur de siéger dans notre Jury de Thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de notre grande estime.

Madame, le professeur Zoubida Charrouf. Nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre grande estime.

Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans l'aide précieuse de certains collaborateurs et collègues que je tiens vivement à remercier :

Le professeur Robert Whyne Owen pour ses conseils avisés en chromatographie et ses discussions riches en spectrométrie de masse. J'aimerais par la même occasion remercier son groupe et particulièrement Ulricke Knust, Roswitha Haubner et Guerthe Würtele pour leur aide, leur patience et leur joie de vivre.

Le Dr Williams Hulls du service de spectroscopie au Deutsch Krebs Forschung Zentrum à Heidelberg en Allemagne. Je le remercie pour les discussions passionnantes sur les dépouillements de mes spectres qu'il n'a pas hésité à me faire partager.

Monsieur Jean Marie Bessière, pour sa gentillesse, ses conseils avisés et sa disponibilité.

Le professeur Gilbert Kirsch, directeur de notre Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et de Biochimie Pharmacologique : en hommage respectueux

Madame le professeur Denise Bagrel, pour son attention, sa rigueur et les facilités qu'elle a mises à notre disposition, plus particulièrement, le spectrofluorimètre Kontron SFM 25.

Qu'il nous soit permis de lui témoigner notre très sincère admiration.

Le groupe du professeur François Muller du Laboratoire de chimie du laser et de la spectrométrie de masse pour tous les moments passés ensemble.

Je remercie Konda-Ku Augustin pour le recueil des données ethnobotaniques, la collecte et l'identification de 14 plantes congolaises sélectionnées et dont deux ont fait l'objet d'études approfondies dans notre travail.

Le Docteur Salah Jarmouni pour son amitié, son entrain et pour le fait qu'elle ne m'en veuille pas trop d'être dans certaines circonstances en mauvaise humeur.

Je tiens aussi à remercier les différents membres du Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et de Biochimie Pharmacologique avec lesquels j'ai passé de bons moments.

J'adresse mes remerciements aussi à certains proches et amis qui n'ont pas participé scientifiquement à ce travail, mais qui ont partagé une grande partie de ma vie durant ces cinq années :

Ma famille pour sa gentillesse, son soutien moral et financier, sans laquelle je n'aurais certainement pas pu venir à bout de cette thèse.

Et finalement toutes les personnes que j'aurais malencontreusement oubliées mais à qui je témoigne tous mes remerciements.

PRINCIPALES ABBREVIATIONS

AOCS : American Oil Chemist Society

ATF : Acide trifluoroacétique

BHT: Butylhydroxytoluene

CC: Chromatographie sur Colonne

CCE: Chromatographie sur couche épaisse

CCM: Chromatographie sur couche mince

CH₃COOH: acide acétique

CH₃CN: Acétonitrile

CH₂Cl₂: Dichlorométhane

CD₃OD: Méthanol deutérié

CDCl₃: Chloroforme deutérié

CLHP: Chromatographie Liquide haute performance

COLOC: COrelated spectroscopy via LOngue range Coupling

COSY-LR: Long Range Correlated Spectroscopy

COSY ¹H-¹H: Correlated Spectroscopy

CPG: Chromatographie en phase gazeuse

DAD: Détecteur à barrettes de diodes (diode array detector)

DC: Dienes Conjuguées

DCM: Dichlorométhane

DHBA: Acide dihydroxybenzoïque

DL: Dose létale

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DMSO-d₆: Diméthylsulfoxyde deutérié

DO: Densité Optique

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EMAC: Extrait méthanolique d'*Annona cuneata*

EMAD: Extrait méthanolique d'*Anisophyllea dichostyla*

EMHA: Extrait méthanolique de l'huile d'argan alimentaire

EMHE: Extrait méthanolique de l'huile d'argan esthétique

ESI/MS: Electrospray Ionisation/Mass Spectrometry

GC/MS: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GLC: Chromatographie Gaz-Liquide

HP: Hewlett-Packard

HCOOH: Acide formique

HCl: Acide chlorhydrique

HMQC: ¹H detected chemicals shift correlation via Multiple Quantum Correlation

HMBC: ¹H detected chemicals shift correlation via Multiple Band Correlation

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
HX: Hypoxanthine

KCl: Chlorure de potassium
KH₂PO₄: Phosphate de potassium monobasique
K₂HPO₄: Phosphate de potassium dibasique
KI: Potassium Iodure

LC/MS : Chromatographie liquide couplée avec la spectrométrie de masse

MeOH: Méthanol
Min: minutes

NH₄SO₄: Sulfate d'ammonium
NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

Pav: p-anisidine values
PEG-4000: Polyethylene glycol-4000

RMN: Résonance magnétique nucléaire
ROESY: Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
RSD: Deviation relative standard

SDS: Sodium dodecyle sulfate
SIM: Single Ion monitoring
SI : Selected Ions en mode Scan

TBArS: Thiobarbituric acid réactif substances
TEP: TetraEthoxyPropane
Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride
TOCSY: Total Spectroscopy

Uma: Unité de masse atomique
UV: Ultraviolet

Vp: Valeurs des peroxides

XO: Xanthine oxidase

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : ETUDE ETHNOBOTANIQUE DES ESPECES SELECTIONNEES.....	5
I-1- <i>ANNONA CUNEATA</i> OLIV.	5
I-1-1- ETUDE ETHNOBOTANIQUE	5
I-1-2- DESCRIPTION BOTANIQUE.....	7
I-2 <i>ANISOPHYLLEA DICHOSTYLA</i> REYDER (BR.)	7
I-2-1- ETUDE ETHNOBOTANIQUE	7
I-2-2- DESCRIPTION BOTANIQUE.....	8
I-3- <i>ARGANIA SPINOSA</i> (SKEELS.) (L.)	8
I-3-1- ÉTUDE ETHNOBOTANIQUE	8
I-3-2- DÉSCRIPTION BOTANIQUE	12
CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES	14
II-1- MATÉRIEL VÉGÉTAL	14
II-1-1- POUR L'ÉTUDE D' <i>ANNONA CUNEATA</i>	14
II-1-2- POUR L'ÉTUDE D' <i>ANISOPHYLLEA DICHOSTYLA</i>	15
II-1-3- POUR L'ÉTUDE D' <i>ARGANIA SPINOSA</i>	16
II-2- SOLVANTS	17
II-3- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	17
II-3-1- SYSTÈMES	18
II-3-2- RÉVÉLATEURS.....	18
II-3-2-1- POUR LES DERIVÉS TERPÉNIQUES.....	18
II-3-2-2- POUR LES POLYPHÉNOLS	18
II-4- EXTRACTION.....	19
II-4-1- HYDRODISTILLATION.....	19
II-4-2- LIXIVIATION	20
II-4-3- EXTRACTION AU SOXHLET.....	20
II-4-4- LYOPHILISATION	20
II-5- SEPARATION ET ISOLEMENT	21

II-5-1- CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE À PRESSION ATMOSPHÉRIQUE	21
II-5-2- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE ÉPAISSE (C.C.E.)	21
II-5-3- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	22
II-5-3-1- CLHP SEMI-PREPARATIVE.....	22
II-5-3-2- CLHP ANALYTIQUE.....	23
II-5-3-3- PROGRAMME CLHP POUR L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE	23
II-6- TECHNIQUES D'IDENTIFICATION.....	26
II-6-1- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	
COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE	26
II-6-1-1- POUR LES HUILES ESSENTIELLES	26
II-6-1-2- POUR L'INSAPONIFIABLE DE L'HUILE D'ARGAN ET LES EXTRAITS MÉTHANOLIQUES DE L'HUILE D'ARGAN, D' <i>A. CUNEATA</i> ET D' <i>A. DICHOSTYLA</i>	26
II-6-2- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPÉCCTROMÉTRIE DE MASSE (LC/MS/DAD)	
.....	27
II-6-3- CHROMATOGRAPHIE CPG-FID (COLONNE REMPLIE).....	27
II-6-4- SPECTROMÉTRIE EN UV	28
II-6-5- RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE.....	28
II-7 CONTRÔLE PHYSICO-CHIMIQUES DES HUILES.....	29
II-7-1- HYDROLYSE ACIDE.....	29
II-7-2- INDICES DE CONTRÔLE DE L'OXYDATION DE L'HUILE D'ARGAN	30
II-7-2-1- DIÈNES CONJUGUÉES.....	30
II-7-2-2- VALEURS DES PEROXIDES	30
II-7-2-3- VALEURS DE PARANISIDINE	31
II-7-3- CALCUL DES INDICES DE KOVATS POUR L'IDENTIFICATION DES HUILES ESSENTIELLES	
.....	31
II-8- ACTIVITÉS ANTIRADICALAIRES.....	31
II-8-1- ETUDE DES TBARS PAR SPECTROFLUORIMÉTRIE.....	31
II-8-2- ETUDE DE LA CATALYSE DE LA XANTHINE OXIDASE PAR CLHP	32
II-8-3- DOSAGE QUANTITATIF DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DE LA FRACTION FARSAP UTILISANT LE MODÈLE DU β - CAROTENE.....	33
II-9- TOXICITÉ AIGUË DE L'HUILE D'ARGAN.....	34
II-10- STATISTIQUES.....	34
CHAPITRE III: INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE D' <i>ANNONA CUNEATA</i> OLIV	35
III-1- EXTRACTION	35

III-2- SEPARATION ET PURIFICATION	35
III-3- IDENTIFICATION	37
III-4- ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES	39
III-5- CONCLUSION.....	40
CHAPITRE IV : INVESTIGATION	
PHYTOCHIMIQUE D' <i>ANISOPHYLLEA DICHOSTYLA</i>	43
IV-1- EXTRACTION	43
IV-2- SÉPARATION ET PURIFICATION	43
IV-3- CARACTÉRISTIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTRALES (LC/MS/DAD) DES PRODUITS ISOLÉS	50
IV-3-1- COMPOSÉ ANIS ₁	51
IV-3-2- COMPOSÉ ANIS ₂	52
IV-3-3- COMPOSÉ ANIS ₃	52
IV-3-4- COMPOSÉ ANIS ₄	53
IV-3-5- COMPOSÉ ANIS ₅	53
IV-3-6- COMPOSÉ ANIS ₆	54
IV-3-7- COMPOSÉ ANIS ₇	54
IV-3-8- COMPOSÉ ANIS ₈	55
IV-3-9- COMPOSÉ ANIS ₉	55
IV-3-10- COMPOSÉ ANIS ₁₀	56
IV-3-11- COMPOSÉ ANIS ₁₁	57
IV-3-12- COMPOSÉ ANIS ₁₂	57
IV-3-13- COMPOSÉ ANIS ₁₃	58
IV-3-14- COMPOSÉ ANIS ₁₄	58
IV-3-15- COMPOSÉ ANIS ₁₅	59
IV-3-16- COMPOSÉ ANIS ₁₆	59
IV-4- ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE GC/MS.....	63
IV-5- ANALYSE PAR RÉSONANCE MAGNETIQUE NUCLÉAIRE	68
IV-5-1- RAPPELS.....	68
IV-5-1-1-RMN HOMONUCLÉAIRE	69
IV-5-1-2- RMN HÉTÉRONUCLÉAIRE.....	70
IV-5-1-2-1- HMQC.....	71
IV-5-1-2-2- COLOC	71
IV-5-2- IDENTIFICATIONS	71

IV-5-2-1- ACIDE ELLAGIQUE	72
IV-5-2-2- ACIDE ELLAGIQUE, DERIVES MONOMETHYL ETHERS	72
IV-5-2-3- ACIDE MONO- ET DIMETHYL ELLAGIQUES REPURIFIES	74
IV-5-2-4- ACIDE ELLAGIQUE A PONTS METHYLENES ANIS ₁₆ MELANGE AU TRITERPENE ANIS ₂₇	77
IV-5-2-5- LES GLYCOSIDES DE L'ACIDE ELLAGIQUE.....	83
IV-5-2-6- LES PROCYANIDINES MONOMERIQUES	95
IV-6- QUANTIFICATION DES PRODUITS ISOLÉS DANS L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE D' <i>A. DICHOSTYLA</i>	103
IV-6-1- ESSAIS PRÉLIMINAIRES	103
IV-6-2- COURBES DE CALIBRATION	104
IV-7- HÉMI-SYNTHESE	106
IV-8- CONCLUSION	108
CHAPITRE V: INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE D' <i>ARGANIA SPINOSA</i>	109
V-1- CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'HUILE D'ARGAN	109
V-2- DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE EN INSAPONIFIABLE	110
V-2-1 STEROLS DE L'HUILE D'ARGAN.....	112
V-2-2- SQUALENE.....	114
V-3- DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES ACIDES GRAS, DES MONOACYLGLYCEROLS ET DES TOCOPHÉROLS.....	115
V-3-1- ACIDES GRAS ET MONOACYLGLYCÉROLS	115
V-3-2- TOCOPHEROLS.....	119
V-4- METHODES D'ETUDE DE L'ALTERATION THERMOOXYDATIVE DE L'HUILE D'ARGAN.....	123
V-4-1- TEST À L'ÉTUVE À 37 °C.....	124
V-4-2- TEST À L'ÉTUVE À 63,5°C.....	126
V-5- APPLICATION DE LA RMN POUR L'ÉTUDE DE LA STABILITÉ DE L'HUILE D'ARGAN ET SA COMPOSITION TRIGLYCÉRIDIQUE.....	129
V-5-1- RMN DU PROTON.....	129
V-5-2- RMN DU CARBONE 13	133
V-6- COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE D'ARGAN EN COMPOSÉS POLYPHÉNOLIQUES	139
V-6-1- INTRODUCTION.....	139
V-6-2- EXTRACTION ET IDENTIFICATION.....	139

V-7- CONCLUSION.....	147
CHAPITRE VI : RECHERCHES DES ACTIVITES ANTIRADICALAIRES	150
VI-1- INTRODUCTION.....	150
VI-2- METHODE DE L'ESTIMATION DES TBARS	151
VI-3- EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES PHÉNOLS D' <i>ARGANIA SPINOSA</i> ET DES EXTRAITS METHANOLIQUES D' <i>A. CUNEATA</i> ET D' <i>A. DICHOSTYLA</i> EN UTILISANT LE MODÈLE DE XANTHINE OXIDASE.....	154
VI-3-1-PRINCIPE ET VALIDATION DE LA MÉTHODE	154
VI-3-2- EXTRAIT MÉTHANOLIQUE D' <i>A. CUNEATA</i>	158
VI-3-3- EXTRAIT MÉTHANOLIQUE D' <i>A. DICHOSTYLA</i>	160
VI-3-4- EXTRAITS DE L'HUILE D' <i>ARGANIA SPINOSA</i>	161
VI-4- EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DE LA FRACTION FARSAP DE L'HUILE D'ARGAN EN UTILISANT LE MODÈLE DE β -CAROTÈNE-ACIDE LINOLÉIQUE	163
VI-5- ETUDE DE LA TOXICITÉ AIGUË DE L'HUILE D'ARGAN.....	167
VI-6- CONCLUSION	167
CHAPITRE VII : CONCLUSION GÉNÉRALE ET DISCUSSIONS	169
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	188
PUBLICATIONS	200

INTRODUCTION GENERALE

Aujourd'hui, la recherche de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle est basée sur la répartition des plantes médicinales par des études ethnobotaniques qui permettent de réaliser des inventaires de plantes d'une zone ou d'un pays, puis par des études phytochimiques et pharmacologiques. Ainsi, on peut citer le cas de la prostatine extraite d'une Euphorbiaceae qui pourrait devenir une molécule importante contre le SIDA ou encore l'artémisine d'*Artemisia annua* utilisée actuellement contre les formes rebelles du *Plasmodium* etc. (Sevenet, 1994). De ce fait la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays africains, asiatiques et même euro-américains.

La conception et la réalisation de notre travail s'inscrivent dans le cadre des recherches menées par l'équipe 'Ethnobotanique et Pharmacologie' du Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique (LIMBP) de l'Université de Metz et dont l'un des thèmes principaux est la recherche pour contribuer à la valorisation de la flore médicinale dans le domaine de la santé et de l'alimentation par des résultats scientifiques.

Notre démarche dans la réalisation de cette thèse s'inscrit également dans le sens de la thématique de cette équipe universitaire et qui consiste en une prospection ethnobotanique dans les différentes régions du monde, une sélection des plantes utilisées par la pharmacopée traditionnelle, un répertoire des utilisations traditionnelles consistant en des relevés ethnobotaniques, l'extraction, l'analyse et l'isolement de principes actifs, les molécules isolées ou les fractions obtenues enrichies de celles-ci font l'objet de tests d'activités biologiques et éventuellement pharmacologiques. Notre recherche est axée vers l'identification de supports polyphénoliques et terpéniques d'extraits d'arbustes africains sélectionnés, dans ce travail, les plus importants sont en l'occurrence *Annona cuneata* Oliv., *Anisophyllea dichostyla* R. Br. du Congo et *Argania spinosa* L. (Skeels) du Maroc.

La reconnaissance d'*Anisophyllea dichostyla* et d'*Annona cuneata*, prescrites, a eu lieu sur le terrain sous la conduite du guérisseur prescripteur ou d'un guide désigné par lui dans les contrées de Kwilu, Lemfu et du Kwango, situées dans la province de Bandundu et de Kikwit en république du Congo. Toutes les données concernant ces deux arbustes sont inédites. En effet, parmi 181 plantes qui ont été recensées au cours de cette enquête ethnobotanique (de décembre 1998 à septembre 1999) organisée par l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), dans la ville du Kikwit et dans la sous région rurale du Kwilu et du Lemfu, 58 guérisseurs appartenant aux tribus respectivement de

Bunda, Wongo, Dinga, Pende, Yansi et Mbala ont été interrogés. Parmi eux, Mr. Nsimba, agent de développement de l'Armée du salut à Kasangulu, Madame Tshibuabua, guérisseuse et collaboratrice de l'ANAMED Kasai, Mr Mukala, pasteur Kimbanguiste, collaborateur de l'ANAMED Kasai, Ingompa Jean, agent du bureau de développement du diocèse catholique de Luebo au Kasai occidental, Madame Ndaya, guérisseuse à Luebo, collaboratrice de l'ANAMED Kasai, la Soeur Thérèse, religieuse de la congrégation des Sœurs de Saint Vincent de Turin, guérisseuse traditionnelle à Kikwit, Mr. Booto Buangi, guérisseur traditionnel à Gemena, province de l'Equateur au Congo et enfin Ntangu Mpasi, guérisseur traditionnel à Lemfu/Bas-Congo.

Leurs données ont été confirmées par le dispensaire saint Joseph de Médecine Naturelle de Kikwit (RDC), mais aussi par des praticiens de niveau universitaire, ainsi que des animateurs pastoraux. Des monographies rédigées par des étudiants de l'Institut Supérieur de Kikwit confirment que les deux espèces congolaises étudiées dans ce travail sont parmi celles les plus indiquées dans la médecine traditionnelle congolaise.

Le recueil des données ethnobotaniques concernant les trois plantes étudiées dans ce travail a été fait sur un questionnaire d'enquête à plusieurs rubriques: l'identification des guérisseurs susmentionnés, la récolte, les noms locaux, la préparation de la drogue, les indications et les contre indications, l'administration et la posologie, et enfin les effets indésirables, les interdits et les rituels.

L'intérêt du travail entrepris est la valorisation des substances naturelles susceptibles de présenter un intérêt pharmacologique à partir de la biomasse végétale médicinale et alimentaire africaine.

Après avoir analysé ces études ethnobotaniques, il s'est avéré qu'*A. cuneata* et *A. dichostyla* sont effectivement parmi les plantes les plus indiquées dans la médecine traditionnelle congolaise pour lutter principalement contre la vermineuse, l'anorexie, ainsi que l'asthénie sexuelle entre autres maladies.

La troisième espèce étudiée dans ce travail, *Argania spinosa* L.(Skeels) (l'Arganier) est une espèce endémique du Maroc et dont les intérêts d'utilisations médicales et alimentaires n'ont pas été rigoureusement exploités. De plus, c'est face à la dégradation de l'Arganier marocain qui constitue actuellement un véritable désastre, tant du point de vue écologique, que socio-économique que notre choix sur cette espèce a été orienté.

Nous avons tenté de déterminer les vertus alimentaires, médicinales et cosmétiques de l'huile extraite des amandes des fruits de cette espèce. En effet la pulpe et l'amande dont

on extrait l'huile représentent la principale richesse et les composants les plus intéressants fournis par l'Arganier.

Pendant nos investigations, *Argania spinosa* et *Anisophyllea dichostyla* feront l'objet de travaux plus approfondis en vue de mieux comprendre leurs potentialités pharmacologiques.

Nous nous sommes orientés dans un premier temps vers l'identification des composés chimiques d'*A. cuneata*, les profils de ses extraits semblent être pauvres en composés polyphénoliques, ainsi, les huiles essentielles de cette espèce ont été étudiées, Cette étude préalable a été jugée utile vue la spontanéité d'*A. cuneata* au Congo et vue la nouveauté de sa composition chimique en huiles essentielles extraites des écorces du tronc. Une étude comparative a été aussi faite en identifiant l'huile essentielle des écorces du tronc d'une autre espèce du genre *Annona*: *Annona senegalensis* L. Ces deux espèces pourraient présenter un intérêt économique.

Nous avons poursuivi notre recherche par une étude phytochimique approfondie des polyphénols d'*Anisophyllea dichostyla* R. Br., cette espèce a fait l'objet d'étude pour la première fois dans ce travail.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes consacrés à l'étude d'*Argania spinosa*, nous avons étudié l'huile extraite des amandes des fruits de cette espèce, Trois formes de cette huile ont fait l'objet de cette étude (une huile alimentaire et aussi dite esthétique et une huile seulement alimentaire provenant des coopératives Targanine à Tamanar, région d'Essaouira au Maroc et enfin une huile extraite industriellement fournie par la société Mille et une huiles, Paris, France). Les caractéristiques physico-chimiques (indices des peroxydes, les valeurs de p-anisidine et de diènes conjugués, ainsi qu'une méthodologie de résonance magnétique nucléaire ou RMN), nous ont permis l'étude de l'évolution oxydative des différentes formes de cette huile. Nous avons par la suite, étudié la répartition des acides gras ainsi que leurs positions dans le glycérol par RMN de l'huile alimentaire et esthétique.

L'identification chimique des extraits étudiés et leurs dosages ont été aussi réalisés, en effet l'insaponifiable de l'huile d'argan et principalement son contenu en vitamines rapportées par les auteurs mais ayant fait l'objet de controverses, ses hydrocarbures majoritaires et ses polyphénols, ont fait également l'objet d'étude lors de ce travail.

Puis nous avons validé à l'aide d'une batterie de tests principalement *in vitro*, les propriétés antiradicalaires des extraits méthanoliques des parties utilisées des plantes susmentionnées.

Nous avons mis l'accent plus particulièrement sur l'activité antioxydante directe des différents polyphénols isolés des trois plantes. En fonction de la solubilité des produits et des extraits obtenus, nous avons choisi la méthode d'étude du dynamisme de la xanthine oxidase jugée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP), en système aqueux selon le procédé d'Owen *et al.*, 1996. La fraction dite "Farsap" issue de l'huile d'argan a été aussi étudiée et vue sa lipophilicité, son activité antioxydante a été évaluée par le modèle du β -carotène-Acide linoléique.

En conclusion générale, les résultats seront discutés sur les composés polyphénoliques obtenus qui semblent jouer un rôle important dans le domaine de la chimio-prévention contre certaines maladies en particulier celles liées à un stress oxydant.

CHAPITRE I : ETUDES ETHNOBOTANIQUES DES PLANTES SELECTIONNEES

I-1- *Annona cuneata* Oliv.

I-1-1- Etude ethnobotanique

Le genre *Annona* couvre une région s'étendant principalement sur les 24 territoires autour de la ville de Kinshasa. Dans les environs de Kinshasa les savanes arbustives dominent, celles-ci sont remplacées sur les sols sablonneux, dans la plaine de Ndjili et sur les plateaux Bateke, par des savanes herbeuses dépourvues d'éléments ligneux. Le bord du Pool de Malebo est caractérisé par des prairies et des forêts marécageuses. Des galeries forestières s'accrochent aux rivières Ndjili, Nsele-Lukunga et Mbombo-Lumene et aux bords du Fleuve en aval de Kinsuka.

Les écorces fibreuses et aromatiques, le bois avec des bandes tangentielles, le parenchyme fin sont parmi les caractères qui donnent aux Annonaceae leur aspect indubitable. Dans les forêts riches d'Annonaceae au bassin supérieur d'Amazon, quelques espèces, telles que *A. cherimola* (chérimolier), *A. muricata*, *A. squamosa* (pomme douce) et *A. mucosa* sont cultivées en raison de leur fruit comestible. En Espagne méridionale, le chérimolier, est une espèce subtropicale économiquement importante. L'Espagne est le producteur principal dans le monde du Chérimolier et son amélioration agronomique avait intéressé Encina *et al.* en 1994.

Les espèces d'*Annona* sont largement distribuées et la conservation de leurs ressources génétiques a gagné un degré d'attention mondiale. Les plus importantes des espèces incluent *A. diversifolia* et *A. glabra*, cultivées en Inde occidentale comme plantes médicinales plutôt que fruit.

A. Senegalensis est répandue dans toute l'Afrique tropicale, au Sénégal, au Congo, au Kenya, au Soudan, en Rhodésie du Nord (Zimbabwe actuellement) et en Afrique du Sud. Elle est également présente dans les Comores et à Madagascar. Une plus petite espèce relative, *Annona cuneata*, se rencontre en Angola, en Zambie, en Zimbabwe et dans le Bas-Congo, plus particulièrement dans les régions Tumba-Mani, M'vuazi, Kasangulu (plateau de Bateke), Kasai (Dinga, Bassin de la Lufuna), Bandundu (Kahemba, Kianza, Kikwit), Bas-Katanga (Kaniama), Enclave de kabinda (I.N.E.A.C., 1951).

La famille des Annonaceae et vu sa grande taille (130 genres et 2300 espèces), est chimiquement l'une des familles les moins connues des plantes tropicales.

Seulement 320 produits naturels de 150 espèces appartenant à 41 genres ont été recensés en 1982 par le Bœuf *et al.*

Récemment un certain nombre d'Annonaceae est devenu important dans la recherche pharmaceutique en raison d'une large gamme d'activités biologiques (Alali *et al.*, 1999), et plus particulièrement les possibilités cytostatiques (Amaro *et al.*, 1998) et insecticides (Chopra *et al.*, 1956), dues principalement à une gamme de constituants chimiques dérivés d'acides gras (acétogénines) (Fujimoto *et al.*, 1994).

Une certaine attention a été portée sur cette famille dès le 20^{ème} siècle, À compter de 1983. Des 2300 espèces estimées que comporte cette famille, 900 sont Neotropicales, 450 sont africaines, et la partie restante est asiatique.

La classification historique réalisée par Fries (1939) a été faite principalement sur la base des caractéristiques florales des *Annona*. *A. cuneata* a été classée dans la section 7, sous-section 2 dans la clé de détermination du genre *Annona*.

C'est une plante vasculaire, à graine, appartenant à la classe des dicotylédones, à l'ordre des magnoliales et à la famille des Annonaceae.

➤ Feuilles à la fois simples, alternes, à nervation entièrement pennée, limbe profondément découpé (bipinnatiséqué) se terminant en segments à sommet aigu, de 19-23 x 11-12 cm, discolore ;

➤ Plante sans épines ou/et aiguillons ;

➤ Folioles (segments) pliées ;

➤ Fleurs de moins de 2 cm de long ;

➤ Nervures non sécantes ;

➤ Inflorescences non urcéolées, à réceptacle ouvert ;

➤ Infrutescences charnues contenant 1 seul akène ;

Genre : *Annona*

Espèce *Annona cuneata* (Oliv.) R.E. Fries, Schwed. Rhod. (Robyns, 1934)

Synonymie : *A. senegalensis var. cuneata* Oliv. (De Wild., 1906)

A. cuneata, a été aussi décrite par Oliver. Cette plante est connue sous les noms vernaculaires (dialecte) par mulolo, lolo-kia-ndambi, lolo, kilolo ki nkufi (Kikongo), Nlolo (Kiyaka), lolol, Mulolo (Bandundu), tshilolo (Lueba). En république démocratique du Congo, cette espèce est utilisée dans la médecine traditionnelle principalement sous forme de décocté des écorces de ses racines contre l'hernie, la stérilité féminine, l'asthénie sexuelle et contre les parasitoses (verminose, amibiase....).

Pour les maux de ventre, les feuilles fraîches d'*A. cuneata* sont mâchées et le suc est avalé et l'effet est immédiat.

I-1-2- Description botanique

Annona cuneata Oliv. est un arbuste des savanes africaines ; facile à reconnaître par ses gros boutons floraux, ovoïdes, jaunâtre, courtement pédicellés par 1 ou 2 à 3 dans l'axe des feuilles alternes ; ses fleurs jaunâtre à 3 petits sépales verts, 3 grands pétales extérieurs valvaires, épais, jaunes et 3 petits pétales intérieurs valvaires, et à l'intérieur, sur un réceptacle, une masse de minuscules anthères sessiles entourant un groupe centrale de carpelles, solitaires ou géminées, à pédicelle réfléchi, de 1,2-2,2 de long, généralement bibractéolé à la base, pubescent; sépales de 4-5 mm de long et de 3-4 mm de large, apprimés-pubescents à l'extérieur ; étamines de plus ou moins 2 mm de long; connectifs papilleux au-dessus des thèques ; carpelles cylindriques, de plus ou moins de long, ses fruits charnus, globuleux de 5 à 8 cm ; de long, à surface écailleuse ou réticulée contenant, dans une pulpe orangée, nombreuses graines entourées d'une arille savoureuse (Aubréville, 1950).

Ce sous-arbrisseau à rhizome épais atteignant 30-40 cm de long et 15 cm de diamètre, tiges aériennes renaissant généralement à chaque saison de végétation. Feuilles à pétiole de 5-13 cm de long, pubescent-lanugineux; limbe obovale, oblong à oblong-elliptique, cunéiforme ou obtus à la base, de 9,5-24 cm de long et de 4,5-7,5 cm de large ; papyracé ; éparsément pubérulent à glabre au-dessus, finement pubescent en dessous ; nervures secondaires 7-10 paires. Fruits plus petits qu'un œuf, squameux, orange intense (I.N.E.AC, 1951).

I-2- *Anisophyllea dichostyla* R. Br.

I-2-1- Etude ethnobotanique

La famille des Anisophylleacea comprend seulement 15 genres et 140 espèces (Schwarzbach *et al.*, 2000). *Anisophyllea dichostyla* (Synonymies *Anisophyllea quangensis* Engl. Ex Henriq, *A. poggei* Engl. ex De Wild.& Th.Dur., *A. fruticulosa* Engl.& Gilg., *A. dichostila* Engl. & V. Brehm., *A. brachystila* Engl. & V. Brehm. ou encore *A. pochettii* Duvign. & Dewit), est un arbre connu par région sous les noms locaux suivants (dialecte) : Baiosswe (Kitetela), Fungwa (Kiyaka), Kindulu (Kimbala), Mbungu, Kikongo (Mfungu, Mfungwa, Mfungu mfungu), Bandundu (Mundulu, Lukwanga), Lingala (Mbila esobe), Kisonge (Mololo) et enfin à Pangi ya lenge (Kiyombe).

Elle se présente sous forme d'arbuste buissonnant dans les brousses et comme arbre dans les lisières des forêts. Malgré sa valeur médicinale et sa forte consommation, la littérature

est extrêmement pauvre en ce qui concerne la monographie de ce genre de la famille d'Anisophylliaceae.

Cette espèce se rencontre en R.D. du Congo plus particulièrement au Côtier Moanda, Tshoa, Boma, Kanzi et Boma-Banana, au Bas-Congo dans les régions Kaonga, Kimuenza, Kinshasa, Bationgo, Kinanga, Ndembo, Mvuazi, Lusolo, Ntadi, Luvituku, Kimvula, Mpese, dans la région de Bandundu (au Bolobo, Ibali, Mushie, Idiofa, Kwango), à Kasai, à Katanga, et enfin au Gabon, en Angola et en Zambie.

En République du Congo, *A. dichostyla* est utilisée contre l'amaigrissement, l'amibiase, la diarrhée, l'anorexie et la verminose. Deux cuillerées à café de l'infusé de poudre de l'écorce de la racine dans un verre d'eau (trois fois par jour avant les repas) sont prescrites pour ces traitements.

I-2-2- Description botanique

A. dichostyla est une espèce très polymorphe et est remarquable par ses feuilles alternes, à 3 ou 5 grandes nervures longitudinales, joignant la base au sommet. Les feuilles sont ovées, lancéolées, cunéiformes, aiguës à la base, coriaces ; jeunes recouvertes sur les 2 faces d'une pubescence opprimée, mais adultes, elles sont glabres.

L'inflorescence en fascicules d'épis axillaires, représentées par des fleurs solitaires seulement axillaires, sur un axe non ramifié ou sur un axe embranché, aux bractées nombreuses et persistantes. Les fleurs, à feuilles caduques, non égrappées, 4 pétales unisexués dans la partie supérieure, non charnues, 8 étamines. Ovaire inféré à 3-4 styles courts.

Fruits : prunes jaunes, ovoïdes, sessiles, mesurant 3 cm de long, comestibles ; couronnés au sommet par les restes du calice et des styles (Aubréville, 1950).

I-3- *Argania spinosa* (L) (Skeels.)

I-3-1- Etude ethnobotanique

Cette troisième espèce (Arganier) étudiée dans ce travail est endémique du Maroc.

Selon les données, l'apparition de l'Arganier date de l'ère tertiaire, époque à laquelle il serait répandu sur une grande partie du Maroc (Maire, 1925 ; Boukhobza *et al.*, 1988).

C'est une espèce xéro-thermophile qui appartient à la famille tropicale des Sapotacées, dont elle est la seule représentante septentrionale dans la région méditerranéenne.

Le *derivatio nominis* du genre *Argania* serait le village d'Argana, situé au sein de l'arganeraie, au Nord-Est d'Agadir.

C'est un arbre forestier-fruitier-fourrager dont l'espérance de croissance est d'une dizaine de mètres. Le fruit (la noix d'argan) renferme des amandes très riches en huile. Ses racines vont chercher fort loin dans le sol la centaine de millimètres d'eau annuelle nécessaire à sa vie. Pour économiser les avaricieuses ressources hydriques, l'Arganier peut sporadiquement se défolier, retrouvant à l'aubaine de nouvelles précipitations, son aspect touffu.

Les Phéniciens commerçaient son huile dans leurs comptoirs établis tout au long de l'Océan Atlantique. Plus récemment, comme au XVIII^e siècle, bien des voyageurs et diplomates anglais donnent dans leurs récits des rapports documentés de la densité de l'arganeraie d'Alors (in Mhirit, 1999).

Selon Boukhobza et Pichon-Prum, 1988, la première mention de l'Arganier remonte au X^e siècle, où Ali ibn rodhwân avait décrit l'usage de ses fruits sans mentionner sa description. Aux XI^e et XII^e siècles, respectivement, al-Bekrî et al-Idrissi (in Boukhobza, 1988), décrivaient également l'usage des fruits.

Pour la première fois, la description de l'Arganier sous le nom "arjân" est donné par ibn al-baytâr dans al-mufradat al-adwîya wa'l aghziya traduit par Leclerc, 1877-1883. Ibn al-baytar consacre trois monographies à cet arbre et à ses parties : l'arbre sous le nom "arjân" dit argân, son fruit sous la monographie "lûz al-birbir" (amande de berbère) et l'huile de fruit qu'il l'appelle "zayt as-sûdân" (huile de Soudan).

Al-Hassan bin Mohammad al-Wazân al-Zaghîyâtî (Jean Léon l'Africain) dans sa "Description de l'Afrique" parle des arbres épineux qui produisent un fruit appelé argân. Nous n'avons pas trouvé la mention de cet arbre dans les ouvrages de la médecine et de la botanique arabo-persanes.

D'après ibn al-baytâr : "le mot arjân" est un terme berbère et c'est le nom d'un arbre qui se trouve dans le Maghreb extrême, dans la province du Maroc. Il a des aiguillons très piquants, et donne un fruit de la forme d'une petite amande appelée vulgairement "lûz al-berber".

Par ailleurs, sous la monographie de "zayt as-soudân" il mentionne : qu'il s'agit de "zayt al-harjân" que les berbères du Maroc appellent "arjân", "argân" et arqân", un arbre de haute taille, épineux, donnât un fruit du volume d'une petite amande et contenant un noyau que l'on recueille, que l'on triture et dont on extrait l'huile dans les environs. Elle est douce comme l'huile d'olive.

Déjà ibn al-baytâr décrivait le procédé d'obtention de l'huile des amandes du fruit dans les villages de Hâhâ et Rijrâjâ (dit : Rigrâgâ).

Etymologiquement les mots argan et Arganier (l'arbre) proviennent du mot berbère "arjân" qui, dans le langage courant s'est transformé en "argân" ou "arqân". Ce terme dérive probablement du "rajnah" qui, en arabe veut dire "rester enfermé dans un lieu déterminé". En effet l'Arganier est un arbre endémique au Maroc, d'où il reste enfermé dans une zone bien limitée.

D'autre part, pour désigner l'Arganier on emploie aussi le mot "arqân". Ce mot montre une transformation linguistique du mot "arjân"; ou encore par l'usage de son huile, comme produit cosmétique, il semble qu'il existe un rapprochement de ce produit au terme "al-arqân" qui désigne les feuilles du henné (*Lawsonia inernis*), également employées en cosmétique traditionnelle pour rendre les cheveux plus beaux, et aussi comme cicatrisant des plaies cutanées. Ici on constate un usage traditionnel commun du henné et de l'huile d'argan, pour rendre la peau plus douce et plus belle, d'où probablement l'usage du mot "arqân" pour désigner cet arbre.

L'arganeraie (târgânt), exemple type d'ethnobotanique reposant sur 3 composants principaux : arbre, homme et chèvre (= "arad", pour le mâle et "tarat", pour la femelle), il joue un rôle socio-économique très important.

L'arganeraie étant la propriété de l'état, la population locale qui conserve aussi le droit de procéder à des cultures intercalaires (Bellakhdar, 1997), peut profiter de cette forêt. A l'époque du gaulage, elle est découpée en enclos provisoires (= "akal"), dans lesquels la population locale travaille uniquement pendant la saison de la récolte.

Toutes les parties de l'Arganier sont employées par toute une population, d'une zone désertique et défavorisée qui en tire profit.

Déjà le bois de l'Arganier, de couleur rouge est dur, d'où il est utilisé pour l'obtention d'un excellent charbon.

Les fruits, les feuilles ainsi que le résidu d'extraction de l'huile (le tourteau) ou "zikmum" constituent une source de nourriture et d'engraissement des animaux.

Cet arbre outre son huile, fournit également des produits tannants. En ce qui concerne cette huile, déjà ibn al-baytâr mentionnait son utilisation dans la médecine : "l'huile est avantageuse contre la surdité chronique et les maux d'oreille. Pour resserer le ventre, on en donne à la dose d'une drachme".

Aujourd'hui l'huile est utilisée traditionnellement, en onction sur les cheveux pour les fortifier, et aussi comme produit cosmétique sur la peau, dans le traitement des peaux sèches et ridées. Elle est également employée contre les acnés, les gerçures et les brûlures. Aussi, elle rentre dans les préparations aphrodisiaques, comme dans la préparation de

‘‘amlo’’ ou ‘‘âmlû’’ qui est un mélange des amandes grillées et moulues et l’huile d’argan. Ou encore pour la préparation de ‘‘bsis’’, un mélange de la farine d’orge, du miel et de l’huile d’argan qui est considéré comme fortifiant chez les habitants de Hahâ.

Enfin, l’huile d’argan est utilisée au même titre qu’une autre huile végétale dans les préparations culinaires, notamment dans la région de Souss d’Essaouira où on prépare avec l’huile, ce qu’on appelle ‘‘tagurramt’’, une huile offrande constituée de pain, de viande boucanée (= ‘‘hli’’), de miel et de beurre. Aussi elle est utilisée pour la préparation de ‘‘al-mandaq’’, un aliment fortifiant à base de semoule de l’orge et l’huile d’argan destiné aux enfants.

L’Arganier constitue la deuxième ressource forestière marocaine, après le chêne vert, sensiblement à égalité avec le thuya. Il couvre une superficie de plus de 828.000 Ha (à peu près de 21 millions d’arbres) (Ayad, 1989). L’arganeraie assure la subsistance des ruraux, et donc limite le phénomène de l’exode rural, de plus, il joue un rôle environnemental dans la protection des sols contre l’érosion et dans les régions montagneuses, il facilite la pénétration de l’eau, ce qui entraîne une alimentation accrue de la nappe phréatique. De même l’Arganier est considéré dans les régions de l’extrême sud comme la ceinture verte contre la désertification, en effet l’arbre protège par son ombre l’herbe pastorale et les plantes. L’Arganier fructifie dès l’âge de 5 ans. Il fleurit au mois de Mai-Juin, le fruit paraît vers la fin du mois suivant ou au début d’août, il continue à croître lentement jusqu’à l’époque des pluies, qui commence à tomber en septembre. À partir de cette époque il augmente de volume et à la fin de mars de l’année suivante, il est prêt pour la cueillette. Après la récolte, les fruits sont exposés au soleil en couches minces afin de sécher la pulpe. Nous signalons que la période de récolte a une certaine influence sur le rendement en huile car les amandes les plus mûres sont aussi les plus riches en huile.

La production fruitière varie selon l’âge de l’arbre, la densité du peuplement, le milieu et la pluviométrie. L’ordre de grandeur est de 8 kg/arbre/an, soit 128000 tonnes/an pour l’arganeraie marocaine avec une densité moyenne de 200 souches/ha.

La production pour 100 kg de fruits mûrs donne 60 kg de fruits secs dont 30 kg de pulpes sèches et 30 kg de noyaux. Ces 30 kg de noyaux donnent environ 27 kg de coques et 3 kg d’amandons. Selon les estimations un hectare d’arganeraie fournit environ 12 Kg d’huile.

Les dimensions du fruit varie de 17 à 30 mm de long et de 10 à 17 mm de large. Sa couleur est verdâtre avant maturation, puis elle évolue vers le jaune ou jaune-brun clair suivant les arbres. La couleur sombre se développe après abscission.

L'Arganier est une espèce végétale reconnue endémique du Sud atlantique marocain depuis 1877 (Griesbach, 1877) où son aire de distribution géographique principale s'étend entre les embouchures de l'oued Tensift (au Nord) et l'Oued Souss (au Sud), soit entre 29° et 32° de latitude Nord, ce qui en fait le représentant le plus septentrional de la famille des Sapotaceae, essentiellement tropicale.

Des colonies isolées d'Arganiers se trouvent également au Nord Est du Maroc du côté d'Oujda, dans les monts des Bénisnassen, et dans le Sud Ouest d'Algérie.

L'Arganier est une essence thermophile, peu exigeante sur le plan pluviométrique depuis le bord de la mer jusqu'à 1500 m environ sur le versant Sud du Haut-Atlas occidental. Cette essence se développe en ambiance bioclimatique aride, de variante tempérée à semi-aride dans la zone du littoral entre Safi et Agadir (in Mhirit, 1999).

Cet arbre appartient à l'embranchement des phanérogames (plantes à fleurs, qui se reproduisent par graine), à l'embranchement des gymnospermes, à la classe des dicotylédones, à la sous classe des gamétopétales et à l'ordre des ébénales. Cet ordre comporte 4 familles qui sont : les Sapotaceae, Ebenaceae, Styrracaceae et la famille des Symplocaceae.

L'Arganier appartient à la famille des Sapotaceae renfermant huit genres : *Syderoxylon*, *Tsebona*, *Bumelia*, *Argania*, *Chrysophyllum*, *Pouteria*, *calocapum* et *Pycnandra*, le genre *Argania* est constitué d'une seule espèce endémique du Maroc, *Argania spinosa* (ou *Argania syderoxylon* L., *Sideroxylon spinosum* L. *Elaerandron argan* Retz).

1-3-2- Description botanique

C'est un arbre de grande taille pouvant atteindre 10 mètres à tronc court et tourmenté ayant un suc laiteux. Son écorce rugueuse est craquelée. Ses branches et ses rameaux très étalés sont à extrémités épineuses. Ses feuilles persistantes, alternes, coriaces, lancéolées et plus pâle sur la face inférieure, son tronc est formé de plusieurs tiges entrelacées, la ramification commence à environ 1 mètre du sol. La floraison a lieu au mois de mai.

Les fleurs jaune verdâtre sont hermaphrodites, éclosent au printemps en petits glomérules, à l'aisselle des feuilles, portent cinq sépales poilus, cinq pétales verdâtre profondément séparés. L'ovaire velu donne à maturité, une baie verte de la taille d'une grosse olive, renfermant 2 à 3 graines très dures (Ozenda, 1977).

Ces fruits sont des drupes ovoïdes, striées de rouges, leur mésocarpe contient un suc laiteux qui s'épaissit au contact de l'air. Ils ont le plus souvent un seul noyau, plus

rarement deux, voire trois. Ovales à coque épaisse, dure et très lisse et de couleur brun pâle. Le fruit entier se compose de 43 % de péricarpe, 2,5 % de coque et 4,4 % d'amande. Selon la forme et la dimension, six types de fruits ont été distingués : fusiforme, ovale, apiculé, goutte, arrondie ou globuleuse (Jaccard, 1925).

L'accroissement moyen en circonférences de l'arbre est de 1,35 à 1,80 cm/an selon les stations, en hauteur il varie de 20 à 30 cm/an durant les premières années (Jacard, 1925).

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II-1- MATERIEL VEGETAL

II-1-1- Pour l'étude d'*Annona cuneata* Oliv. et *Annona senegalensis* L.

Les échantillons des écorces des racines d'*A. cuneata* et d'*A. senegalensis* (photo 1) ont été récoltés en juillet 1999, dans la région de Bandundu autour de la ville de Kikwit, dans la province du bas Congo dans la contrée du Lemfu.

Les écorces ont été séchées à l'ombre, pendant une dizaine de jours, puis réduites en poudre par pilage dans un mortier à bois, un spécimen d'herbier a été déposé à l'Herbarium de l'NERA (Institut d'Etude et de Recherches Agronomiques) à Kinshasa.

Les caractères organoleptiques des écorces des racines :

- Couleur marron,
- Odeur aromatique.
- Goût amer

Les huiles essentielles ont été obtenues par entraînement à la vapeur d'eau des écorces du tronc et des tiges (hydrodistillation) à partir de 150 g de poudre du végétal.

20 grammes de poudre des écorces des racines, ont fait l'objet d'extraction par 500 ml de méthanol pendant 3h en utilisant un appareil soxhlet après délipidation par l'hexane.

L'extrait méthanolique obtenu a fait l'objet de travaux ultérieurs



Photo 1 : *Annona senegalensis* Pers.

II-1-2- Pour l'étude d'*Anisophyllea dichostyla* R. Br.

Le matériel végétal est constitué des écorces des racines d'*Anisophyllea dichostyla* R. Br. (photo 2) et a été récolté aussi en juillet 1999, dans la région de Bandundu autour de la ville de Kikwit, dans la province du bas Congo dans la contrée du Lemfu.

Les écorces ont été séchées à l'ombre, pendant une dizaine de jours, puis réduites en poudre par pilage dans un mortier à bois, un spécimen d'herbier a été déposé à l'Herbarium de l'NERA (Institut d'Etude et de Recherches Agronomiques) à Kinshasa.

Les caractères organoleptiques de la poudre des écorces des racines sont :

- Couleur marron clair et présence de grains noirs,
- Odeur indéfinissable.
- Goût amer

Cette poudre est soumise à l'extraction en utilisant une lixiviation à l'aide de l'hexane et du méthanol.

Sur 120g d'écorces des racines desséchées et pulvérisées sont délipidées par l'hexane et imbibées au contact d'eau distillée, la percolation s'est poursuivie à l'aide de 1,5 l de Méthanol pour amorcer l'extraction pendant 4 heures.

L'extrait obtenu est évaporé et le résidu a été lyophilisé et a fait l'objet de travaux ultérieurs.

Anisophyllea dichostyla



Photo 2 : *Anisophyllea dichostyla* R. Br.

II-1-3- Pour l'étude d'*Argania spinosa* Skeels. (L.)

L'huile d'argan est extraite des amandes des fruits (photo 3) par des méthodes artisanales traditionnelles (Elghazouli, 1969). Les procédés artisanaux d'obtention des huiles sont les suivants :



Photo 3 : *Argania spinosa* (L'Arganier)

Le concassage de la coque pour extraire l'amande se fait à la main à l'aide de pierres, les amandes sont mises à sécher dans des vases de terre cuite. Elles sont torrifiées comme des grains de café, dans des plats en terre ou de fer ou sur une pierre plate chauffée sur un feu doux. On les amène à une couleur brune et on évite leur carbonisation en les remuant. Les amandes grillées sont, après refroidissement, moulues dans un moulin à bras traditionnel. On obtient une substance pâteuse qui ressemble à la pâte d'amandes mais de couleur brune. Cette pâte malaxée est mise dans un vase. Pour extraire l'huile, on verse de l'eau bouillante au-dessus et on la presse avec les mains. On continue la manipulation jusqu'à ce que la pâte devienne dure, plus elle l'est, mieux on aura extrait l'huile. La pâte devenue solide est de couleur noirâtre et d'un goût amer.

L'huile laissée au repos, devient limpide et de couleur brunâtre. Après décantation, le résidu appelé aussi tourteau contient encore une grande quantité d'huile qui sert d'aliment pour le bétail, car il est très riche en glucides.

A partir de 100 kg de fruits et 8 à 10 heures de travail, 55 Kg de fruits séchés sont obtenus dont 25 Kg de noyaux produisent 4 Kg d'amandes et 2 Kg d'huile. Le taux d'extraction par rapport au poids des amandes est d'environ 45 %. Cette forme est destinée aux besoins alimentaires.

Le même procédé est appliqué sans que les amandes soient torréfiées. L'huile qui en résulte est destinée à l'alimentation et à la cosmétique.

La troisième forme étudiée dans ce travail est obtenue par un industriel par pressage mécanique.

Pour obtenir une huile avec un rendement satisfaisant, l'extraction par solvant est aussi effectuée par les Laboratoires Pierre Fabre. En effet les amandes du fruit d'Arganier sont soigneusement séparées des débris du péricarpe puis réduites en poudre dans un broyeur à meules ou à cylindre. Cette poudre est soumise à une extraction avec un solvant apolaire de type hydrocarbure, éventuellement halogéné, dans un appareil d'extraction approprié, en acier inoxydable de préférence, afin de ne pas apporter d'impuretés métalliques risquant de catalyser l'oxydation. Après séparation du végétal épuisé, le solvant est évaporé. On obtient un extrait lipidique jaune paille, d'odeur agréable. Les solvants utilisés sont soit le cyclohexane, l'hexane, l'ether de pétrole, chloroforme, éthane ou l'éthylène.

Les formes alimentaire et esthétique étudiées dans ce travail, ont été fabriquées par pression mécanique et nous sont fournies par l'association Targanine, à Tamannar, région d'Essaouira (Maroc). La variété commerciale a été obtenue de la société "Mille et une huiles", Paris (France).

Pour des études de comparaison, l'huile d'olive extravierge provient de la société Zaït, Grünstadt en Allemagne et l'huile de tournesol provient du marché local d'Heidelberg.

II-2- SOLVANTS

Les solvants utilisés pour les extractions proviennent de chez Prolabo redistillés deux fois par nos soins sur une colonne vigreux. Les solvants organiques, de qualité CLHP, proviennent de la maison SDS (France) ou Across (Belgique). L'eau a été bidistillée et les solvants CLHP ont été filtrés sur un filtre Millipore (Supelco, USA) en nylon (0,45 μm , 47 mm de diamètre) et sont dégazés par passage aux ultrasons, les échantillons analysés en CLHP sont préalablement centrifugés et dilués avant injection.

II-3- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

C'est une technique que nous avons utilisée généralement en monodimensionnel, pour suivre les étapes d'extraction, de fractionnement ou de purification. La CCM a été conduite sur plaques de silice 60 F₂₅₄ (ART. 5554) sur support plastique (Merck, Darmstadt,

Allemagne), les phases mobiles utilisées en chromatographie sur couche mince (systèmes S-1 à S-4) ainsi que les révélateurs utilisés sont les suivants :

II-3-1- Systèmes

Systèmes	Solvants	Proportions
(S-1)	- Iso-octane, Acétate d'éthyle, Acide acétique	4,5/4,5/1
(S-2)	- Chloroforme, Méthanol, Acide acétique	9/1/gouttes
(S-3)	- Acétate d'éthyle, acide formique, Eau	6/1/1
(S-4)	- Butanone, Acétate d'éthyle, Acide formique, eau	5/3/1/1

II-3-2- Révélateurs

Avant toute révélation par un réactif, les fluorescences ou leurs extinctions en lumière UV (254 et 365 nm) sont notées.

Le réactif est ainsi pulvérisé

Après pulvérisation, la plaque est chauffée pendant 5 mn à 100 °C. Les tâches sont observées sous lumière UV à 365 nm.

II-3-2-1- Pour les dérivés terpéniques

Le tableau 1 récapitule les deux révélateurs choisis dans ce travail pour la révélation des composés terpéniques.

Tableau 1 : Révélateurs utilisés pour les dérivés terpéniques

Réactifs	Composition	Méthodologie	Sites d'action	Couleurs
Vanilline sulfurique	Solution de 2 g de vanilline dans 100 ml d'une solution méthanolique à 20% d'acide sulfurique.	- Pulvérisation - Chauffage à l'étuve (2 mn à 100 °C).	Alcools supérieurs, produits carbonylés, phénols, terpènes	Rouge brique, bleu-vert, violet.
Anisaldehyde	Kriatchevsky, 1963	Pulvérisation	Terpènes et polyphénols	Rose, violet, orange

II-3-2-2- Pour les polyphénols

En plus du révélateur décrit par Kriatchevsky, 1963, le réactif de Neu dont la composition est la suivante, a été employé (Brasseur et Angelot, 1986) :

Réactifs de NEU : Acide amino-2-éthylidiphénylborique 1g
 PEG-4000 5g
 Méthanol q.s.p. 100 ml

II-4- EXTRACTION

L'extrait méthanolique de l'huile d'argan a été obtenu selon le procédé d'Owen *et al.*, 2000a, b et c, légèrement modifié et cette opération ainsi que la préparation de l'insaponifiable des huiles étudiées sont décrites dans le chapitre V. La fraction nommée désormais Farsap a fait l'objet de l'étude de l'activité antioxydante en utilisant le modèle du β -carotène-acide linoléique et a été obtenue en présence d'une solution KOH 1 M dans 50 ml de méthanol.

Pour ce qui suit, nous décrivons les procédés utilisés pour l'extraction des plantes congolaises.

II-4-1- Hydrodistillation

Les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation en utilisant un appareil préconisé par la Pharmacopée française X^e Edition, 1983 (figure 1). Cette méthode consiste en un entraînement à la vapeur d'eau *in situ* des constituants de la drogue au contact de l'eau distillée.

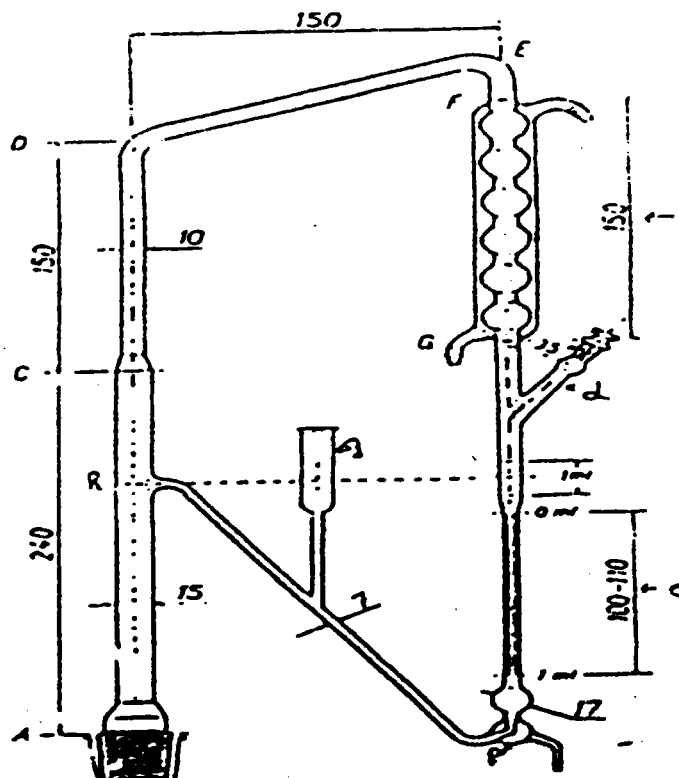


Figure 1: Appareil pour la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (Pharmacopée française X^e Edition, 1983) (dimensions de chaque partie de l'appareil sont en mm).

II-4-2- Lixiviation

La lixiviation est un procédé d'extraction qui consiste à épuiser une substance par passage de solvants tels que l'hexane et le méthanol, qui entraînent tout ce qui leur est soluble, à travers une poudre (Goris et Liot, 1942). Les drogues pulvérisées (*A. cuneata* et *A. dichostyla*) qui sont utilisées ont été humectées avec de l'eau distillée avant cette opération. Par cette opération nous avons obtenu l'extrait hexanique d'*A. cuneata* ainsi que les extraits hexanique et méthanolique à partir d'*A. dichostyla*.

II-4-3- Extraction au soxhlet

L'extracteur soxhlet est un dispositif qui permet d'obtenir une tisane améliorée. L'appareil soxhlet comporte un ballon dans lequel le solvant est chauffé et vaporisé, un réfrigérant qui condense les vapeurs et un extracteur à l'intérieur duquel, on dispose une cartouche poreuse qui contient le produit à extraire et dans lequel retombe le solvant condensé par le réfrigérant. Un siphon permet de vider périodiquement l'extracteur. La solution chargée du produit à extraire retourne alors dans le ballon où se concentrent les extraits.

Nous avons effectué cette opération pour l'extraction de 20 g de poudre à l'aide du 500 ml de Méthanol d'*Annona cuneata*.

II-4-4- Lyophilisation

La lyophilisation est une méthode de dessiccation douce qui consiste à éliminer progressivement l'eau d'un produit préalablement congelé.

Cette opération a été effectuée sur des fractions aqueuses, obtenues après CLHP semi-préparatives et contenant le produit pur recherché.

Les résidus aqueux ont été congelés puis lyophilisés et les lyophilisats ont été conservés dans des ballons (50 et/ou 100 ml) préalablement pesés à température ambiante, à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'humidité pour des travaux de purification si nécessaire ou d'analyses RMN ultérieures.

De même, les fractions hydrométhanoliques ont été concentrées par évaporation sous pression réduite, à une température inférieure à 45 °C jusqu'à l'élimination complète du méthanol. Les phases aqueuses résiduelles ont été ensuite congelées et lyophilisées.

Le lyophilisateur Christ alpha-4 muni d'une pompe à palette type EDM12 a été utilisé.

II-5- SEPARATION ET ISOLEMENT

Des techniques chromatographiques combinées ont été utilisées pour la stratégie de purification des produits.

II-5-1- Chromatographie sur colonne à pression atmosphérique

L'élution a été réalisée par simple gravité de solvant, la faible pression d'élution et le débit important (3 à 5 ml/min) ajustés manuellement permettent en général un fractionnement rapide. La hauteur de la colonne utilisée est d'environ 25 fois la dimension de son diamètre. Le poids du support est de l'ordre de 30 à 100 fois celui de l'échantillon.

Les opérations complètes sont renouvelées autant de fois que nécessaire pour l'obtention d'extraits suffisants pour les opérations de purifications ultérieures.

Les éluats sont finalement regroupés puis filtrés et enfin évaporés avant toute purification par CLHP semipréparative.

Cette opération a été effectuée pour les extraits méthanoliques d'*A. dichostyla* et l'huile d'*A. spinosa*.

II-5-2- Chromatographie sur couche épaisse (CCE)

C'est une chromatographie dite préparative. Les plaques commerciales de silice Merck (Art. 5531) d'un demi-millimètre d'épaisseur sont activées par passage à l'étuve à 100 °C pendant 10 h environ.

L'échantillon est déposé en ligne au bas de la plaque. Après développement, les bandes correspondantes aux produits à séparer sont révélées en lumière UV ou au moyen d'un réactif, sur une petite portion latérale de la plaque.

Les bandes sont prélevées et les substances séparées sont recueillies.

Cette technique a été utilisée pour la purification finale des composés polyphénoliques d'*A. dichostyla* de leurs homologues triterpéniques.

II-5-3-Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

II-5-3-1- CLHP semipréparative

La séparation par CLHP semipréparative a été faite à l'aide d'une colonne C-18 (Latek, Eppelheim, Allemagne), de 25 cm de longueur (5 μ m) et de 10 mm de diamètre intérieur. La chromatographie est réalisée sur un ensemble Work Station Hewlett-Packard (HP) sous contrôle d'un ordinateur HP chemstation opérant dans un environnement Windows™. L'appareil comporte une pompe 1100, permettant d'effectuer des mélanges binaires avec le méthanol et l'eau acidifiée et un détecteur polychromatique HP 1040 M (Diodes Array Detector ou DAD, Agilent).

La colonne est équilibrée avec du méthanol et 70 à 100 μ l d'échantillon (extraits méthanoliques) préalablement filtrés sur un filtre Millipore (Latek C-18, Allemagne) sont injectés. Puis l'élution se fait avec un gradient de concentration au cours duquel l'eau ultra pure acidifiée s'enrichit en méthanol (0 à 100 %).

La durée totale du chromatogramme est de 50 min, le débit est fixé à 3 ml/min.

La température de la colonne est stabilisée à 30 °C par un four et la détection est faite à 278 nm. Les pics élués de la colonne sont collectés sur des microplates HP 220 et sont regroupés entre eux avant d'être concentrés puis lyophilisés.

La méthode nommée montpr. 1 a été utilisée pour la séparation des extraits méthanoliques des trois plantes étudiées.

Pour la séparation des produits de l'hémisynthèse des dérivés mono-, di-, tri- et tetraméthylether de l'acide ellagique, cette même méthode a été utilisée : Les proportions des solvants utilisés pour montpr.1 sont présentées par le tableau 2.

Pour la séparation des composés terpéniques d'*A. dichostyla*, la CLHP semipréparative a été aussi utilisée dans les mêmes conditions chromatographiques à l'exception de la phase mobile qui est dans ce cas, composée de 80 % de méthanol et 20 % d'une solution aqueuse (2% acide acétique dans l'eau bidistillée). Puis l'élution se fait avec un gradient de concentration au cours duquel la phase mobile s'enrichit en méthanol jusqu'à 100 %, pendant 20 min, enfin 100% de méthanol sont maintenus pendant 10 min. La détection est faite dans ce cas à 210 nm.

Tableau 2: Proportions de l'éluant utilisées pour la séparation et l'isolement des composés étudiés

Temps (min)	Montpr. 1	
	2% acide acétique dans l'eau bidistillée	% Méthanol
0	95	5
15	75	25
20	60	40
24	50	50
25	0	100
50	0	100

II-5-3-2- CLHP analytique

Nous avons appliqué cette méthode pour la caractérisation, le dosage des composés phénoliques de l'huile d'argan ainsi que des extraits méthanoliques d'*A. dichostyla* et d'*A. cuneata*. Cette même technique a été utilisée pour la caractérisation et le dosage des tocophérols de l'huile d'*Argania spinosa*.

L'analyse CLHP a été conduite sur un même appareil Hewlett-Packard (HP) 1090, munie d'une colonne C-18 (Latek, Eppelheim, Allemagne), de 25 cm (5 µm) de 4 mm de diamètre intérieur. La détection des phénols a été suivie à 278 nm à température ambiante.

Pour la séparation des composés phénoliques, la phase mobile est la même que celle décrites sous les conditions de la CLHP semipréparatives (montpr.1). Le temps global de l'analyse est aussi de 50 min. L'extrait méthanolique a été 5 fois dilué dans le méthanol et 20 µl ont été injectés. Le débit est fixé à 1 ml/min.

Pour l'analyse des tocophérols (en dupliquât), 20 µl d'une solution (huile, dichlorométhane 1/1) ont été injectés dans les mêmes conditions chromatographiques à l'exception d'un programme isocratique avec du méthanol (100 %), la détection a été faite à 295 nm. Le temps total de l'analyse est de 20 min, le dosage des différentes formes des tocophérols a été effectué par rapport à leurs homologues de référence en utilisant un étalonnage externe entre 0 et 500 µg/ml. Après chaque opération, la colonne est lavée avec du dichlorométhane pendant 10 min et reconditionnée par la suite avec du méthanol pendant aussi 10 min avant l'injection suivante.

II-5-3-3- Programme CLHP de l'activité antioxydante utilisant le système xanthine/xanthine oxidase »

Le programme CLHP, pour évaluer l'activité antioxydante des produits et des extraits des trois plantes étudiées a été effectué selon le procédé d'Owen *et al.*, 1996, 2000a. Le protocole détaillé de cette technique est décrit dans le paragraphe II-8-2, sur l'étude de

l'activité antioxydante. La détection des hydroxylations de l'acide salicylique ou de l'hypoxanthine en présence ou en absence des extraits étudiés a été suivie à deux longueurs d'ondes différentes : $\lambda = 278$ et à 325 nm, respectivement pour suivre l'hydroxylation de l'hypoxanthine et celle de l'acide salicylique. La calibration de la CLHP a été réalisée par nos soins, les résultats sont concomitants avec les travaux d'Owen *et al*, 1996. Toutefois le tampon dans lequel évoluait l'hypoxanthine et l'acide salicylique, doit être impérativement préparé extemporanément pour la reproductibilité de cette méthode. Les profils CLHP de l'hypoxanthine et l'acide salicylique et de leurs produits d'hydroxylation respectifs sont illustrés par les figures 2 et 3.

Pour suivre l'hydroxylation de l'hypoxanthine, en chromatographie à paire d'ions, nous avons utilisé comme phase mobile une solution tampon aqueuse contenant 0,005 M du tetrabutylammonium à pH égale à 4,6 (ajusté par l'addition de gouttes d'acide formique, 6%).

La phase stationnaire est constituée de polymères en forme de sphères chimiquement modifiées par transformation des surfaces en des sites ioniques. Ces phases permettent l'échange de leurs contre-ions mobiles avec des ions de mêmes signes présents dans la phase mobile. Cette séparation repose donc sur les coefficients de distribution ioniques entre les deux phases.

La chromatographie est conduite sur un chromatographe, Hewlett-Packard HP 1090, avec une colonne C-18 (Latek C-18, Eppelheim, Allemagne), 25 cm (5 μ m) et 4,6 mm de diamètre intérieur.

Pour suivre l'hydroxylation de l'acide salicylique, les conditions de la chromatographie ionique CLHP/UV/DAD, sont les mêmes que celles décrites dans la méthode montpr.1, la détection des phénols a été effectuée dans ce cas à 325 nm et le profil chromatographique obtenu est représenté dans la figure 3.

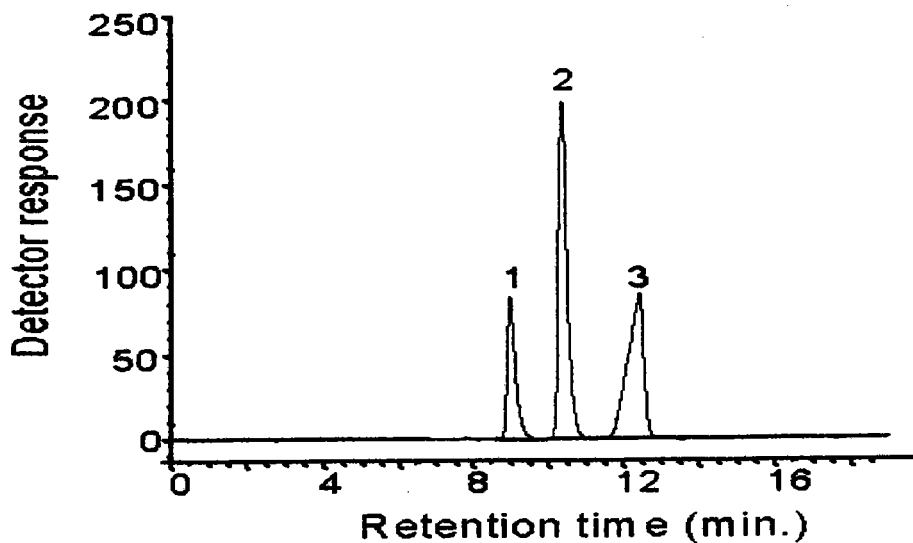


Figure 2: Chromatogramme CLHP de l'hypoxanthine et ses produits d'hydroxylation
1: hypoxanthine, 2: xanthine, 3: acide urique

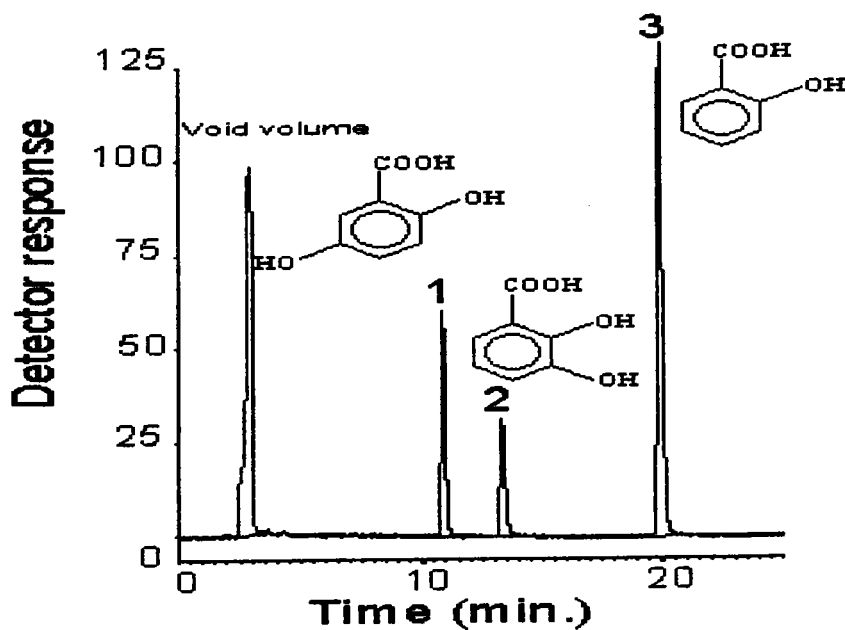


Figure 3: Chromatogramme de l'acide salicyllique et ses produits d'hydroxylation, 1: acide 2,5-dihydroxy benzoïque, 2: acide-2,3-dihydroxybenzoïque et 3: acide salicyllique, colonne Latek, C-18, 250 mm, 4 mm di (5 µm), Eluant montpr.1, débit 1 ml/min

II-6- TECHNIQUES D'IDENTIFICATION

II-6-1- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

II-6-1-1- Pour les huiles essentielles d'*Annona cuneata* et d'*Annona senegalensis*

Nous avons utilisé un chromatographe équipé d'un détecteur de masse quadripolaire, modèle HP 8970, la séparation a été réalisée sur une colonne capillaire remplie de silice fondue DB- 1 (polydiméthylsiloxanne) (25 m x 0,13 mm, 0,25 µm). Le gaz vecteur est l'hélium fonctionnant à un débit de 0,9 ml/min.

1 µl de chaque solution hexanique respectivement d'huile essentielle d'*Annona cuneata* et d'*A. senegalensis* sont injectés. La programmation de température du four est de 50 °C pendant 3 min et de 50°C à 220°C à 5°C / min pendant 30 min.

La colonne traverse l'interface chauffée à 200 °C du spectromètre de masse ; le courant ionique est de 220 µA, la vitesse de balayage effective est de 1 scan/s par spectre pour un domaine de masse allant de 30 à 450 uma. L'énergie d'ionisation est de 70 eV.

La quantification a été faite par le calcul des pourcentages de chaque composé identifié en utilisant la méthode de normalisation interne sans tenir compte des différents facteurs de réponse des composés élués.

II-6-1-2- Pour l'insaponifiable et l'extrait méthanolique de l'huile d'argan, de l'extrait méthanolique d'*A. cuneata* et d'*A. dichostyla*

Le chromatographe utilisé est de type (HP) 6890 couplée à un spectromètre de masse quadripolaire type HP 5973. La séparation a été réalisée sur une colonne capillaire OV-101 (30 m, 0,25 mm di, 0,25 µm épaisseur du film). Le gaz vecteur est l'hélium à un débit de 38 ml/sec.

1 µl d'échantillon est injecté via un injecteur à axe vertical avec auto-échantillonneur constitué d'un carroussel porte échantillon, qui permet d'enchaîner plusieurs dosages. La température du four est la suivante : de 100 °C à 270 °C à 4 °C/min, enfin 270 °C est maintenue pendant 20 min. La température de l'injecteur est de 250 °C. La température de la ligne de transfert est de 320 °C.

Les conditions utilisées en Impact Electronique sont les suivantes: La température de la source ionique est de 250 °C, l'énergie d'ionisation est de 70 eV, les mêmes conditions sont utilisées en mode de monitoring d'ions sélectionnés (SIM).

Avant injection 50 µl d'extrait méthanolique sont additionnés de 100 µl de BSTFA à la température de 37 °C durant 15 min jusqu'à dérivation totale.

II-6-2- Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

Les analyses LC/MS ont été effectuées sur le Thermofinnigan TSQ 7000 (USA) en mode négatif. Le flux provenant du chromatographe est séparé par un *Split* post-colonne, ainsi 90% du solvant est éliminé et 10% sont introduits dans la source ESI. Les paramètres utilisés sont identiques à ceux décrits dans la CLHP avec un débit de 0,5 ml/min. Nous avons appliqué différents modes d'analyse (SIM, SI et Scan) en fonction de l'expérience réalisée. En mode SIM: l'*Ion Trap* stocke sélectivement les ions présélectionnés, puis les scanne de manière à fournir une trace ionique de chaque ion. Ceci permet d'augmenter la sensibilité de l'analyse. Les extraits sont analysés en UV dans la phase mobile.

L'analyse par spectrométrie de masse ESI/MS préconisée pour des produits polaires et peu volatiles, a été effectuée en mode négatif. Dans cette analyse, les ions sont émis directement dans la phase gazeuse à partir de gouttes chargées. Ce qui permettra l'ionisation des composés qui sont ensuite introduits dans le spectromètre de masse sous forme d'ions pseudo-moléculaires monochargés ou multichargés.

II-6-3- Chromatographie en phase gazeuse (CPG) (colonne remplie)

Cette chromatographie analytique en phase gazeuse, a été utilisée pour la quantification du squalène. L'appareil utilisé est un chromatographe modèle HP 5890, munie d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne remplie (3% OV-1), de 3m * 0,5 mm de diamètre intérieur. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 30 ml/min.

2 µl d'une solution (1g d'huile additionnée de 5 ml de dichlorométhane contenant 100 µg de l'étalon interne) sont injectés "On column". La programmation de la température est la suivante : 160 °C (1 min), de 160-260 °C à 4 °C/min, 260 °C pendant 20 min, la température de l'injecteur est de 250°C, alors que le détecteur est maintenu à la température de 270 °C.

II-6-4- Spectrométrie en UV

Les spectres d'absorption dans l'ultraviolet sont réalisés sur un spectrophotomètre KONTRON modèle UNVIKON 930.

Des cuves standards de quartz sont utilisées. Les solutions sont préparées par dissolution d'une faible quantité du composé (~ 0,1 mg) dans 100 ml de MeOH pour analyser les composés isolés après hydrolyses.

Cet appareil a servi aussi pour le dosage des pigments de l'huile d'argan, et lors du calcul des diènes conjugués formés (selon Chan and Levett; 1977) pendant l'étude de l'autoxydation de l'huile d'argan et enfin, il a servi pour le dosage de l'activité antioxydante de la fraction dite Farsap de l'huile d'argan.

II-6-5- Résonance Magnétique Nucléaire

Les paramètres relevés sur un spectre de RMN unidimensionnel sont :

- le déplacement chimique (δ), exprimé en ppm, et défini par la relation suivante :
- $\delta = \nu_{\text{atom}} - \nu_{\text{TMS}} / \text{fréquence de l'appareil (en Hz)}$; il est comparé à celui d'une substance de référence, le TMS (tetraméthylsilane). Au signal de résonance de ce produit, la valeur 0 est affectée arbitrairement.
- la constante de couplage (exprimée en Hertz) est une donnée qui permet d'apprécier l'information et l'effet liés aux spins des noyaux voisins.

Ces deux paramètres, ainsi que l'intégration des signaux, sont essentiels pour interpréter un spectre de RMN du proton.

Le spectre obtenu en RMN du Carbone renseigne par ailleurs, sur le nombre et la nature des carbones.

En RMN bidimensionnelle, les tâches des signaux pourraient être faites directement par des prévisions chimiques de déblindage en utilisant les règles empiriques d'incrément du Spectool et par rapport à la banque de données RMN (22000 spectres) en utilisant le logiciel WIN SpecEdit.

Pour résoudre les ambiguïtés restantes des tâches, des spectres ont été obtenus à partir des composés par des expériences de découplage sélective ou de corrélations homo- (COSY45, COSY DQF) ou hétéronucléaire (HMQC ou COLOC) et quand il est nécessaire, les stéréochimies ont été déterminées à l'aide des séquences NOE et les expériences ROESY.

Ces méthodes sont décrites dans le chapitre IV traitant les méthodes d'identification par RMN des produits essentiellement isolés d'*A. dichostyla*.

La modélisation moléculaire a servi de guide pour nos attributions pour le triterpène d'*A. dichostyla*, les déplacements sont exprimés par Chemdraw 6.0 (Cambridge soft, ma, Cambridge) et le modèle moléculaire est obtenu par Chem3D, utilisant le champ de force MM2.

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été mesurés sur un appareil Bruker AMX-500 Rheinstetten, Allemagne, fonctionnant à une fréquence de 500 MHz. Comme solvants deutériés, nous avons utilisé soit le D₂O, soit MeOH-d₄ ou encore le CDCl₃ ou le DMSO (Cambridge Isotope Laboratories Inc., USA).

Les spectres de résonances de ¹H pour les huiles d'argan alimentaires et esthétique ont été enregistrés sur un appareil Bruker, AC-250, fonctionnant à une fréquence de 62,8 MHz pour ¹H.

Les spectres de résonances du ¹³C pour les huiles d'argan ont été enregistrés sur un appareil Bruker AM-500 MHz et en utilisant les mêmes séquences de pulses et les conditions décrites par Mannina *et al.*, 1999.

II-7- CONTRÔLES PHYSICO-CHIMIQUES

II-7-1- Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide des hétérosides d'*A. dichostyla* (rhamnoglycosylé et glucoglycosylé) est réalisée au bain-marie bouillant pendant deux heures en présence de HCl 5N. L'aglycone est extrait de l'hydrolysât par l'éther. La présence des sucres est confirmée, après neutralisation de l'hydrolysât par le carbonate de baryum, par CCM en présence de témoins, à l'aide de systèmes spécifiques.

Les extraits méthanoliques (10 µl de chaque) à partir d'*A. spinosa* et d'*A. cuneata*, transférés dans des tubes de verre de 15 ml de volume, séchés sous vapeur d'azote sont repris dans 100 µl d'acide sulfurique (0,5 M), l'hydrolyse est conduit pendant 3 h à 37 °C. Après incubation, 100 µl d'eau distillée sont ajoutés, la fraction hydrophobe est extrait par la suite avec 2 ml d'acétate d'éthyle, après décantation pendant 24 h, l'extrait acétate d'éthyle, évaporé est repris dans 100 µl de méthanol puis dérivatisés en présence de BSTFA à 37 °C pendant 15 min pour enfin être dérivatisé et analysé par GC/MS.

L'hydrolyse basique est conduit en présence d'une solution de potasse de 100 g/l en présence de 10 µl de solution méthanolique, après incubation, le milieu est acidifié par

ajout de gouttes d'HCl et enfin l'hydrolysât est extrait comme décrit pour l'hydrolyse acide.

II-7-2- Indices de contrôle de l'oxydation de l'huile d'argan

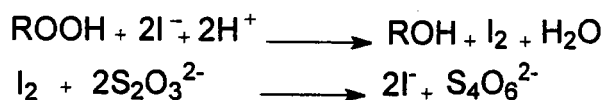
Nous avons utilisé quelques indices pour contrôler l'oxydation des huiles d'argan et de tournesol à 63,5 °C. Les valeurs des peroxides ou Vp, diènes conjugués ou DC ou encore les valeurs de p-anisidine ou p-Av sont des indices très utiles pour apprécier les étapes primaires et secondaires d'une détérioration oxydative. 25 ml (de chaque) de l'huile d'argan esthétique et alimentaire ainsi que l'huile de tournesol ont été soumises à un stress thermique dans les conditions de stockage rapportées par Udaya *et al.*, 1995.

II-7-2-1- Diènes conjugués

Cette expérience a été conduite selon Chan and Levett, 1977, in Ulrich *et al.*, 2000. En effet, l'évaluation de la stabilité des huiles a été effectuée en analysant chaque 24 h l'absorbance en UV à 234 nm des échantillons dilués dans l'iso-octane aux concentrations donnant des absorbances inférieures à 1.

II-7-2-2- Valeurs des peroxides (AOAC, 1990)

C'est par définition le nombre de µg d'O₂ actif du peroxyde (ROOH) contenu dans un g de corps gras, susceptible d'oxyder I⁻ pour libérer I₂ exprimée en mmol /Kg ou en milliequivalent d'O₂ actif /Kg de corps gras. Ip (mmol/Kg) = 1/16 Ip (µg/g) = 1/8 Ip (µg/g). La réaction du dosage est la suivante :



Le dosage de cet indice a été suivi selon la méthode suivante, un minimum de 5g de l'huile, en présence de 30 ml du mélange acide acétique/chloroforme, dans les proportions 3:2 v/v en présence de 0,5 ml d'une solution saturée d'iodure de potassium (83,2 g de KI / 40 ml eau). Après agitation pendant 10 s, 30 ml de l'eau desionisée sont ajoutés, la couleur de la phase supérieure devient marron, la phase en dessous est transparente, le mélange est gardé au repos pendant 10 min à la température ambiante et titré avec une forte agitation par exactement 0,01 M de thiosulfate de sodium. 0,5 ml d'amidon (1% dans CHCl₃) est ajouté comme indicateur de dosage et la fin du dosage est estimée quand la phase supérieure passe du jaune au noir et la phase organique reste grise claire.

$I_p = S \cdot N / 5 \cdot 1000$ où S est le volume en ml de fin du dosage, N=0,01 N.

II-7-2-3- Valeurs des p-anisidine

L'indice de p-anisidine ou p-Av permet de déterminer les composés aldéhydiques α -insaturés essentiellement. Le principe est basé sur la réaction en solution acétique entre les composés aldéhydiques présents dans l'échantillon et la p-anisidine pour donner un complexe coloré jaune absorbant à 350 nm.

Par convention, l'indice de p-Av est 100 fois la valeur de la densité optique d'une solution de 1 g de matière grasse dans 100 ml d'un mélange de solvant et de réactif.

50 ml d'une solution S₁ à 2 % m/v d'huile d'argan solubilisée dans du propanol-2, est additionnée de 50 ml d'une solution S₂ ($3 \cdot 10^{-2}$ M de p-anisidine dans l'acide acétique glacial/propanol-2 : 1/1). Les solutions sont mélangées et la densité optique (DO) est lue à 350 nm.

II-7-3- Calcul des indices de Kovats pour l'identification des huiles essentielles

Pour caractériser les propriétés de rétention, on utilise à la place des temps de rétention, les indices de rétention de Kovats pour la série homologue des n-alcanes servant de substances de référence. Il donne la position relative d'un pic de substance dans un chromatogramme, interpolé à partir des temps de rétentions de n-alcanes voisins. Cet indice est utile pour la comparaison des données de rétention obtenues par plusieurs auteurs dans différentes conditions puisqu'il est presque indépendant de plusieurs paramètres et des conditions chromatographiques en phase gazeuse. Dans une série homologue, on obtient d'abord une relation linéaire entre le logarithme du temps de rétention $\log t_s$ et le nombre de carbones du composé paraffinique. L'indice de rétention est donné par : $I = 100(y-x)(\log t_{sA} - \log t_{sx}) / (\log t_{sy} - \log t_{sx}) + 100x$. x et y représentent le nombre de carbones des n-alcanes précédant ou suivant la substance A, avec les temps de rétention nets correspondants.

II-8- ACTIVITES ANTIRADICALAIRES

II-8-1- ETUDE DES TBARS PAR SPECTROFLUORIMETRIE

Les analyses spectrofluorimétriques des produits de peroxydation de l'huile d'argan et des esters d'acide linoléique, linoléinique et arachidonique, ont été effectuées sur un appareil type KONTRON SFM 25 après formation des substances réactives avec l'acide

thiobarbiturique (TBAr) par condensation. Des cuves standards de quartz spécifiques ont été utilisées. Les paramètres suivants ont été choisis :

High voltage : 500 ; Response : 1 ; $\lambda_{\text{emi}} = 526 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{exc}} = 541 \text{ nm}$.

La peroxydation de l'huile d'argan a été effectuée en présence du réactif de Fenton selon le protocole de Nishiyama *et al.*, 1993: le milieu réactionnel est constitué de 2,5 mmol (KCl 0,3 M, tampon Trizma 0,1 M), le pH à 7,4 est ajusté en ajoutant quelques gouttes d'HCl, 1 ml FeCl_2 , 10^{-3} M ; 50 μl H_2O_2 , 10^{-3} M , 100 μl SDS (10 %) et 1,35 ml H_2O q.s.p. Le témoin est constitué de 2,5 ml (KCl 0,3 M, Tris, 0,1 M) auxquels on rajoute 100 μl SDS 10 % et 2,45 ml d' H_2O q.s.p. Les solutions sont agitées doucement pendant 18 h à 37 °C dans des tubes plastiques à hémolyse. La peroxydation est stoppée en ajoutant 50 μl de BHT à 4 % dans l'éthanol.

Les tubes ont été couverts avec du papier aluminium pendant l'incubation pour éviter toute influence de lumière sur la peroxydation.

Les essais de la réaction de condensation, ont été réalisés en triplicat dans des tubes Eppendorffs en présence de l'acide thiobarbiturique selon le procédé de Wasowicz *et al.*, 1993. Le protocole est détaillé dans le chapitre VI.

II-8-2- Etude de la catalyse de la xanthine oxydase par CLHP

Les extraits méthanoliques sont obtenus à partir de 200 g de chaque huile étudiée dans 50 ml de méthanol. La même procédure d'extraction est maintenue, et le résidu obtenu est repris par 1 ml de méthanol prêt pour doser son activité antioxydante.

La méthode de dosage employée pour tester l'activité antioxydante des produits purs et des extraits méthanoliques obtenus, est basée sur le procédé décrit par Owen *et al.*, 1996. La préparation enzymatique est composée de 73 mg d'EDTA, du fer ferreux (32,7 mg), de l'hypoxanthine (20,5 mg) et de 125 mg d'acide salicylique (SA) auxquels on additionne 19,05 ml de K_2HPO_4 (1M) et de 30,95 ml de KH_2PO_4 (1 M), ce mélange est repris dans 500 ml du tampon phosphate (PO_4 , 0,1 M). Le pH est ajusté à 7,4 par addition de gouttes d'HCl. Les expériences ont été conduites en dupliquât (1 ml, volume final), dans des tubes plastiques de 15 ml de volume. Le témoin est le Trolox, les concentrations sont ajoutées (en dupliquât) dans des tubes plastiques de 15 ml, puis évaporées sous vapeur d'azote. Le tampon est ajouté (1 ml), 5 μl du mélange xanthine oxidase dans le sulfate d'ammonium (3,2 M) dans le rapport volume 1:5 sont rajoutés pour initier la réaction. Après incubation pendant 3h, à 37 °C, 20 μl du mélange réactionnel sont analysés par CLHP.

Quand les concentrations de différents produits sont étudiées, 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 et 500 μ l de différents extraits méthanoliques ont été alors respectivement additionnés dans les tubes en plastiques.

Les mélanges réactionnels après l'incubation sont centrifugés à 5000 rpm. puis filtrés avant injection.

L'hydroxylation de l'hypoxanthine en xanthine et en acide urique est suivi à 270 nm (point isobéistique de l'hypoxanthine et de l'acide urique) utilisant un détecteur UV à barrette de diodes. L'acide salicylique et ses produits hydroxylés sont séparés en incorporant exactement 40% de méthanol dans la phase mobile, dans le cas de la chromatographie à pair d'ions ou en utilisant la méthode montpr.1, la détection est faite à 325 nm représentant λ_{\max} des acides 2,3- et 2,5-Dihydroxybenzoïques. La quantité du diphenol produite est calculée à partir des courbes standards des deux formes 2,5-DHBA et 2,3-DHBA en tenant compte de leurs coefficients de réponse, et sont construites à partir du chromatogramme obtenu à 325 nm dans l'intervalle 0-1000 μ M en absence d'antioxydants. La Chromatographie est suivie à température ambiante. Les courbes d'étalonnage obtenues font part du protocole de cette méthode au chapitre VI.

II-8-3- Dosage quantitatif de l'activité antioxydante de la fraction Farsap de l'huile d'argan en utilisant le modèle du β -carotène-acide linoléique

0,2 ml d'une solution A (1 mg β -carotène + 10 ml CHCl_3), auquel on rajoute 5 ml de CHCl_3 , la solution est protégée à l'abri de la lumière et de la chaleur, cette solution présente une absorbance maximale à 470 nm en UV-Visible (Spectrophotomètre UV type UNVIKON 930) de 0,48. Une solution B consiste en 1 ml de la solution A à laquelle on rajoute 20 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Cette solution B est évaporée, reprise dans 50 ml d'eau distillée préalablement oxygénée par barbotage d'oxygène pendant 15 min et sous agitation. L'émulsion formée doit être fraîchement utilisée.

La cinétique d'absorption à 470 nm est suivie pendant 120 min à 50 °C et sous agitation continue. À intervalles de temps réguliers de 15 min et en présence ou sans antioxydant. Le blanc est constitué de 20 mg d'acide linoléique, 200 mg de Tween, 1 ml de la solution A et 50 ml d'eau oxygénée.

Les solutions méthanoliques ainsi que la fraction Farsap (0,2 ml) sont testées à des concentrations de 100 mg/l. Les solutions méthanoliques sont utilisées avant et après leurs

hydrolyses des deux variétés d'huile étudiées pour le dosage, les résultats sont exprimés en : pourcentages d'inhibition : $A_A = (R_{\text{control}} - R_{\text{échantillon}} / R_{\text{control}}) * 100$.

$R_D = \text{Ln} (A_I / A_X) * 1/t$, t= 15, 30, 45, 60, 100, 120 (taux d'oxydation).

$C_{AA} = [A_S(120) - A_C(120)] [A_C(0) - A_C(120)] * 1000$ (coefficients d'activité antioxydante) où A est l'absorbance et t représente le temps de la réaction.

II-9- TOXICITE AIGUË

Nous avons utilisé des souris Swiss, de sexes mâles âgés de 10 à 11 semaines provenant du centre d'élevage Janvier (Lyon), elles séjournent dans une pièce à 20 °C ±1, équipée d'une photopériode de 12 h. Eau et croquettes sont fournies à volonté.

Une semaine d'adaptation des souris dans leurs cages a été nécessaire.

Le protocole a consisté en la recherche de la dose létale (DL₅₀) responsable de 50 % de la mortalité. La variété alimentaire de l'huile d'argan a été administrée par voie orale, le groupe témoin a été traité dans les mêmes conditions en utilisant l'eau à la place de l'huile.

Les aiguilles d'intubation 16 G-3 sous référence 42553 ont été fournies par polylabo (France)

Les souris sont placées dans des cages en lot de 10.

II-10- STATISTIQUES

Les valeurs représentent la moyenne de 3 déterminations de 3 essais pour le calcul des valeurs d'hydroperoxydes, des valeurs de p-anisidine, de diènes conjugués et des calculs des TBARS, sauf pour la RMN ¹H de l'huile d'argan où les valeurs représentent la moyenne de deux déterminations. Les comparaisons statistiques dans le test d'activité antioxydante utilisant le modèle du β-carotène ont été déterminées en utilisant le test de student alors que les interactions entre les antioxydants utilisant le modèle de la xanthine oxidase dans les extraits méthanoliques des huiles, d'*A. cuneata* et d'*A. dichostyla* et l'inhibition de l'attaque des espèces réactives d'oxygène sur l'acide salicylique sont évaluées en utilisant le modèle de régression linéaire multiples. Les CI₅₀ sont calculées à partir de la table (Jendel Scientific programm).

CHAPITRE III- INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE D'ANNONA CUNEATA PERS.

III-1- Extraction

L'extraction (Schéma 1) a été réalisée sur 20 g des écorces des racines préalablement desséchées. L'épuisement à l'aide du méthanol après délipidation (hexane, 1,5 l), a été effectué pendant 3 heures en utilisant un appareil soxhlet. 500 ml de méthanol ont été nécessaires à cette opération.

1,91 g du résidu qui représente 9,55 % du rendement ont été obtenus après évaporation du méthanol. L'extrait méthanolique est prêt à être étudié.

III-2- Séparation et purification

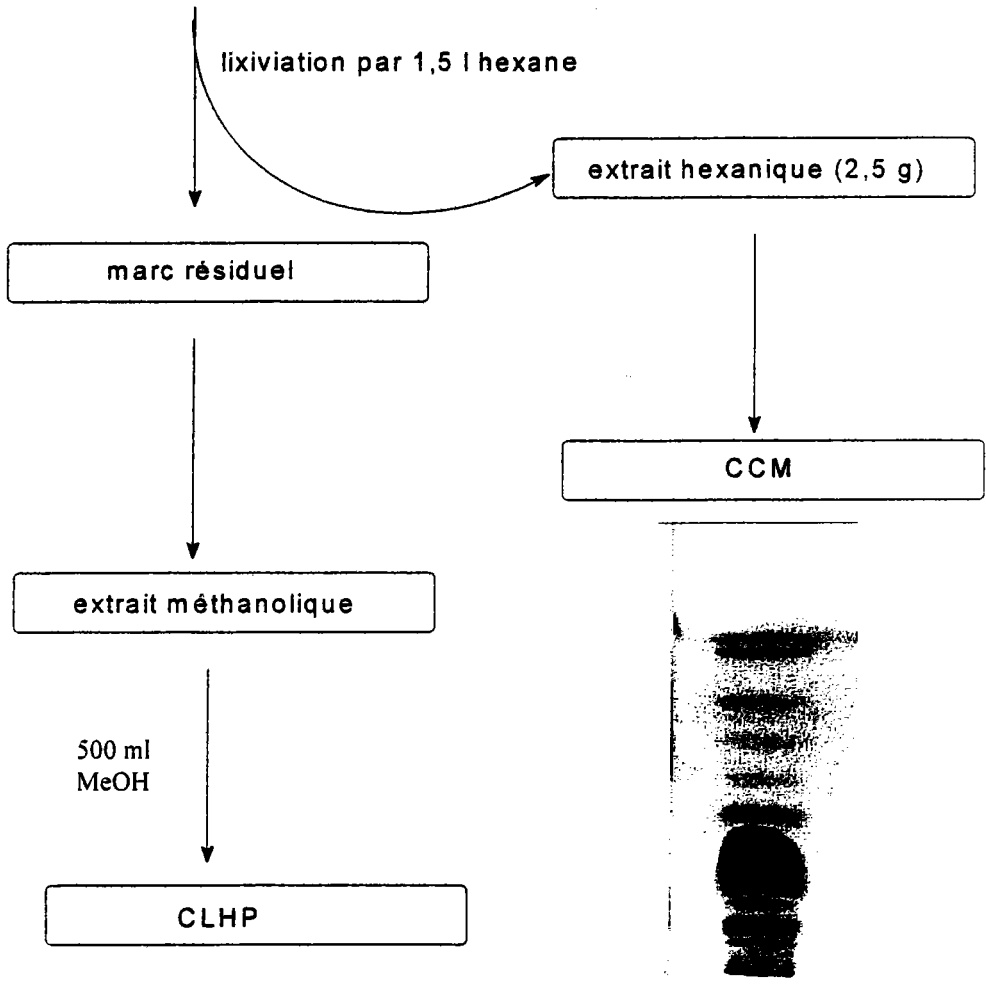
Avant toute tentative de purification, l'analyse a été tentée par des techniques chromatographiques, principalement la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie en phase gazeuse (GC/MS) et la chromatographie liquide haute performance analytique (CLHP).

Nous avons fait appel à la technique CCM en utilisant le système de solvant S-1 pour l'extrait hexanique d'*A. cuneata* (schéma 1). Cet extrait semble être riche en composés réagissant avec le réactif à la vanilline sulfurique et à l'anisaldehyde. Plusieurs produits (pigments chlorophylliens, acides gras, composés terpéniques), font part de ce mélange. Notre but a été de faire une délipidation ou une prépurification pour entamer l'isolement des produits plus polaires qui nous intéresse.

Nous avons utilisé la technique CLHP (cf. Matériels et Méthodes) et la méthode choisie est montrée. 1. Le profil de l'extrait total méthanolique obtenu après délipidation est représenté dans la figure 4. Nous sommes intéressés aux produits présentant une absorption maximale supérieure à 280 nm dans l'extrait méthanolique et des temps de rétention supérieurs à 20 min dans les conditions utilisées. En revanche, les différents produits de cet extrait méthanolique d'*A. cuneata* présentent respectivement des temps de rétention faibles (entre 5 et 20 min) et une absence d'absorption à 340 nm à l'exception d'un seul composé qui élue à 41,28 min dans les conditions utilisées et présente une absorption maximale vers 315 nm.

Ce composé (le produit 8) pourrait probablement se rattacher à une structure de flavone (figure 4). Son spectre UV est présenté par la figure 5, p. 39.

20 g des écorces des racines de chaque *Annona*



CCM de l'extrait hexanique d'*A. cuneata* (5-4)

Schéma 1: Protocole d'extraction des constituants des écorces des racines d'*A. cuneata* Oliv.

Analytical high performance liquid chromatograph of a methanolic extract of *Annona cuneata*



Figure 4: Chromatogramme CLHP de l'extrait méthanolique des écorces des racines d'*Annona cuneata* Oliv. Colonne Latek RP C-18, 250 mm, 4 mm d.l. (5 µm), Eluant Méthanol, (2% acide acétique dans l'eau), gradient d'éluion montpr.1, débit: 1 ml/min.

III-3- Identification

Une identification plus approfondie de cet extrait a été tentée par chromatographie liquide en utilisant le détecteur de Masse (LC/MS/DAD). Le spectre de masse en ESI/MS du produit 8 ne donne aucune réponse, probablement liée à son instabilité.

De plus, les résultats de la CCM en utilisant le système de solvant S-4 à partir de l'extrait méthanolique d'*A. cuneata* qui sont indiqués dans le tableau 3 montrent un profil pauvre en produits qui nous intéresse.

Tableau 3: Données récapitulatives de l'examen par CCM (S-4) de l'extrait méthanolique d'*A. cuneata*

Rf	Fluorescence à 254 nm	Fluorescence à 365 nm	Coloration à l'aide du réactif de Neu
0,05	Extinction	Jaune pale	-
0,12	Extinction	Jaune pale	-
0,18	Orange	Jaune	-
0,27	Extinction	Bleu	-
0,82	orange	Jaune	orange pas claire
0,92	extinction	Jaune pale	-

Les données de la CCM (S-4), ainsi que l'observation du chromatogramme en lumière UV à 365 nm et les colorations obtenues font apparaître une seule tache orange probablement attribué au composé 8.

Sur la figure 5, le spectre UV enregistré présente une première bande (B I) située à 320 nm, attribuée au chromophore cinnamoylé et une deuxième bande (BII) à 275 (295 ep.) nm due au chromophore benzoylé, une troisième bande pourrait être attribuée à un autre chromophore à 215 (230 ep.) nm. Ce spectre renseigne sur une structure de flavone car la bande BI < 350 nm est caractéristique des flavones (Mabry, 1970).

Il serait facile de pouvoir identifier ce produit, mais nous n'avons pas pu obtenir sa stabilité en ESI/MS.

Sur la base des données des spectres UV et de Masse obtenues par LC/MS/DAD, la clé de détermination des 8 composés détectés et identifiés est la suivante :

1. = acide-3,4-dihydroxy benzoïque
2. = acide p-hydroxy-benzoïque
3. = 3,4-dihydroxy benzaldehyde
4. = p-hydroxy benzaldehyde
5. = inconnu (M-H⁻ = 387, 2M-H⁻ = 775)
6. = inconnu (nous n'avons enregistré aucune réponse en ESI/MS)

7. = acide ferulique

8 = inconnu (en ESI/MS, nous n'avons enregistré aucune réponse).

Le travail d'identification est poursuivi par GC/MS après hydrolyse acide (technique décrite dans Matériels et Méthodes) de l'extrait méthanolique d'*A. cuneata*, cette analyse s'est révélée nettement plus sensible que la CLHP et ceci pour tous les composés phénoliques sous leurs formes aglycones identifiés.

Le tableau 4 récapitule le profil chromatographique obtenu par GC/MS de cet extrait méthanolique. Sur ce tableau sont présentées, treize structures détectées dans les écorces des racines d'*A. cuneata*, leurs temps de rétentions et leurs masses respectives sont aussi rapportés. L'acide ferulique, vanillique, syringique et le tyrosol sont parmi les phénols détectés dans l'extrait méthanolique des écorces des racines d'*A. cuneata*.

Tableau 4: tableau récapitulatif des différents composés identifiés par GC/MS dans l'extrait méthanolique d'*A. cuneata*

TR (mn)	Composés	Principaux ions détectés (Masses)
16,5	Acide-3,4-dihydroxybenzaldehyde	73, 147, 193, 267, 282
16,8	Acide-p-hydroxybenzoïque	73, 126, 193, 223, 236, 282
22,1	Acide dihydroxybenzoïque	73, 193, 311, 355, 270, 370
28,3	Acide ferulique	73, 131, 249, 323, 338
21,5	Acide vanillique	73, 223, 253, 267, 282, 297, 312
14,0	Vanilline	73, 93, 147, 194, 209, 224
17,2	Alcool vanillique	73, 179, 209, 268, 298
19,4	Homovanillate	73, 147, 193, 217, 312
10,1	p-Hydroxybenzaldehyde	75, 93, 117, 151, 179, 194
24,0	Acide syringique	73, 93, 117, 131, 253, 297, 312, 327, 342
15,2	Tyrosol	73, 179, 267, 282
19,1	Syngaldehyde	73, 93, 209, 224, 239, 254
44,5	Squalene	41, 69, 95, 137, 410

TR : Temps de rétention

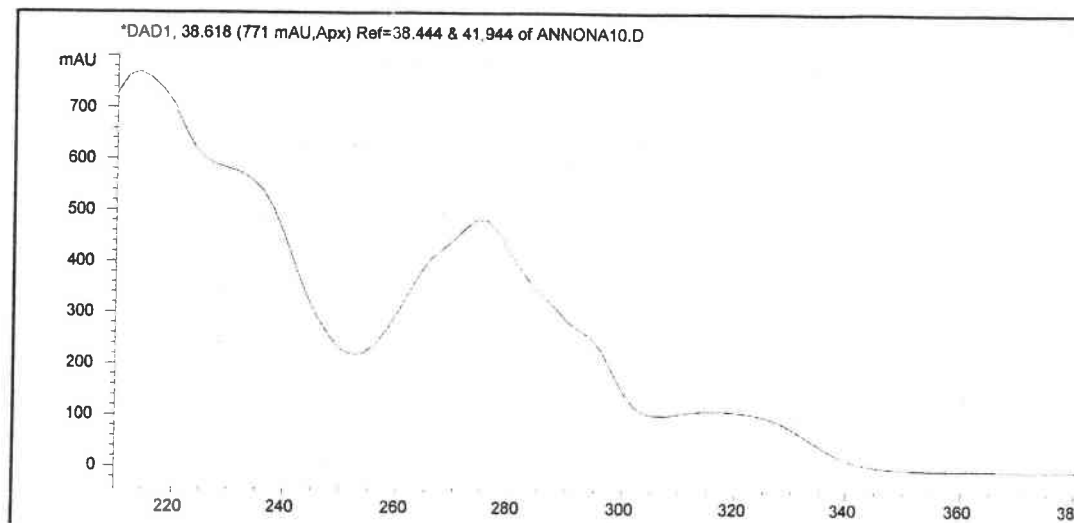


Figure 5: Spectre en UV du produit 8 identifié dans l'extrait méthanolique d'*A. cuneata*

Après cette investigation, nous avons ensuite jugé utile de travailler la fraction volatile de cette espèce à partir des écorces du tronc et des tiges. En effet les écorces traitées de cette espèce présentaient une odeur aromatique forte. L'étude comparative sur l'identification de la composition chimique des huiles essentielles d'*A. cuneata* a été réalisée par rapport à l'étude d'une autre espèce du même genre *A. senegalensis*.

III-4- Etudes des Huiles essentielles

Nous nous sommes orientés donc vers l'identification complète du chromatogramme obtenu par GC/MS des huiles essentielles provenant des écorces du tronc et des tiges d'*A. cuneata* et d'*A. senegalensis* et ainsi de déterminer les indices de rétention pour chaque composé mis en évidence par rapport aux produits paraffiniques de référence. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 5.

Les huiles essentielles des deux espèces sont étudiées et les rendements de leurs extractions respectifs sont de 0,16 et 0,3 % pour *A. cuneata* et *A. senegalensis* en utilisant un appareil préconisé par la Pharmacopée française (X^{ème} édition, 1983-1996). Les compositions chimiques de ces huiles sont établies au moyen de la chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (GC/MS).

Dans la littérature, une étude comparative a été effectuée par rapport aux fractions volatiles de différentes espèces de la famille des Annonaceae (Ekundayo *et al.*, 1989) et a fait état de présence de plus de 200 composés parmi lesquels les monoterpènes tels que α -pinène, β -pinène, myrcène, *p*-cymène, limonène, linalool et 1,8-cinéole étaient les composés majoritaires. Par ailleurs, dans une autre recherche, Fekam *et al.*, en 1996 avaient aussi observé la composition chimique des huiles essentielles de 9 espèces appartenant à la famille des Annonaceae provenant du Cameroun. Entre autres espèces, les feuilles et les fruits d'*A. senegalensis* se retrouvaient pauvre en huiles essentielles avec cependant une

prédominance des monoterpènes tels que α -phellandène, α -pinène, myrcène et l'ocymène.

Dans notre travail, 25 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle d'*A. cuneata*. La teneur en sesquiterpènes est de 19,7 %, on trouve aussi 9 sesquiterpènes dont le germacrène D (9,0 %), est le composé majoritaire et 17 monoterpènes représentant 81 % de l'huile. Le sabinène (39,9 %) étant le monoterpène majoritaire dans l'huile.

D'*A. senegalensis*, nous avons identifié 24 composés, les hydrocarbures monoterpéniques sont à 84,22 %, 36 % de p-cymène est retrouvé, α -pinène (8,3 %), le limonène (4,8 %), des monoterpènes oxygénés tels que le linalol (1,6 %), le Z-sabinol et le thymol (0,4 %) avec d'autres composés sesquiterpéniques tels que le β -caryophyllène (1,7 %).

Les spectres de masse des composés majoritaires détectés dans les deux huiles sont présentés par la figure 6.

L'examen du tableau 5 montre qu'il existe chez le genre *Annona* un groupe important de monoterpènes. La littérature (Ekundayo *et al.*, 1989) indique aussi une intervariabilité de la qualité et la quantité des huiles essentielles dans cette famille qui dépendent des effets pédologiques, de l'origine et de la partie traitée de la plante.

Les écorces des tiges d'*A. senegalensis* se sont avérées plus riches en composés volatils (0,16 %) que les fruits (0,08 %) de la même espèce mais provenant du Cameroun (Fekam *et al.*, 1996).

III-5- Conclusion :

Dans ce chapitre, l'investigation phytochimique a montré que la GC/MS était une méthode plus sensible dans la caractérisation des phénols d'*A. cuneata*. Ainsi nous avons pu démontrer la présence entre autres dérivés de l'acide ferulique, vanillique, tyrosol et l'acide syringique. L'étude faite sur les huiles essentielles des deux espèces du genre *Annona* à partir des écorces du tronc et des tiges est aussi accomplie pour la première fois dans ce travail. 39 composés ont été caractérisés dans les huiles essentielles des deux espèces étudiées, avec une nette dominance des monoterpènes. Après avoir analysé et interprété les profils GC/MS des deux huiles, nous avons calculé les indices de Kovats pour chaque composé, nous avons mis en évidence la présence de p-cymène comme produit majoritaire (36 %) dans la fraction volatile des écorces des tiges d'*A. senegalensis* alors que le sabinène avec un taux de 40 % de l'huile représente le composé majoritaire dans l'huile essentielle d'*A. cuneata*.

Tableau 5: Compositions chimiques des huiles essentielles des espèces d'*Annona* étudiées

IR	Composés	<i>A. cuneata</i>	<i>A. senegalensis</i>
934	α -thylène	1,4	2,12
944	α -pinène	5,1	8,3
977	Sabinène	39,9	-
980	myrcène	9,2	-
981	β -pinène	1,0	3,9
997	Δ -2 carène	-	0,5
1008	α -phellandrène	0,4	25,0
1020	α -terpinène	0,6	-
1026	p-cymène	0,8	36,0
1030	limonène	5,8	4,8
1030	β - phellandrène	4,9	-
1031	1,8- cinéole	1,1	-
1033	Z- β -ocimène	-	2,0
1063	γ terpinène	1,3	-
1080	Sabinène hydrate	1,0	-
1089	Terpinolene	0,3	-
1093	Linalool	3,8	1,6
1181	Terpinen-4-ol	2,3	-
1193	α -terpinéol	1,1	-
1222	Z-sabinol	-	6,9
1328	Thymol	-	0,4
1341	δ -elemene	3,0	-
1354	α -cubebene	-	0,5
1380	β -cubebene	-	0,4
1381	α -copaene	0,2	0,9
1394	β elemene	3,8	-
1420	β -carryophyllene	0,9	1,7
1430	E- α -bergamotene	-	0,5
1446	γ elemene	0,3	-
1453	α -humulene	0,5	0,4
1466	β -ionone	-	0,2
1472	Germacrène D	9,0	1,0
1496	α -muurolène	-	1,0
1527	δ -cadinène	-	0,4
1540	α -cadinène	-	0,2
1556	Elemol	1,6	-
1560	Germacrène B	0,4	-
1631	α -muurolol	-	0,4
1642	α -cadinol	-	0,6

-A. *Annona* - IR: Indices de rétention

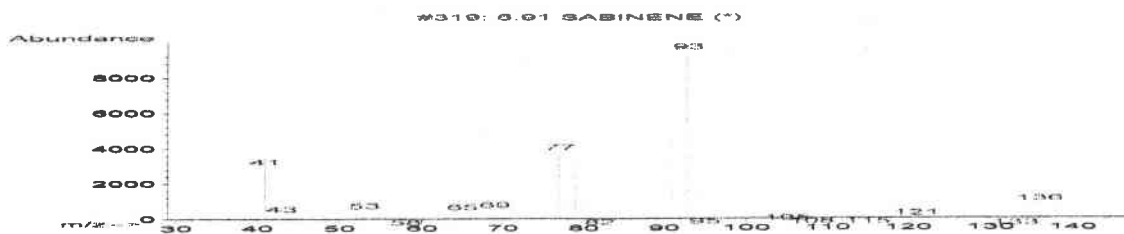
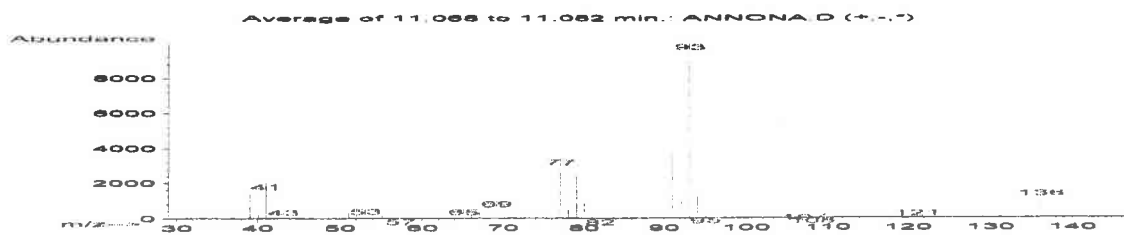
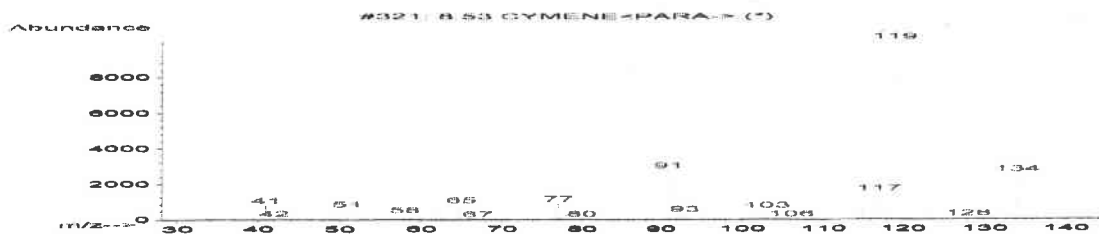
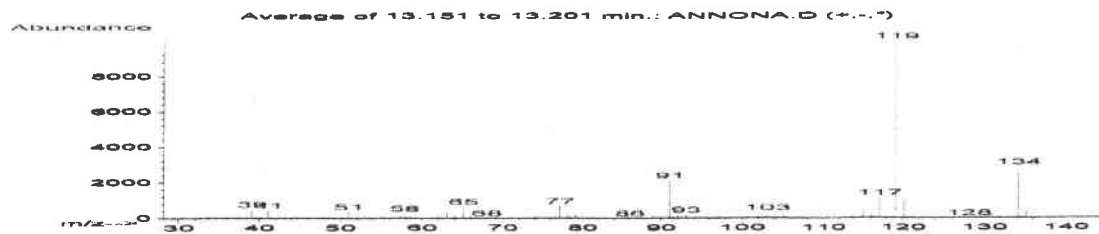


Figure 6: Spectres de masse des produits majoritaires p-cymène et Z-sabinène respectivement des deux espèces étudiées *A. senegalensis* et *A. cuneata*

CHAPITRE IV : INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE D'ANISOPHYLLEA DICHOSTYLA R. Br.

IV-1 - Extraction

Anisophyllea dichostyla R. Br. a été récoltée dans la région du Lemfu à Kinshasa (Congo) en Juillet 1999. L'extraction des polyphénols a été faite dans des solvants alcooliques tels que le méthanol, le mélange hydrométhanolique (20:80) ou encore avec l'acétone/eau (75:25). Des essais préliminaires ont montré la présence de tannins dans l'extrait méthanolique d'*A. dichostyla* en nombre intéressant, un groupe de métabolites rarement rencontré dans les plantes supérieures (Kashiwada *et al.*, 1990). En effet, une solution du macérât alcoolique obtenue des écorces des racines d'*A. dichostyla*, dosé à 5% d'équivalent plante sèche, développe en présence d'une solution aqueuse de chlorure ferrique à 1% une coloration bleu noirâtre. Le profil en chromatographie sur couche mince (CCM) utilisant le système de solvant S-4 est récapitulé dans le tableau 6, les résultats indiquent l'absence des structures de types flavones et flavonols réagissant spécifiquement avec le réactif de Neu. Notre extraction a été conduite sur 120 g d'*A. dichostyla* (écorces de ses racines) par percolation. Ainsi et après délipidation par l'hexane, le marc résiduel a été repris par 1,5 l de méthanol pendant 4h. Lors de nos prépurifications, l'extrait méthanolique a fait l'objet de séparations chromatographiques sur colonne ouverte (CC) (schéma 2).

Tableau 6: Récapitulatif du profil CCM de l'extrait méthanolique d'*A. dichostyla*, (système S₄ avec réactif de Neu pour la coloration)

Plante	Fluorescence à 254 nm	Rf	Fluorescence à 365 nm	Rf	Couleur après révélation par le Neu (S ₄)
<i>Anisophyllea dichostyla</i>	extinction	0.08	jaune	0.08	-
	extinction	0.13	jaune	0.13	rose pas clair
	Violette	0.18	Bleu	0.18	-
	extinction	0.23	Jaune pale	0.23	-
	extinction	0.85	Jaune pale	0.85	-
	extinction	0.91	violet	0.91	-

- : réaction négative

IV-2- Séparation et purification des constituants

La chromatographie sur colonne a été menée en utilisant 5 g de l'extrait méthanolique total d'*A. dichostyla* R. nommé CC₁, qui ont été immobilisés sur une colonne de silice de diamètre 2 cm et 50 cm de longueur, un gradient d'élution à l'aide du dichlorométhane, méthanol a été utilisé comme éluant (cette opération est répétée 5 fois). Les différentes fractions obtenues sont nommées désormais CC₂, CC₃, CC₄, CC₅, CC₆, CC₇, CC₈, CC₉ et

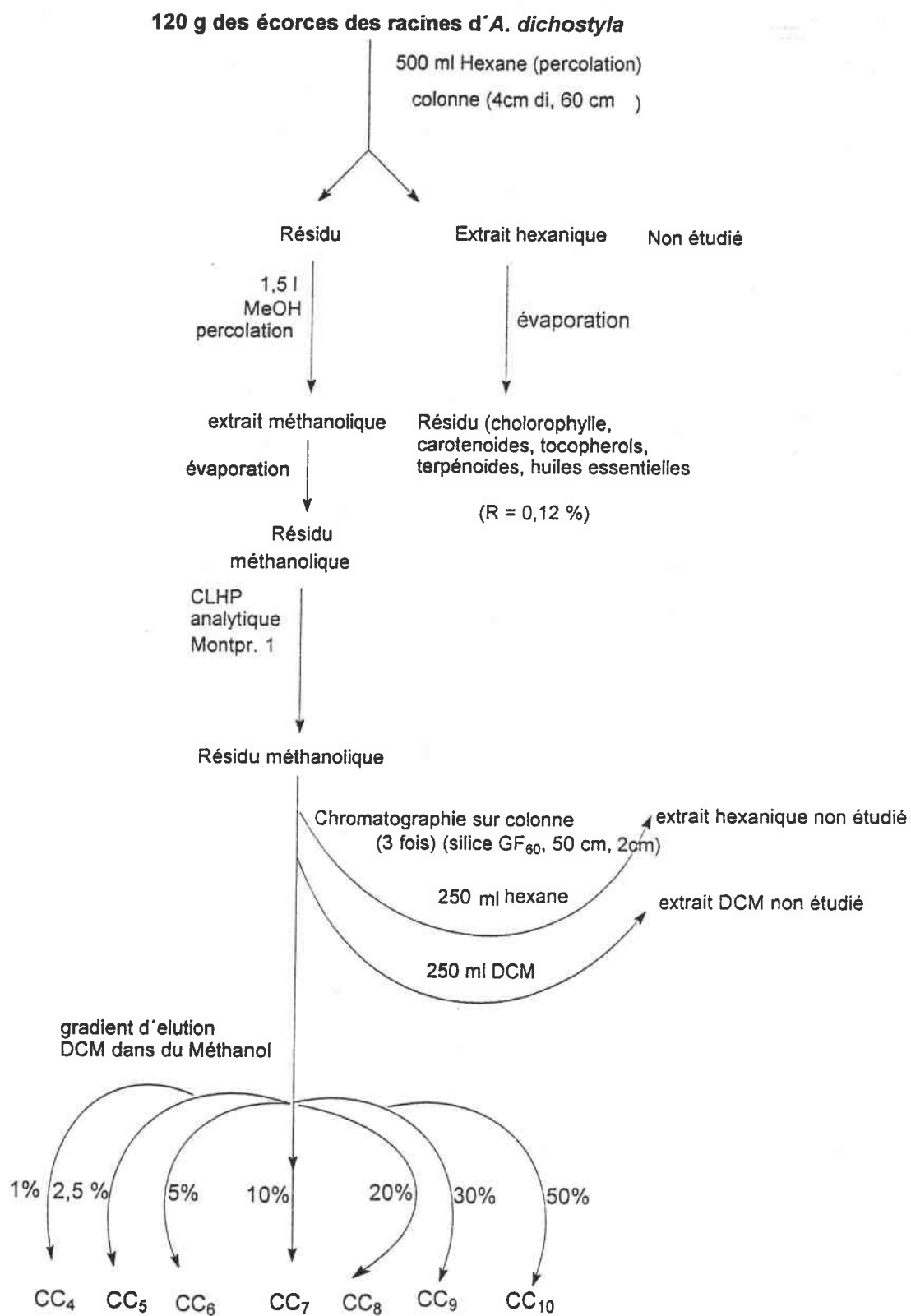


Schéma 2: Protocole d'extraction et de séparation des constituants d'*Anisophyllea dichostyla* R.Br.

CC₁₀ et qui sont examinées à leurs tours par CLHP-UV-DAD (figure 7). Le tableau 7 récapitule les volumes des solvants d'élution qui ont servi pour la séparation chromatographique à pression atmosphérique des fractions d'*A. dichostyla*. Ainsi les masses des fractions obtenues respectivement à l'aide de l'hexane, du dichlorométhane et du gradient d'élution (MeOH dans du dichlorométhane) sont aussi récapitulées dans ce tableau 7.

Les fractions CC₂ et CC₃ obtenues respectivement à l'aide de l'hexane et de dichlorométhane ne contiennent pas de polyphénols et donc ne seront pas étudiées. En effet, sans la présence de méthanol, nous ne notons aucun décrochage des composés polyphénoliques qui nous intéressent. La chromatographie sur colonne en utilisant un gradient d'élution (MeOH dans CH₂Cl₂) (CC₄, CC₅, CC₆, CC₇, CC₈, CC₉ et CC₁₀) (schéma 2) s'est avérée importante et les extraits obtenus, contiennent des tannins vrais oligomériques ainsi que des ellagitannins qui seront confirmés dans ce travail.

Tableau 7: Tableau récapitulatif des résultats de la chromatographie sur colonne de silice de CC₁ d'*A. dichostyla* R. Br.

Solvants	Quantité en ml	Eluats obtenus	
		Masse (mg)	Appellation
Hexane	250	25,5	CC ₂
DCM	250	18,2	CC ₃
1% MeOH dans DCM	250	60,5	CC ₄
2,5% MeOH dans DCM	250	86,3	CC ₅
5% MeOH dans DCM	250	186	CC ₆
10% MeOH dans DCM	250	156	CC ₇
20% MeOH dans DCM	250	250,8	CC ₈
30% MeOH dans DCM	250	224,3	CC ₉
50% MeOH dans DCM	250	503,7	CC ₁₀

La figure 7 représente les chromatogrammes des différentes fractions obtenues après prépurification de l'extrait méthanolique (CC₁), 20 µl de chaque fraction ont été respectivement analysés par CLHP en phase inverse. Le programme CLHP utilisé est celui décrit dans Matériels et Méthodes (montpr. 1). Les profils CLHP-UV-DAD de l'extrait méthanolique total (CC₁) ainsi que celui des sept fractions obtenues sont représentés dans la même figure 7.

Les analyses par CLHP de CC₁, CC₄, CC₅, CC₆, CC₇, CC₈, CC₉ et CC₁₀ ont permis de révéler la présence de seize produits dont sept sont majoritaires. Tous ces produits seront séparés par CLHP en mode semi-préparative ultérieurement. En règle générale, en phase inverse, plus leurs temps de rétention sont élevés, moins les poids moléculaires des

produits augmentent (Defreitas *et al.*, 1998). Les chromatogrammes ci-dessus montrent nettement les différents pics justifiant d'une bonne résolution et d'une bonne efficacité de la colonne dans les conditions utilisées.

Notre séparation appelle à quelques commentaires, en effet, dans la première partie du chromatogramme de l'extrait méthanolique global (CC₁) (0-20 min) apparaissent entre autres dérivés des proanthocyanidines monomériques majoritaires. La deuxième partie du chromatogramme (20-40 min) montre une série de pics bien résolus pouvant être attribués à des dérivés de tannins ellagiques, ces structures sont confirmées parallèlement par LC/MS qui sera détaillée ultérieurement. Dans notre analyse par CLHP, les composés dérivés de l'acide ellagique ou ellagitannins s'éluent à des temps de rétention plus élevés que les procyanidines. La séparation dans les conditions utilisées nous a permis le fractionnement des extraits CC₄ à CC₈ par CLHP semipréparative.

Par ailleurs la séparation des fractions polymériques des procyanidines ainsi que des procyanidines galloylées quand elles existent est difficile par CLHP et ceci est dû principalement au grand nombre d'isomères et aux dérivés possibles de ces structures. Par exemple, la littérature montre que l'analyse des tannins par CLHP n'apporte pas de solution à la séparation d'extraits tanniques des plantes composées de mélanges de proanthocyanidines et de proanthocyanidines galloylées (Lea, 1982 ; Ricardo-dasilva, 1990 ; Tanaka *et al.*, 1992 ; Rigaud *et al.*, 1993 ; Suarez *et al.*, 1996 ; Guillen *et al.*, 1996 ; Hamerstone *et al.*, 1999 ; Ding *et al.*, 1999 ; DePascual-Teresa *et al.*, 2000 ; Sanoner *et al.*, 1999 ; Palomino *et al.*, 2000). L'isolement de tels composés nécessite l'utilisation de multiples méthodes de purification et une séparation par CLHP en phase normale ne s'est avérée être efficace que lorsque l'extrait tannique ne contenait pas de proanthocyanidines galloylées (Hamerstone *et al.*, 1999). Cette même méthode a été appliquée par Cheynier *et al.* en 1997, mais sans grand succès. Cependant, dans notre travail, nous avons réussi à obtenir une bonne séparation dans les conditions utilisées nous permettant les fractionnements de CC₄ à CC₁₀. Par ailleurs, et en CCM, en utilisant le système de solvants (S-1) (figure 8a p. 49), l'extraction à l'aide du méthanol semble plus efficace que l'extrait hydro-méthanolique (méthanol / eau, 80 : 20), en effet, la solubilité des tannins dépend de leur degré de polymérisation. Les tannins à faibles degrés de polymérisation (DP_m < 6) sont plus solubles dans le méthanol que ceux à DP_m plus élevé (>6). Notre extraction s'est basée sur cette particularité (Karshevy *et al.*, 1992). En outre, d'après la littérature, les oligomères sont moins abondants que les polymères dans les plantes et sont les plus extractibles. Des fractions CC₄ et CC₆, deux produits Anis₁₁ et Anis₁₆ sont obtenus par

précipitation et sont recristallisés dans le méthanol, et ont ensuite fait l'objet d'une analyse par RMN. Les profils des premiers spectres RMN indiquent que même après délipidation (respectivement les fractions obtenues CC₂ et CC₃), des lipides résiduels ainsi que des composés triterpéniques contaminaient toujours nos produits recherchés. La repurification par chromatographie sur couche épaisse (CCE) en utilisant le système de solvant (S-1) (figure 8b) et aussi par CLHP (conditions décrites dans Matériels et Méthodes) ont été réussies et les composés nommés désormais Anis₁₁, Anis₁₆ et un triterpène Anis₂₇ sont obtenus à l'état pur et seront analysés à nouveau par RMN ultérieurement. Anis₂₇ a été obtenu principalement de la fraction CC₄ et a été co-chromatographié par rapport à d'autres triterpènes existants dans l'huile d'olive (acide maslinique et oléanolique) (figure 8b). Avant d'établir la structure d'Anis₂₇, nous nous sommes orientés vers l'isolement et la purification des 14 autres produits détectés dans la fraction méthanolique d'*A. dichostyla*. Les fractions obtenues sont recueillies à l'aide d'un collecteur automatique sur des microplates HP 220, elles sont analysées aussi par CCM en utilisant les différents systèmes S-1, S-2 et S-3, pour vérifier leurs degrés de pureté, les produits purs obtenus sont directement lyophilisés et analysés par RMN. Nous avons remarqué que les conditions opératoires dépendent étroitement de la composition chimique de l'extrait d'*A. dichostyla* en particulier sa teneur en composés lipophiles. La séparation dans les conditions utilisées nous a permis le fractionnement de CC₄ à CC₈.

- de CC₄, le profil nous a permis l'isolement d'Anis₁₅ et ainsi par précipitation nous avons obtenu Anis₁₆.
- de CC₅, le profil nous a permis l'isolement d'Anis₁, Anis₃, Anis₁₅ et Anis₁₆.
- de CC₆ apparaissent la montée d'Anis₅, Anis₉, Anis₁₁ et Anis₁₃.
- de CC₇ et CC₈ ont été purifiés Anis₂, Anis₄, Anis₆, Anis₇, Anis₈, Anis₁₀, et Anis₁₂.

D'autres fractions ont été obtenues avec des profils différents, ce sont les fractions CC₉ et CC₁₀. Ceci indique probablement la présence de procyanidines polymériques qui sont moins concentrées dans l'extrait CC₁ étudié. Plus le poids moléculaire augmente, moins la séparation des pics est bonne. De ce fait, la deuxième partie du chromatogramme (20-40 min) correspond aux oligomères et aux polymères éluant sous la forme d'un large pic irrésolu. De ces fractions Anis₁₄, Anis₃ et Anis₆ ont été aussi obtenus à l'état pur. La principale différence des profils CC₉ et CC₁₀ par rapport aux autres fractions est due très probablement à un rapport plus élevé entre les tannins polymériques et les tannins monomériques ou oligomériques à faibles poids moléculaires dans l'extrait méthanolique d'*A. dichostyla* R. Br.

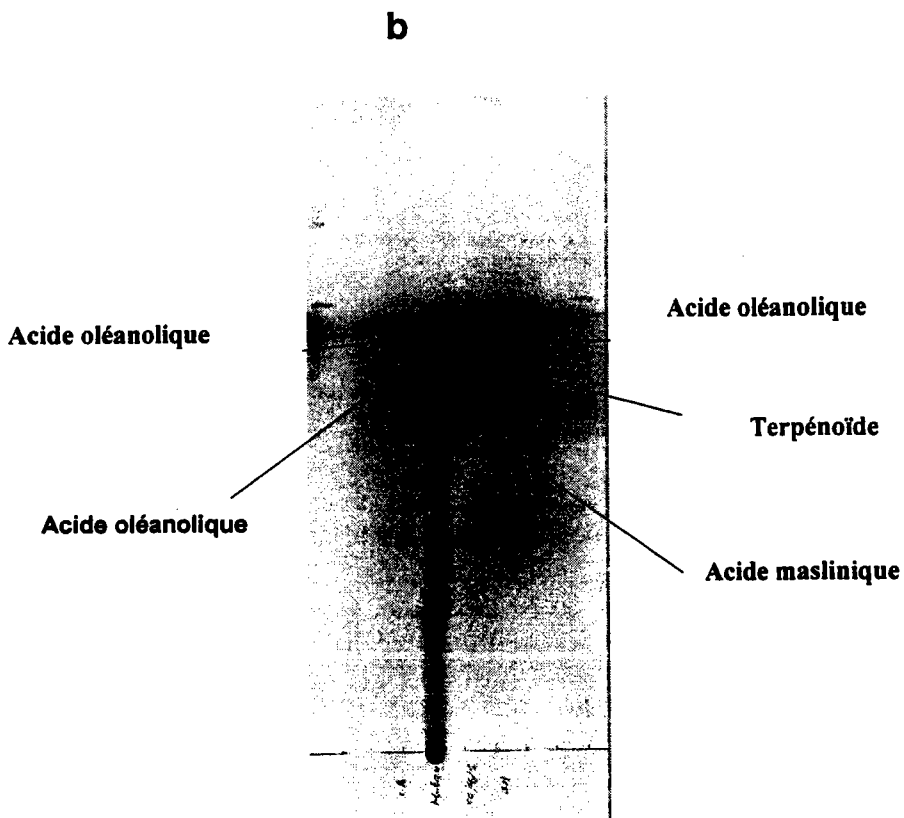
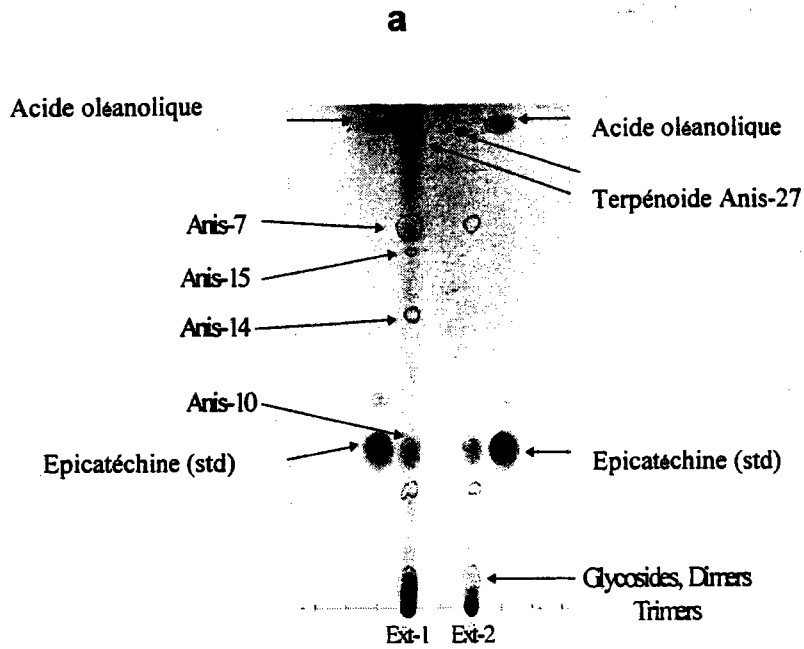


Figure 8a, b : ^a CCM des extraits méthanoliques (Ext-1) et l'extrait hydrométhanolique (Ext-2) d'*A. dichostyla*
^b CCM du terpénoïde isolé d'*A. dichostyla* comparé au triterpènes de l'huile d'olive
 Ext. 1 : Extrait méthanolique
 Ext. 2 : Extrait hydrométhanolique, Système utilisé S₁

IV-3- Caractéristiques chromatographiques et spectrales (LC/MS/DAD) des produits isolés

Dans ce paragraphe et avant toutes analyses par RMN, les résultats acquis sur les caractéristiques en chromatographie liquide et sur la spectrophotométrie UV seront confirmés par chromatographie liquide couplée avec la spectrométrie de masse (LC/MS) (conditions décrites dans Matériels et Méthodes) et dans certains cas le recours à des produits de référence a été suffisant. En LC/MS, les différents produits d'*A. dichostyla* s'ionisent très bien en mode négatif. En effet, ce sont des composés riches en électrons, qui par la présence des phénols sur le cycle benzénique, peuvent facilement perdre un proton. Les intensités fortes des ions moléculaires en mode négatif pourraient aussi expliquer leurs abondances dans l'extrait méthanolique d'*A. dichostyla*.

Nos conditions expérimentales en LC/MS étaient optimales par rapport aux composés que nous avons analysés, en effet, la séparation, la résolution et la durée de l'analyse étaient satisfaisantes. Nous avons procédé par la suite à des analyses des différents ions caractéristiques préalablement sélectionnés. Tout le chromatogramme (CC₁) a été caractérisé par cette analyse. Grâce à ce mode, chaque molécule a été détectée. C'est ainsi que chaque monomère procyanidique ou oligomère ainsi que les ellagitannins sont partiellement caractérisés mais leurs stéréochimies restent toujours inconnues et les structures exactes seront confirmées par RMN ultérieurement dans ce travail.

L'analyse par LC/MS des proanthocyanidines oligomériques est aussi largement décrite dans la littérature (Nawwar *et al.*, 1997 ; Lecchi *et al.*, 1998 ; Fulcrand *et al.*, 1999 ; Lazarus *et al.*, 1999 ; Salminen *et al.*, 1999, Rohr *et al.*, 2000 ; Friedrich *et al.*, 2000 ; Ross *et al.*, 2000). Une bonne séparation des composés est obtenue sur colonne RP-C₁₈ et par élution, un gradient eau/acétonitrile/acide formique ou acide acétique est souvent utilisé (Hammerstone *et al.*, 1999). La présence d'un acide réduit les interactions entre les composés et la phase mobile, diminuant ainsi la largeur des pics du chromatogramme et favorise la déprotonation des proanthocyanidines, il augmente aussi le nombre d'ions formés en solution et améliore ainsi la sensibilité de la méthode (*peak tailing*). Nos essais réalisés au laboratoire ont montré que les proanthocyanidines s'ionisaient beaucoup mieux en mode négatif et la présence d'acide dans notre mélange pour les analyses LC/MS a été aussi maintenue. Dans ce qui suit, nous récapitulons les résultats obtenus par LC/MS et par CLHP analytique et semipréparative des 16 produits détectés et isolés d'*A. dichostyla*.

IV-3-1- Composé Anis₁

Ce produit se présente sous forme d'une poudre blanche et un temps de rétention en CLHP de 8,5 min, dans les conditions décrites dans Matériels et Méthodes. Le spectre UV (figure 9) indique des absorbances à 242 et à 280 nm. Le spectre de masse enregistré en ESI/MS en mode négatif (figure 10) présente quelques fragments caractéristiques. En effet, dans ces conditions, la présence d'un ion moléculaire à 451 uma est confirmée, indiquant une formule brute de $C_{21}H_{24}O_{11}$ et renseigne sur une structure dérivée d'épicatéchine. La masse et le temps de rétention indiquent une glycosylation. Ceci est conditionné par la nature de l'aglycone (en phase inverse, plus une molécule est chargée en sucres et plus elle migre). Cette hypothèse est aussi confirmée par la présence du pic à 289 uma obtenu par perte d'un hexose, de plus le contrôle chromatographique après hydrolyse confirme une structure hydrolysable et donc de type O-hétéroside. C'est donc à fortiori, l'épicatéchine glucoside.

UV spectrum of Peak-1 (epicatechin glucoside)



Figure 9: Spectre en UV du composé Anis₁

Negative ESI spectrum of Peak-1 epicatechin glucoside)

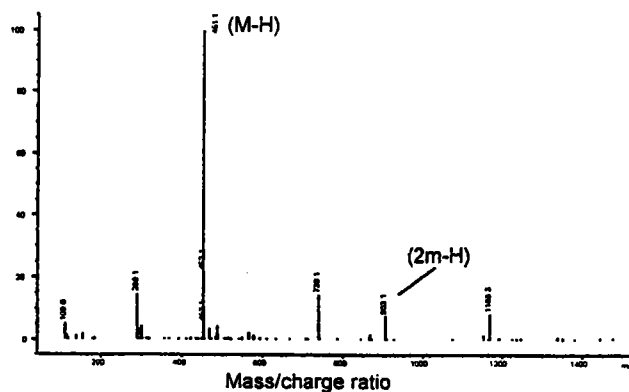
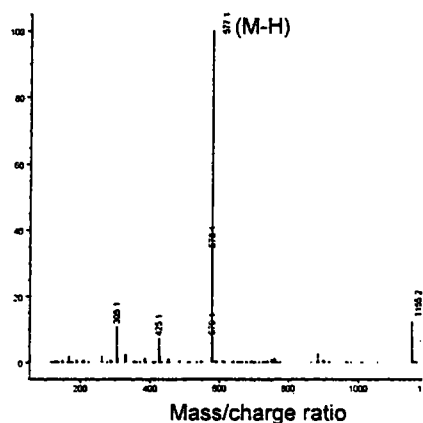


Figure 10: Spectre de Masse en ESI /MS (mode négatif) du composé Anis₁

IV-3-2- Composé Anis₂

Le composé Anis₂ est un produit qui se présente sous la forme d'une poudre amorphe blanche, il présente un temps de rétention de 12,1 min dans les conditions décrites dans Matériels et Méthodes. Son spectre de masse (figure 11) présente un pic de base à 577 uma et renseigne sur une structure d'épicatéchine dimer. Le pic à 425 uma est probablement le résultat d'un réarrangement de type Diels-Alder. Ce produit présente deux maximums respectivement à 240 et 280 nm (figure 12).

Negative ESI spectrum of Peak-2



UV spectrum of Peak-2 (epicatechin:epicatechin dimer)

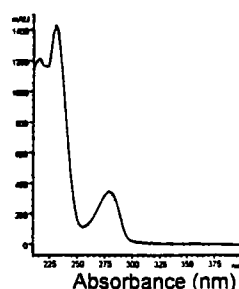


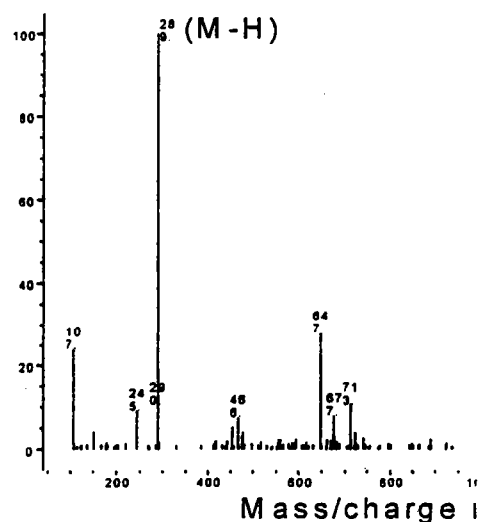
Figure 12: Spectre en UV du composé Anis₂

Figure 11: Spectre de masse en ESI/MS (mode négatif) du composé Anis₂

IV-3-3- Composé Anis₃

Ce produit se présente sous forme d'une poudre blanche amorphe et présente un temps de

Negative ESI spectrum of Peak-3 (catechin)



UV spectrum of Peak-3 (catechin)

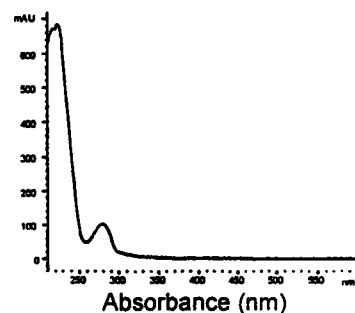


Figure 13: Spectre de masse (ESI/MS) en mode négatif d'Anis₃

Figure 14: Spectre en UV du produit Anis₃

rétenion de 13,2 min en CLHP, son spectre de masse obtenu en ESI/MS (figure 13) et celui en UV (figure 14) indiquent respectivement une masse de 290 uma et deux absorbances à 240 et à 280 nm. C'est une structure qui se rattache de par ses données chromatographiques et spectrales à une structure de la catéchine.

IV-3-4- Composé Anis₄

Ce produit de couleur blanchâtre s'élut à 13,5 mn, et présente les caractéristiques spectrales liées à une structure trimers de la catéchine. Son spectre de masse enregistré en ESI/MS et présente un pic de base à 865 uma (figure 15). Nous notons aussi la présence de

Negative ion ESI of Peak-4 (epicatechin trimer)

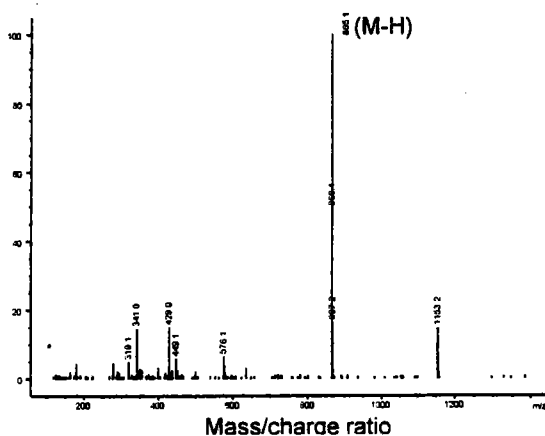


Figure 15: Spectre de masse en ESI/MS (en mode négatif) d'Anis₄

UV spectrum of Peak-4 (Epicatechin trimer)

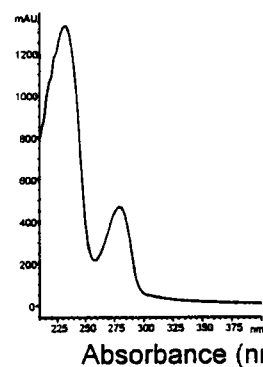


Figure 16: Spectre en UV d'Anis₄

deux absorbances maximales à 240 et 280 nm (figure 16).

IV-3-5- Composé Anis₅

D'après les caractéristiques chromatographiques, le temps de rétenion de ce produit est de

UV spectrum of Peak-5 (epicatechin)

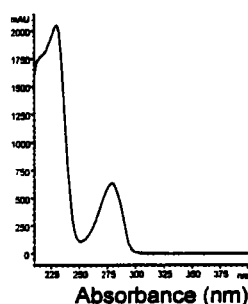


Figure 17: Spectre de Masse en ESI/MS (mode négatif) du produit Anis₅

Negative ion mass spectrum of Peak-5 (epicatechin)

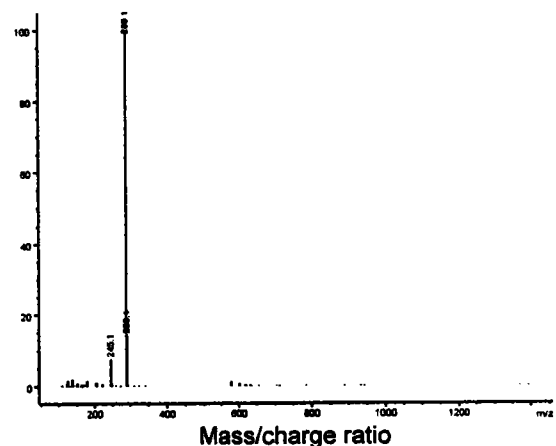


Figure 18: Spectre en UV du produit Anis₅

14,3 min, les spectres en UV et masse (figures 17 et 18 ci-dessus), montrent deux absorptions maximales à 240 et 280 nm et un pic de base à 289 uma. Ce produit se rattache à la structure d'épicatéchine.

IV-3-6- Composé Anis₆

Ce produit se présente sous forme d'une poudre blanche amorphe, son temps de rétention est de 17,3 min, sa masse est de 442 uma déduite du pic moléculaire (figure 20) et ses absorbances se situent à 230 et à 280 nm (figure 19). Ces résultats nous renseignent sur une structure d'épicatéchine contenant un fragment gallate qui est observé par les ions fragments à 169 et 289 uma. Toutefois, le spectre permet aussi d'observer une masse à 884 qui correspond aussi à la dimérisation du produit.

UV spectrum of Peak-6

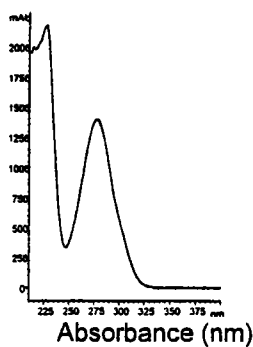


Figure 19: Spectre en UV du composé Anis₆

Negative ESI spectrum of Peak-6

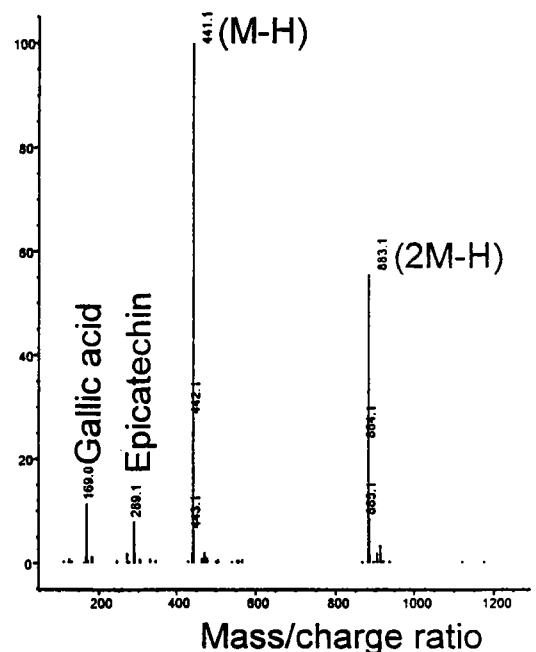


Figure 20: Spectre de Masse en ESI/MS (mode négatif) du produit Anis₆

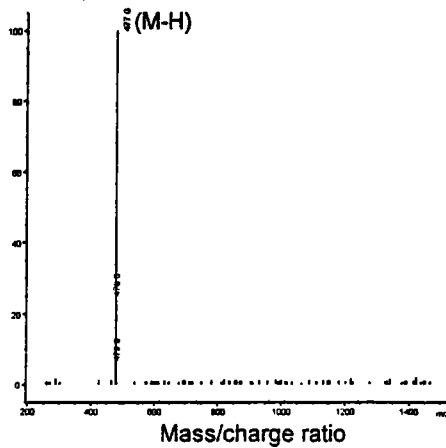
IV-3-7- Composé Anis₇

Ce produit a été isolé à l'état de traces, et présente le même ion moléculaire en mode négatif (577 uma) que le produit Anis₂, et donc renseigne sur une structure isomère probablement catéchine/epicatéchine (dimer) puisque son temps de rétention (18,6 min) est différent de celui d'Anis₂. Les liaisons interflavonoïdes seront confirmées par RMN.

IV-3-8- Composé Anis₈

Ce produit présente un temps de rétention de 21,6 min et un ion moléculaire de 477 uma (spectre de masse est représenté dans la figure 21), le spectre UV obtenu en CLHP/DAD présente 3 absorptions maximales respectivement à 215, 275 et 370 nm et renseigne sur une structure d'acide ellagique méthoxylé lié à un sucre (figure 22).

Negative ion ESI of Peak-8



UV spectrum of Peak-8 (methoxyellagic acid glucoside)

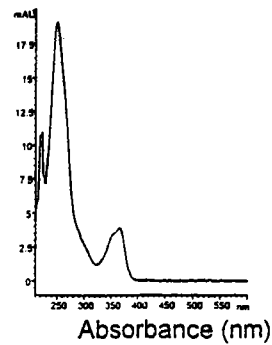


Figure 22: Spectre en UV du composé Anis₈

Figure 21: Spectre de masse enregistré en ESI/MS (mode négatif) du composé Anis₈

VI-3-9- Composé Anis₉

Ce produit présente en UV, 3 absorbances respectivement à 220, 270 et 300 nm (figure 23), son spectre de masse obtenu en ESI/MS renseigne sur une masse moléculaire égale 439 uma, dont on déduit facilement un fragment vanillate par la présence du pic à 289 uma (figure 24).

UV spectrum of Peak-9 (epicatechin homovanillate)

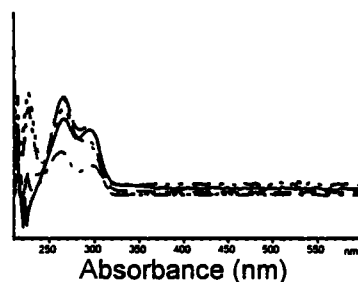


Figure 23: Spectre en UV du composé Anis₉

Negative ESI spectrum of Peak-9 (epicatechin homovanillate)

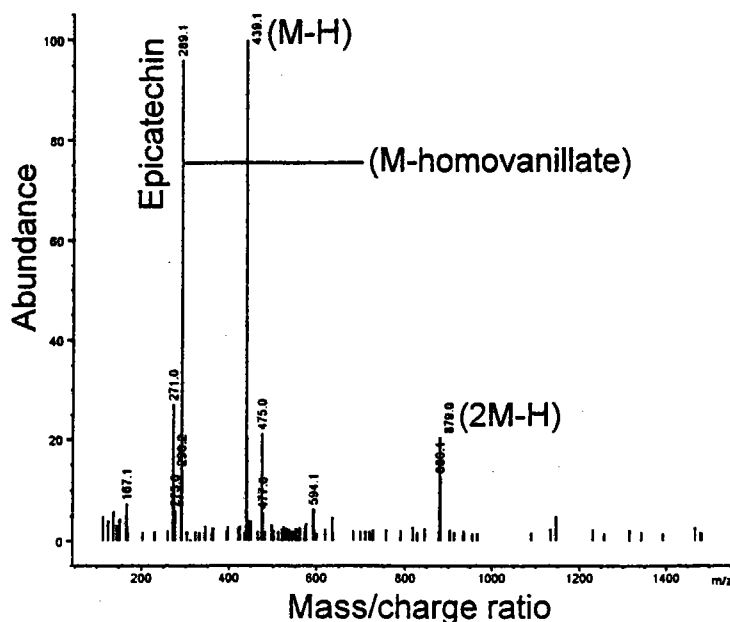


Figure 24: Spectre de masse enregistré en ESI/MS (mode négatif) du produit Anis₉

IV-3-10- Composé Anis₁₀

Le comportement en CLHP/DAD est à la faveur d'une structure dérivée d'acide ellagique. Le temps de rétention est de 24,8 min. La masse obtenue en ESI/MS (figure 26) (330 + 146 uma) renseigne sur un hétéroside contenant probablement un sucre rhamnose, les 3 absorbances respectivement à 215, 265 et à 365 nm sont aussi enregistrées en UV (figure 25).

UV spectrum of Peak-10

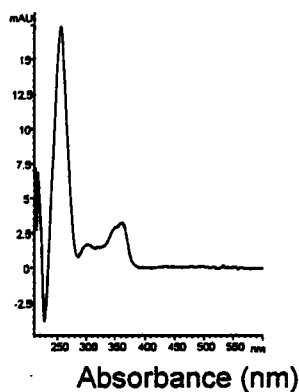


Figure 25: Spectre en UV du produit Anis₁₀

Negative ESI spectrum of Peak-10

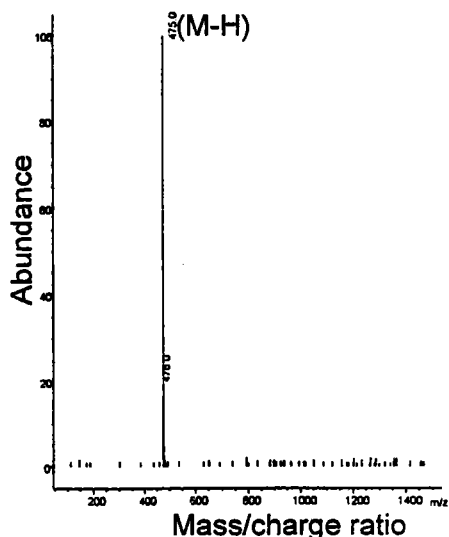
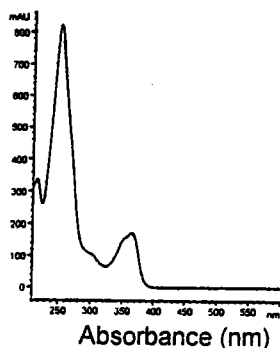


Figure 26: Spectre de masse en ESI/MS (mode négatif) du composé Anis₁₀

IV-3-11- Composé Anis₁₁

Les données préliminaires chromatographiques CLHP/DAD, montre un temps de rétention à 25,3 min, une masse de 489 (figure 28) dont l'intensité est trop faible, toutefois

UV spectrum of Peak-11



ESI of Peak-11 (methyl dimethoxyellagic acid glucoside)

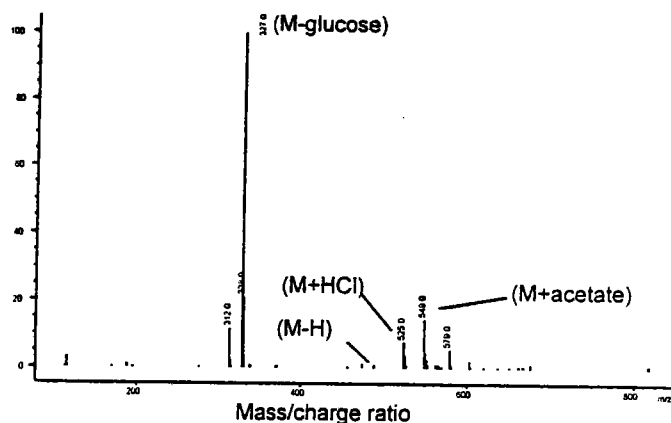


Figure 27: Spectre en UV du composé Anis₁₁

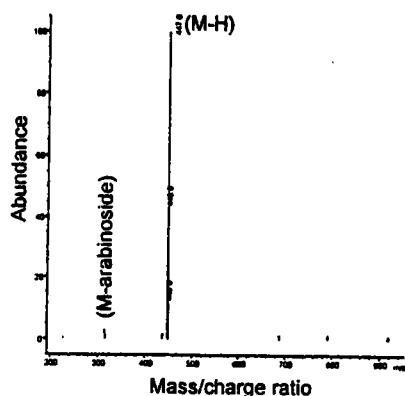
Figure 28: Spectre de masse en ESI/MS (mode négatif) d'Anis₁₁

des pics correspondant à des adduits HCl ou acétate sont aussi enregistrés. Le pic à 327 à 100 % renseigne sur une glycosylation de l'acide ellagique (perte d'unité à 162 uma). L'UV (figure 27) conforte cette structure (absorption à 215, 276 et 360 nm), il s'agit d'une structure d'acide ellagique glycosylée et méthoxylé.

IV-3-12- Composé Anis₁₂

Ce produit présente un temps de rétention à 26,5 min. D'après la masse (figure 29) et l'UV (figure 30), ce composé est identifié à un dérivé d'acide ellagique méthoxylé contenant un sucre pentose probablement arabinose ou xylose.

Negative ESI mass spectrum of Peak-12



UV spectrum of Peak-12

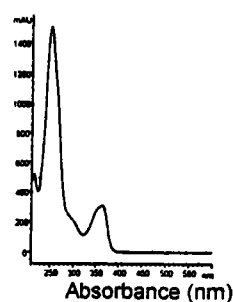


Figure 29: Spectre de masse en ESI/MS (mode négatif) du composé Anis₁₂

Figure 30: Spectre en UV du produit Anis₁₂

IV-3-13- Composé Anis₁₃

Ce composé possède un temps de rétention de 27,8 min et est identifié par LC/MS/DAD (figure 31 et 32) à un dérivé d'acide ellagique méthoxylé et rhamnoglucosylé.

Negative ESI mass spectrum of Peak-13

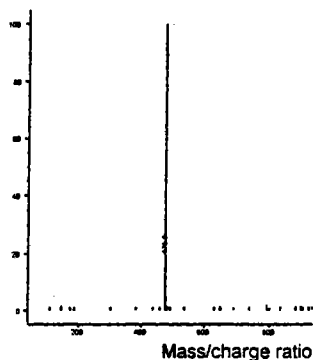


Figure 31: Spectre de masse en ESI /MS (en mode négatif) d'Anis₁₃

UV spectrum of Peak-13 (methoxyellagic acid rhamnoside)

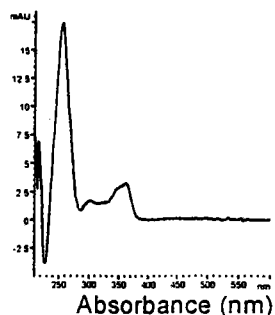


Figure 32: Spectre en UV d'Anis₁₃

IV-3-14- Composé Anis₁₄

Ce composé présente un temps de rétention de 28,4 mn. En UV, trois absorbances à 260, 300 et 365 nm (figure 33) sont enregistrées, une masse déduite de l'ion moléculaire à 315 uma (figure 34) et est identifié aussi à un dérivé d'acide ellagique monométhoxylé.

UV spectrum of Peak-14 (methoxyellagic acid)

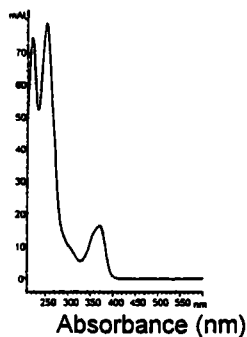


Figure 33: Spectre en UV du produit Anis₁₄

Negative ESI mass spectrum of Peak-14 (methoxyellagic acid)

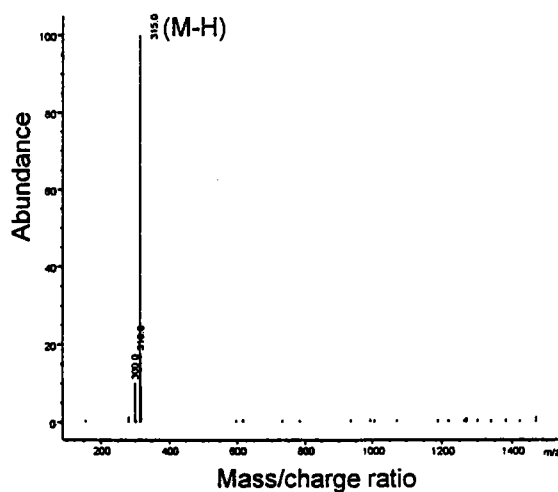


Figure 34: Spectre de masse en ESI/MS (en mode négatif) du produit Anis₁₄

IV-3-15- Composé Anis₁₅

Ce composé s'élut 33,1 min et présente 3 absorbances à 215, à 265 et à 370 nm (figure 35), le spectre de masse (figure 36) indique une structure d'acide ellagique avec deux groupements methoxy, structure que nous allons confirmer par RMN.

UV spectrum of Peak-15 (Dimethoxyellagic acid)

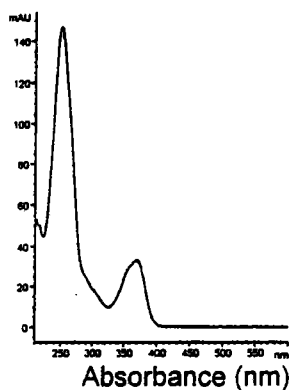


Figure 35: Spectre UV du produit Anis₁₅

Negative ESI mass spectrum of Peak-15

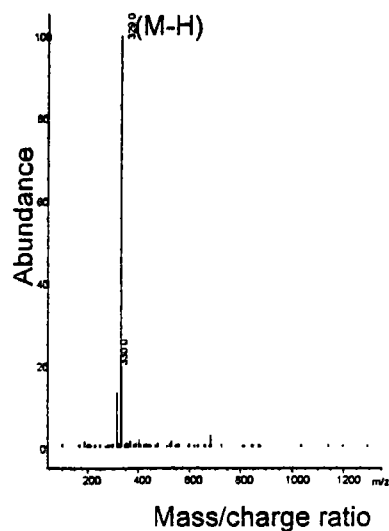


Figure 36: Spectre de masse enregistré en ESI/MS (mode négatif) du produit Anis₁₅

IV-3-16- Composé Anis₁₆

Ce composé est identifié par LC/MS/DAD (figures 37 et 38) à un dérivé d'acide ellagique qui pourrait se rattacher d'après sa masse à une structure C-méthyl et deux groupements méthoxy. Nous confirmerons ou nous infirmerons ces hypothèses par RMN.

Negative ESI spectrum of Peak-16

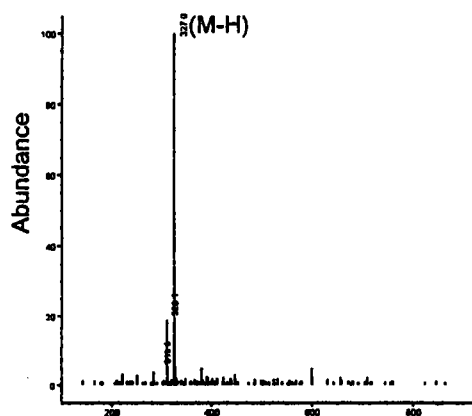


Figure 37: Spectre de masse en ESI/MS (mode négatif) d'Anis₁₆

UV spectrum of Peak-16 (methyl dimethoxyellagic acid)

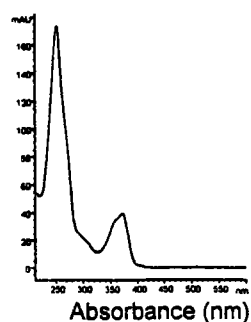


Figure 38: Spectre en UV d'Anis₁₆

Les produits sont identifiés sur la base de leurs caractéristiques chromatographiques et leurs confirmations a été faite par le biais de leurs caractéristiques spectrales UV et masses et en nous inspirant aussi des données de la littérature. D'une manière générale, on assiste à 2 ou 3 longueurs d'ondes d'absorptions en UV et sur les spectres de masse des procyanidines, on assiste à des fragmentations de type retro Diels-Alder ainsi que la présence du pic moléculaire comme pic de base pour la majorité des produits identifiés, enfin la présence de l'ion $[2M-H]^-$ est fréquente dans les spectres de masse enregistrés.

Sur la figure 39 sont présentés les chromatogrammes de l'extrait méthanolique total et les différents profils correspondant aux ions sélectionnés par leurs masses respectives qui dérivent majoritairement des procyanidines identifiées dans *A. dichostyla* et qui sont :

1. epicatechine glucoside
2. epicatechine dimer
3. catechine
4. epicatechin trimer
5. epicatechine
6. gallate d'epicatechine
7. epicatechin/catechin dimer
8. acide-methoxyellagique glucoside
9. vanillate d'epicatechine

Sur cette même figure, sont aussi présentés les profils des différents produits qui dérivent des ellagitannins identifiés dans *A. dichostyla* et qui sont :

10. acide dimethoxyellagique rhamnoside
11. acide monomethylether methylenedioxyellagique glucoside
12. acide monomethoxyellagique arabinoside ou xylopyranoside
13. acide monomethylether ellagique rhamnoside
14. acide monomethoxyellagique
15. acide dimethylether ellagique
16. acide monomethylether methylenedioxyellagique

En utilisant le Mode d'Ions Sélectionnés et le Monitoring d'ions sélectionnés (*Selected Ion Monitoring*) (SIM) et en connaissant leurs structures, il nous a été possible de sélectionner au préalable une liste d'ions et d'obtenir en conséquence leurs traces SIM.

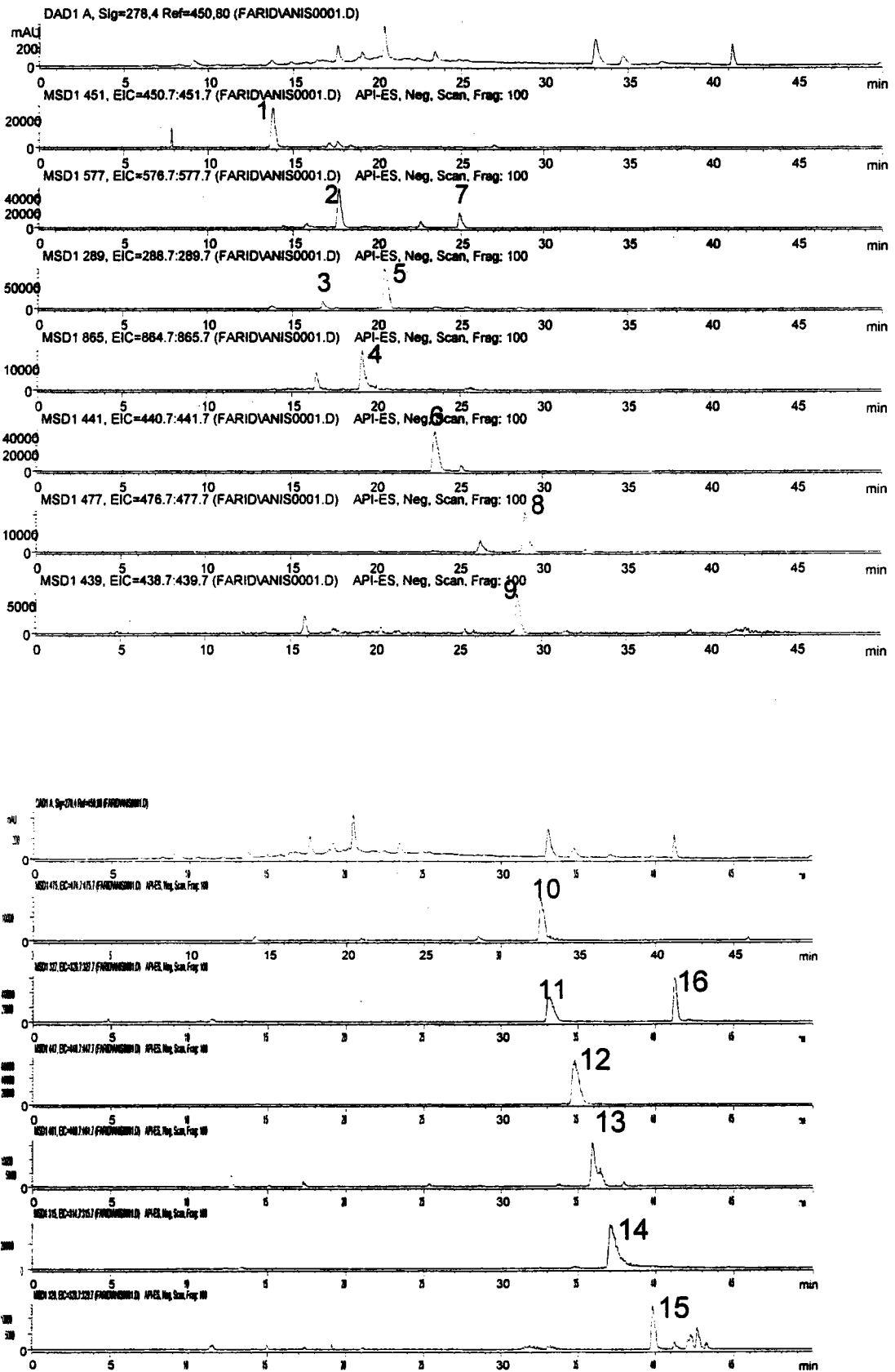


Figure 39: LC/MS (mode SIM) de l'extrait méthanolique total d'*A. dichostyla* montrant la répartition des différents procyanidines et ellagitannins détectés.

Ces informations nous ont permis de dresser la clé d'identification représentée dans le tableau 8 ci-dessous. Dans ce dernier, sont récapitulées nos données sur les caractéristiques chromatographiques (temps de rétentions), les aires des pics, les masses respectives et les masses des lots des produits obtenus ainsi que leurs éventuelles identifications préliminaires. Dans ce travail, les structures principales seront confirmées par RMN mono- et bidimensionnelle ultérieurement.

Tableau 8: Liste des ions observés en mode négatif sur le spectre ESI/MS de CC₁

Composés	Quantité en mg	Aires des pics	Identité	APCI-ESI [M-H]	TR (mn)
Anis ₁	5,1	1733	Epicatechine glucoside	451	8,5
Anis ₂	6,8	5087	Epicatechine dimer	577	12,1
Anis ₃	2,7	1061	Catéchine	289	13,2
Anis ₄	3,3	2480	Epicatechine trimer	865	13,5
Anis ₅	10,6	10524	Epicatechine	289	14,3
Anis ₆	2,9	2823	Gallate d'epicatechine	441	17,1
Anis ₇	-	753	Epicatechin/catechin dimer	577	18,6
Anis ₈	-	374	Acide methoxyellagique glucoside	477	21,6
Anis ₉	-	289	Epicatechinevanillate	439	22
Anis ₁₀	-	342	Acide dimethoxyellagique rhamnoside	475	24,8
Anis ₁₁	9,1	9627	Acide-3,4-methylenedioxy-3'-O-methylellagiqueglucoside	489	25,3
Anis ₁₂	1,7	3645	Acide methoxyellagique arabinoside	447	26,5
Anis ₁₃	-	189	Methoxyellagique rhamnoside	461	27,8
Anis ₁₄	1,7	1066	Acide methoxyellagique	315	28,4
Anis ₁₅	2,3	392	Acide dimethoxyellagique	329	33,1
Anis ₁₆	8,0	4401	Acide-3,4-methylenedioxy-3'-O-methyellagique	327	35,5

TR : temps de rétention

IV-4- Analyse par Chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse

Les résultats de l'analyse par CCM, représentés par la précédente figure 8b p. 49, ainsi que les premières études préliminaires par RMN nous laissent suggérer que nous soyons en présence d'un triterpène Anis₂₇ dans la fraction CC₄ et CC₆. L'analyse par GC/MS après sa purification a été aussi effectuée. Les chromatogrammes ainsi que les spectres de masse de ce triterpénoïde comparés avec ceux de l'acide oléanolique et l'acide maslinique (triterpènes de l'huile d'olive) sont représentés sur la figure 40.

Anis₂₇ a été obtenu à l'état pur par CCE (S₁) et aussi par CLHP (chromatogramme est présenté par la figure 41).

Par ailleurs et pendant que nous tentions la séparation de nos produits par CLHP semipréparative, ces derniers présentaient des temps de rétention légèrement différents par rapport à l'analyse par CLHP analytique. Nous avons tenté d'identifier d'autres produits issus de la CLHP semipréparative par GC/MS après leurs hydrolyses et leurs dérivations. Ce sont les fractions CC₄ et CC₆ qui ont fait l'objet de cette étude, les résultats de cette étude sont récapitulés dans le tableau 9. Les structures de ces produits sont établies aux moyens des temps de rétention et des masses respectives et doivent être isolées et confirmées par RMN. Nous allons définir ensuite seulement les différentes fragmentations du Lariciresinol (figure 42), produit qui se rattache à une structure de lignane à noyau tétrahydrofurane et donc vraisemblablement le plus important. Les différentes fragmentations les plus probables sont en parfait accord avec les résultats publiés par Ekman en 1976, à l'exception du fragment à 223 uma absent dans notre spectre (figure 43).

Tableau 9: Tableau récapitulatif des résultats de l'analyse par GC/MS des fractions CC₄ et CC₆

Composés	Temps de rétention (mn)	Masses	Identités
Anis ₁₈	RT _a = 28,469	-	Non déterminée
Anis ₁₉	RT _a =15,08	179	Tyrosol
	RT _b =25,56	338	Acide isoferrulique
Anis ₂₀	RT _a =20,27	312	Acide vanillique
Anis ₂₁		-	Non déterminée
Anis ₂₂		-	Non déterminée
Anis ₂₃		576	Lariciresinol
Anis ₂₄		-	Non déterminée
Anis ₂₅	RT _a =18,85	215	Homovanillate
	RT _b =20,25	312	Acide vanillique
Anis ₂₆	RT _a =18,51	281	Vanilline
	RT _b = 18,85	326	Syringine
	RT _c = 18,94	215	Homovanillate
	RT _e =21,69	312	Acide vanillique

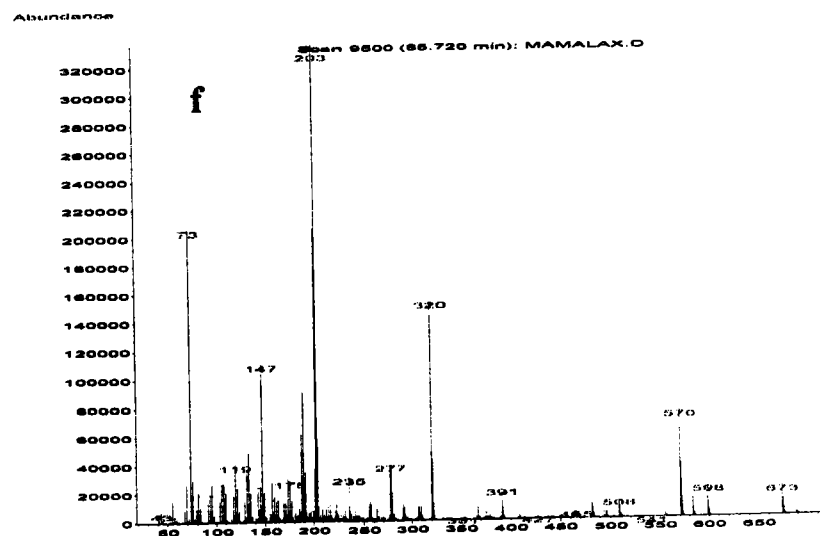
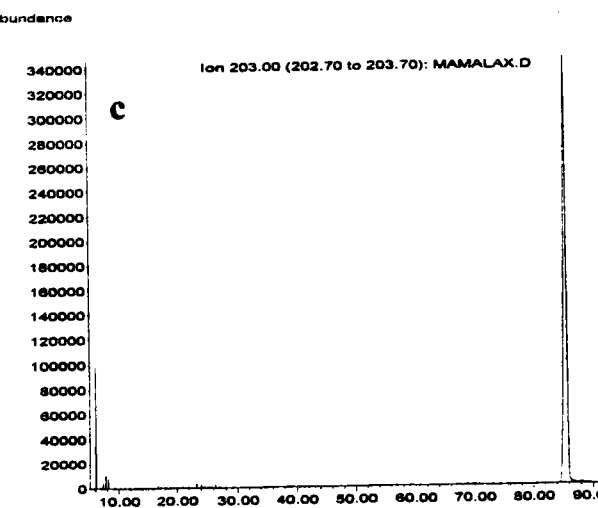
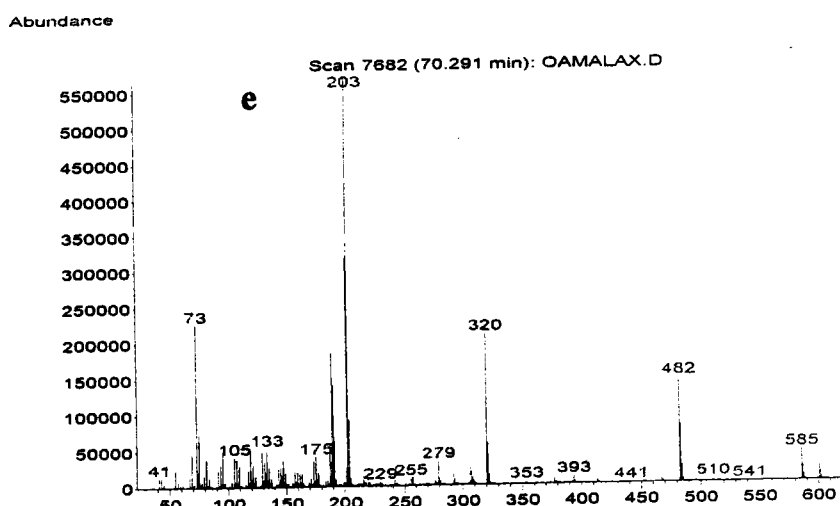
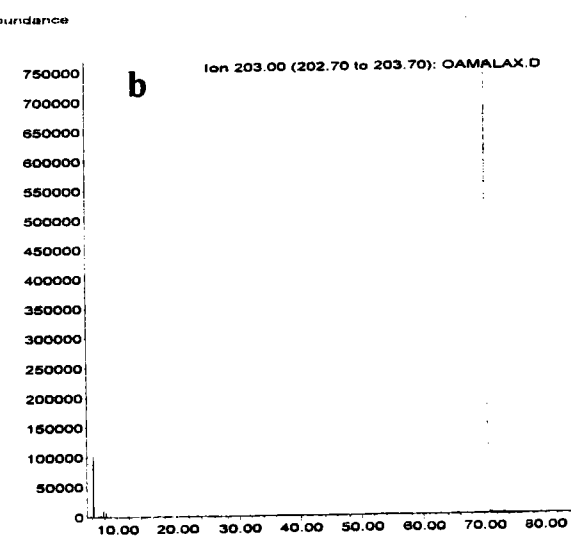
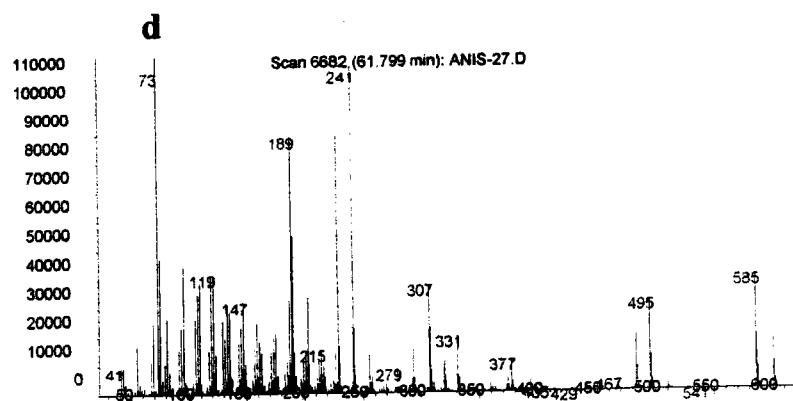
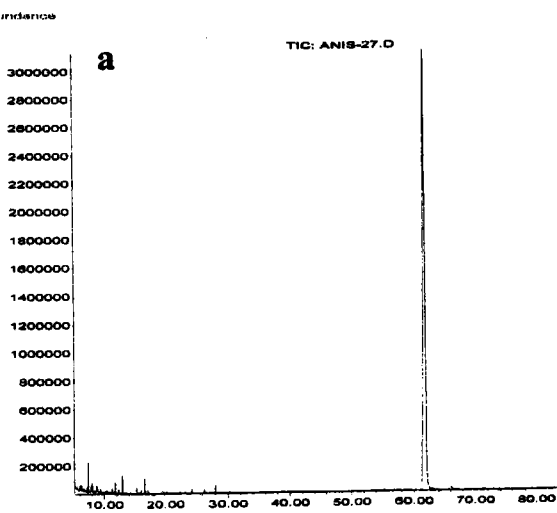


Figure 40: GC/MS : ^adu terpénoïde isolé d'*A. dichostyla* et son spectre de masse (d), des triterpènes de références, ^bacide oléanolique et son spectre de masse (e) et ^cacide maslinique et son spectre de masse (f).

Quelques spectres de masse (figures respectives 43-44) mettent en évidence la caractérisation partielle de quelques phénols détectés tels que de l'acide vanillique, isoferulique, la syringine, la vanilline et le lariciresinol. D'autres composés ont été aussi détectés mais leurs seuls spectres de masses respectives, ne permettent pas d'établir leurs structures.

Semi-preparative HPLC of Anis-7 yielding Anis-16 and Anis 27

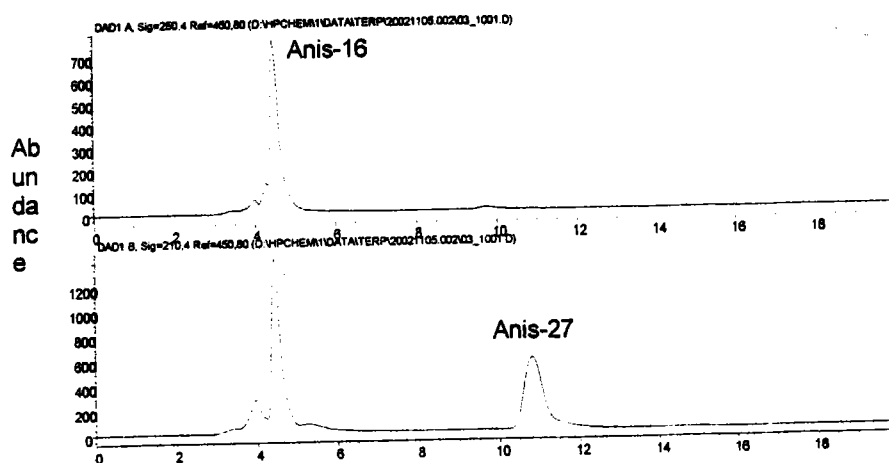


Figure 41: Profil CLHP du produit Anis₁₆ mélangé avec le produit Anis₂₇, colonne Latek C-18, gradient d'éluion MeOH, 2% acide acétique dans l'eau bidistillée, Débit: 3 ml/l, détection à 210 nm.

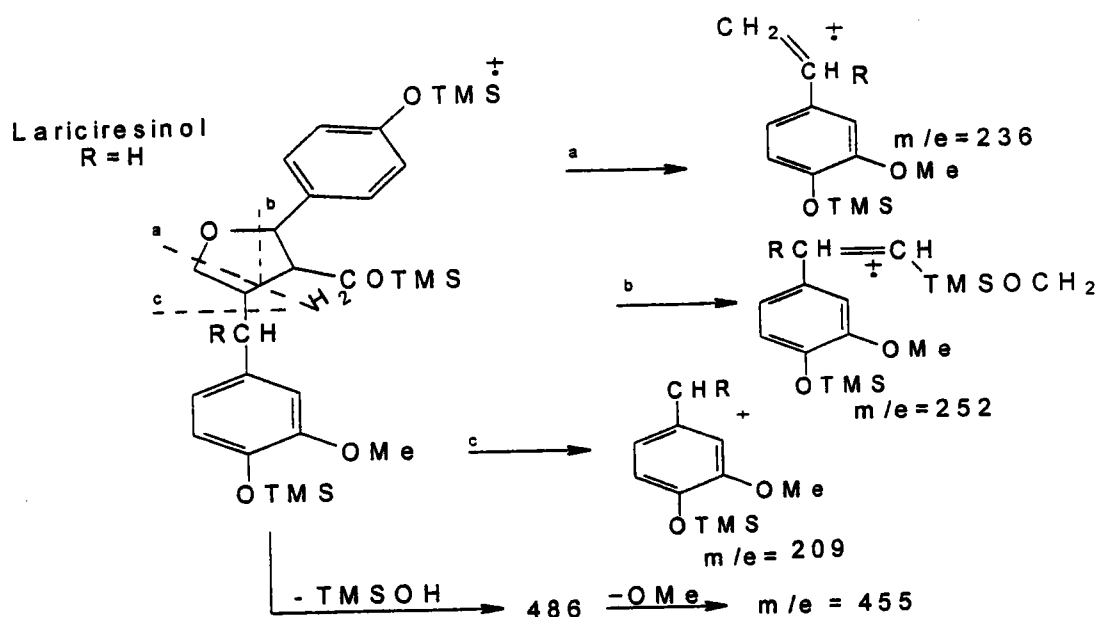
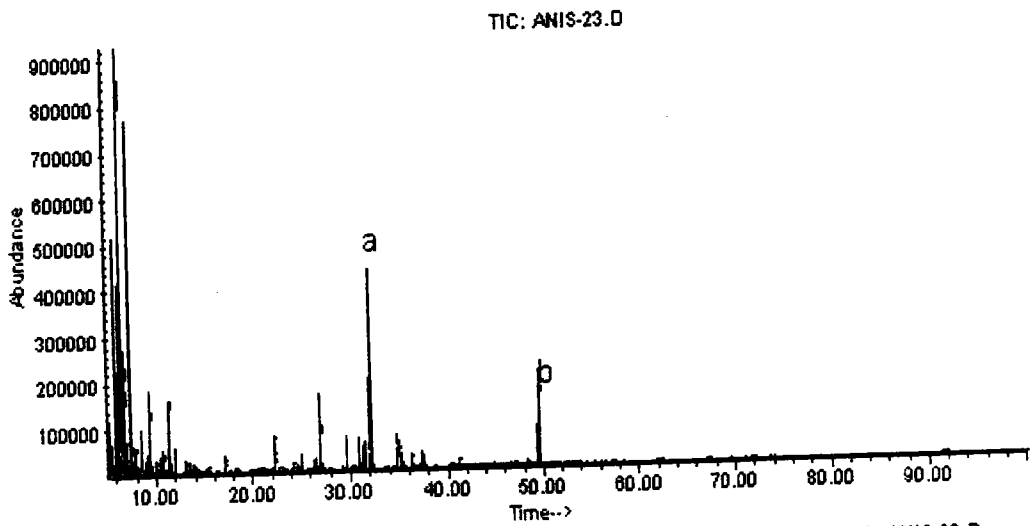
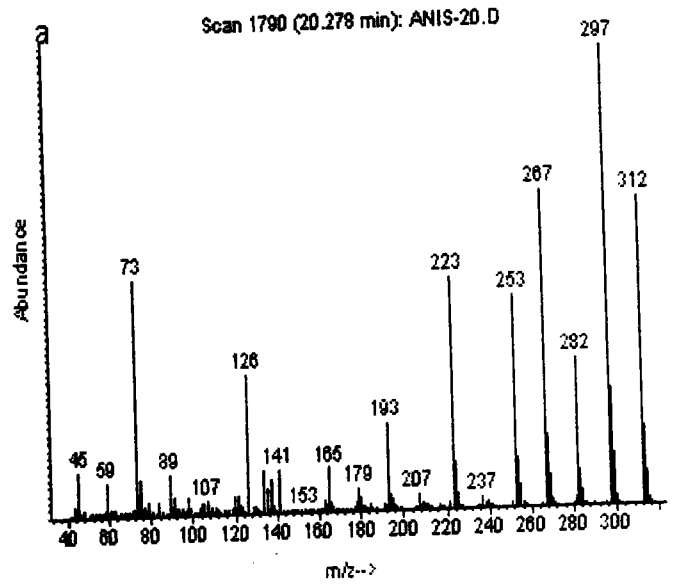
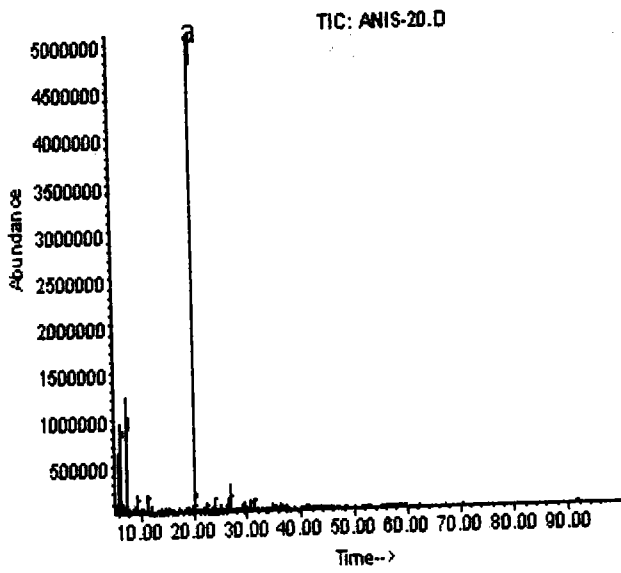
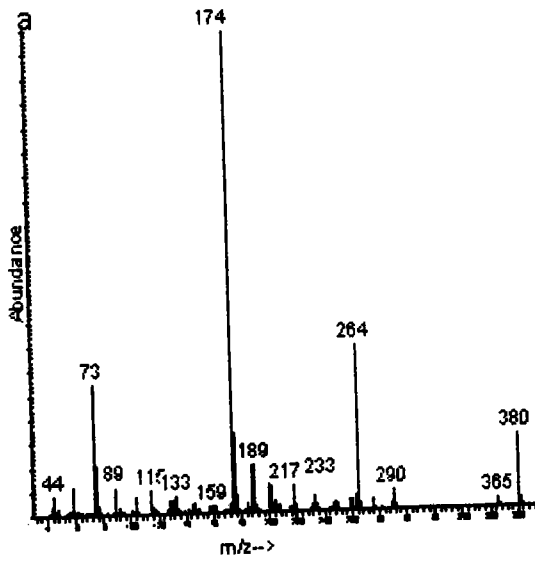


Figure 42: Fragmentations possibles en CG/SM du Lariciresinol (Ekman, 1976).



Scan 3174 (32.025 min): ANIS-23.D



Scan 5238 (49.544 min): ANIS-23.D

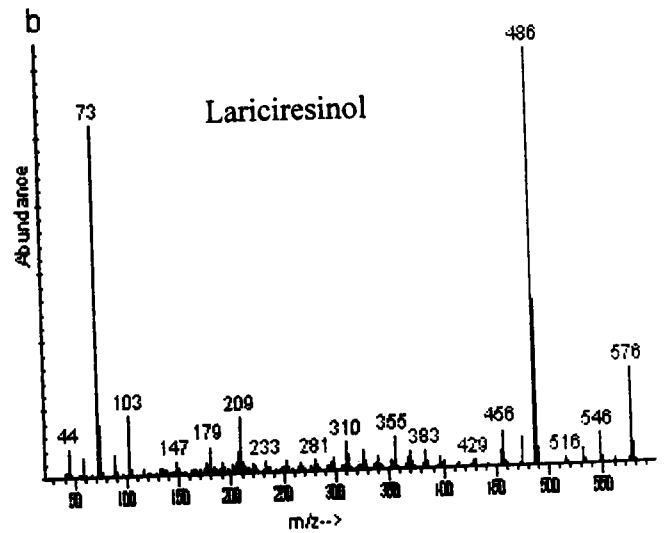
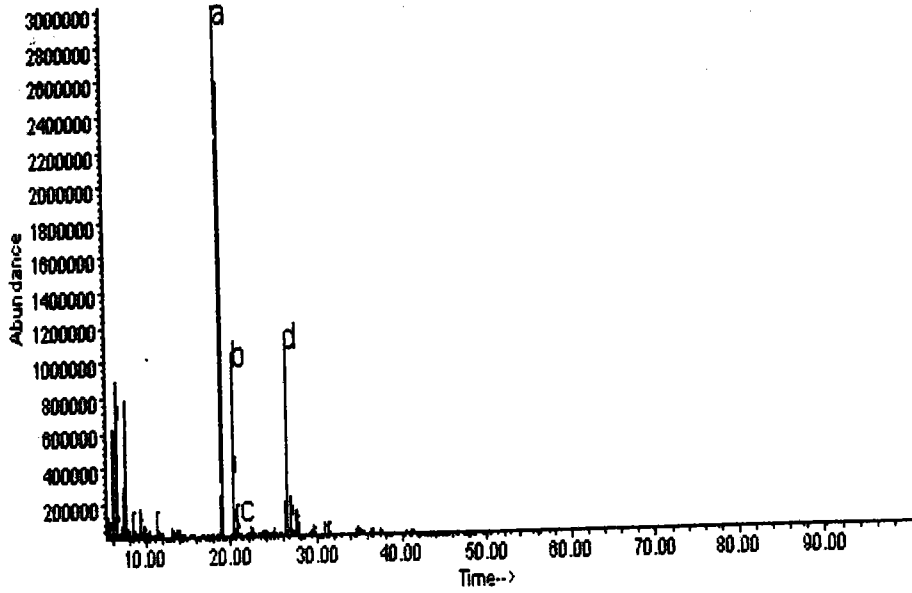
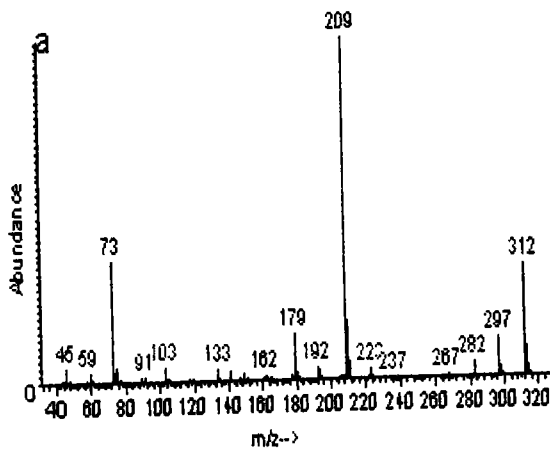


Figure 43: GC/MS des fractions Anis₂₀ et Anis₂₃ de la fraction CC₄ obtenue par CC d' *A. dichostyla*

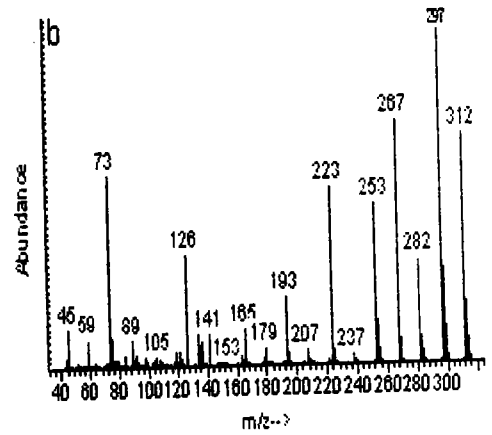
TIC: ANIS-25.D



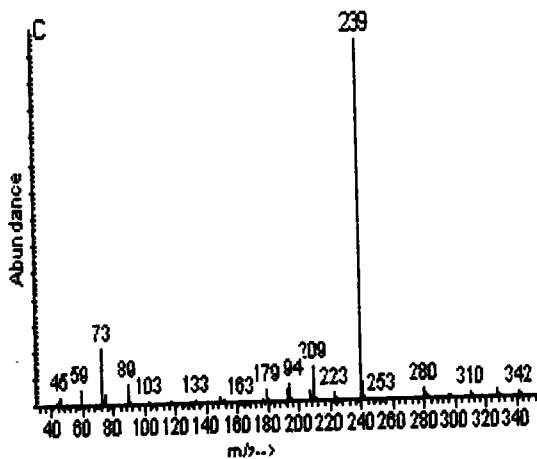
Scan 1622 (18.855 min): ANIS-25.D



Scan 1787 (20.255 min): ANIS-25.D



Scan 1850 (20.790 min): ANIS-25.D



Scan 2511 (26.401 min): ANIS-25.D

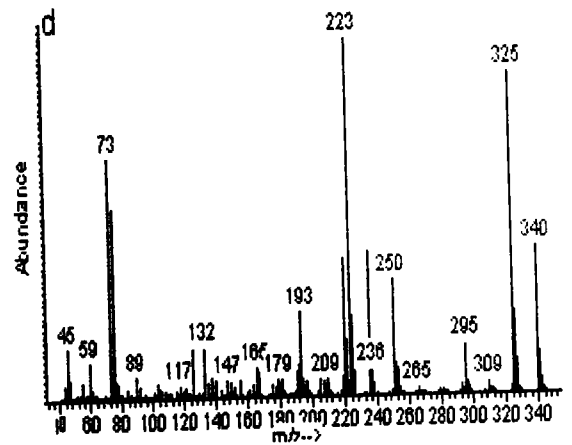


Figure 44: GC/MS de la fraction Anis₂₅ obtenue par CLHP de CC₆ de l'extrait méthanolique d'*A. dichostyla*

IV-5- Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire

IV-5-1- Rappels

La résonance magnétique nucléaire à haute résolution est une méthode physique essentielle pour l'analyse des structures et les conformations moléculaires grâce aux progrès considérables accomplis dans la méthodologie de cette technique durant les 20 dernières années (développement de spectromètre à haut champ, augmentation de la puissance des ordinateurs, découverte de la RMN multidimensionnelle comprenant nombreuses séquences d'impulsion). La RMN est devenue un outil indispensable pour l'analyse des produits naturels complexes.

L'étude structurale d'un produit naturel nécessite dans un premier temps l'enregistrement des spectres 1D (RMN, ^1H , ^{13}C) dans les meilleures conditions possibles (recherche des conditions de dissolution, de concentration, de température etc.). On peut ainsi obtenir des renseignements importants sur les déplacements chimiques et les constantes de couplage. Des expériences d'irradiation sélectives et de découplage peuvent aussi être réalisées, pour identifier les signaux complexes d'un système de spin.

Malheureusement, dans les molécules complexes comme c'est le cas des produits naturels, l'information sur les déplacements chimiques et les constantes de couplage sont parfois inaccessibles dans les spectres de RMN classiques à une dimension à cause du recouvrement des signaux.

De plus les expériences d'irradiation sélectives et de découplage sont difficiles à réaliser à cause de signaux mal résolus et superposés. Il est d'autre part fastidieux d'utiliser ces techniques lorsque de nombreux découplages sont nécessaires.

Les méthodes de RMN à 2 dimensions (RMN, 2D), offrent des améliorations considérables dans la résolution des spectres et permettent l'obtention directe de toutes les informations d'un même type. Ces généralités ont pour but de présenter les différentes stratégies de RMN 2D utilisées pour la détermination particulière de la plupart des structures isolées d'*A. dichostyla* dans notre travail.

Nous nous intéresserons non pas à la description mathématique et à l'explication des séquences d'impulsion, mais à l'évaluation pratique des spectres et à leur importance dans l'élucidation des structures.

Les principales expériences de RMN 2D sont répertoriées dans le tableau 10. Nous exposerons ici les différentes techniques ayant été utilisées pour la détermination de nos structures.



Tableau 10: Principales expériences de RMN 2D, information contenue dans les axes de fréquence F1 et F2 et corrélations observées.

Expériences	F2	F1		Mécanisme
COSYLR	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}		${}^n J_{HH} \ n = 1, 3$
COSY	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}		${}^n J_{HH}$
ROESY	δ_C, J_{CC}	D. Q. fréquence		${}^1 J_{H=C}$
HMQC	δ_C ou δ_N	δ_H, J_{HH}		${}^1 J_{CH}$ ou ${}^1 J_{NH}$
HMBC	δ_C	δ_H, J_{HH}		${}^n J_{CH} \ (n > 1)$

IV-5-1-1- RMN homonucleaire COSY

L'une des techniques de RMN 2D les plus importantes est l'expérience COSY, (Homonuclear COrelated Spectroscopy) dont les spectres montrent les déplacements chimiques du proton dans deux dimensions F1 et F2. Deux types principaux de signaux apparaissent dans cette expérience.

Les pics de la diagonale ($F1 = F2$) représentent le spectre original obtenu dans cette expérience 1D, les taches hors du diagonale montrent l'existence d'un couplage scalaire (J_{HH}) entre deux noyaux. Ces taches apparaissent de façon symétrique par rapport à la diagonale et sont centrées aux coordonnées correspondants aux déplacements chimiques des deux noyaux couplés.

Toute rangée ou colonne passant à travers un multiplet donné sur la diagonale, contient tous les signaux de corrélation pour ce spin.

Les corrélations s'arrêtent quand il y a un carbone quaternaire ou un hétéroatome sans spin nucléaire. Un exemple théorique d'une surface COSY est illustré dans la figure 45. Malheureusement, l'expérience COSY ne peut dans le cas de molécules complexes, fournir l'information suffisante pour l'identification des systèmes de spin RMN 1H , ainsi, lorsque les systèmes de spin sont compliqués et présentent des chauvauchements de multiplets, il est nécessaire de recourir à des expériences COSY plus performantes (COSY-DQF, COSYLR) pour obtenir une meilleure résolution et satisfaire ces contraintes.

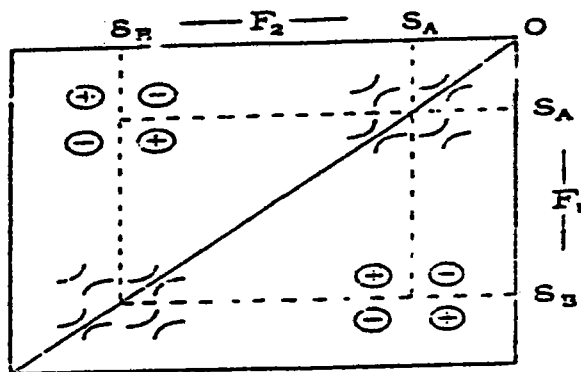


Figure 45: Spectre COSY d'un système de spin AB. Les pics diagonaux sont en dispersion et ces tâches de corrélation (cercles) sont en absorption dans les deux dimensions mais avec un sens alterné (+, -).

IV-5-1-2- RMN hétéronucléaire : Expériences inverses

Dans le cas de molécules complexes dont les signaux en RMN du proton sont superposés, l'attribution des résonances est impossible à l'aide des seules expériences homonucléaires, on a alors recours à la RMN hétéronucléaire du carbone 13 ou azote 15.

La RMN hétéronucléaire apporte donc une nouvelle dimension plus sélective en information : la disparition des déplacements chimiques est de plusieurs centaines de ppm dans le cas du ^{13}C , le nombre de résonances du ^{15}N est plus faible que celle de ^1H , sur une gamme de quelques dizaines de ppm.

Etant donné que le rapport signal sur bruit d'une expérience RMN est directement proportionnel au produit des rapports gyrométriques des noyaux excités et détectés, il en résulte qu'une expérience dans laquelle on détecte les noyaux ^{13}C ou ^{15}N a une sensibilité beaucoup plus faible qu'une expérience réalisée sur les protons.

Pour résoudre ces problèmes, des expériences dites inverses sont effectuées dans lesquelles l'excitation et la détection se font sur les protons.

Le principe de base est schématisé dans la figure 46 et repose sur le transfert de polarisation entre un proton et un noyau X peu sensible rendu possible par l'existence d'un couplage scalaire $J_{\text{X-H}}$.

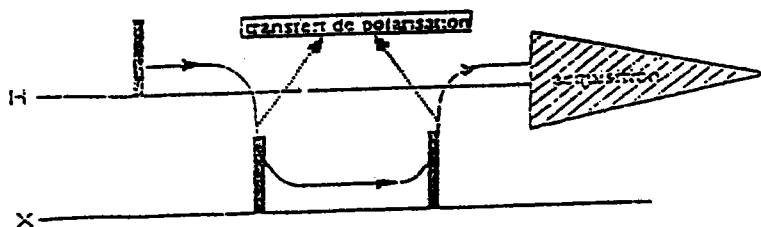


Figure 46: Schéma d'une expérience "inverse" : détection inverse d'un noyau peu sensible X par un noyau H avec lequel il est couplé, il y'a transfert de polarisation du proton sur X, évolution de X et retransfert pour détection sur H

IV-5-1-2-1- HMQC

L'expérience HMQC (^1H -detected chemical shift correlation via Multiple Quantum Coherence) est une expérience inverse qui permet de mettre en évidence les couplages scalaires hétéronucléaire à travers une liaison covalente. Dans le cas du carbone, elle montre la liaison de tel atome d'hydrogène à tel atome de carbone. L'expérience offre une augmentation de sensibilité considérable comparativement à l'expérience conventionnelle de corrélation hétéronucléaire HETCOR (HETeronuclear chemical shift CORrelation) dans laquelle le noyau à faible rapport gyromagnétique γ est détecté directement pendant la période d'acquisition.

Dans le cas du carbone, seuls les signaux pour le CH_n ou $n \geq 1$ sont visibles : il n'y'a pas d'information concernant les carbones quaternaires. Lorsqu'on est en présence de protons inéquivalents sur un même carbone, on obtient deux signaux distincts qui sont généralement petits car l'intensité de la tache de corrélation est distribuée en deux parties.

IV-5-1-2-2- COLOC

Equivalente à l'expérience HMBC (^1H detected chemicals shift correlation via Multiple Band Coherence, l'expérience COLOC (CORrelated spectroscopy via LOngue range Coupling), est une expérience inverse très sensible qui permet de déterminer les couplages lointains $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (à travers 2, 3 ou 4 liaisons covalentes), fournissent ainsi des informations structurales importantes. Elle est particulièrement intéressante dans les molécules contenant plusieurs carbones quaternaires.

IV-5-2- Identification

Les résultats préliminaires obtenus par LC/MS et CLHP/DAD ont permis l'isolement et l'identification des produits, ces résultats seront confirmés par RMN mono et bidimensionnelle.

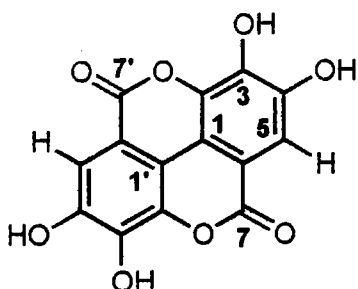
L'utilisation d'un spectromètre (Spectromètre AM-500: 11,7 Tesla, $^1\text{H} = 500,137$ MHz ; ^{13}C , 125,6 MHz) et la prédiction de différents déplacements chimiques, effectuée par Chem Draw nous ont permis de dresser une interprétation aussi exhaustive que possible pour les produits essentiellement dérivés d'acide ellagique. La catéchine, l'épicatéchine et l'épicatéchine gallate sont aussi confirmées sur la base de leurs spectres RMN obtenus. La confirmation des structures a été aussi faite par rapport aux données de la littérature quand elles existent.

IV-5-2-1- Acide ellagique

Acide ellagique a été enregistré dans $\text{CD}_3\text{OD} / \text{CDCl}_3$ (1:1) + TMS, 30°C

^1H : SR = 7370,90 Hz, $\text{CHCl}_3 = 7,582$ ppm, $\text{CHD}_2\text{OD} = 3,3472$, TMS = 0,0

^{13}C : SR = 69564,5 Hz, TMS = 0



Ellagic acid, C_2 sym.

$\text{C}_{14}\text{H}_6\text{O}_8$
Exact Mass: 302,0063

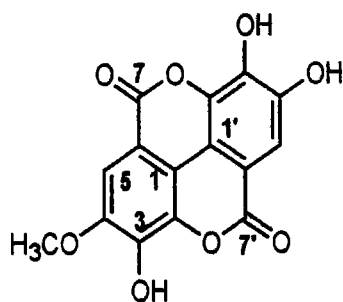
La numérotation que nous avons adoptée est celle utilisée dans la littérature (Nawwar *et al.*, 1994 et Li *et al.*, 1999). Les données RMN pour l'acide ellagique (structure de référence dans notre étude) sont résumées dans tableau 11

IV-5-2-2- acide ellagique, dérivés O-methyl ethers.

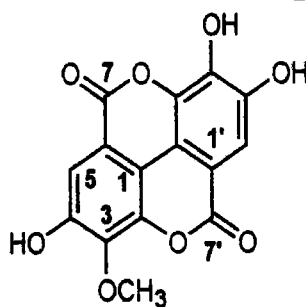
Selon les structures représentées ci-dessous, il y'a deux possibilités pour les dérivés mono et 4 possibilités pour les dérivés dimethyl de l'acide ellagique. D'autres structures peuvent être rencontrées contenant un pont méthylène entre les OH adjacents.

mono-O-methyl ellagic acids

$C_{15}H_8O_8$
Exact Mass: 316.0219



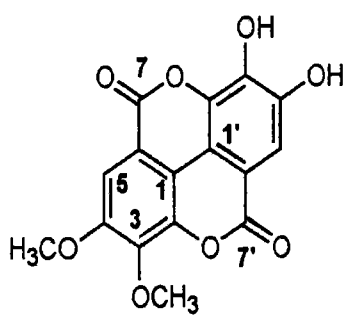
4 Me (C_1)



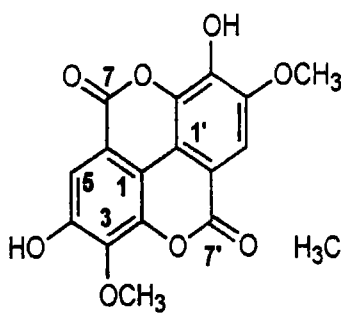
3 Me (C_1)

di-O-methyl ellagic acids

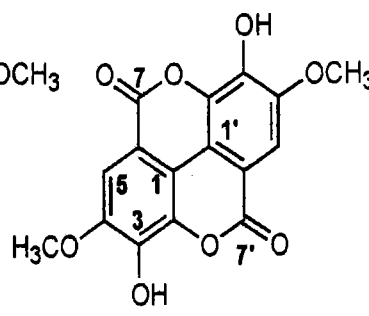
$C_{16}H_{10}O_8$
Exact Mass: 330.0376



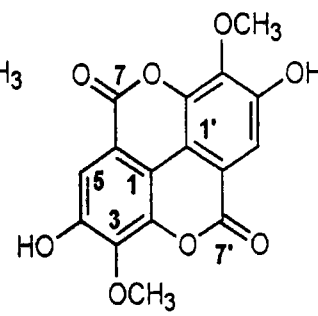
3,4 diMe (C_1)



3,4' diMe (C_1)

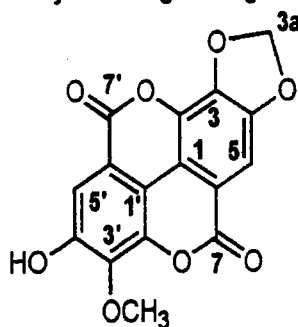


4,4' diMe (C_{2h})
= nasutin-C



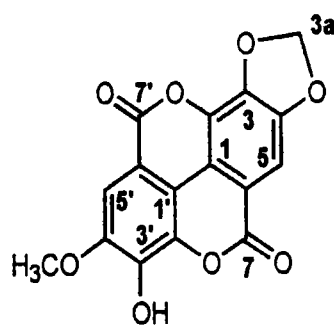
3,3' diMe (C_{2h})

methylene bridged ellagic acids

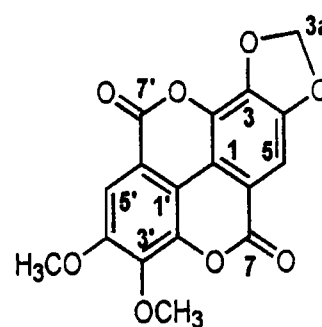


3'-O-methyl-3,4-methylenedioxy
ellagic acid

$C_{16}H_8O_8$
Exact Mass: 328.0219



4'-O-methyl-3,4-methylenedioxy
ellagic acid



3',4'-di-O-methyl-3,4-methylenedioxy
ellagic acid

$C_{17}H_{10}O_8$
Exact Mass: 342.0376

Anis₁₄: Sa masse molaire est de 316,02 uma., les premières données de la RMN dans CD₃OD à 37°C montre que ce composé contient un mélange d'autres composés dérivé de l'acide ellagique méthylethers.

Dans le spectre ¹H enregistré dans CD₃OD, nous distinguons 4 singulets qui sont observés dans la région où les groupes -OMe apparaissent, avec les valeurs en ppm suivantes (intégrales): 3,982 (1,96); 3,945 (3,39); 3,715 (1,38); 3,503 (3,34); plusieurs autres signaux, dans certaines cas des singulets larges, sont aussi observés à 8,54 (I = 0,27), 7,35 (0,59), 7,28 (0,95), 7,09 (0,41), 7,02 (1,01), 6,99 (0,26), 6,89 (0,08), 5,36 (0,44), et 5,31 (0,41).

Anis₁₅: Ce produit possède une masse molaire de 330; la RMN a été enregistrée dans DMSO-d₆ à 37°C. Ce composé montre une quantité du matériel gras et plusieurs signaux qui pourraient être des methyl ethers de l'acide ellagique. En RMN ¹H, les singulets suivants et leurs intégrales (entre parenthèses) sont observées : 8,53 (0,22); 7,27 (0,40); 7,08 (0,51); 7,06 (0,25); 5,35, 5,33, 5,31 (0,70 total); 3,947 (3,00); 3,706 (2,04); 3,502 (1,78).

IV-5-2-3- acide mono- et dimethyl ellagiques repurifiés

Après purification par CCE d'Anis₁₄ et Anis₁₅, en utilisant le système de solvant S₁, les nouveaux composés sont soumis alors à la RMN dans DMSO-d₆ pure à 37°C, les spectres se retrouvent purs.

Anis₁₄ : Acide ellagique mono-methyl ether

Le spectre ¹H (figure 47) montre des singulets larges à 7,490 (1,06); 7,377 (1,00); 4,021 (3,22). Quelques impuretés sont observées à 3,500 (0,13) et à 3,163 (1,13). Le pic -OH à 4,2 ppm est très large et donc les phénols -OH ne sont pas détectés individuellement (échange chimique). Nous notons pas d'effet ¹H NOE détecté du -OMe à 4,02 ppm avec H5 ou H5', consistant donc avec la localisation du groupe -OMe en position C-3. Les données de RMN ¹³C renseignent sur une structure d'**acide-3-O-methoxyellagique** (figure 48) (Tableau 12).

Anis₁₅ : acide ellagique di-methyl ethers

Les données de la RMN ¹H montrent deux singulets larges: 7,483 (2,00) et 4,034 (6,18); 3,3 (large -OH), consistant avec le dérivé dimethyl avec une symétrie C₂. Alors que le

signal -OMe a le même déplacement chimique que pour le dérivé mono-methyl, la structure est assignée comme étant l'**acide- 3,3'-di-O-methyl ellagique**

Le problème des résonances larges reste toujours à résoudre (échanges chimiques du solvant ou existence d'impuretés paramagnétiques). Par conséquent, d'autres travaux sur les dérivés methylethers ont été effectués par acidification du milieu à l'aide de l'acide trifluoroacétique (ATF) et ont permis de résoudre le problème de la largeur des pics due à l'échange de -OH. En effet une goutte d'acide trifluoroacétique- d_1 est additionnée à 0,15 ml de CD_3OD en présence du TMS, et la solution est ajoutée dans le tube RMN du produit Anis₁₅. La couleur jaune brun disparaît et l'échantillon reste en solution. L'enregistrement du spectre de RMN 1H (figure 49) a montré dans ce cas des signaux très bien résolus, et il nous a été possible d'analyser en RMN et le carbone ^{13}C et les corrélations CH 2D (Tableau 13). Les résultats pour chaque moitié de la molécule sont consistants avec les données pour l'acide ellagique et le dérivé 3,3'-di-O-Me.

Ce résultat est confirmé par la RMN ^{13}C (figure 50). La littérature (Bindra *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1999) indique que l'identification du -OMe à C3 ou C4 peut être facilement faite du spectre ^{13}C des groupes methyl (ca. 61-62 ppm ou 56-57 ppm, respectivement). Les produits communément rencontrés ont le -OMe en C3 et -OMe ou -O-glycoside en C4.

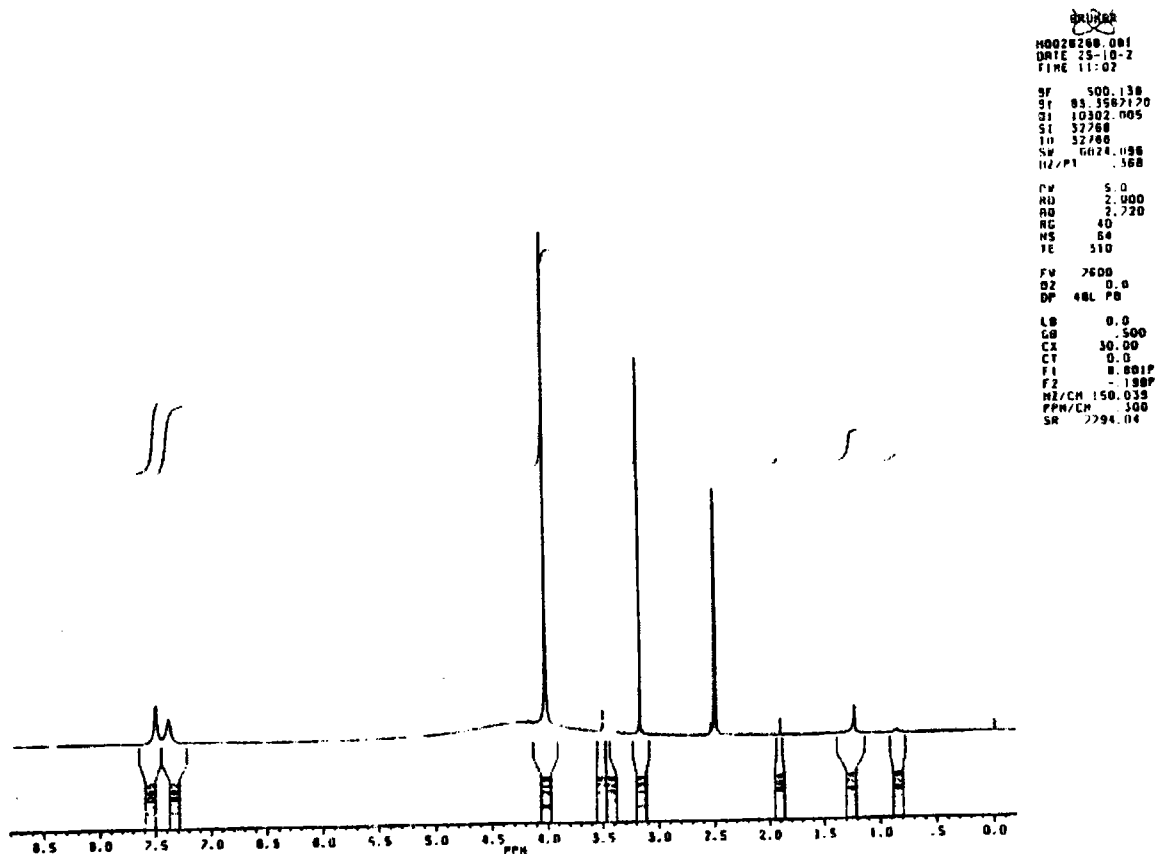


Figure 47: Spectre de RMN du proton enregistré dans $DMSO-d_6$ à 500 MHz d'Anis₁₄

```

PROBHD: QNP
DATE: 10-10-2
TIME: 4:01

SF 125.760
ST 85.8
G1 41588.000
G2 45834
T0 68538
W 76515.700
HZ/PT .603

F1 4.0
F2 0.0
RG 1.245
RG 200
RS 8000
TE 303

F1 32900
G2 10000.000
OP 20H 88

LB .000
CB .600
CX 30.00
CT 0.0
F1 185.000P
F2 55.002P
H2/CH 481.110
PPH/CH 1.687
SR 29722.93

D1 2.350000
S4 200
D1 001551000
S2 14M
Rb 0.0
P1 4.0
I0 27.0
M5 0000
DS 2

```

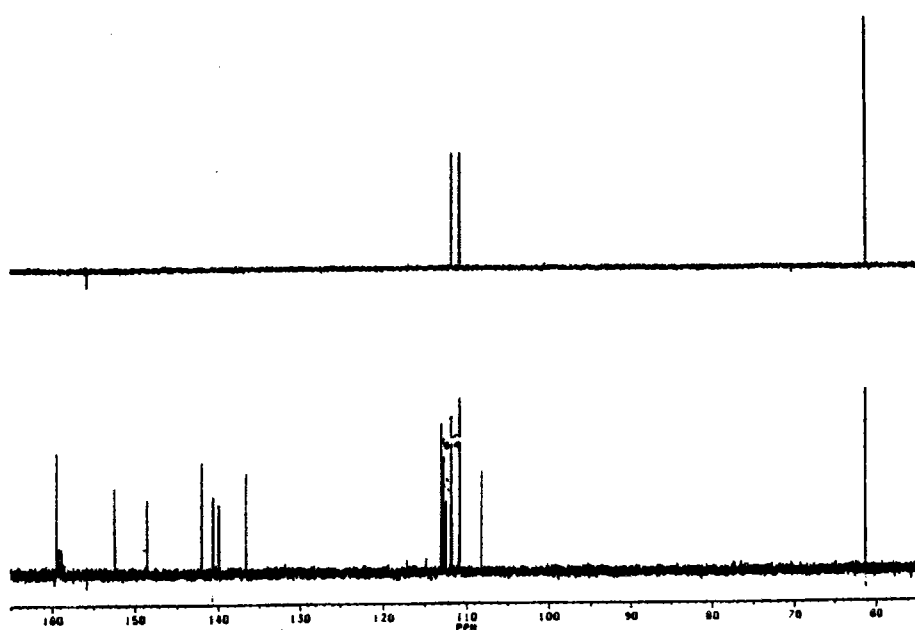


Figure 48: Spectre de RMN ¹³C dans du DMSO+TFA à 125.6 MHz d'Anis₁₄

```

PROBHD: QNP
H0026269.00
H011 1-11 2
I1AL 10:10

SF 500.1
S1 05.3547
G1 10307.0
S1 32768
T0 32768
W 6024.0
HZ/PT .3

F1 6.0
F2 2.0
RG 2.7
RG 40
RS 8
TE 303

F1 7600
G2 0.0
OP 48L P0

LB 0.0
CB .51
CX 30.00
CT 0.0
F1 8.00
F2 -.21
H2/CH 150.03
PPH/CH .31
SR 7784.45

```

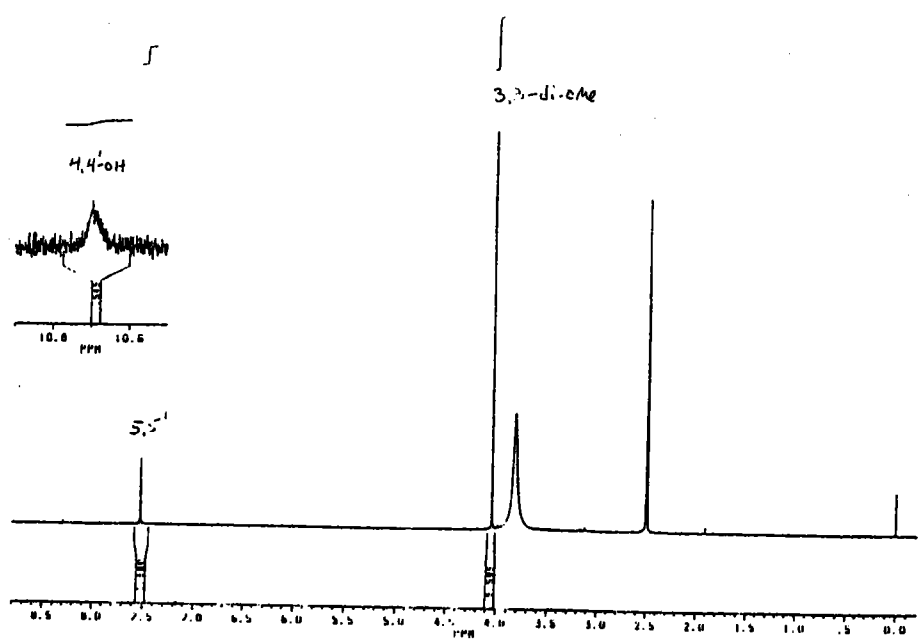


Figure 49: Spectre de RMN du proton enregistré dans DMSO-d₆ (5% CD₃OD) + gouttes de TFA à 500 MHz d'Anis₁₅

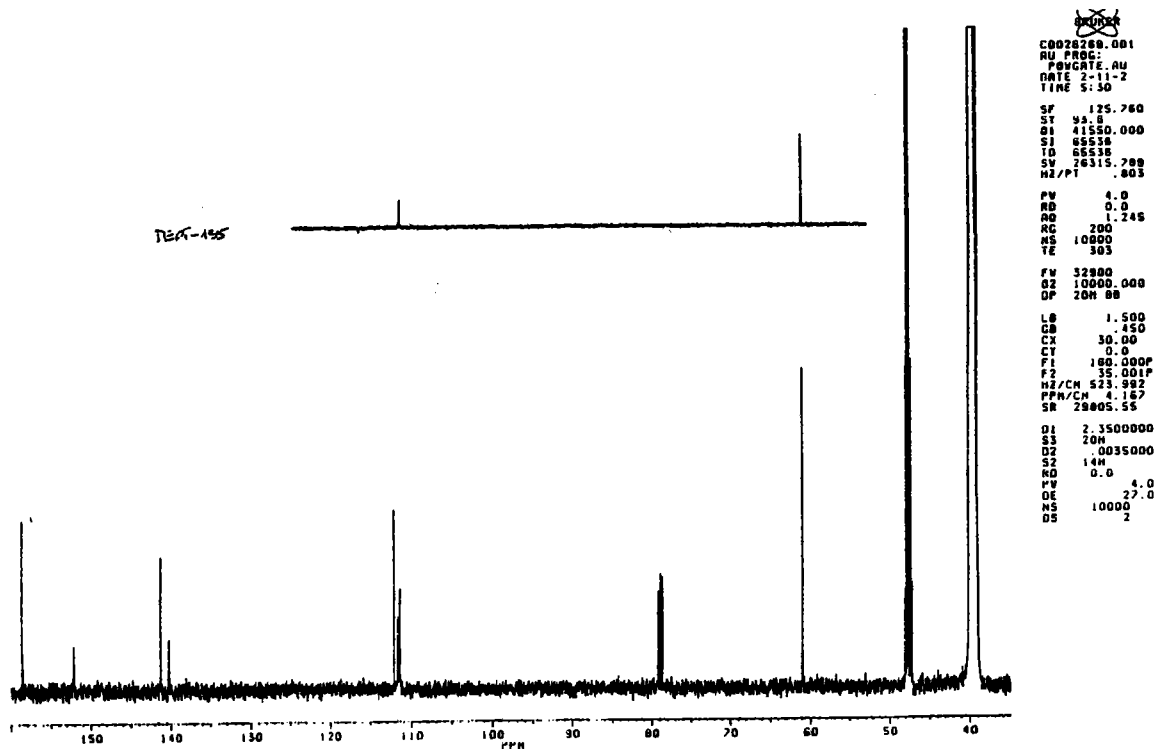


Figure 50: Spectre de RMN ^{13}C dans (DMSO- d_6 , 5% de CD_3OD) à 125,6 MHz d'Anis $_{15}$

IV-5-2-4- Acide ellagique à ponts méthylènes Anis $_{16}$ mélangé au triterpène Anis $_{27}$

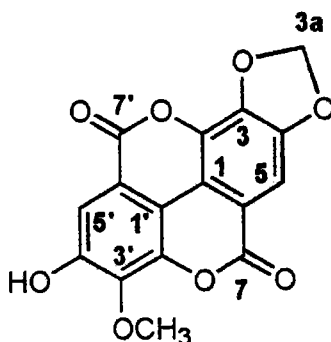
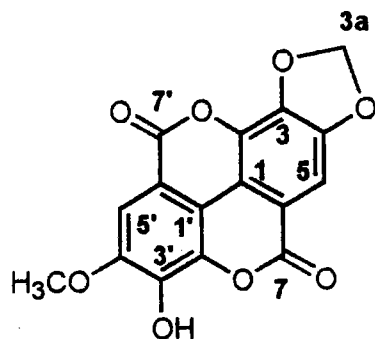
Fréquemment mentionné dans la littérature avec un groupe méthylène ponté entre les hydroxyles en C3 et C4 (nomenclature: -3,4,-methylenedioxy-).

Les groupes -OH restants peuvent être méthylés ou liés à des saccharides.

La RMN ^1H a montré que l'échantillon Anis $_{16}$ enregistré dans du DMSO- d_6 contient 2 composés majoritaires A et B.

La proportion molaire de A par rapport à B est de 0,2 et 1,0 respectivement.

A: c'est un dérivé d'acide ellagique de formule $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{O}_8$ avec 2 protons aromatiques singulets, un groupe OMe, et un CH_2 singulet et l'effet ^1H NOE ne donne aucune réponse entre OMe et H5', aussi le déplacement ^{13}C pour le -OMe indique son attachment en C3' et non en C4'. Le composé est donc probablement l'acide-3'-O-méthyl-3,4-methylenedioxy ellagique, et il est déjà décrit dans la littérature (Atta-urahman *et al.*, 2001) que nous confirmerons après purification.



ANIS-7



Exact Mass: 328.0219

B: Le second composé dans Anis₁₆ est un triterpène $C_{30}H_{48}O_3$ (MW = 456,36), les données RMN ^{13}C (tableau 15) confirment la formule moléculaire brute mais démontrent clairement qu'il ne s'agit pas de l'acide oléanolique mais plutôt d'un isomère avec la double liaison C=C sans protons attachés, en position 13,18 ou 9,8- et non en 12,13-ene.

Ce produit a été repurifié par CCE et par CLHP. Par CLHP, la repurification nous a permis d'obtenir 5 mg du produit, le triterpène semble très pure et les données spectrales de RMN (1H et ^{13}C) enregistrées dans du DMSO (figures 51 et 52) sont résumées dans le tableau 15. La masse du produit est confirmée aussi par GC/MS, la RMN ^{13}C aidée par l'expérience DEPT (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfert) révèle la présence de deux carbones oléfiniques tetrasubstitués (δ 133,22 ; 133,71), un groupement carboxylique à δ 179,54, cinq autres insaturations seraient attribuées à 5 cycles formant le squelette du triterpène. Ce triterpène contient un seul carbone oxygéné tertiaire à δ 76, 71.

Les données de la RMN ^{13}C d'Anis₂₇, donnent 7 C-CH₃ singulets, 11 groupes CH₂, 2 CH, 1 CHOH, 1 COOH, 2 C=, 6 C_q que nous attribuerons par la suite. Les structures possibles sont l'isomère 13,18-ene de l'acide α -boswelique ou encore l'acide bryonolique (8,9-ene). Les déplacements chimiques mesurés avec les corrélations one-bond CH sont résumés dans le tableau 15 et les valeurs des déplacements chimiques sont concordants avec celles de l'ester de l'acide bryonolique, rapportées par Kamisako *et al.*, 1984 (tableau 18).

En RMN 1H (figure 51) (tableau 15), les signaux de résonance des méthynes oléfiniques sont absents, ce qui conforte notre hypothèse de la migration de la double liaison de la position 12,13 à celle 8,9 très probablement et la clé de détermination de la structure est le proton H-18 (R) déblindé par rapport de H-5 (S) par sa proximité de COOH.. Les expériences COLOC confirment ces hypothèses (tableau 16).

Des données de RMN ^{13}C en j_{mod} (figure 52) (tableau 15), nous distinguons 30 signaux attribuables au squelette triterpénique, Nous distinguerons parmi ces signaux, sept groupes méthyles (δ 15,88 (C-24) ; δ 17,12 (C-27) ; δ 19,58 (C-25) ; δ 21,7(C-26) δ 28,02(C-23) ;

δ 30,93(C-28) ; δ 32,51(C-30), six carbones quaternaires à δ 39,35 (C-20) ; δ 41,26 (C-14) ; δ 38,34 (C-4) ; δ 37,02 (C-10) ; δ 36,63 (C-13) ; δ 30,47 (C-17); onze groupes méthylènes δ 18,77 (C-6) ; δ 20,07 (C-11) ; δ 27,57 (C-2) ; δ 24,55 (C-15) ; δ 29,97 (C-21) ; δ 27,01 (C-7) ; δ 29,97 (C-19) ; δ 29,70 (C-12) ; δ 33,96 (C-22) ; δ 34,62 (C-1) ; δ 36,66 (C-16), trois groupes méthynes δ 44,17 (C-18) ; δ 50,13 (C-5) ; δ 76,71 (C-3), deux groupes méthynes insaturés δ 133, 22 (C-8) ; δ 133,71 (C-9) et un (COOH) à δ 179,54.

Les différents méthylènes du triterpène ont été codés par un label (de A à K), les 3 méthynes par la lettre Q, R et H, les carbones quaternaires avec les lettres Q1-Q6 et enfin les deux oléfiniques avec les lettres O1-O2 (figure 53) pour mieux permettre la suite des séquences COSY45 et HMQC et ainsi de confirmer la structure du triterpène et sa stéréochimie. Quelques spectres de corrélation (One band C-H et COSY45) sont présentés par les figures 54 et 55 respectivement.

Le tableau 16 récapitule tous les résultats des séquences en RMN bidimensionnelle (ROESY, COLOC incluses) qui nous ont servi pour la confirmation finale de la structure d'Anis₂₇. D'autres séquences RMN 2D ont aussi été réalisées, le tableau 17 récapitule les résultats des séquences 2D plus performantes, telles que le ROESY QFS et COSY DQF (Double Quanta Filtre) du triterpène. Des singulets intenses des groupes méthyles non couplés sont fortement réduits. Par conséquent, nos résultats nous ont permis la confirmation et l'apport de certaines caractérisations spectrales ainsi que la stéréochimie par le calcul des constantes de couplage 2j et 3J du triterpène (tableau 17). Comparées aux données de la littérature (Kamisako *et al.*, 1984), les prédictions des différents déplacements chimiques obtenues par Chem Draw et les données comparatives par rapport aux données de la banque WinSpecEdit ainsi que nos données expérimentales sont résumées sur le tableau 18 et confirment de part les valeurs faibles des DRMS, la structure du triterpène. A la lumière de ces données la structure du triterpène est l'acide-3 β -hydroxy-D:C-friedoolean-8-en-29-oïque nommé **acide bryonolique**.

Nous notons que ce triterpène existe sous deux conformères, la forme S (D:E, bateau-bateau et la forme F (D-E, chaise-chaise). Nos données en RMN nous permettent d'établir que le triterpène, que nous avons isolé adopte la conformation F, obtenue aussi par modélisation en utilisant les formules empiriques dans le programme Chem3D et représentée ainsi dans la figure 53. Dans cette figure ont été représentées en plus de la structure de l'acide bryonolique isolé celles de l'acide oléanolique et l'isomultiflorinol, ainsi que la numérotation adoptée selon la littérature.

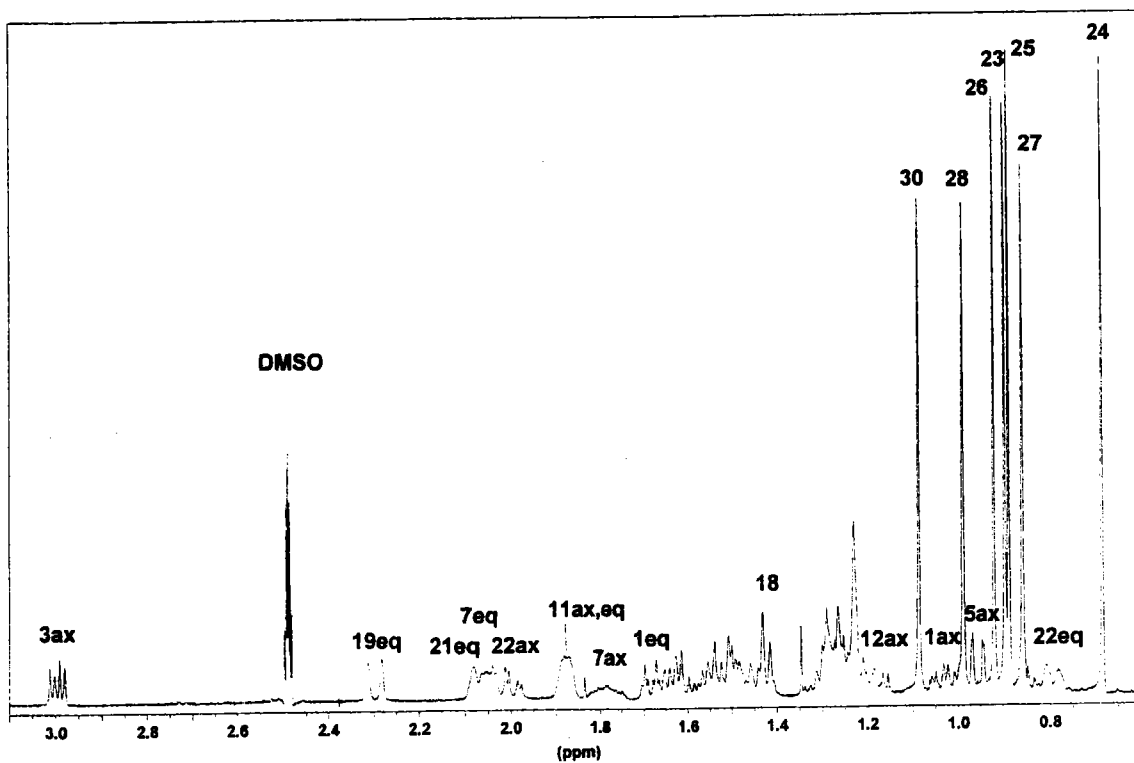


Figure 51: Spectre de RMN ^1H d'Anis₂₇ = acide bryonolique enregistré dans DMSO- d_6 à 500 MHz

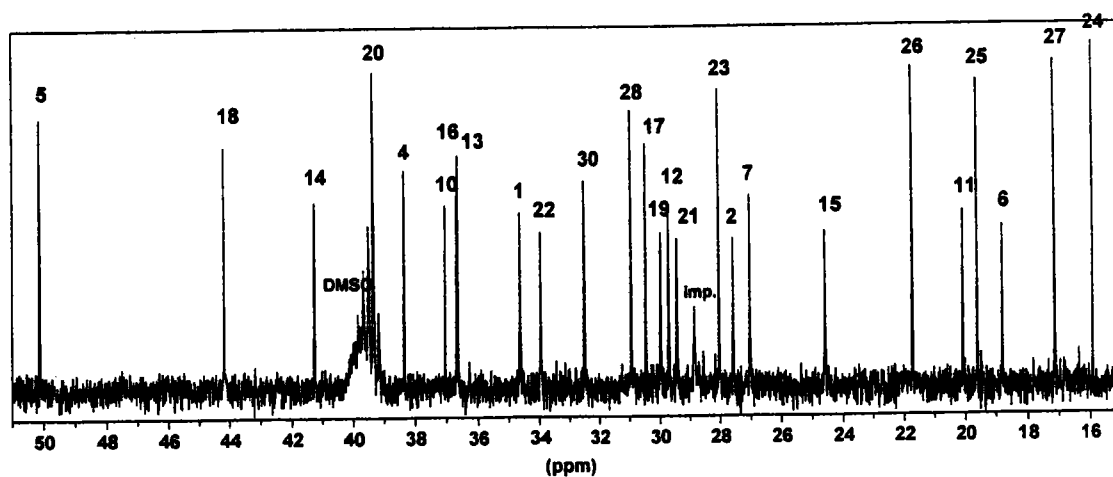
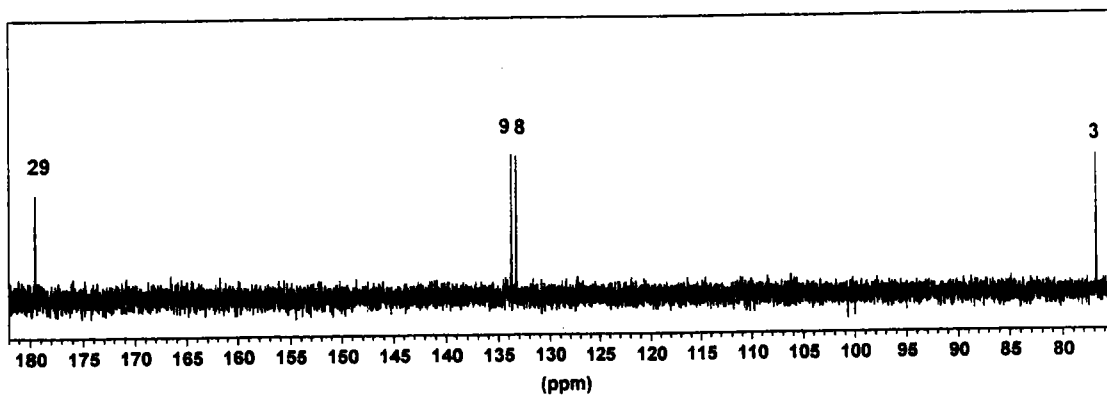
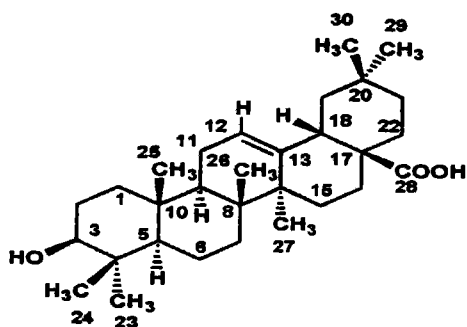
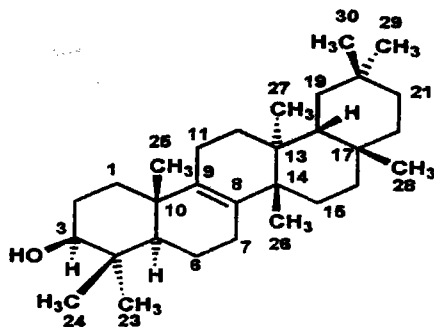


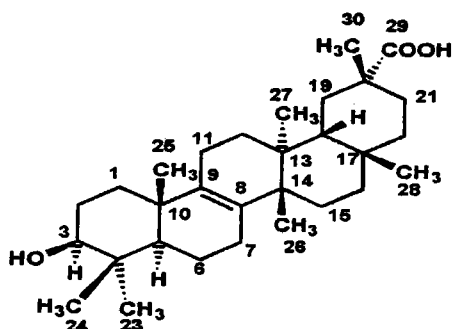
Figure 52: Spectre de RMN ^{13}C d'Anis₂₇ = acide bryonolique enregistré dans DMSO- d_6 à 125.76 MHz



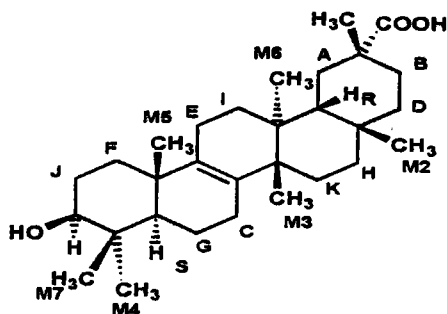
Oleanolic acid
3 β -hydroxy olean-12-en-28-oic acid
C₃₀H₄₈O₃ Exact Mass: 456,380



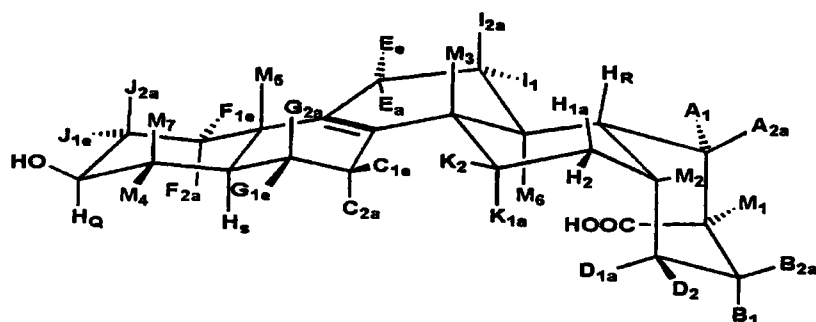
Isomultiflorenol
3 β -hydroxy-D:C-friedo-olean-8-ene



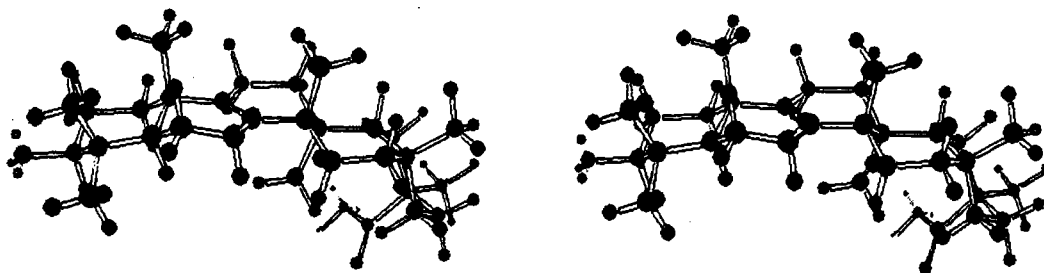
ANIS-27 triterpene
bryonolic acid
3 β -hydroxy-D:C-friedoolean-8-en-29-oic acid
C₃₀H₄₈O₃ Exact Mass: 456,380



Labels refer to NMR peak assignments



conformation en 3D basée sur la modélisation et la RMN



modèle Chem3D (MM2), stéréochimie du cycle D et E (forme chaise).

Figure 53: structure de l'acide bryonolique comparée à celle de l'acide oléalonique et sa conformation F en 3D basée sur les données de la RMN et ainsi sur la modélisation par Chem3D.

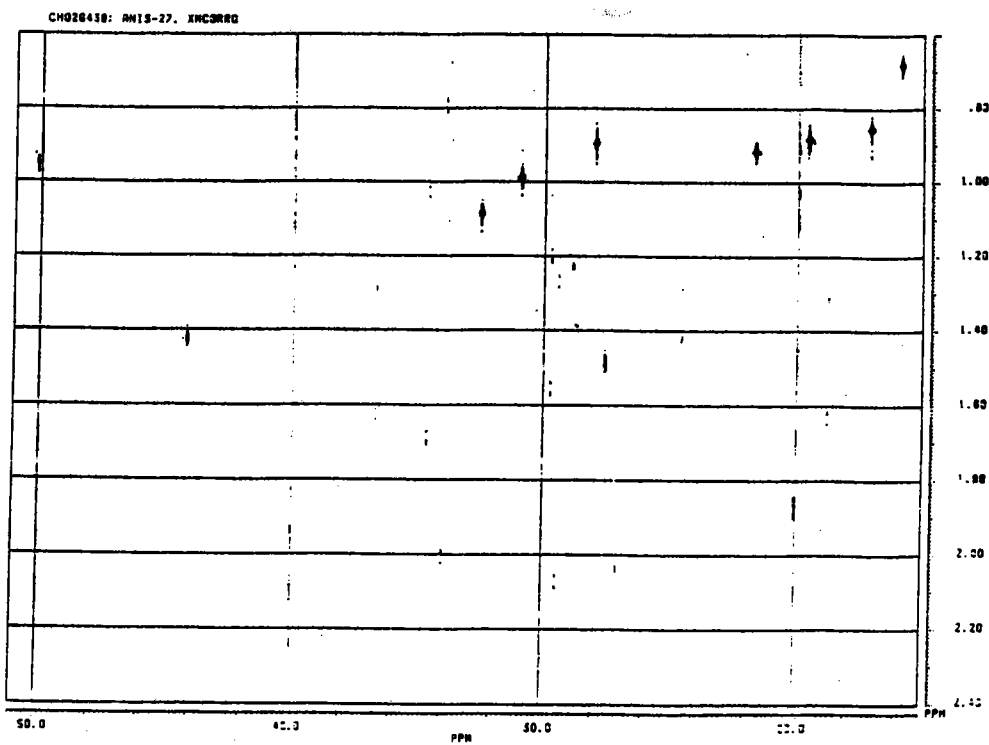


Figure 54: Spectre HMQC (^1H - ^{13}C) du produit Anis₂₇

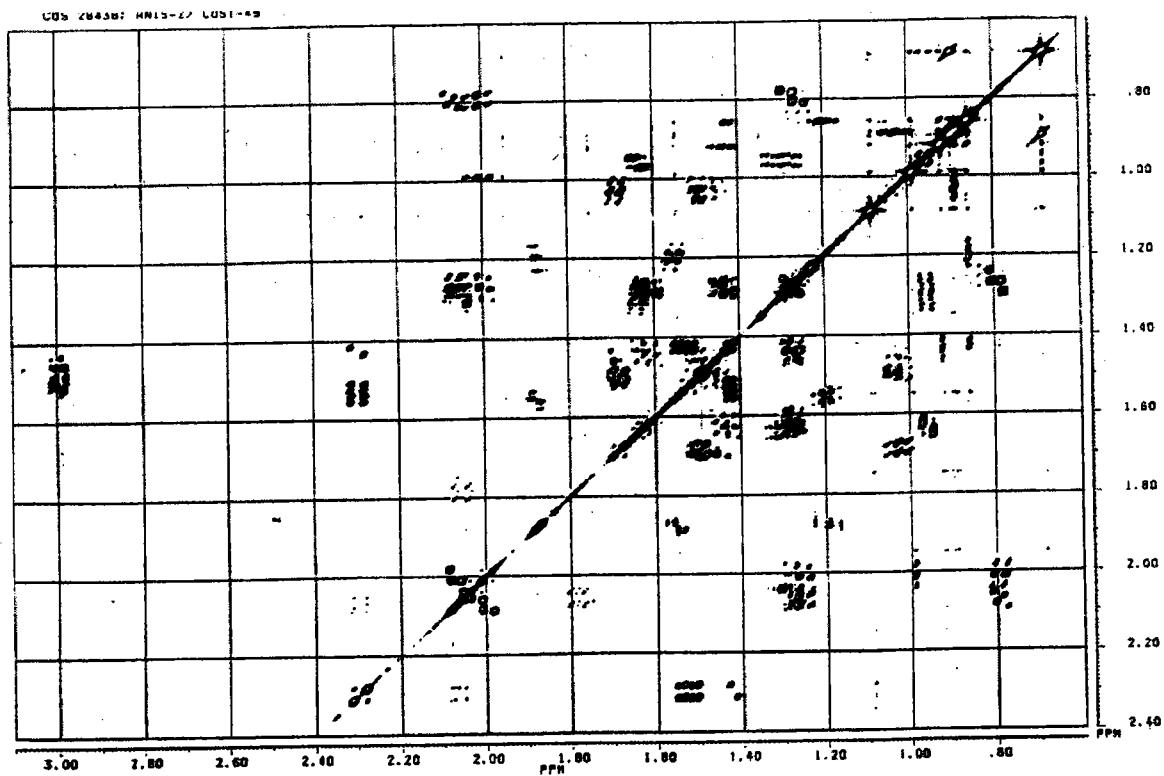


Figure 55: Spectre COSY (^1H - ^1H) du produit Anis₂₇

Anis₁₆ pur: Après repurification d'Anis₁₆ par CCE et par CLHP. Par CLHP, nous avons obtenu 2 mg de ce produit, nous notons en RMN ¹H, les mêmes signaux que dans Anis₁₄ et -₁₅ et des singlets larges consistants avec un dérivé d'acide ellagique et qui sont observés avec les valeurs de ppm suivantes (intégrales) : 7,309 (1,00), 6,813 (1,08), 6,248 (2,25), 3,909 (3,34), 3,503 (6,15). Alors que le singlet à 3,503 ppm apparaît dans tous les composés (Anis₁₄ à ₁₆), il est assumé donc qu'il correspond à une impureté.

Les quatre autres signaux cités en dessus sont consistants avec les dérivés monométhyl ether d'acide ellagique possédant un pont méthylène (voir Anis₁₁ en bas). Nous ne décelons pas d'effets ¹H NOE détecté du groupe -OMe (3,909 ppm) avec d'autres protons de la molécule, c'est donc une structure **acide-3'-O-méthyl-3,4-méthylendioxy ellagique**.

La même procédure que celle utilisée pour Anis₁₅ est conduite en RMN pour Anis₁₆.

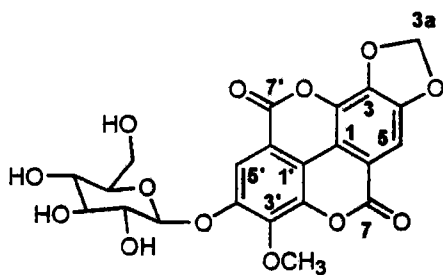
La couleur jaune brun disparaît après addition d'ATF, cependant, après une heure, une quantité significative de l'échantillon précipite. L'addition en plus de CD₃OD ou CDCl₃ n'a pas permis de solubiliser l'échantillon.

L'échantillon a été analysé après 2 jours de repos, 0,4 ml de DMSO-d₆ a été ajouté au précipité dans le tube RMN, l'échantillon a été complètement dissolu et les données de RMN ¹H. Les données de RMN ¹³C sont résumées dans le tableau 14 et sont en accord avec les données de la littérature (Atta-Urahmann *et al*, 2001).

IV-5-2-5- Les glycosides de l'acide ellagique.

Anis₁₁: identifié comme étant le **4'-O-β-D-glucoside d'Anis₁₆**. Cette structure est confirmée par les signaux caractéristiques pour le groupe méthylène 3a, et le 3'-OMe. Le site de la glycosylation C4' est confirmé par l'observation d'un fort effet ¹H NOE du H5' et le H1 du glucose. Nous ne notons aucun effet NOE observé du groupe 3'-OMe.

L'échantillon contient aussi 10 d'impuretés (terpènes (stéroïde?)) visibles dans le spectre de RMN ¹H, avec des groupes oléfiniques et possiblement liés à un monosaccharide.



ANIS-11

$C_{22}H_{18}O_{13}$
Exact Mass: 490.075

Les spectres de RMN 1H et ^{13}C enregistrés dans le DMSO sont présentés par les figures (56, 57 respectivement) et sont en parfait accord avec les données rapportées par Li *et al.*, 1999 et les résultats du dépouillement des ces spectres sont récapitulés dans le tableau 19. dans l'article (Atta-Urahmann *et al.*, 2001) (tableau 19), il y'a une erreur évidente dans l'attribution des carbones G2 et G5 du glucose. Dans la figure 58 sont représentées les corrélations COSY 1H - 1H de la partie glucose d'Anis₁₁.

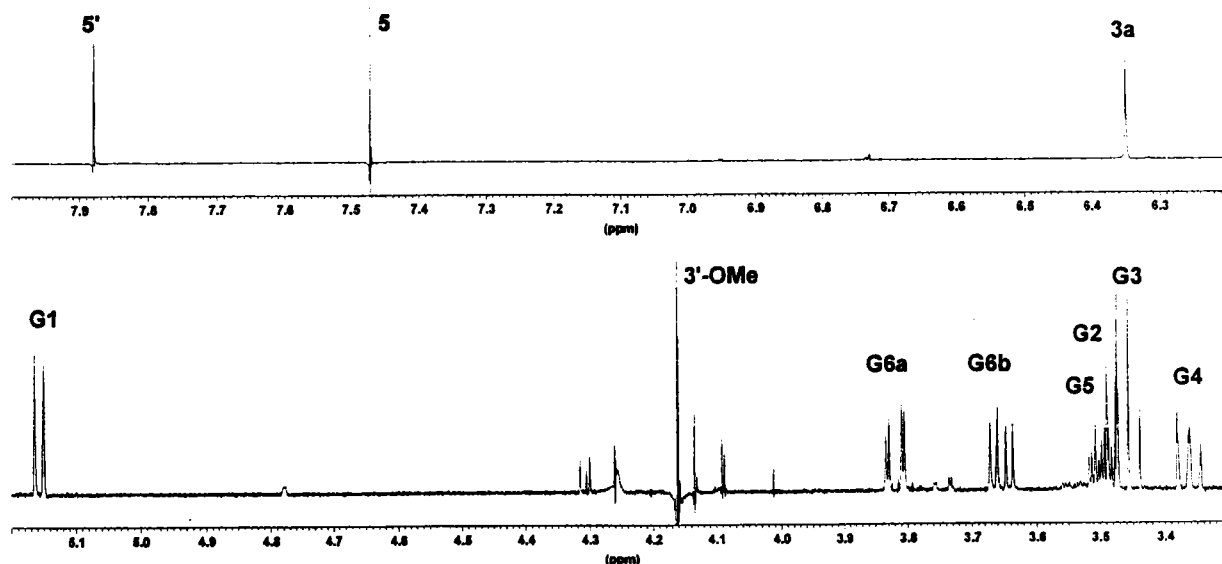


Figure 56: Spectre de RMN 1H 500 MHz de l'acide- 3'-O-méthyl-3,4-méthylendioxy ellagique- 4'-O- β -D-glucopyranoside (9 mg in DMSO- d_6 , 37°C)

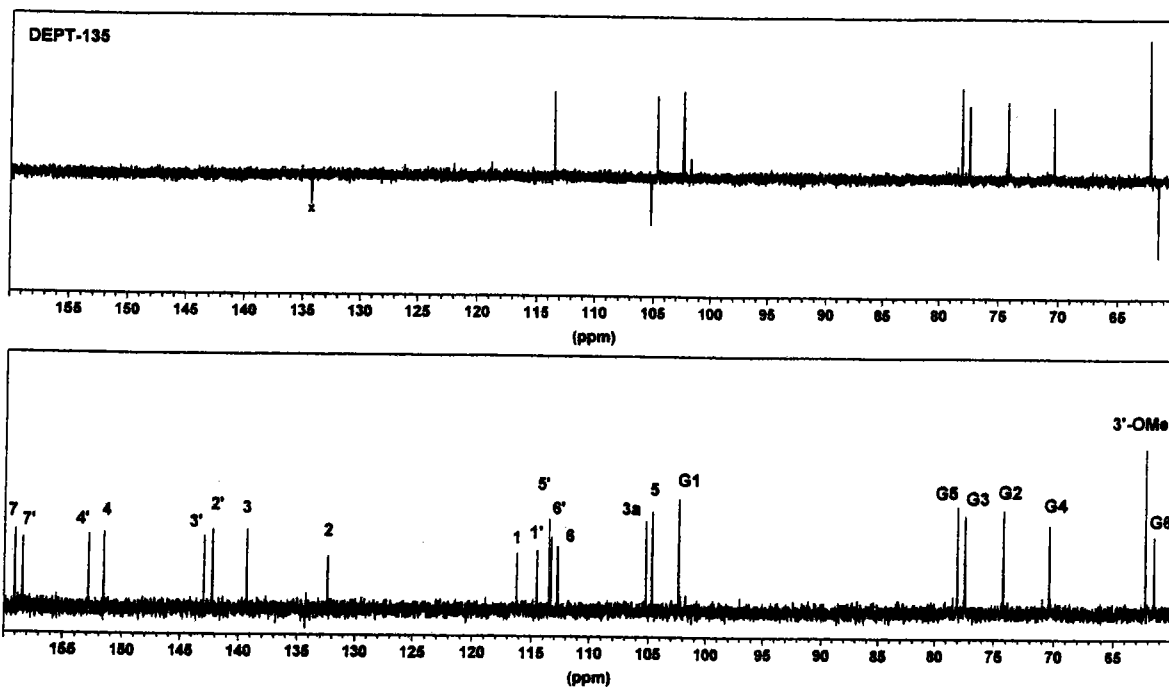


Figure 57: Spectre de RMN ^{13}C à 125,76 MHz d'Anis₁₁ par rapport au TMS dans $\text{CD}_3\text{OD} / \text{DMSO-d}_6$, 2 : 1, 30°C.

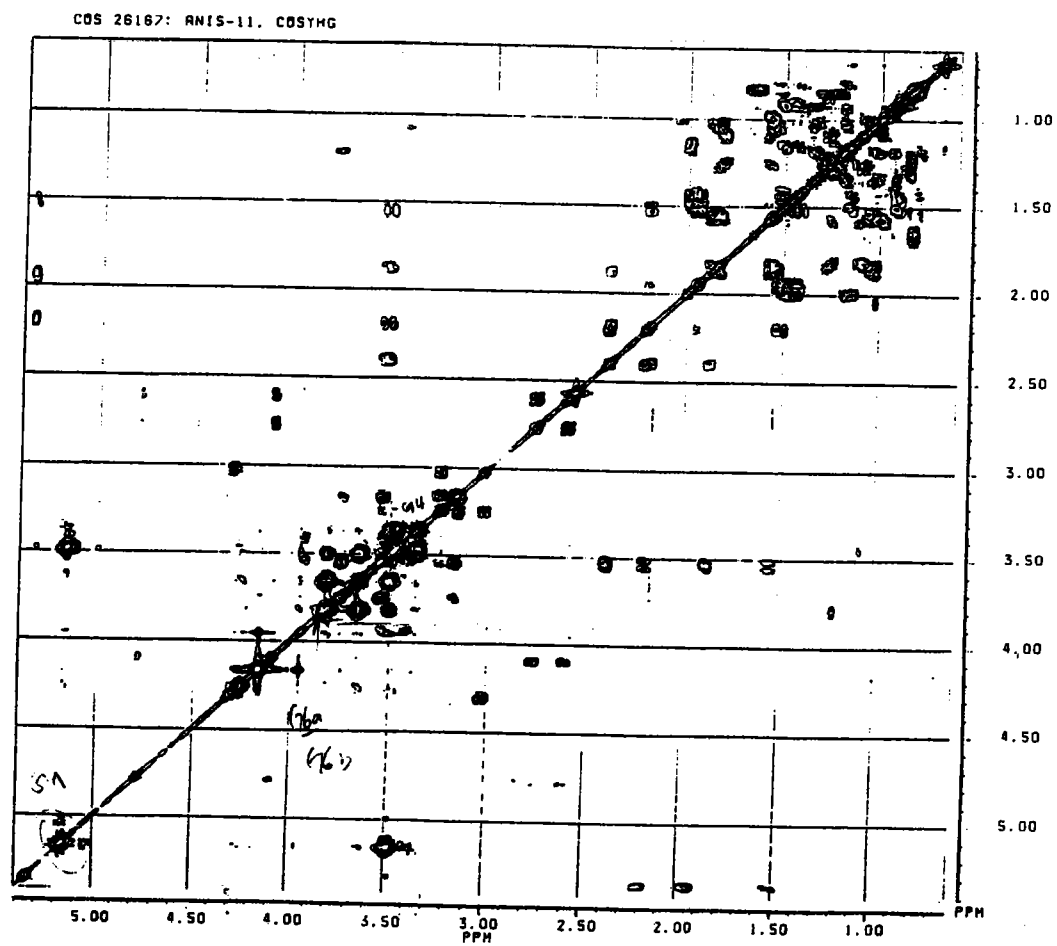


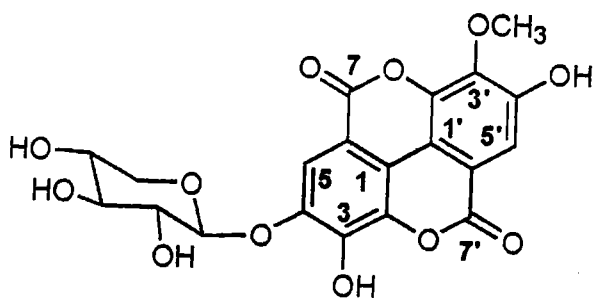
Figure 58: Spectre COSY ^1H - ^1H du produit Anis₁₁ (partie du glucose)

Anis₁₂ : les données de RMN ¹H et ¹³C enregistrés dans du DMSO-d₆ (figure 59)(tableau 20) indiquent une formule moléculaire C₂₀H₁₆O₁₂ avec le carbone 4 attaché au sucre de l'acide-3-O-methyl ellagique. Le glucoside montre 4 CHOH et 1 groupe CH₂O avec C1 en configuration β. Les protons du sucre H1 - H4 et H5b sont tous en position axiale (couplage ³J large par rapport aux protons voisins, alors que H5a est équatorial). Les données de RMN ¹³C sont concomitantes avec un β-D-xylopyranose (arabinose sous forme pyranose ou furanose sont clairement exclues).

Un faible effet ¹H NOE a été détecté entre le proton H5' et le H1 anomérique du sucre, suggérant une glycosylation en position C4. Nous ne notons aucun effet NOE observé du groupe 3'-O-methyl, indiquant qu'il ne suit pas le site de la glycosylation. La littérature décrit l'acide-3,3'-di-O-methyl ellagique-4-O-β-D-xylopyranoside (Li, 1999; Khac, 1990; Sinha, 1999); l'acide-3,3',4'-tri-O-methyl ellagique-4-O-β-D-xylopyranoside (Sinha, 1999); et ses glucosides correspondants (Nawwar *et al.*, 1982 ; Khac *et al.*, 1990 ; Li *et al.*, 1999).

La structure d'**Anis₁₂** est l'acide-3'-O-methyl ellagique-4-O-β-D-xylopyranoside.

A notre connaissance, la littérature ne décrit pas encore ce produit.



3'-O-methyl ellagic acid 4-O-β-D-xylopyranoside

C₂₀H₁₆O₁₂
Exact Mass: 448.0642

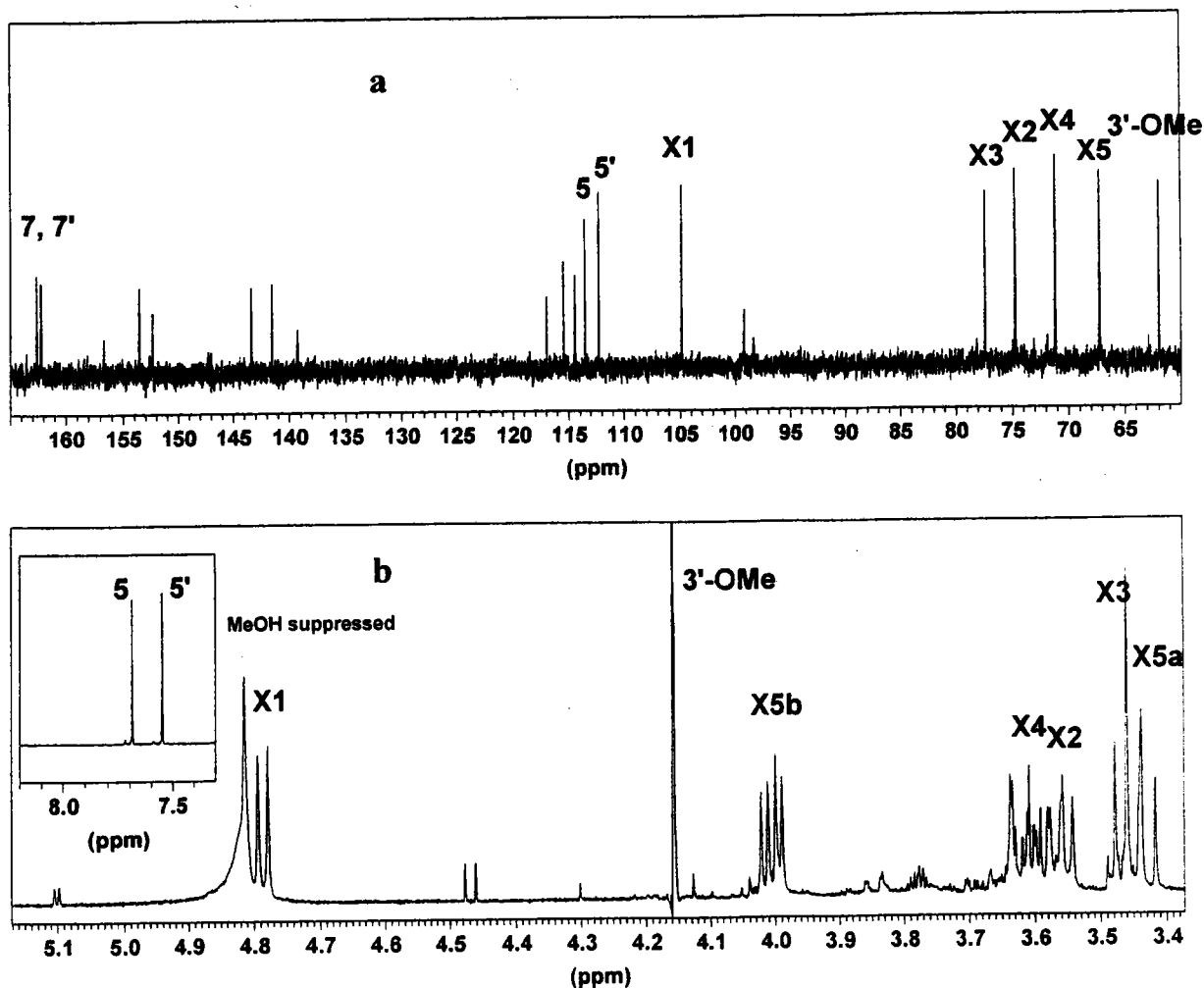


Figure 59: Spectre RMN (a. ^{13}C , b. ^1H) enregistré dans DMSO-d_6 à 500 MHz d'Anis₁₂

Tableau 11: Données de RMN pour l'acide ellagique (1:1 $\text{CD}_3\text{OD} / \text{CDCl}_3$, 37°C, relative au TMS)

pos. ^a	^{13}C	mult. ^b	^1H	mult	Couplages CH				Li, 1999 (DMSO-d ₆)		Prédictions (Chem Draw 6.0)	
					1J	2J	3J	4J	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	113,649	Sd (br)*					7,2 (H5)	ca. 1,0 (H5')	112,2		125,1	
2	136,902	S (br)*						ca. 1,0 (H5)	136,3		140,5	
3	140,342	Sd					7,01 (H5)		139,4		143,1	
4	148,756	Sd				2,95 (H5)			148,0		143,7	
5	111,645	D (br)*	7,59	s	n.d.				110,2	7,47	116,0	7,40
6	108,806	Sd				1,71 (H5)			107,6		123,9	
7	161,242	Sd (br)					4,0 (H5)		159,0		164,0	

^a la numérotation est prise de la littérature; les attributions sont effectuées à partir des corrélations Long-Range CH. ^b les multiplicités définies pour les ^{13}C sont en lettres majuscules directement attachés aux protons (S,D,T,Q) et en lettres minuscules celles obtenues par couplage Long-Range CH.

*br = linebroadening, probablement due au couplage ^2H via les groupes OD ou par effets des échanges chimiques.

Tableau 12: Données de RMN pour l'acide-3-O-methoxy ellagique (Anis₁₄) dans DMSO-d₆ / CD₃OD 7:3 + trace de TFA et TMS, 30°C

pos.	¹³ C	mult.	¹ H	mult.	corrélations CH (COLOC) détectées de H5 ou H5'				Prédictions (Chem Draw 6.0)	
					¹ J	² J	³ J	⁴ J	¹³ C	¹ H
1	112,45	S					+ H5	+ H5'	124,7	
2	141,99	S						+	138,9	
3	140,64	S					+ H5,3-OMe		147,8	
4	152,47	S				+			142,1	
5	111,81	D	7,536	s	+				115,6	7,46
6	113,04	S				+			123,6	
7	159,39	S					+		164,0	
3-OMe	61,24	Q	4,081	s					56,3	3,73
1'	112,74	S					+ H5'	+ H5	125,1	
2'	136,65	S						+	140,5	
3'	139,90	S					+		143,1	
4'	148,48	S				+			143,7	
5'	110,82	D	7,489	s	+				116,0	7,40
6'	108,13	S				+			123,9	
7'	159,30	S					+		164,0	
DMSO	39,522		2,544							
CD ₃ OD	48,003		3,222							

Les déplacements chimiques ¹H des résonances larges dans DMSO-d₆ pure à 37 °C sont : 7,490, 7,377, 4,021 (3-OMe).

Les attributions des ¹³C sont basées sur les corrélations ¹J CH pour C5,5'; corrélations ³J pour H5 à C1, C3, C7 et le -OMe à C3; corrélations ²J pour H5 à C4, (C6) et aussi par analogie avec l'acide éllagique et le 3,3'-di-O-Me ether.

Tableau 13: Données de RMN de l'acide-3,3'-di-O-methyl ellagique dans DMSO-d₆ + 5% CD₃OD + trace de TFA et TMS, 30°C (Anis₁₅)

pos. ^a	¹³ C	Mult. ^b	¹ H	mult. ^b	Nawwar, 1982 (DMSO-d ₆)		Sato, 1987: DMSO-d ₆		Bindra, 1988 (pyridine)	Prédictions (Chem Draw 6.0)	
					¹³ C	¹ H	¹³ C 3,3'-di-O-Me	¹³ C 4,4'-di-O-Me		¹³ C	¹ H
1	111,71	S, br			111,8		111,68	107,32		124,7	
2	141,22	S			141,1		141,18	140,92		138,9	
3	140,19	S, br			140,2		140,30	136,32		147,8	
4	152,03	S, br			153,0		152,13	150,27		142,1	
5	111,40	D	7,527	s	111,4	7,52	111,52	107,07	8,01	115,6	7,46
6	112,14	S			112,0		112,06	113,55		123,6	
7	158,46	S			158,3		158,37	158,96		164,0	
3-OMe	60,94	Q	4,053	s	60,9	4,08	60,91	56,65	4,23	56,3	3,73
4-OH			10,7	s,v br							
CD ₃ OD	47,572										
DMSO	39,473		2,508								

Déplacements chimiques ¹H de très larges pics dans DMSO-d₆ pure à 37 °C: 7,483 (H5,5'), 4,034 (3,3'-OMe)

^aPos. : Position, ^bmult. : multiplicité

Tableau 14: Données de RMN pour l'acide-3'-O-méthyl-3,4-méthylendioxy-ellagique dans DMSO-d₆, 37°C (Anis₁₆ pur).

pos.	¹³ C ^a	mult.	¹ H ^b	mult.	Atta-Urahmann, 2001 (pyridine-d ₅)		Prédictions par Chem Draw 6.0	
					¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	116,04	S			112,0		124,4	
2	<i>131,00</i>	S			131,1		138,5	
3	138,25	S			138,0		146,2	
4	149,95	S			150,1		146,8	
5	103,78	D	7,521	s	104,4	7,74	114,0	7,50
6	<i>112,58</i>	S			114,9		123,2	
7	158,20	S			158,9		164,0	
3a	104,16	T	6,368	s	104,6	6,30	91,3	5,90
1'	110,98	S			111,2		124,7	
2'	<i>141,55</i>	S			143,0		138,9	
3'	140,24	S			142,0		147,8	
4'	152,91	S			153,5		142,1	
5'	112,10	D	7,536	s	113,5	8,04	115,6	7,46
6'	<i>110,91</i>	S			114,0		123,6	
7'	157,57	S			158,0		164,0	
3'-OMe	60,84		4,044		61,5	4,16	56,3	3,73

^a toutes les attributions sauf celles en italique sont confirmées avec ¹J et des corrélations long-range CH; les attributions de C_{6,6'} et C_{2,2'} sont basés sur les valeurs décrites dans la littérature.

^b déplacements chimiques ¹H pour Anis₁₆ + ⁻²⁷ (CLHP) dans DMSO-d₆, 37°C, sont H_{5,5'} = 7,309, 6,813; H_{3a} = 6,248, 3'-OMe = 3,909.

Tableau 15: Données de RMN préliminaires pour le triterpène dans Anis₁₆ (DMSO-d₆, 37°C).

type	¹³ C	mult.	¹ H	mult.	type	¹³ C	mult.	¹ H	mult.
COOH	179,54	S	11,85	s (br)	CH ₃	32,39	Q	1,099	s
C=	133,71	S			CH ₃	30,90	Q	0,986	s
C=	133,22	S			C	30,45	S		
CHOH	76,71	D	2,993	dd	CH ₂	29,89	T	2,278; 1,550	m; m
CH	50,13	D	0,952	dd	CH ₂	29,73	T	1,537; 1,200	m; dt
CH	44,17	D	1,426	m	CH ₂	29,30	T	2,057; 1,278	dm; m
C	41,26	S			CH ₃	28,04	Q	0,892	s
C	39,35	S			CH ₂	27,56	T	1,493	s
C	38,34	S			CH ₂	27,00	T	2,06; 1,77	dm; m
C	37,02	S			CH ₂	24,50	T	1,43; 1,29	m; m
C	36,63	S			CH ₃	21,71	Q	0,915	s
CH ₂	36,66	T	1,62; 1,275	m; m	CH ₂	20,06	T	1,874	s
CH ₂	34,62	T	1,682; 1,02	dt; td	CH ₃	19,58	Q	0,882	s
CH ₂	33,96	T	1,99; 0,81	td; dm	CH ₂	18,77	T	1,632; 1,291	m; m
					CH ₃	17,15	Q	0,847	s
					CH ₃	15,88	Q	0,680	s

Tableau 16: Données de RMN (COLOC-S, COSY-50 et ROESY) d'Anis₂₇, mélangé d'Anis₁₆ dans DMSO-d₆,

		COLOC (freq. 1H)	
		fort	faible
		M1	
		M5	M3; E12, I1
		M3	
		M6, M3	S
		M1	R > B1,
		M7, M4	S
		M5	S, F1
	Q5 + H	M2>M6>M3	K1, H2 or K2
COSY-50		M2	C1, K1
corrél. COSY-45	corrél. ROESY		
J1, J2 >> F2	M4, S(ax), F2(ax)	M4	F1
G1, G2	M4, Q > G1(eq), F2(ax)	M4	M7, F1,
A1, A2 > M6	M3 > M2 > A1, I2a >> M6 (A2 tocsy)	M2 > M6	
H2, K1, K2	M3 = M2		
H1, K1, K2			
F2, J1, J2	F2, M5	M5	
F1, J1, J2, M5	J1 > R		
D2, B1, B2, M2	D2, M6	M2	
D1, B1, B2	D1 > (B2a, H2e), B1e > M2		
A2 > R > B1, M1	A2, R > M1 = M6	M1	
A1, R	M1 = M2		
I2, E12, M6 (faible)	M6	M6	R ou K1
I1, E12, M6	M3 > R		
B2, D1, D2 > A1	B2a >> M6 > M1, D2(eq); (D1a tocsy)	M1	
B1, D1, D2	M1, M2, B1 >> D1		
J2, Q, F1, F2	F2		
J1, Q, F1, F2	M5		
C2, G2 > G1, E12	M3		S
C1, G1, G2 > E12			
K2, H1, H2, M3	M6	M3	
K1; H1, H2			
I1, I2 > C1, C2	M5, M6 > F1, I1, I2		
G2, S, C2 > C1	M4		S
G1, S, C1, C2	M5, M7		
A1 faible	A2, B2 > A1 > B1 > R, M6 > M2		
D1 fort	B2, R > H1, A2, D2 > M3 > M1, M7		D1
M7 fort	M7, Q, S, G1 > G2, E	M7	S
K1 > M6	R > I2, H1, C1 > E12, C2, K2 > M2 > M6		K1
F2	M7, G2, E12 > F1, J2	S	F1
I2 > R > M3 > I1	D1 > E12, K1 > A1, B1, I1, K2		K1, I2
M4 > S	G2, M3 > M4 > J2 > G1	M4 > S	

Tableau 17: Données de RMN après l'analyse du triterpène Anis₂₇ pure C₃₀H₄₈O₃

RMN 2D pour Anis ₂₇ : COSY-45, COSY DQF, ROESYQFS, XHCORRD								
DMSO-d ₆ , 310 K: SR(¹ H) = 7793,87, SR(¹³ C) = 29820,12								
Données des Corrélations CH								
C30: 1 COOH, 2 Cq=, 1 CHOH, 2 CH, 11 CH ₂ , 7 CH ₃ singlets, 6 Cq								
Type de C	Code du Signal	Attributions	Dépt. C	Dept. H	mult.	stéréochim.	³ J(HH)	² J(HH)
COOH		C29	179,54					
sp ² Cq	O1	C9	133,72					
	O2	C8	133,22					
sp ³ Cq	Q1	C14(C13)	41,27					
	Q2	C20	39,36					
	Q3	C4	38,35					
	Q4	C10	37,03					
	Q5	C13(C14)	36,63					
	Q6	C17	30,47					
sp ³ CH	Q	C3	76,71	2,995	dd	ax	10,7; 5,4	
	S	C5	50,13	0,956	dd	ax	12,4; 1,5	
	R	C18	44,18	1,423	d	eq		8,3
CH ₂	H	C16	36,66	1,623	td	ax		
				1,271		eq		
	F	C1	34,62	1,685	dt	eq	3,3; 3,3	13,1
				1,027	td	ax	12,7; 5,2	13,5
	D	C22	33,96	2,006	td	ax	14,2; 3,9	13,8
				0,792	dt	eq		13,1
	A	C19	29,98	2,297		eq	< 2	15,35
				1,530		ax		7,9
	I	C12	29,70	1,553	d	eq	< 3	12,3
				1,196	dt	ax	8,8; 8,8	13,5
	B	C21	29,42	2,073	dm	eq	< 3	13,5
				1,269	td	ax	14; 4,5	13,6
	J	C2	27,57	1,500		eq		
				1,481		ax		
	C	C7	27,02	2,052	dd	eq		
1,782				m	ax			
K	C15	24,55	1,435	td	ax	13,4; 4,6	13,5	
			1,273		eq			
E	C11	20,07	1,879	m	ax,eq		n.d.	
G	C6	18,77	1,632	dd	eq		7	
			1,296		ax	13; 12,3; 5,8	13	
CH ₃	M1	C30	32,53	1,086	s			
	M2	C28	30,94	0,988	s			
	M4	C23	28,02	0,895	s			
	M3	C26	21,71	0,919	s			
	M5	C25	19,59	0,886	s			
	M6	C27	17,13	0,857	s			
	M7	C24	15,89	0,684	s			

Tableau 18: Comparaison entre les Données de RMN théoriques (bases de données) et celles obtenues par modélisation moléculaire utilisant le champs de force MM2 par Chem 3D avec nos valeurs expérimentales et avec celles de l'ester d'acide bryonolique décrit dans la littérature

Prédictions des dept. ¹³ C						littérature			
SpecEdit (20000 Spectres)		RMN dept. DB (ca. 540 spectra)		Prédictions Chem Draw 6		Kamisako <i>et al.</i> , 1984			
Jusqu'à 6 Sphères		Jusqu'à 4 sphères		Depl. Utilisant les incréments		acide bryonolique methyl ester dans CDCl ₃			
Prédi. ppm	Exp. - Préd.	Préd.	Exp. - Préd.	Préd.	Exp. - Préd.	Dépt. - Exp.	Diff. (Anis ₂₇ - ester)	Diff. Corrig.	
								moyennes corrigées	
36,0	-1,38	38,20	-3,58	27,7	6,92	35,0	-0,377	0,078	
28,0	-0,43	26,80	0,77	25,7	1,87	27,9	-0,330	0,125	
79,0	-2,29	77,78	-1,07	79,7	-2,99	78,9	-2,187	-1,732	
39,0	-0,65	41,50	-3,15	35,0	3,35	38,8	-0,452	0,003	
50,0	0,13	52,70	-2,57	48,9	1,23	50,5	-0,366	0,089	
19,0	-0,23	19,79	-1,02	25,9	-7,13	19,2	-0,428	0,027	
27,0	0,02	26,70	0,32	28,3	-1,28	27,6	-0,582	-0,127	
134,0	-0,78	137,89	-4,67	140,1	-6,88	133,9	-0,677	-0,222	
134,0	-0,28	135,00	-1,29	140,1	-6,38	134,0	-0,285	0,170	
37,0	0,03	37,65	-0,62	31,7	5,33	37,5	-0,473	-0,018	
21,0	-0,93	22,24	-2,17	25,2	-5,13	20,7	-0,627	-0,172	
30,0	-0,30	34,32	-4,62	34,9	-5,20	30,3	-0,596	-0,141	
37,0	-0,37	42,08	-5,45	39,6	-2,97	37,1	-0,470	-0,015	
42,0	-0,73	44,07	-2,81	41,7	-0,44	41,8	-0,535	-0,080	
26,0	-1,45	25,92	-1,37	26,4	-1,85	25,0	-0,447	0,008	
37,0	-0,34	30,34	6,32	31,5	5,16	37,0	-0,340	0,115	
31,0	-0,53	38,41	-7,94	30,4	0,07	30,9	-0,426	0,029	
45,0	-0,82	49,35	-5,17	44,9	-0,72	44,7	-0,524	-0,069	
31,0	-1,02	39,01	-9,03	28,2	1,78	30,8	-0,824	-0,369	
40,0	-0,65	43,27	-3,92	39,5	-0,15	40,5	-1,145	-0,690	
30,0	-0,58	28,88	0,54	28,1	1,32	29,9	-0,476	-0,021	
34,0	-0,04	30,34	3,62	30,5	3,46	34,4	-0,439	0,016	
22,0	6,02	22,86	5,16	19,2	8,82	28,0	0,023	0,478	
22,0	-6,11	22,86	-6,97	19,2	-3,31	15,6	0,289	0,744	
19,0	0,59	19,48	0,11	20,9	-1,31	19,9	-0,312	0,143	
22,0	-0,29	23,70	-1,99	18,1	3,61	22,1	-0,392	0,063	
18,0	-0,87	18,87	-1,74	18,5	-1,37	17,1	0,027	0,482	
26,0	4,94	20,38	10,56	22,8	8,14	31,2	-0,260	0,195	
185,0	-5,46	181,28	-1,74	181,0	-1,46	179,2	0,342	0,797	
33,0	-0,47	19,10	13,43	19,8	12,73	32,9	-0,371	0,084	
Sommes des carrées	144,31		738,63		687,58	Moyenne des diff.	-0,455		
N	30		30		30				
Dev. RMS	2,23		5,05		4,87				

Les déplacements chimiques expérimentaux sont donnés par le tableau 15

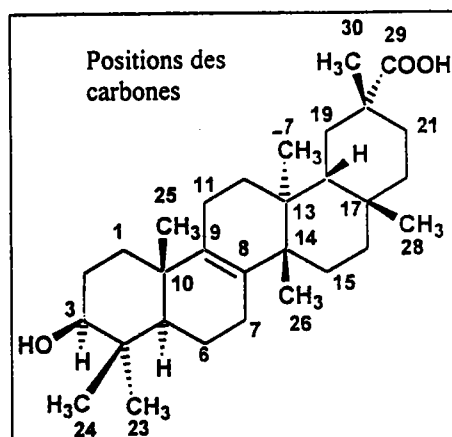
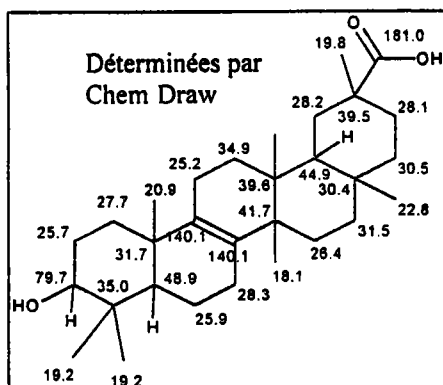


Tableau 19: Données de RMN pour l'acide-3'-O-méthyl-3,4-méthylendioxy ellagique-4'-O-β-D-glucopyranoside (Anis₁₁) dans CD₃OD / DMSO-d₆ (2:1) + TMS, 30°C

						Données RMN (DMSO-d ₆) ^d		Données RMN (pyridine-d ₅) ^e	
pos.	¹³ C ^a	mult.	¹ H	mult	³ J _{HH}	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	116,22	S				114,8		112,6	
2	132,39	S				130,8		132,1	
3	139,33	S				138,0		138,9	
4	151,62	S				150,3		151,1	
5	104,70	D	7,472	s		103,7	7,29	104,0	7,74
6	112,73	S				111,2		115,9	
7	159,06	S				157,6		158,0	
3a	105,23	T	6,350	s		104,5	6,34	104,6	6,33
1'	114,53	S				112,9		113,2	
2'	142,25	S				140,8		142,0	
3'	142,97	S				141,7		142,7	
4'	152,88	S				151,9		153,0	
5'	113,49	D	7,880 ^b	s		112,3	7,75	113,5	8,44
6'	113,28	S				111,8		114,0	
7'	158,40	S				157,0		158,6	
3'-OMe	62,24	Q	4,162	s		61,6	4,11	61,7	4,23
4'-O-β-G1	102,37	D	5,157	d	7,40 (1,2)	101,4	5,14	102,8	5,85
G2	74,20	D	3,486	dd ^c	9,1 (2,3)	73,2	3,40	78,3	n.d.
G3	77,39	D	3,457	t ^c	9,1 (3,4)	76,4	3,40	79,0	n.d.
G4	70,38	D	3,362	dd ^c	9,7 (4,5)	69,4	3,25	74,6	n.d.
G5	78,04	D	3,492	ddd	2,30(5,6a); 5,43 (5,6b)	77,2	3,50	70,9	n.d.
G6	61,51	T	a: 3,819 b: 3,653	dd	-12,05(a,b)	60,5	3,75; 3,56	62,1	n.d.

^a toutes les attributions sont confirmées par des corrélations CH sauf ceux en italique; ^b effet NOE de G1 et 4' = 6.7%; ^c système de spin du 2^{ème} ordre. ^d Li, 1999: ca. 20 mg/ml, temp. ambiante ^e Atta-ur-rahman, 2001: grand effet du solvant sur les déplacements; les protons du glucose ne sont pas attribués, pour ¹³C les attributions des déplacements de G2-G5 ne sont pas corrects.

Tableau 20: Données de RMN pour Anis₁₂ in CD₃OD, 30°C (3'-O-méthyl ellagic acid 4-O-β-D-xylopyranoside).

							Li, 1999: 3,3' di-O-Me- 4-O-β-xylopyranoside	
pos.	¹³ C ^a	mult.	¹ H	mult.	³ J _{HH}		¹³ C	¹ H
1		S					114,1	
2		S					140,8	
3		S					141,8	
4		S					151,1	
5	113,52	D	7,692	s			111,8	7,74
6		S					111,8	
7		S					158,2	
						3-O-Me	61,5	4,06
1'		S					111,0	
2'		S					141,5	
3'		S					140,1	
4'		S					152,7	
5'	112,27	D	7,551	s			111,4	7,52
6'		S					112,7	
7'		S					158,3	
3'-O-Me	61,96	Q	4,160	s		3'-O-Me	60,9	4,03
4-O-β-S1	104,84	D	4,783	d	7,56 (1,2)		101,6	5,14
S2	74,72	D	3,562	dd	9,1 (2,3)		72,9	3,33
S3	77,36	D	3,462	dd	8,9 (3,4)		76,0	3,32
S4	71,16	D	3,607	ddd	5,3 (4,5a) 10,4 (4,5b)		69,1	3,38
S5	67,21	T	a: 4,008 b: 3,441	dd dd	-11,4 (a,b)		65,7	3,82 3,33

^a 12 carbones quaternaires non encore attribués: 162,60; 162,20; 156,66; 153,53; 152,36; 143,35; 141,56; 139,23; 116,96; 115,43; 114,41; 99,16 ppm car la masse du lot obtenu Anis₁₂ ne nous a pas permis l'obtention des spectres de corrélation CH.

IV-5-2-6- Les procyanidines monomériques

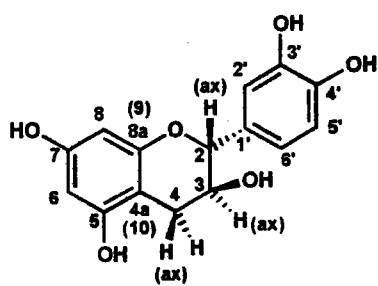
Anis₅ : Le produit Anis₅ se présente sous forme d'une poudre blanche, et présente un temps de rétention de 14,3 min. En RMN ¹H (figure 60), on distingue deux doublets dédoublés correspondant aux protons 4_{ax} et 4_{eq} du noyau C de la molécule, respectivement à 2,86 et 2,74 ppm, un proton attribué à H-3 en position équatoriale à 4,17 ppm. Le proton à 4,81 ppm est attribué à H-2 en position axiale dans la molécule, deux singulets correspondants aux protons 6 et 8 respectivement à 5,95 et 5,95 ppm, H-2', et H-5' et H-7' résonnent respectivement à 6,98; 6,75 et 6,82 ppm.

En RMN ¹³C en *j_{mod.}*, (figure 61), on distingue 15 signaux attribuables au squelette flavanique, Nous distinguons parmi ces signaux, six groupes méthynes aromatiques, deux CH aliphatiques et 6 carbones quaternaires.

À la lumière de ces données, la structure de Anis₅ est l'**epicatéchine**. Ces résultats sont aussi en accord avec celles déjà rapportés par Cui *et al*, 1992.

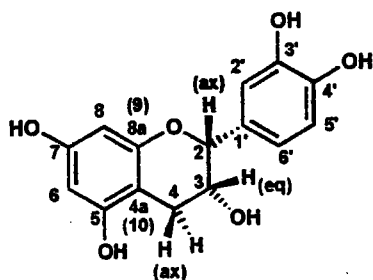
Ces attributions sont confirmées en exploitant les modèles isotopes formés (isotopomers), observés après deutération partielle du composé **Anis₅**. Après deutération pendant 21 jours à 22 jours, les résultats des expériences d'enregistrement dans CD₃OD des spectres ¹H, 1D ainsi que les séquences de différenciation : NOE et les corrélations 2D et COLOC, sont récapitulés dans le tableau 21.

Anis₃: Le composé Anis₃ est un produit de couleur blanche, il présente un temps de rétention par CLHP de 12,1 min. La caractérisation spectrale a montré que ce composé se rattache à une structure de la catéchine. En effet, le spectre de RMN ¹H et RMN ¹³C (figure 60)(figure 62), sont superposables à ceux d'un composé de référence enregistré dans les mêmes conditions. La valeur de la constante de couplage *J*_{2,3} confirme la position axiale du proton H-3 et donc la structure de la **catéchine**. Toutefois, des travaux par RMN ont été conduits afin de pouvoir discerner entre les différents protons et les carbones et ainsi contribuer à un apport approfondi sur quelques points de cette structure comme pour Anis₅ (quelques commentaires portants sur les résultats d'enregistrement des spectres ¹H, ¹D après 22 jours et les corrélations CH 2D après 26 jours sont insérés dans le tableau 22).



(+)-catechin

$C_{15}H_{14}O_6$
Exact Mass: 290.0790



(-)-epi-catechin

$C_{15}H_{14}O_6$
Exact Mass: 290.0790

Anis₃

Anis₅

Ces structures sont aussi confirmées par comparaison de leurs spectres avec ceux des produits de référence en utilisant un spectromètre RMN AC-250 MHz.

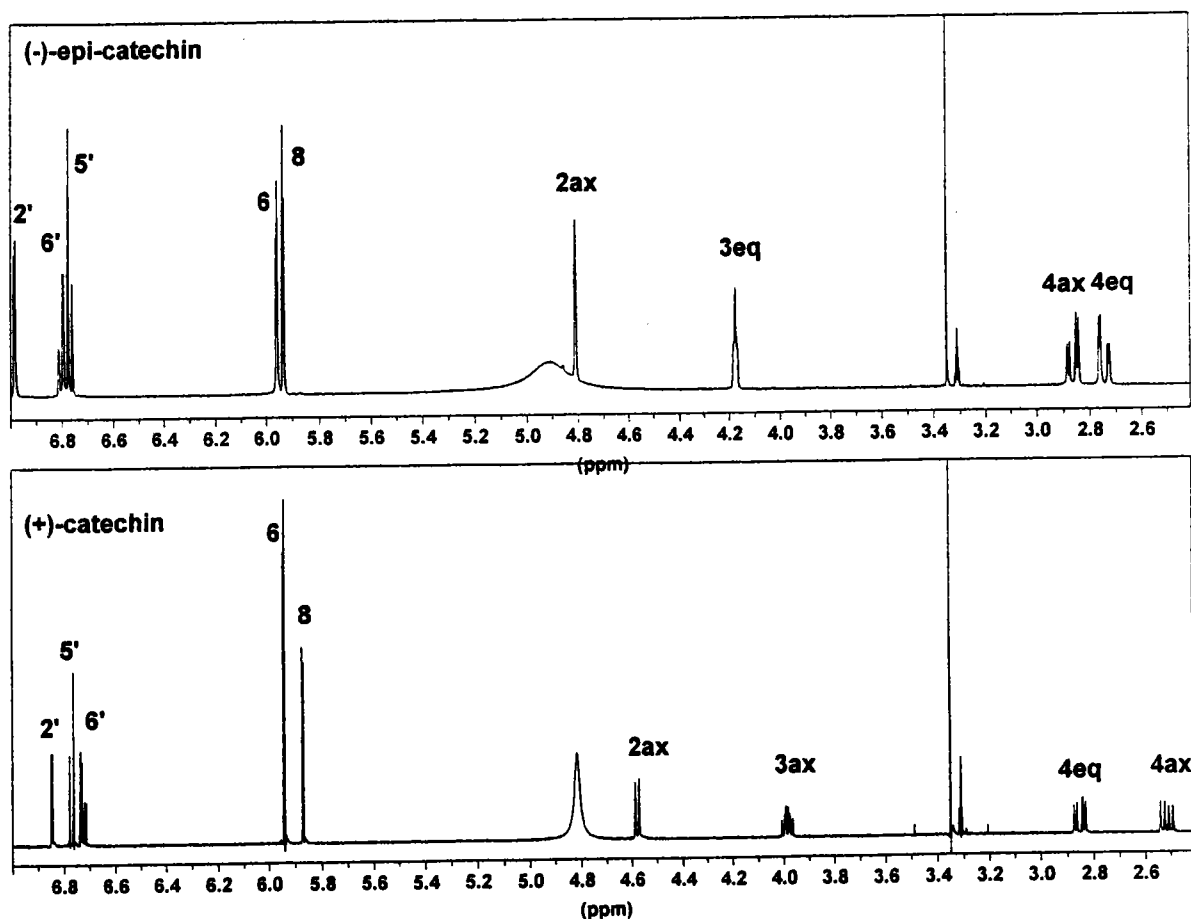


Figure 60: Spectres enregistrés dans CD_3OD par rapport au TMS respectivement d'Anis₅ et Anis₃ à 500 MHz.

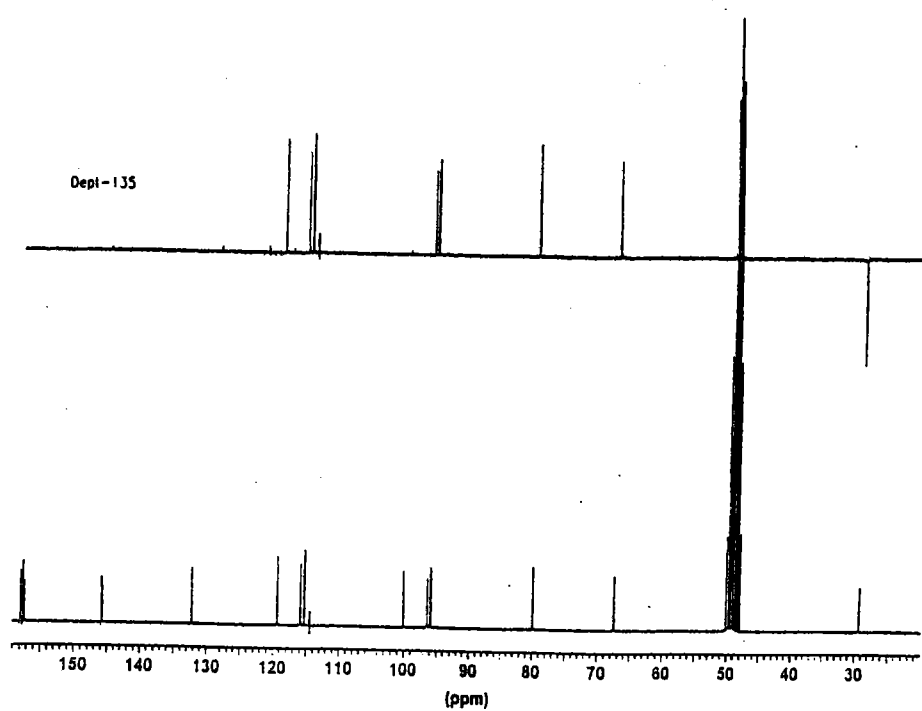


Figure 61: Spectre de RMN ^{13}C enregistré dans CDCl_3 à 500 MHz du produit Anis,

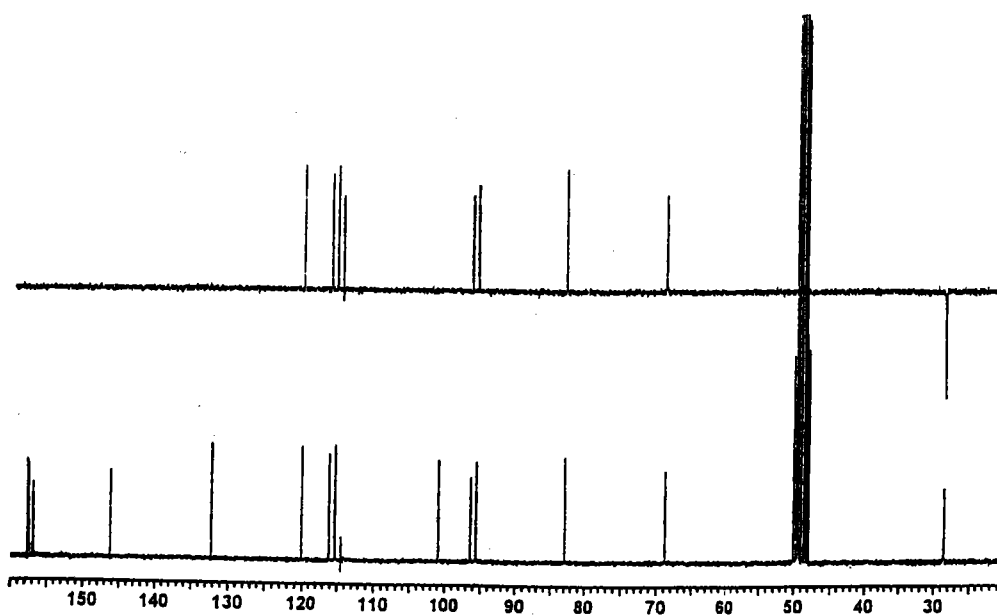
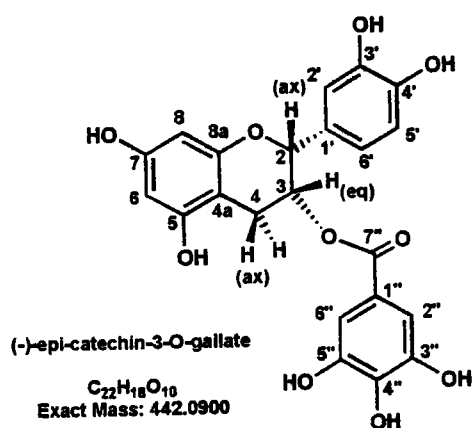


Figure 62: Spectre de RMN ^{13}C enregistré dans CDCl_3 à 500 MHz du produit Anis,

Anis₆ est un produit de couleur blanche, ses caractéristiques chromatographiques, ainsi que son spectre de masse renseignent sur un dérivé de l'épicatéchine, nous avons déjà déduit du spectre de masse un fragment correspondant à l'acide gallique, la position de ce dernier est aussi déterminée. Le reste de son spectre RMN ¹H est superposable à celui de l'épicatéchine déjà identifiée avec un déblindage de 0,22 ; 1,35 et 0,13 ppm respectivement pour les protons (H2, H3 et H4) dus à la structure gallate



Ce produit, contient quelques impuretés lipidiques et acétates. En outre, nous notons la présence aux alentours de 10% de substances secondaires (voir signaux additifs pour le fragment gallate H2'', 6'' et pour la catéchine H2', H6'). Le spectre ¹H à 500 MHz est présenté dans la figure 63 et les données sont résumées dans le tableau 23. Nous notons que les singulets H6 et H8 de la catéchine sont à peu près équivalents donnant comme il apparaît dans la figure un seul signal avec une intégration de 2 protons.

L'ordre des déplacements chimiques est le suivant : H2' > H6' > H5' et est le même que celui de l'épicatéchine et le couplage de H3 montre qu'il est en position équatoriale comme l'épicatéchine. H2(ax) montre seulement un pic large du au couplage faible avec H3 et H2', H6' du noyau aromatique. Le déblindage H3 (de 1,35 ppm) relative à celui de la valeur trouvée par rapport à l'épicatéchine (4,173) indique aussi que le fragment gallate est lié en position 3-OH. Le singulet à 6,948 ppm avec une surface de 2H est attribué aux protons H2'', 6'' du fragment gallate qui apparaît à 7,055 ppm dans l'Ellagitannin-1 (corilagin).

L'effet NOE, attribué au proton 4 par irradiation du proton H-6'' confirme clairement que l'hydroxyle en position 3 est occupé par l'acide gallique. Nos données sont toute à fait en accord avec celles rapportées par Cui *et al.*, 1992. A la lumière de ces données, la structure d'**Anis₆** est (-)-epi-catechin-3-O-gallate.

La RMN ^{13}C (figure 64)(tableau 23) a été aussi effectuée après avoir maintenu l'échantillon pendant 28 jours dans CD_3OD et une deutération étendue à C6,C8 a été produite comme pour les catéchines. Le spectre obtenu ^1H indique seulement 0,3 H des protons restants pour H6+H8; le spectre ^{13}C indique que le proton H8 est complètement échangé par le deutérium et donc le carbone C8 ne pourrait pas être détecté avec certitude, C6 présente 25% par rapport à l'intensité normale et indique par conséquent 25% de H et 75% de D.

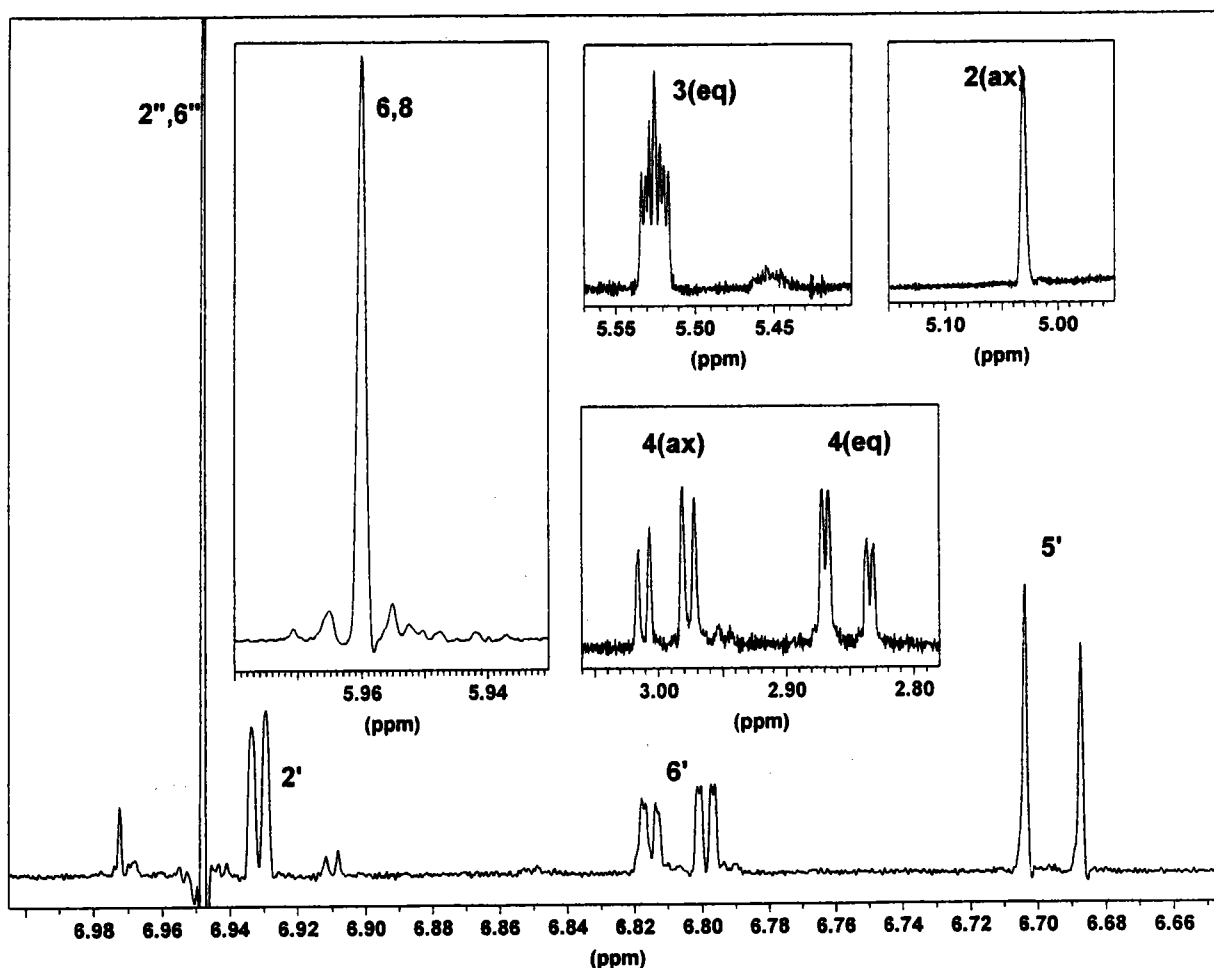


Figure 63: Spectre de RMN ^1H enregistré au 1^{er} jour dans CD_3OD à 500 MHz d'Anis,

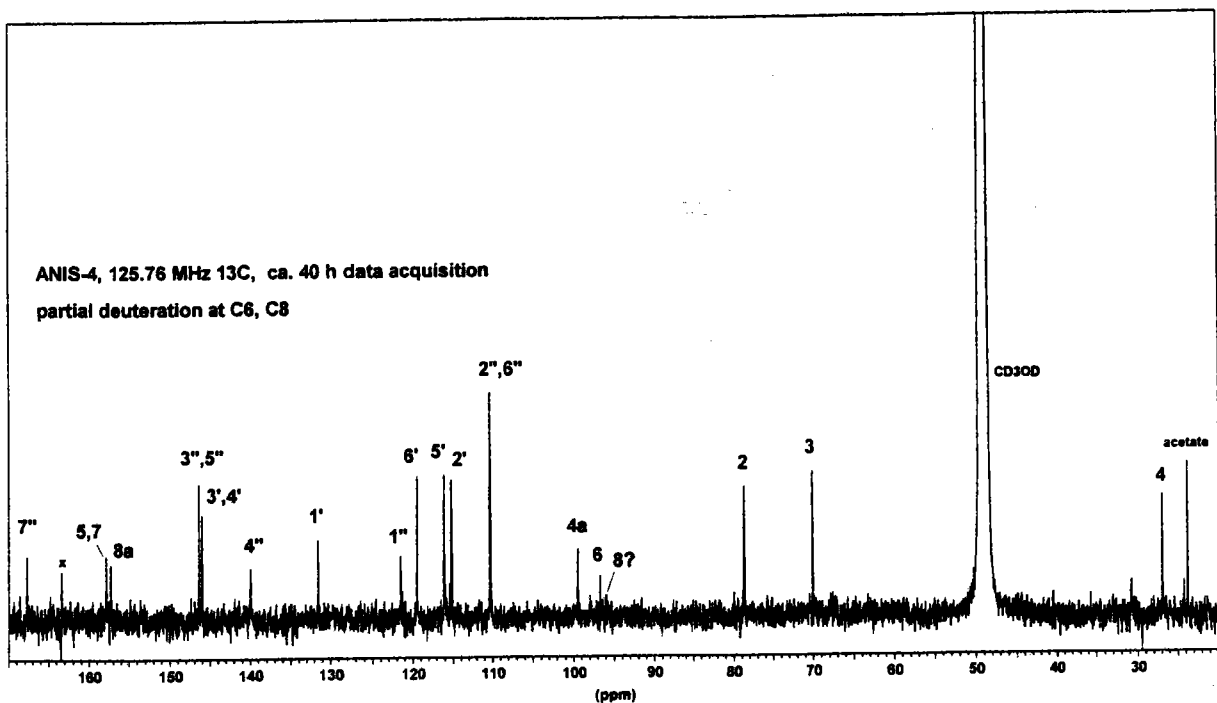


Figure 64: Spectre de RMN ^{13}C enregistré dans CDCl_3 après 28 jours à 125,76 MHz du produit Anis₆

Tableau 21: Données de RMN d'Anis₆ (-)-épi-catéchine, mesurées dans CD_3OD à 30°C; à 500 MHz pour ^1H et à 125,76 MHz pour ^{13}C

Expériences : ^1D , ^1H							
^{13}C (DEPT-135)							
Après 21 jours, enregistrement des spectres dans CD_3OD : ^1D , ^1H , ^{13}C							
Après 22 jours, enregistrement des spectres ^1D ^{13}C et 2D CH correl., correl. long-range CH et COLOC							
Cui, 1992 CD_3OD							
pos.	^{13}C	Mult.	^1H	Mult./Stéréo	$J(\text{H,H})$	^{13}C	^1H
2	79,850	D	4,810	m (ax)	Non résolu	80,6	4,81
3	67,475	D	4,173	ddd (ax)	$4,55 \text{ } ^3J(3\text{eq}, 4\text{ax}); 3,0 \text{ } ^3J(3\text{eq}, 4\text{eq}); 1,4 \text{ } ^3J(2\text{ax}, 3\text{eq})$	68,3	4,18
4	29,247	T	2,864	dd (ax)	$16,6 \text{ } ^2J(4\text{ax}, 4\text{eq})$	30,0	2,85
			2,743	dd (eq)			2,73
4a(10)	100,134	S				100,9	
5	157,971	S				158,7	
6	96,461	D	5,958	d	$2,32 \text{ } ^4J(6,8)$	97,2	5,93
7	157,625	S				158,4	
8	95,951	D	5,932	d		96,7	5,91
8a (9)	157,363	S				158,1	
1'	132,292	S				133,0	
2'	115,342	D	6,984	ddd	$1,98 \text{ } ^4J(2',6'); 0,4 \text{ } ^4J(2\text{ax}, 2')$	116,1	6,97
3'	145,914	S				146,7	
4'	145,748	S				146,5	
5'	115,953	D	6,766	dd	$8,15 \text{ } ^3J(5',6')$	116,7	6,75
6'	119,459	D	6,802	ddd	$0,5 \text{ } ^4J(2\text{ax}, 6')$	120,2	6,79

En supposant que le dépt. ^{13}C de C6 > C8 implique $\delta^1\text{H}$ de H6 > H8 et les attributions de C5,7,8a sont ainsi obtenues via Long-range CH

Deutération partielle: Apparaît plus rapide que celle de la catéchine									
Isotopomères	^{13}C (+22 j)	pop.%	Dépt. Isotope	C7	pop.%	Dept. Isotope	C8a	pop.%	Dépt. Isotope
6-H, 8-H	157,9686	16,7		157,622	18,9		157,3601	18,6	
6-H, 8-D	157,9455	26,5	-23,1	157,5759	38,3	-46,1	157,3203	29,6	-39,8
6-D, 8-H	157,9271	15,7	-41,5	157,5759		-46,1	157,3394	12,0	-20,7
6-D, 8-D	157,9019	41,0	-66,7	157,5309	42,8	-91,1	157,2996	39,8	-60,5

Tableau 22: Données de RMN d'Anis, = (+)-catéchine mesurée dans CD₃OD à 30°C; 500 MHz pour ¹H et à 125,76 MHz pour ¹³C.

CD ₃ OD solvant signal: ¹ H = 3,30 ppm, ¹³ C = 49,053 ppm										
Expériences: 1H (1D, 1D NOE Diff.)										
¹³ C (DEPT-135)										
+22 jours dans CD ₃ OD: 1D 1H										
+26 jours: ¹ D ¹³ C; 2D CH corré., corré. long-range CH (COLOC)						dépts. Par Bae <i>et al.</i> , 1994, acetone-d6				
pos.	Dépts. ¹³ C	Mult.	¹ H	Mult./Stéréo	J(H,H)	¹³ C				
2	82,846	D	4,578	dm (ax)	7,49 (2ax,3ax)	82,30				
3	68,822	D	3,986	ddd (ax)	8,10 (3ax,4ax); 5,42 (3ax,4eq)	68,40				
4	28,485	T	2,853	dd (eq)	-16,1 (4ax,4eq)	28,00				
			2,516	dd (ax)						
4a (10)	100,888	S								
5	157,575	S								
6	96,368	D	5,939	d	2,32; ⁴ J(6,8)	96,20				
7	157,823	S								
8	95,580	D	5,870	d		95,40				
8a (9)	156,925	S								
1'	132,249	S				132,10				
2'	115,294	D	6,845	ddd	2,05 ⁴ J(2',6'); 0,50 ⁴ J(2',2ax); 0,3 ⁵ J(2',5')	115,10				
3'	146,228	S								
4'	146,247	S								
5'	116,153	D	6,768	dd	8,08 ³ J(5',6')					
6'	120,090	D	6,723	ddd	0,55 ⁴ J(2ax,6')	119,80				
Expériences de Diff. NOE										
1) L'irradiation de H2' donne 0,3% NOE à H8, pas de NOE en H6										
2) L'irradiation de H2ax (et -OH du méthanol) donne 0,9% NOE en H6 et 0,6% en H8										
Les attributions de H6, H8 sont la clé des attributions de C5,7,9 par long-range CH										
Les attributions de H6,H8 choisies donnent les attributions correctes de C6,C8, identiques à celle de Cui <i>et al.</i> , 1992										
Deutération partielle :										
Après 22-26 jours dans CD ₃ OD les protons aromatiques H6 et H8 sont partiellement deutérés.										
Le spectre ¹ H montre d'autres singulets pour les isotopomères 6-H(8-D) et 8-H(6-D)										
Le spectre ¹³ C montre pour C5,7,8a trois ou quatre signaux résolus avec des déplacements dus au déplacements des isotopes liés en 2 et 5.										
Isotopomères	Population (%)	Dépt. ¹ H (+22 j)		Dépt. Isotope (ppb)						
		H6	H8							
6-H, 8-H	53,6	5,9399	5,8704							
6-H, 8-D	23,7	5,9392			-0,710					
6-D, 8-H	9,8		5,8698		-0,560					
6-D, 8-D	12,9	n.d.	n.d.							
Déplacement ¹³ C (après 26 jours)										
Isotopomères	C5	pop.%	Dépt. Isotope	C7	population%	Dépt. Isotope	C8a	pop.%	Dépt. Isotope	
6-H, 8-H	157,56	46,5		157,81	49,9		156,9181	47,3		
6-H, 8-D	157,54	26,3	-23,3	157,77	37,4	-45,4	156,8741	23,9	-44,0	
6-D, 8-H	157,52	11,4	-39,8	157,77		-45,4	156,8955	13,6	-22,6	
6-D, 8-D	157,5	15,8	-65,5	157,72	12,7	-93,8	156,8543	15,2	-63,8	
Echange de H8 plus rapide que H6										

Tableau 23: Données de RMN d'Anis₆ = -)-épi-catechine-3-O-gallate, mesurée dans CD₃OD à 30°C; à 500 MHz pour ¹H et à 125,76 MHz pour ¹³C

Expériences: 1D ¹ H (1 ^{er} jour)									
après 28 jours dans CD ₃ OD: ¹³ C et corrélations 2D CH (¹ J)									
Pendant 40 h; masse du lot (< 2 mg) est faible pour réaliser les corrélations long-range CH									
Grande quantité de deutération en C6 et C8 compliquent énormément le spectre obtenu									
pos.	¹³ C	Mult.	¹ H	Mult./Stéréo	J(H,H)				
2	78,702	D	5,030	m	Non résolu				
3	70,041	D	5,525	ddd	4,65 ³ J(3eq,4ax); 2,46 ³ J(3eq,4eq); 1,3 ³ J(2ax,3eq)				
4	26,907	T	2,994	ddm (ax)	-17,35 ² J(4ax,eq)				
			2,852	ddm (eq)					
4a (10)	99,463	S							
5	157,906	S							
6	96,640	D	5,962	dd (AB)	2,3 ⁴ J(6,8)				
7	157,863	S			Signal central du système AB domine à 5,960 ppm				
8	95,968	D	5,959	dd					
8a (9)	157,324	S							
1'	131,537	S							
2'	115,193	D	6,931	dd	2,05 ⁴ J(2',6'); 0,4 ⁴ J(2',2ax)				
3'	146,042	S							
4'	146,021	S							
5'	116,079	D	6,695	d	8,20 ³ J(5',6')				
6'	119,448	D	6,807	ddd	0,6 ⁴ J(6',2ax)				
1"	121,529	S							
2",6"	110,297	D (2C)	6,948	s					
3",5"	146,393	S (2C)							
4"	139,918	S							
7"	167,682	S							
corrélations ¹ J CH, sont détectées pour les groupes CH 2,3,2',5',6',2",6"									
signaux C6,C8 sont faibles et C5,7,8a montre un dédoublement isotopique due à une deutération > 50% de ces sites.									
Toutes les attributions non confirmées par corrélations CH sont faites par analogie avec les données de l'épi-catechine et le 1-O-gallate dans ellagitannin									
Les signaux suivants peuvent être interchangeables: 5,7 et 3',4'									
C6 montre seulement 27% de son intensité due à la deutération; C8 est faible et est tentativement attribué un doublet isotopomère à 95,96 ppm									
Après 28 jours dans CD ₃ OD le spectre ¹ H montre un singulet avec intégration = 0,3 H pour H6+H8 au lieu d'une intégration = 2,0 H									
C'est consistant avec 25% de H6 et 5% de H8 restantes et explique pourquoi C8 a été difficile à détecter.									

Dept. Déplacements ; pop. Populations ; mult. Multiplicité; pos. Positions

IV-6- Quantification des produits isolés dans l'extrait méthanolique d'*Anisophyllea dichostyla*

Dans ce paragraphe, nous avons décidé de réaliser le dosage des différents procyanidines et ellagitannins d'*A. dichostyla*. Ce dosage est conduit par CLHP, et concerne les 16 produits détectés, analysés, isolés, purifiés et identifiés dans les écorces des racines d'*Anisophyllea dichostyla* R. Br.

Les méthodes de dosage des procyanidines ont fait l'objet de quelques travaux qui ont évolué au cours du temps en fonction de l'avancée technologique. La CLHP a rendu d'incalculables services aux chercheurs travaillant dans le domaine des substances naturelles et plusieurs travaux anciens font part de dosages de l'acide ellagique sous sa forme aglycone.

L'analyse CLHP de l'acide ellagique ou des procyanidines en phase inverse utilisant plusieurs systèmes sont bel et bien décrits dans la littérature, nous citons entre autres, quelques travaux réalisés par Dhingra *et al*, 1988 ; ZhuJ *et al*, 1992 ; Viriot, 1994 ; Shahrzad *et al*, 1996 ; Versari *et al*, 1997 ; Daniel *et al*, 1991 ; Häkkinen *et al*, 1999 ; Goldberg *et al*; 1999 ; Adamson *et al.*, 1999 ; Yoshioka *et al.*, 2002....etc.

Ces travaux font part également d'utilisations de colonnes de silices greffées, RP-C-18 et de gradients (ou non) de mélanges éluants (eau, méthanol, acide phosphorique).

La quantification utilisant une phase inverse et un gradient d'élution à base de l'eau acidifiée (2%) et du méthanol, des dérivés d'acide ellagique (méthoxylés et sous forme hétérosides) est rapportée dans ce travail.

Les différents produits isolés d'*Anisophyllea* sont quantifiés par rapport à leurs homologues standards d'épicatéchine et d'acide ellagique, dans les mêmes conditions opératoires d'analyse par CLHP.

IV-6-1- Essais préliminaires

Les mêmes conditions ont été maintenues pour le dosage, le débit est fixé à 1 ml/min.

Le volume de l'extrait méthanolique d'*A. dichostyla* injecté est de 20 µl.

La longueur d'onde γ est choisie à 278 nm pour le dosage des dérivés de la catéchine et à 250 nm mais aussi à 278 nm pour le dosage des dérivés d'acide ellagique, en effet, les dérivés d'acide ellagique présentent une absorption maximale à ces deux longueurs.

Le même éluant (2% d'acide acétique dans de l'eau bidistillée et dégazée) a été choisi pour la séparation des différents constituants et a été maintenu pour le dosage des deux familles de composés.

L'appréciation quantitative des 16 composés a été donc rendue possible par méthode d'étalonnage externe. Les teneurs des différents produits (procyanidines et dérivés d'acide ellagique) ont été estimées par rapport aux produits de référence qui sont l'épicatéchine et l'acide ellagique respectivement.

IV-6-2- Courbes de calibration

Les courbes de calibration sont obtenues par l'analyse (en dupliquât) à partir de l'épicatéchine et de l'acide ellagique et sont présentées par les figures 65 et 66. Des réponses linéaires ont été retrouvées entre les aires des pics et les concentrations choisies en épicatéchine (0-1200 μM) et en acide ellagique (0-1000 μM) respectivement.

Les teneurs en équivalent épicatéchine ou en équivalent acide ellagique par rapport à la masse sèche d'*A. dichostyla* sont récapitulées dans le tableau 24.

Ces résultats sont exprimés respectivement en ng/ml, et sont convertis en g/120 g et ensuite en g/kg des écorces des racines sèches d'*A. dichostyla*.

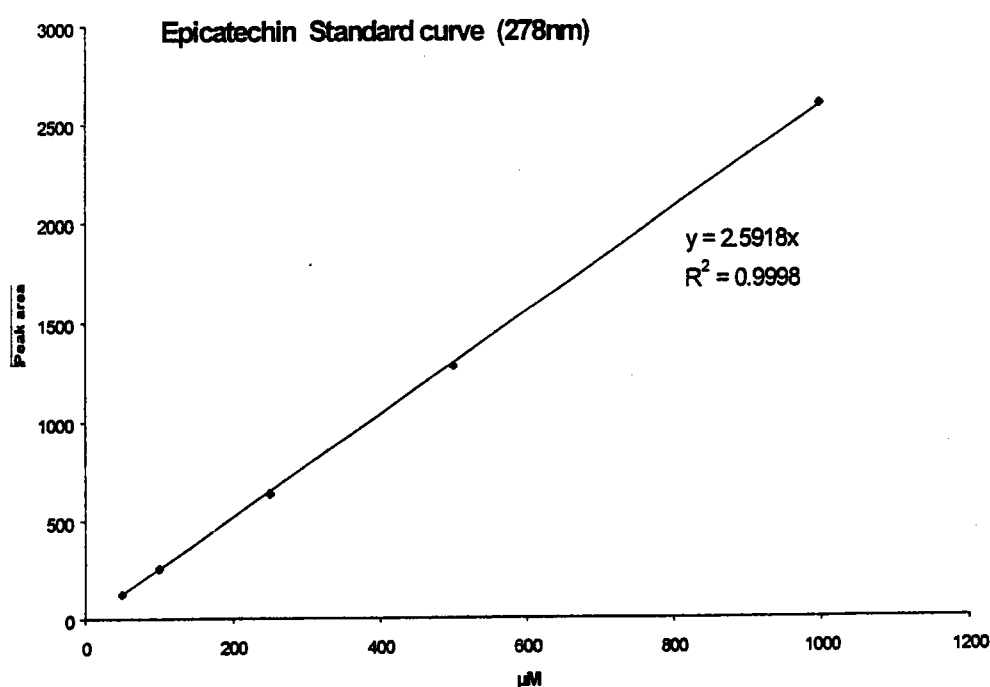


Figure 65: Courbe standards de l'épicatéchine obtenue par CLHP (analyse en duplicat), dans les conditions décrites ci-dessus

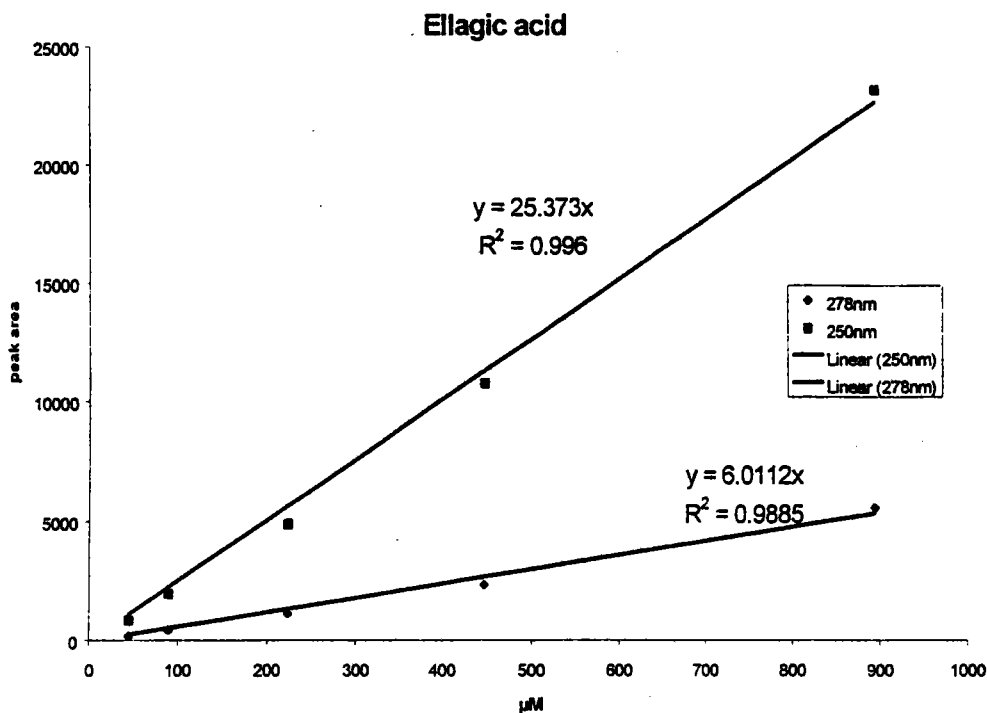


Figure 66: Courbes standards de l'acide ellagique obtenue par CLHP (analyse en duplicat), dans les conditions décrites ci-dessus

Tableau 24: Contenu des phénols antioxydants dans l'extrait méthanolique d'*A. dichostyla*

Composé	Aire du pic	Epicatechine μM	acide ellagique μM	ng/ml	mg/120g	mg/kg
Anis ₁	1733	669		194042	14	113
Anis ₂	5087	1964		569587	40	332
Anis ₃	1061	410		118799	8	69
Anis ₄	2480	958		277683	19	162
Anis ₅	10524	4063		1178363	82	687
Anis ₆	2823	1090		316089	22	184
Anis ₇	753	291		84313	6	49
Anis ₈	374		62	18793	1	11
Anis ₉	289	112		32359	2	19
Anis ₁₀	342		57	17185	1	10
Anis ₁₁	9627		1602	483753	34	282
Anis ₁₂	3645		606	183160	13	107
Anis ₁₃	189		31	9497	1	6
Anis ₁₄	1066		177	53566	4	31
Anis ₁₅	392		65	19698	1	11
Anis ₁₆	4401		732	221148	15	129

Anis₁₋₇ et anis₉ sont calculées à partir de la courbe standard de l'épicatéchine (0-1000 μM); anis₈ et anis₁₀₋₁₆ sont calculées à partir de la courbe standard de l'acide ellagique (0-1000 μM). Les courbes standards sont obtenues sous les mêmes conditions CLHP que pour l'extrait méthanolique.

IV-7- Hémi-Synthèse

Dans ce paragraphe, la synthèse des analogues mono-, di-, tri et tetraméthoxylés en ayant comme précurseur l'acide éllagique a été faite. En effet l'importance des méthoxylations en position ortho, meta ou para est susceptible de diminuer le potentiel redox des polyphénols plus spécifiquement et rend ainsi leur pouvoir antioxydant plus fort. Nous avons essayé de faire la synthèse aussi des dérivés à ponts méthylène dioxy, mais cette dernière n'a pas donné des résultats concluants.

La figure 67 suivante montre la réaction de l'acide ellagique en présence du diazométhane. 20 ml (2 mg/ml d'une solution méthanolique d'acide éllagique) a été préparée. 1 ml de cette solution est transvasée dans 10 tubes à essais contenant chacun, respectivement : 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000 et 9000 μ L de diazométhane, la solution est gardée à température ambiante pendant 1h.

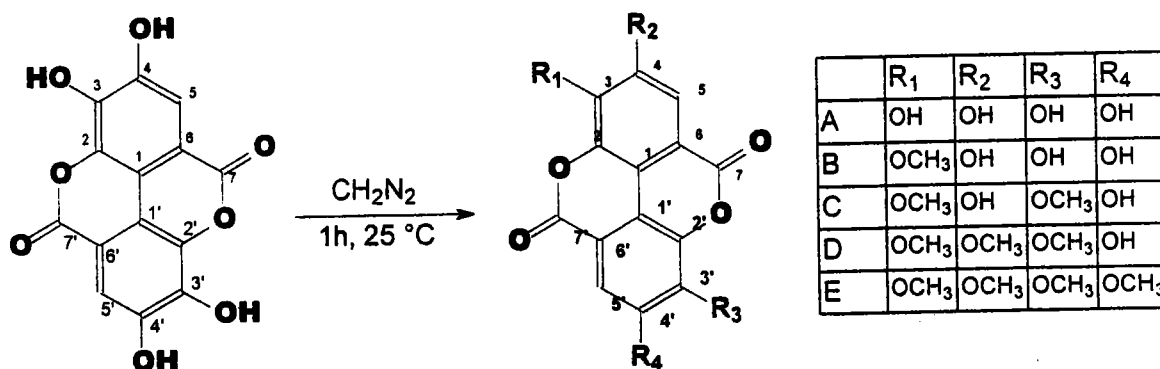


Figure 67: Synthèse des dérivés méthyl ethers à partir de l'acide ellagique

Les résultats de la synthèse des dérivés méthyl ethers à partir de l'acide ellagique sont récapitulés dans le tableau 25, les différentes quantifications ont été réalisées par CLHP en utilisant la méthode montpr.1 (Le chromatogramme obtenu est présenté sur la figure 68). Le chromatogramme obtenu fait état de présence d'un mélange des dérivés mono-, di-, tri- et tetra O-methylether de l'acide ellagique. Cette synthèse a été effectuée dans différentes conditions qui sont aussi récapitulées dans le tableau 25. Nous pouvons conclure que les 4 dérivés sont synthétisés avec un rendement satisfaisant en faisant agir 500 μ l de diazométhane dans les conditions utilisées.

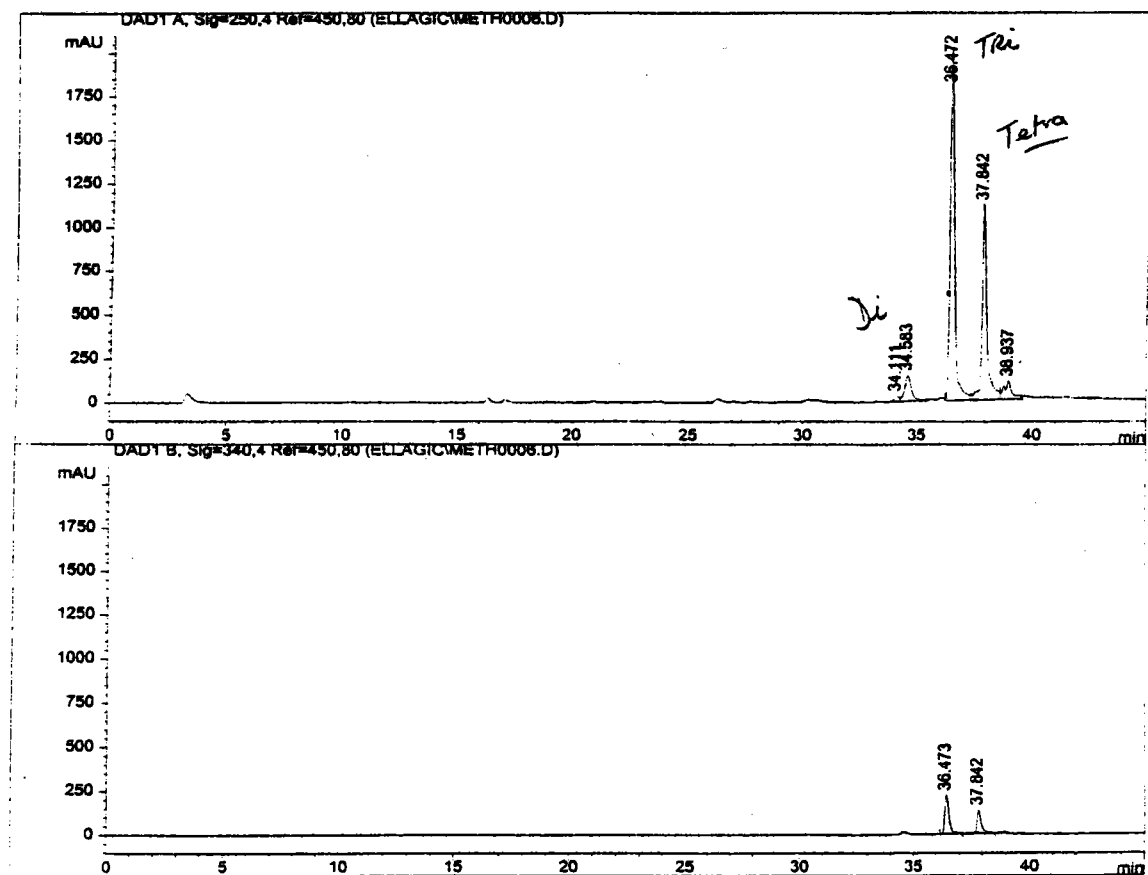


Figure 68: Chromatogramme obtenu résultant de la synthèse de dérivés methoxylés d'acide ellagique

Tableau 25: Méthylation de l'acide ellagique en présence de diazométhane

Diazomethane (μL)	Acide ellagique (%)	Monomethoxy (%)	Dimethoxy (%)	Trimethoxy (%)	Tetramethoxy (%)
0	100	0	0	0	0
10	100	0	0	0	0
25	97	2	1	0	0
50	94	3	3	0	0
100	88	7	4	trace	0
250	63	20	16	1	0
500	41	29	27	2	trace
1000	0	0	3	76	19
2000	0	0	0	73	24
3000	0	0	0	71	26
9000	0	0	0	53	29

IV-8- Conclusion

Dans ce chapitre, la caractérisation de 26 produits respectivement dérivés de la catéchine et de l'acide ellagique a été faite. En plus de la catéchine, épicatechine, épicatechine gallate, épicatechine dimers et trimers, des ellagitannins ont été identifiées. La RMN bidimensionnelle nous a permis d'approfondir quelques éléments importants sur les structures des monométhyl ethers, diméthylether, pontés méthylès et leurs glycosylations (rhamnoside, xylopyranoside et glucopyranoside) ainsi que pour les procyanidines monomériques.

L'étude bibliographique sur *Anisophyllea* montre l'importance de cette espèce, l'observation motivée et effectuée au cours des divers essais au cours de ce travail, mettent en évidence la participation des polyphénols mais soulignent aussi l'importance d'autres structures triterpéniques identifiées et plus particulièrement la présence de l'acide bryonolique dans cette espèce. Vraisemblablement, la concentration des polyphénols est importante dans *Anisophyllea dichostyla* et les produits isolés sont de grandes importances pharmacologiques.

Les expériences effectuées au cours des divers essais de purification et d'identification ont permis de mettre en évidence les composés majoritaires qui ont été purifiés et identifiés par CLHP-UV-DAD, LC/MS, puis caractérisés par RMN moderne. Le préfractionnement d'*Anisophyllea* a permis d'éliminer les extraits hexaniques et dichlorométhaniques dont les viscosités et les solubilités rendraient difficile la purification de tous les produits polyphénoliques qui nous intéressent, néanmoins, nous avons pu purifier et obtenir la stabilité de nos produits. A notre connaissance, c'est la première contribution phytochimique qu'une plante du genre *Anisophyllea* est étudiée.

CHAPITRE V- INVESTIGATION PHYSICO-CHIMIQUE ET PHYTOCHIMIQUE D'ARGANIA SPINOSA (Skeels.) (L.)

V-1- Caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'argan

Le premier intérêt dans ce chapitre entrepris est d'identifier les polyphénols de l'huile d'argan ou autres composés de l'insaponifiable de l'huile d'argan en utilisant principalement des outils modernes de la chromatographie à haute résolution et de la résonance magnétique nucléaire.

Nous avons étudié 3 formes d'huile d'argan dont nous avons déterminé les caractères physico-chimiques et organoléptiques. En effet les indices physico-chimiques représentent un important indicateur analytique des corps gras et dont certains de ces critères offrent encore un intérêt, de nos jours, pour le contrôle de qualité. Ainsi nous avons déterminé l'indice de réfraction, l'indice d'iode et l'indice des peroxydes pour ces trois formes.

Le spectre UV enregistré dans l'isooctane à 1% m/v, montre l'absence de pigments puisque les densités optiques enregistrées à 430 ; 460 ; 550 ; 630 et 670 sont respectivement de 0,105 ; 0,102 ; 0,088 ; 0,085 et 0,085 (figure 69). Cette absence de pigment diminue l'oxydation photosensibilisée de l'huile d'argan.

Les résultats de l'étude préliminaire des contrôles physico-chimiques des 3 formes de l'huile d'argan confirment le caractère insaturé des acides gras de l'huile. Ces 3 formes de l'huile d'argan ont aussi été caractérisées par leurs teneurs en insaponifiables. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le Tableau 26 et confortent les données de la littérature (Farines *et al.*, 1984a).

Tableau 26: Caractéristiques de qualité des trois sortes d'huiles d'argan

	Huile alimentaire	Huile commerciale	Huile esthétique
Masse volumique	0,917	0,889	0,906
Indice de réfraction (20 °C)	1,4129	1,3604	1,4262
Indice d'iode	104,7	105,6	103,8
Indice des peroxydes	2,9	2,9	3,2
Insaponifiable	1,02	1,1	0,97

Les indices d'iodes sont calculés non pas par dosage volumétrique classique mais en utilisant la formule $I_1 = 90\% \text{d'acide oleique} + 181\% \text{d'acide linoléique} / 100$, les pourcentages des acides gras dans l'huile sont déterminés ultérieurement.

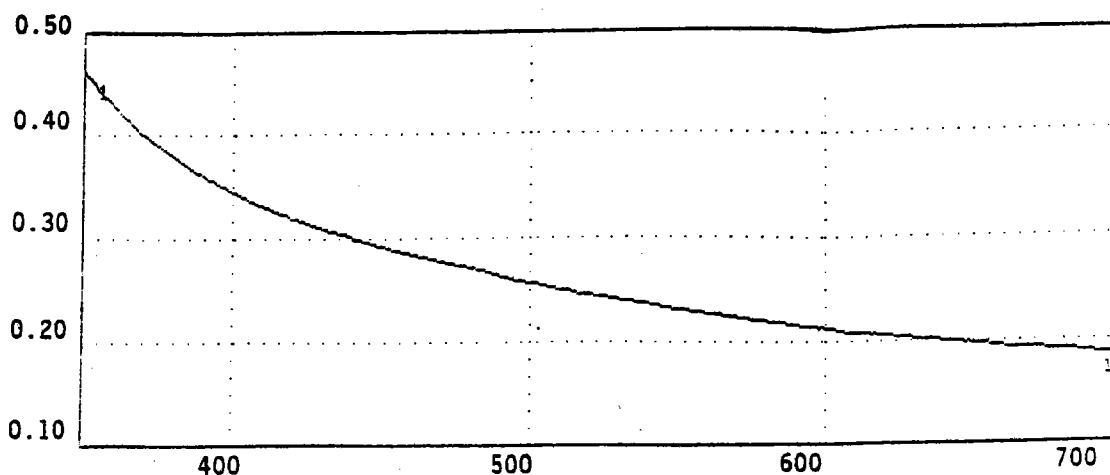


Figure 69: Spectre enregistré en UV (1% dans l'isooctane) de l'huile d'argan (forme alimentaire).

V-2- Détermination de la composition chimique de l'insaponifiable

La fraction insaponifiable d'un corps gras correspond à l'ensemble de ses constituants qui, après hydrolyse basique (saponification), sont très peu solubles dans l'eau et solubles dans les graisses. Généralement l'insaponifiable des huiles contient des molécules de hauts poids moléculaires non volatiles et qui possèdent une solubilité faible dans les solvants aqueux, ainsi son analyse par chromatographie en phase gazeuse nécessite une température assez élevée jusqu'à 300 °C, en plus de sa dérivation. Ces composés sont constitués majoritairement d'alcools aliphatiques, phytostérols, triterpènes et tocophérols en plus de pigments tetraterpéniques.

La méthode d'extraction de l'insaponifiable de l'huile d'argan est représentée sur le schéma 3.

Avec cette méthode une fraction relativement plus enrichie en insaponifiable (réaction totale) a été obtenue pour la variété commerciale et alimentaire. Après saponification de l'huile, l'insaponifiable est extrait à l'aide de l'hexane, puis évaporé sous vide jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. On récupère 0,97 % de l'insaponifiable de l'huile esthétique, 1,1% de la variété commerciale et 1,02 % pour la variété alimentaire.

Sur le schéma 3 sont présentées les différentes étapes nécessaires à l'obtention de l'insaponifiable dont la composition chimique et le rendement en composés stéroliques et en squalène sont aussi optimales.

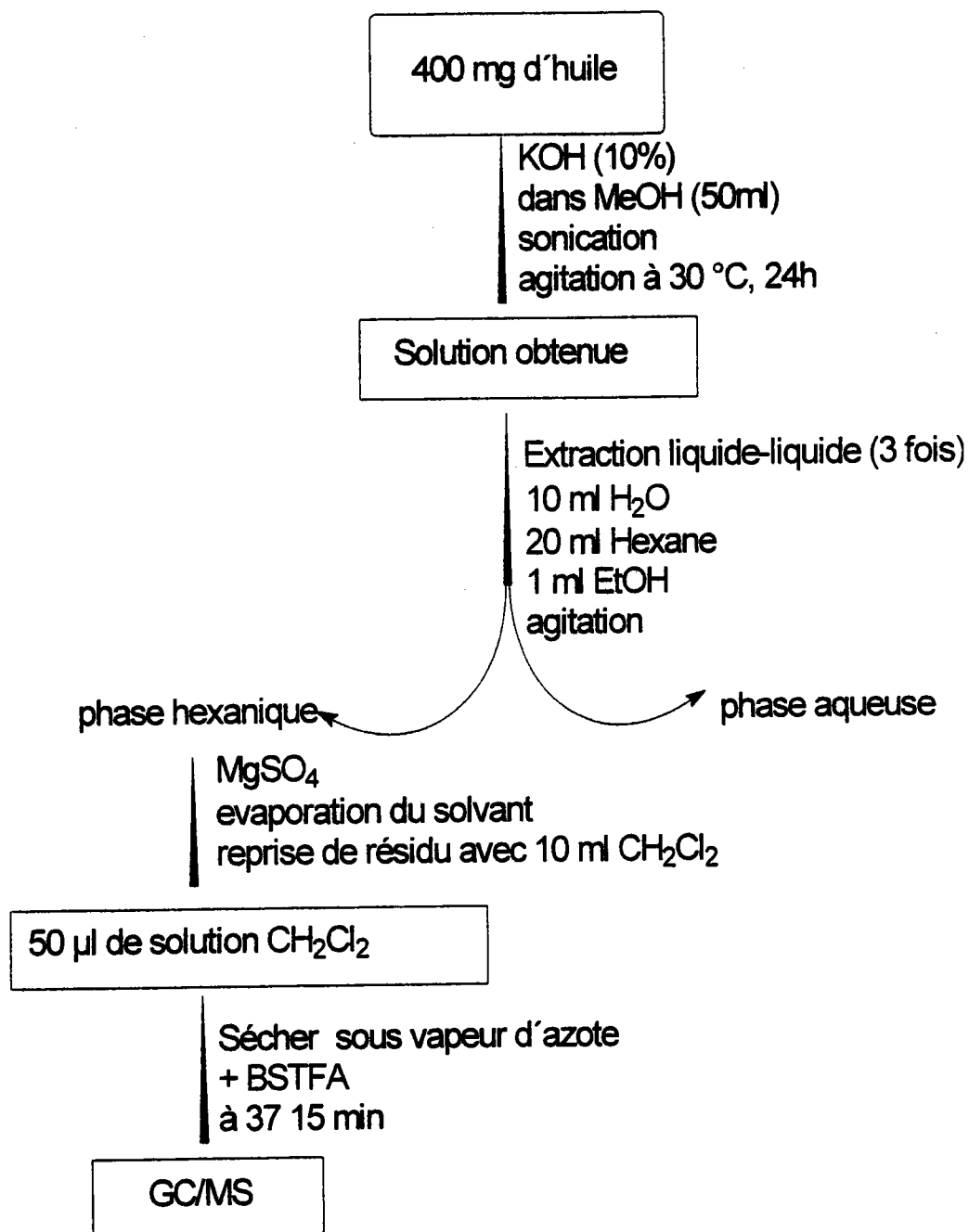


Schéma 3: Obtention de l'insaponifiable enrichi de squalène et de stérols de l'huile d'argan esthétique

Cette composition chimique de l'insaponifiable a été déjà étudiée par Farines *et al.*, 1981 ; 1984b, cependant, notre investigation a été orientée principalement vers :

- 1- La quantification des stérols que nous avons réalisée par GC/MS.
- 2- L'identification des hydrocarbures principalement le squalène ainsi que sa quantification car cet hydrocarbure non encore identifié dans l'huile, peut en l'occurrence contribuer à la stabilité de l'huile et à son pouvoir antioxydant.

Au cours de cette étude, nous avons étudié les 3 formes de l'huile d'argan, la variété de l'huile d'olive et celle de l'huile de tournesol.

V-2-1- Stérols de l'huile d'argan

Un stérol consiste en un système cyclopentano-perhydrophénanthrénique contenant une fonction alcool secondaire en position 3, estérifié par un acide gras généralement, une double liaison en position 5 ou 7 (ou 5 et 7), la chaîne latérale a une structure spécifique en position 17.

Le contenu des stérols dans l'insaponifiable des trois formes de l'huile d'argan étudiées (tableau 27) (figure 70) ainsi que pour l'huile d'olive et l'huile de tournesol a été déterminé par GC/MS. Les stérols majoritaires identifiés et quantifiés par étalonnage interne en utilisant un standard interne 8- β -androstane-3,17-dione, sont le schotténol (48 %) et le spinastérol (40 %) alors que β -sitostérol est le composé majoritaire à la fois dans l'huile d'olive et dans l'huile de tournesol.

Des quantités mineures de méthylstérols et de diméthylstérols (triterpènes) ont été aussi détectées. Nos résultats corroborent les données de la littérature (Farines *et al.*, 1981, Boukhobza *et al.*, 1988 et Charrouf *et al.*, 1999).

Les stérols de l'huile d'argan qui sont le spinastérol et le schotténol sont très rares dans les huiles végétales et sont caractéristiques de cette huile et peuvent en l'occurrence permettre la détection d'adultération de cette huile comme par exemple le cas du δ -7-stigmastérol, abondant et indicateur d'adultération dans les huiles de tournesol et de carthame.

Tableau 27: Contenu en stérols dans les huiles étudiées

Stérols	Type d'huile				
	Argan alimentaire	Argan esthétique	Argan commerciale	Olive	Tournesol
Schotténol	142 ± 11	137 ± 7	163 ± 11	Nd	Nd
Spinastérol	115 ± 7	100 ± 1	151 ± 9	Nd	Nd
δ8-22	9 ± 1	11 ± 0	15 ± 1	Nd	Nd
β-sitosterol	Nd	Nd	Nd	156 ± 3	312 ± 18
Campestérol	Nd	Nd	Nd	12 ± 1	51 ± 3
Stigmastérol	Nd	Nd	Nd	Nd	37 ± 2
autres	29 ± 1	24 ± 2	28 ± 2	151 ± 10*	77 ± 2
Total	295 ± 20	272 ± 10	357 ± 23	319 ± 14	477 ± 23

- * sont les diméthylstérols 24-méthylencycloarténol (47 ± 3 mg/100g) et cycloeucaéolol (104 ± 7 mg/100)
- Données exprimées en mg/100 g (analyse en duplicat par GC/MS)
- Nd : Non déterminée

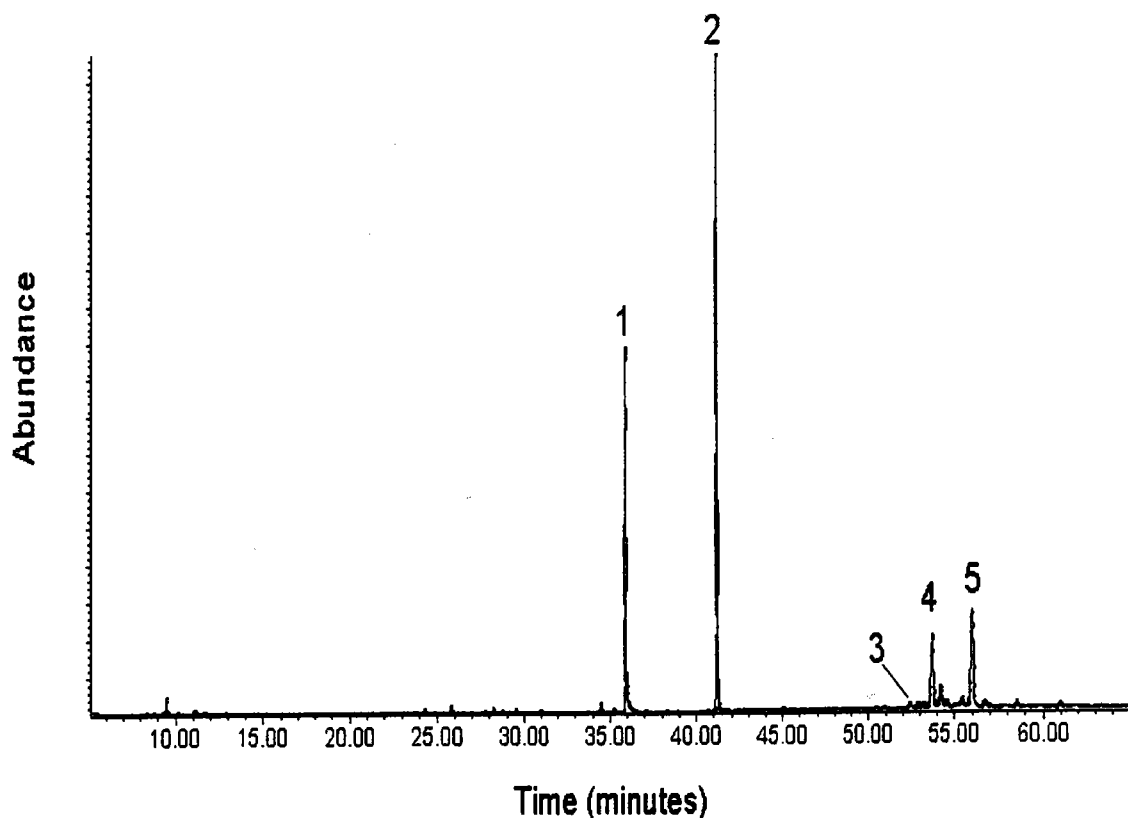


Figure 70: Profil des stérols et de squalène de la variété esthétique de l'huile d'argan déterminé à partir de l'insaponifiable par GC/MS

1. 5-β-androstan-3,17-dione (standard interne), 2. Squalène,
3. Stigmasta-δ-8,22-diene-3-β-ol, 4. Spinastérol, 5. Schotténol

V-2-2- Squalène

Quoique communément très connu comme hydrocarbure triterpénique et existant dans les huiles, l'identification et la quantification du squalène n'ont pas été encore rapportées pour l'huile d'argan. Du profil GC/MS de la figure précédente (figure 70), le dosage du squalène dans l'insaponifiable de l'huile d'argan a été déterminé aussi par étalonnage interne. Le tableau 28 présente les différentes concentrations en squalène dans l'huile d'argan comparée aux taux retrouvés dans l'huile d'olive et ceux de l'huile de tournesol qui sont analysées dans les mêmes conditions par GC/MS en plus de la GC/FID. En GC/FID, nous avons eu recours à l'utilisation d'une colonne remplie OV-1, et les résultats pour cette étude sont aussi satisfaisants en utilisant ce détecteur à ionisation de flamme, mais l'inconvénient de cette méthode réside dans l'usure de ces colonnes lors de la séparation de la matière grasse en général. Le changement de colonne est nécessaire après une moyenne de 10 injections (Owen, *et al.*, 2000a).

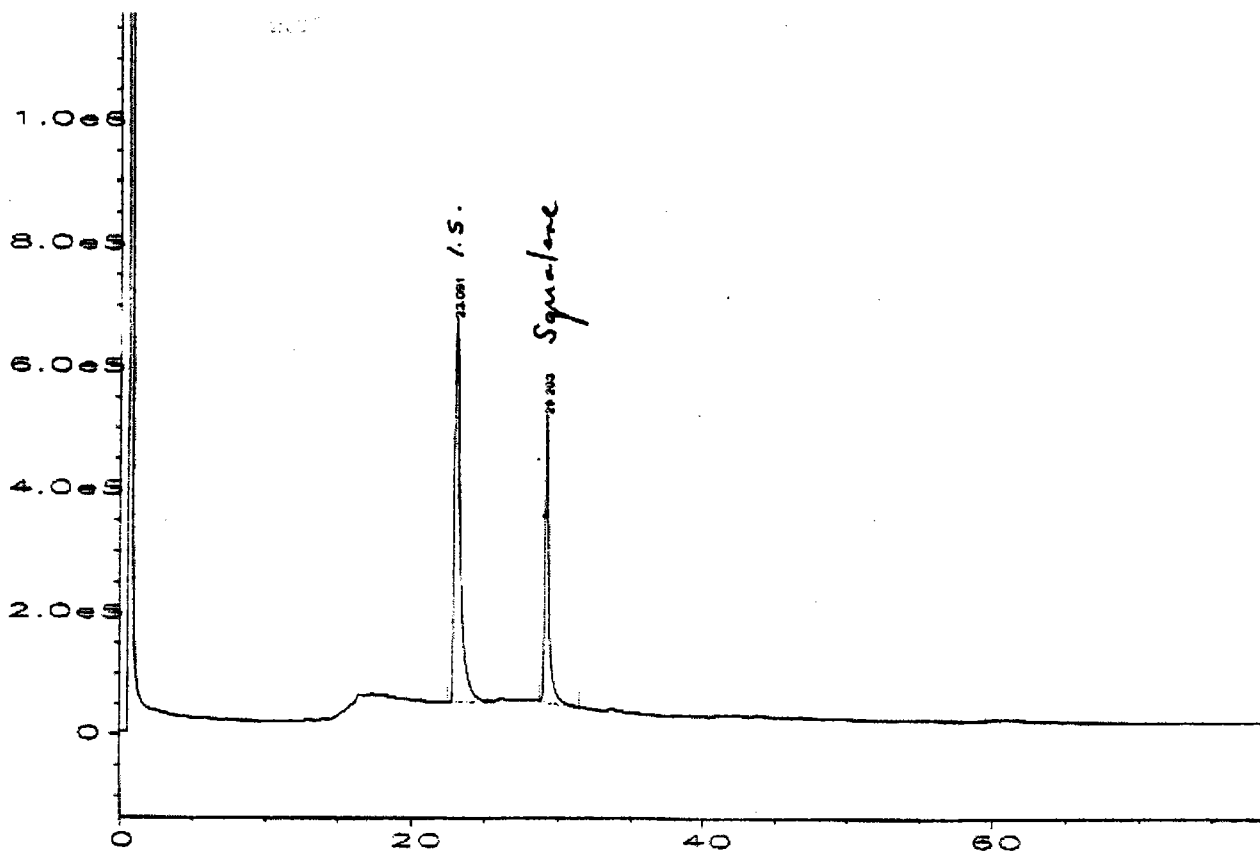
Le dosage par GC/FID a été effectué (figure 71) dans l'huile entière, en effet, l'huile des trois variétés a été diluée dans de l'éther et a été analysée par GLC en utilisant 5β -androstan-3,17-dione, comme étalon interne selon le procédé d'Owen, *et al.* 2000a qui est aussi décrit dans Matériel et Méthode. Sur la figure 71, le choix de cet étalon est compatible avec notre analyse.

D'après nos résultats (Tableau 28), l'huile d'argan contient une quantité appréciable en squalène qui est en moyenne égale à 313 ± 4 mg/kg. La variété esthétique est légèrement plus riche (321 ± 6 mg/100g) que les deux autres variétés, les différences sont statistiquement non significatives. Le contenu en squalène dans l'huile d'argan est comparable à celle de l'huile d'olive et est nettement supérieur à l'huile de tournesol.

Tableau 28: Le contenu en squalène dans les huiles étudiées

Type d'huile	Méthode	
	GC-MS	GC-FID
Argan (alimentaire)	314 ± 1	319 ± 3
Argan (esthétique)	321 ± 6	311 ± 2
Argan (commerciale)	303 ± 4	275 ± 1
Olive	399 ± 0	Nd
Tournesol	6 ± 0	Nd

Calculée en utilisant 5β -androstan-3,17-dione (GC-MS, 50 μ g/ml; GC, 1 mg/ml) comme étalon interne. Coefficient de réponse pour TIC = 0,83; réponse pour FID = 1, Nd = non déterminée.



PCHEM\1\DATA\00-2\033\F0101.D

Figure 71: Chromatogramme mettant en évidence le squalène dans l'huile esthétique obtenue par GLC. 1 g de l'huile esthétique dans 5 ml du dichlorométhane, colonne OV-1
 I.S : Internal standard=5- β -androstan-3,17-one, détecteur FID, facteur de correction=1

V-3- Détermination de la composition chimique des acides gras, monoacylglycerols et des tocophérols

V-3-1- Acides gras et Monoacylglycerols

Nous avons étudié le profil des acides gras dans les 3 formes de l'huile d'argan, de l'huile d'olive et de l'huile de tournesol après saponification incomplète des huiles.

Le protocole d'obtention de cette fraction est le même que celui représenté par le schéma 3 p. 111, sauf, l'utilisation de la potasse méthanolique a été remplacée par une solution de potasse (10%) dans l'eau bidistillée. L'utilisation de la potasse à 10% dans l'eau bidistillée est souhaitable dans ce cas pour éviter la dégradation des tocophérols en milieu basique fort. L'analyse des tocophérols (produits faisant l'objet de controverses dans la littérature) a été faite à la fois par GC/MS en mode SIM et par CLHP analytique en phase inverse ultérieurement.

Les mêmes conditions d'analyse de cet insaponifiable par GC/MS sont maintenues et sont décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes.

La silylation par le Bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacétamide ou BSTFA est appropriée pour l'estérification des acides gras et la trans-estérification des triglycérides. Les siloxanes formés fixent l'eau et diminuent la polarité et la viscosité du milieu et rendent par conséquent la réaction de dérivatisation totale. Le screening analytique de la fraction insaponifiable des huiles étudiées est représenté sur la figure 72. Dans l'ordre d'éluion décroissant, on identifie, les acides gras, les monoacylglycérols, le squalène et ensuite les tocophérols selon leurs masses respectives. Les stérols dans ce cas n'ont pas été détectés.

Utilisant les conditions d'analyse, le profil représenté sur la figure 72 a la particularité de pouvoir caractériser sans co-élution les différents acides gras, les monoacylglycérols, le squalène et les différents isomères des tocophérols dans l'huile d'argan. Les pourcentages des différents acides gras identifiés et leurs homologues monoacylglycérols, pondérés à 100, sont récapitulés dans le tableau 29.

L'examen de ces résultats appelle divers commentaires tant de point de vue qualitatif que quantitatif. L'étude par GC/MS révèle quatre acides gras majoritaires dans les huiles de l'Arganier. La mesure des temps de rétention, l'observation des ions moléculaires (pics de base) caractéristiques ainsi que l'étude des spectres des masses et leurs comparaisons avec les fragmentations de la bibliothèque spectrale permettent cette identification.

Une mise en parallèle de nos résultats avec celles de la littérature (Farines *et al.*, 1984a ; Charrouf *et al.*, 1999) révèle une convergence notable, en effet les trois formes de l'huile: esthétique, alimentaire et commerciale mettent en évidence la présence de l'acide oléique, linoléique, palmitique et stéarique. L'acide linoléique rapporté à l'état de traces n'a pas été détecté dans ce travail. En revanche, nous avons pu identifier non seulement les acides gras majoritaires dans l'huile mais en plus, les monoacylglycérols de ces différents acides gras présents dans l'huile, la méthode nous a aussi paru intéressante puisque ces résultats sont associés à la détection des différents isomères du tocophérol qui ont été aussi mis en évidence, on assiste également à la détection du squalène simultanément. Par cette analyse la mise en évidence du squalène et des tocophérols en plus des acides gras des huiles a nécessité une réaction de saponification incomplète en milieu basique faible.

L'étude comparée par rapport à l'huile d'olive (13,5 %), montre que l'huile d'argan contient plus d'acide linoléique que l'huile d'olive mais en contient moins que l'huile

de tournesol. Ce qui la classe aussi parmi les huiles semi-siccatives avec un indice d'iode qui dépasse 100 par la présence d'acides gras polyinsaturés.

Pour les trois formes de l'huile, on ne note pas de différences significatives dans la composition en acides gras majoritaires identifiés, ainsi analysés, les pourcentages sont les suivants : l'acide palmitique 16,4, 16,5 et 15,6 %, acide stéarique 4,2, 3,7 et 8,5 %, acide oléique 43,1, 45,0 et 41,2 % et acide linoléique 36,4, 35,0 et 37,9 % respectivement pour la forme alimentaire, esthétique et commerciale.

Les teneurs des monoacylglycerols majoritaires détectés dans l'huile d'argan sont récapitulés aussi sur le tableau 29 et montre aussi la prédominance de dérivés oleioyle et linoleioyle respectivement 79,6 ; 82,1 et 78,2 % pour la variété alimentaire, esthétique et commerciale.

D'après nos résultats, nous constatons que les acides gras de l'huile d'argan sont à 80 % des acides gras insaturés, de plus selon nos résultats, les rapports : acides gras insaturés majoritaires et acide gras saturés majoritaire (AGI / AGS) sont de 3,85 ; 3,96 et 3,28 pour la variété alimentaire, esthétique et commerciale respectivement. L'analyse des acides gras de l'huile d'olive italienne, extravierge (obtenue de "Zait", Grünstadt, Allemagne) et celle de l'huile de tournesol (provenant du marché local d'Heidelberg, Allemagne) par GC/MS, permet de situer l'huile d'argan en terme des acides gras qui le composent par rapport à ces deux huiles, et les résultats sont présentés par l'histogramme de la figure 73.

Tableau 29: Composition des lipides dans l'huile d'Argan (acide gras et monoacylglycerols)

Acides gras	composition (%) dans l'huile d'argan		
	Alimentaire	Esthétique	Commerciale
acide Palmitique	16,4	16,5	15,6
acide Stéarique	4,2	3,7	8,5
acide Oléique	43,1	45,0	41,2
acide Linoléique	36,4	35,0	37,9
Monoacylglycerols			
palmitoyl	15,9	14,0	18,0
stéaroyl	4,5	3,4	3,9
oléioyle et linoléioyle	79,6	82,6	78,2

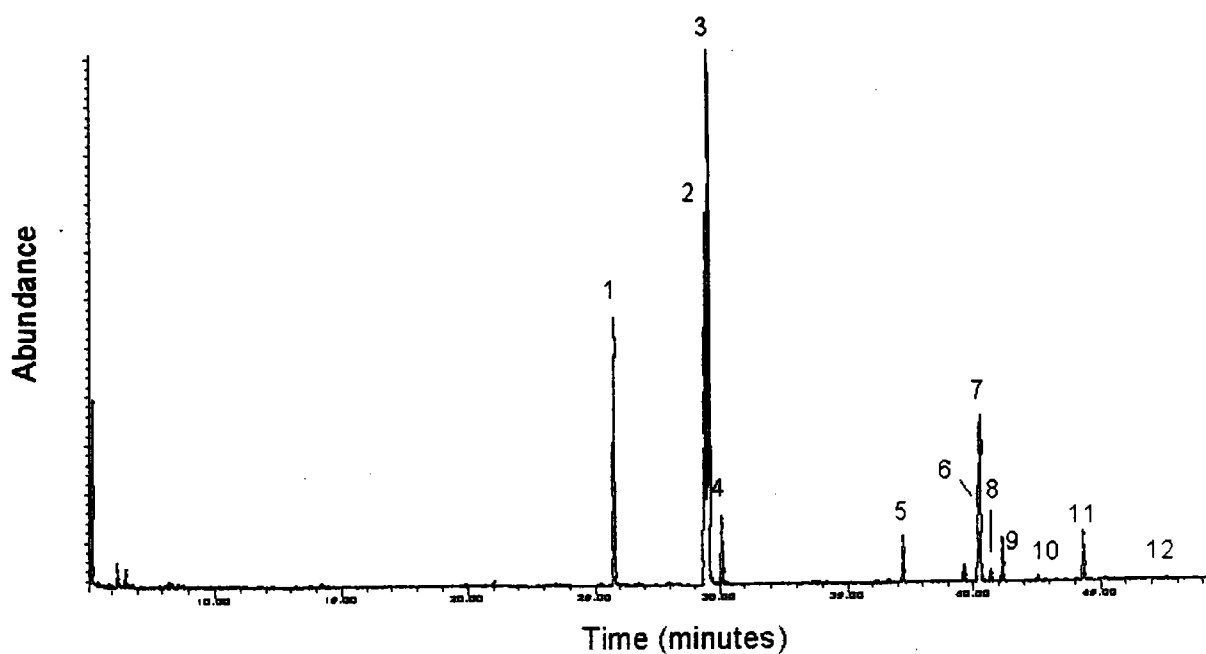


Figure 72: Profil GC/MS des acides gras de l'huile d'argan esthétique et de ses monoacyl glycérols 1.acide palmitique, 2. Acide linoléique, 3. Acide oléique, 4. Acide stéarique, 5. Monoacylglycerol d'acide palmitique, 6. Monoacylglycérol d'acide linoléique, 7. Monoacylglycérol d'acide oléique, 8. Monoacylglycérol d'acide stéarique, 9. Squalène, 10. δ -tocophérol, 11. γ -tocophérol, 12. α -tocophérol.

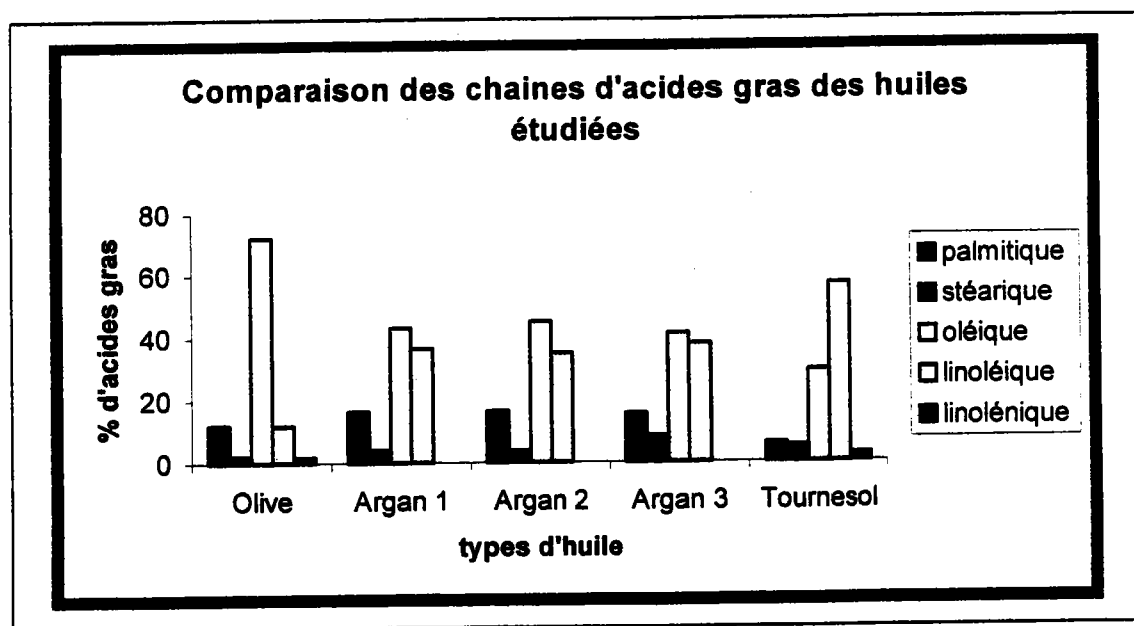


Figure 73: Comparaison de la composition en acides gras de l'huile d'olive, tournesol et l'huile d'argan 1 (alimentaire), argan 2 (esthétique) et argan 3 (commerciale).

V-3-2- Les tocophérols

La vitamine E se réfère à la famille de huit lipides, composés antioxydants largement distribués dans les plantes. Dans les huiles, les taux de ces formes varient avec le type de l'huile. La présence de 3 formes α , γ et δ -tocophérols dans les trois formes de l'huile d'argan étudiées est confirmée par GC/MS (en mode Scan d'Ions Sélectionnés) ou SI. Les chromatogrammes obtenus de chaque forme ainsi que leurs spectres de masses respectifs sont indiqués sur les figures 74.

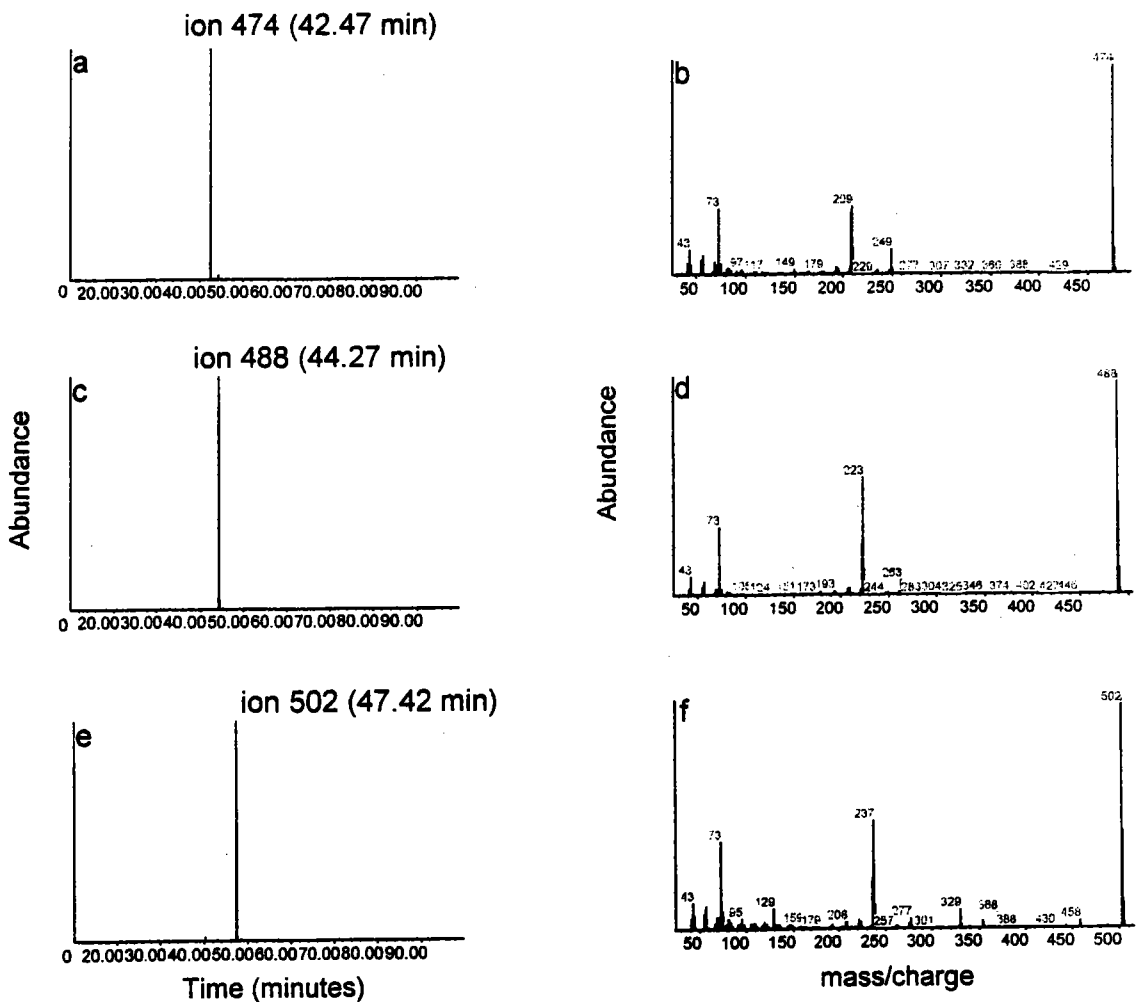


Figure 74: SI en mode Scan des différents tocophérols déterminés par GC/MS dans l'insaponifiable de l'huile d'argan esthétique. (a) ion sélectionné (m/z 474) du δ -Tocophérol, (b) son spectre de masse; (c) ion sélectionné (m/z 488) du γ -Tocophérol et (d) son spectre de masse; ion sélectionné (m/z 502) de l' α -tocophérol et (f) son spectre de masse .

L'examen par spectroscopie de masse (figure 74) indique des fragmentations similaires ainsi que les mêmes ions moléculaires majoritaires et qui sont en accord par rapport aux données de base. Par exemple, le spectre de la forme α (figure 74) indique un ion moléculaire à 502 uma, correspondant à la masse de l' α -tocophérol triméthylsilylé (100 %), le fragment à m/z : 237 correspond à une élimination de la chaîne propyl, celui à m/z : 73 uma correspond à la chaîne isopropyl.

Par CLHP-UV des huiles entières (figure 75) en phase inverse, les pics aux mêmes temps de rétention que les formes standards ont été identifiés.

Les résultats quantitatifs des tocophérols, obtenus par CLHP, sont présentés sur le tableau 30. La quantification des tocophérols a été effectuée par étalonnage externe. Les courbes de calibration par CLHP (aire du pic et volume d'injection) ont été préparées (cinq points en double) pour chaque forme des tocophérols dans du méthanol, et les valeurs des coefficients de corrélations sont retrouvées supérieures à 0,99 (figure 76).

Les concentrations retrouvées varient toutefois dans les trois variétés d'huiles étudiées et au sein même des 3 formes de l'huile d'argan. Les différentes concentrations relevées et converties par rapport à la masse d'un kilogramme de l'huile sont les suivantes: 629 ± 28 mg/kg pour la variété esthétique, 636 ± 18 mg/kg pour la variété alimentaire et 660 ± 2 mg/kg pour la variété commerciale (tableau 30). α , γ et δ -tocophérols ont été ainsi identifiés et quantifiés. La méthode CLHP utilisée a été conduite par rapport à nos conditions propres expérimentales et en ne nous inspirant pas des conditions de la littérature. Comme on peut le constater sur le chromatogramme CLHP (figure 75), les 3 tocophérols α , γ et δ peuvent être séparés en un temps moins de 8 min, la forme la moins polaire étant la moins retenue. Dans notre expérience les pics ont été très bien résolus. Les résultats indiquent aussi une stabilité des tocophérols durant l'analyse. En phase polaire, les différentes formes de tocophérol s'éluent dans l'ordre α , β , γ et δ , mais dans notre cas en utilisant une colonne RP C-18, l'ordre d'éluion est inversé. L' α -tocophérol est élué en dernier du fait de l'interaction minimale de cet analyte qui diminue fortement à cause du gêne stérique causé par les deux méthyles dans cette forme.

D'après la littérature, l'éluion est d'autant plus efficace quand on est en présence d'un gradient de concentration dans le cas de la chromatographie liquide ou de température si nous optons pour la chromatographie en phase gazeuse, mais dans notre cas, un mode isocratique avec du MeOH comme phase mobile en CLHP a été suffisant.

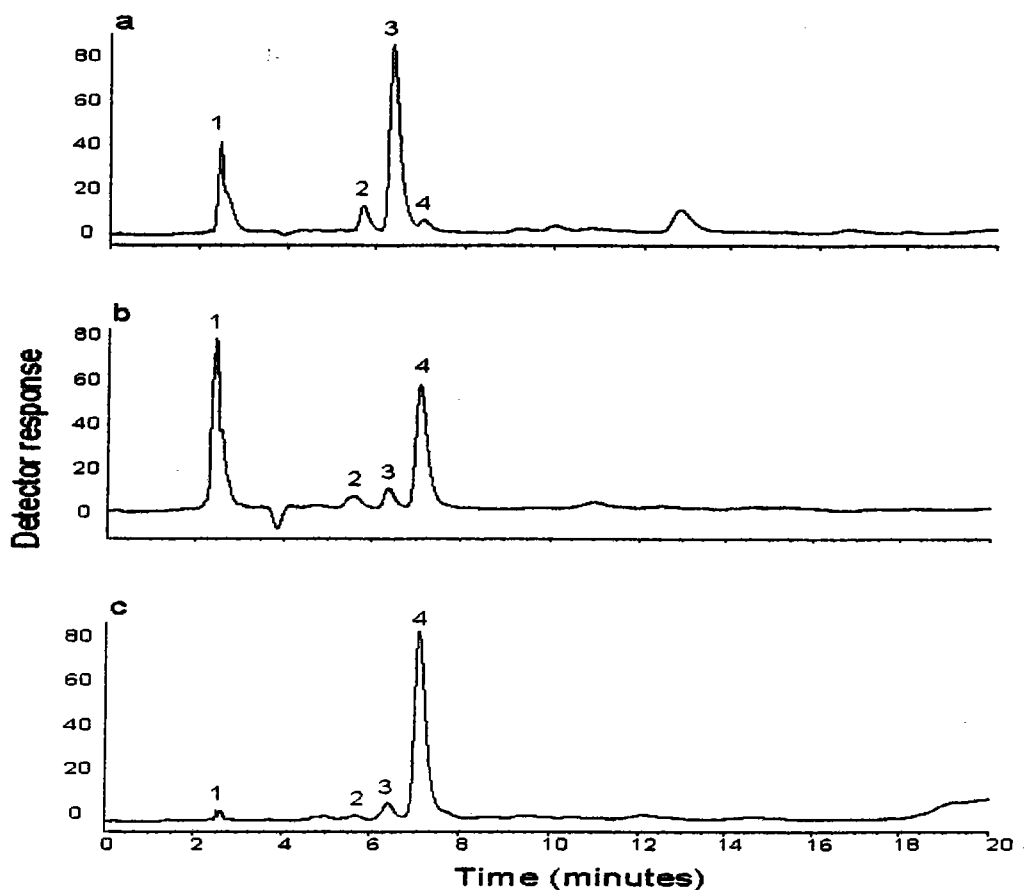


Figure 75: Chromatogrammes CLHP des huiles d'argan, d'olive et de tournesol (conditions décrites dans Matériels et Méthodes), montrant la répartition de différents tocophérols respectivement a. dans l'huile d'argan esthétique, b. huile d'olive extra vierge et c. huile de tournesol. 1. solvant, 2. δ -Tocophérol, 3. γ -Tocophérol, 4. α -tocophérol

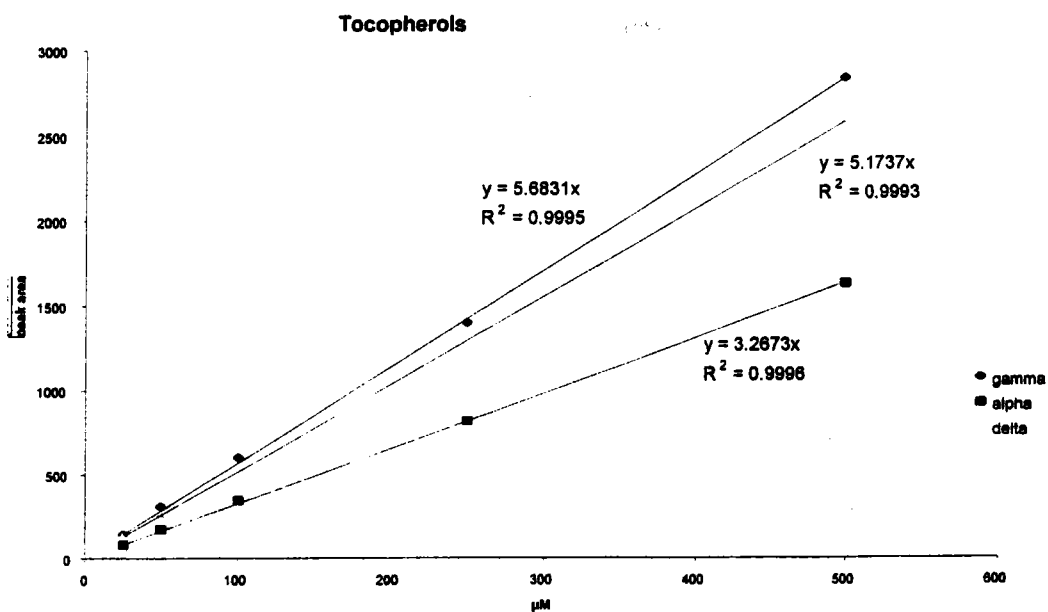


Figure 76: Courbes standards externes de calibration obtenues (en duplicat) par CLHP des différentes formes des tocophérols présentes dans l'huile d'argan ayant servi pour le dosage des 3 formes α , β et γ .

Tableau 30: Contenu des tocophérols dans les huiles étudiées en mg/kg

Type d'huile	Tocopherols			
	γ	α	δ	Total
Argan (alimentaire)	480 ± 7	35 ± 1	122 ± 10	636 ± 18
Argan (esthétique)	465 ± 21	44 ± 3	120 ± 5	629 ± 28
Argan (commercial)	504 ± 4	46 ± 2	111 ± 4	660 ± 2
Olive	26 ± 1	190 ± 1	42 ± 2	257 ± 3
Tournesol	39	532 ± 6	0	572 ± 6

Dans l'huile d'argan, la concentration du γ -tocophérol varie de 465 ± 21, pour la variété esthétique à 504 ± 4 pour la variété commerciale, les concentrations en α -tocophérol ne sont que de 35 ± 1 à 46 ± 2 et enfin le δ -tocophérol varie de 111 ± 4 à 122 ± 10 (mg/kg). Dans ce travail, les données montrent que c'est la forme γ -tocophérol qui est la forme majoritaire dans l'insaponifiable de l'huile et représente plus de 75 % du mélange des tocophérols. Ce résultat est clairement démontré par CLHP et est jugé et confirmé par GC/MS en mode SI.

Nous notons parmi nos résultats que les études effectuées dans ce travail sur l'huile d'olive et l'huile de tournesol sont en parfait accord avec la littérature et montrent la prédominance de l' α -tocophérol dans ces deux huiles. Ce qui conforte nos résultats par rapport à l'huile d'argan et la reproductibilité de nos deux méthodes en l'occurrence la CLHP et la GC/MS.

La méthode CLHP se voit très sensible et intéressante en utilisant une colonne en phase inverse. D'après la littérature, l'utilisation d'une phase fixe apolaire ne permet malheureusement pas la différenciation entre les isomères β et γ (Kamel-eldine *et al.*, 2000), mais sous réserve d'une interesterification au préalable, ces isomères sont séparables en utilisant des colonnes Octadecylsiloxanes. Dans ce travail l'isomère γ a été confirmé par GC/MS en mode SIS, et ce résultat n'exclut pas du tout au moins la discordance trouvée par rapport aux données relatées par Boukhobza *et al.*, 1988, qui suggère la prédominance de l' α -tocophérol dans l'insaponifiable de l'huile d'argan. De plus, dans les huiles végétales, les rapports entre la forme β et γ sont généralement très faibles.

En GC/MS, l'utilisation de la technique d'ionisation en mode d'acquisition : la détection d'ions sélectionnés ou SI (Selected Ions en mode Scan) ou encore ions extraits du mélange a été adoptée. Le but de cette analyse a été de détecter les tocophérols dont les caractéristiques et les traces spectrales sont connues.

V-4- Méthode d'étude de l'altération thermooxydative de l'huile d'argan

Les méthodes de détermination de l'altération thermooxydative sont nombreuses et variées. Le processus d'autoxydation d'une huile est affecté par sa composition en acides gras, leurs degrés d'insaturation, la présence et l'activité des pro- et antioxydants, la pression partielle de l'oxygène, la surface exposée à l'oxygène et aussi les conditions de stockage de cette dernière. Nous présentons dans ce paragraphe les méthodes plus spécifiquement adaptées au contrôle de l'oxydation qui se développe à température de 37 °C et à 63,5 °C et enfin d'apprécier la résistance des acides gras de l'huile d'argan comparée à celle de l'huile de tournesol.

Après avoir caractérisé essentiellement les trois formes de l'huile d'argan et étudié leurs compositions chimiques, nous avons tenté l'étude de leurs évolutions oxydatives tout au long du chauffage, afin de pouvoir estimer leurs stabilités. Bien entendu, plusieurs méthodes permettent de connaître les caractéristiques physico-chimiques d'une huile à un moment donné, nous nous sommes posé la question de rechercher la durée de conservation de l'huile et donc sa résistance à l'oxydation. Théoriquement cette dernière ne peut être mesurée que par un essai réel de conservation dans des conditions proches des conditions naturelles. Cependant et en raison de la durée, ces essais pratiques de vieillissement dans des conditions normales sont peu utilisés et nous avons eu recours à des essais accélérés d'oxydation, qui donnent des réponses plus rapides.

La figure 77 montre les différents réarrangements les plus probables dans l'autoxydation des corps gras et plus particulièrement les huiles végétales type linoléique soumises à un stress thermique.

L'huile d'argan est une huile polyinsaturée due à sa teneur en acide linoléique, qui fait partie des acides gras polyinsaturés, l'autoxydation de cette huile sous l'effet de la chaleur, lumière ou ions métalliques génère des produits hydroperoxydes (rancissement), ces hydroperoxydes peuvent être suivis par iodométrie par le calcul des valeurs des peroxydes (Vp). On peut également suivre le rancissement en calculant le taux de diènes hydroperoxydes (DC). Par ailleurs la détérioration de l'huile génère des produits du deuxième stade d'oxydation tels que les aldéhydes, cétones, alcools, alcanes, alcènes...etc. La mesure de ces produits se fait généralement à l'aide des test TBARS, de p-anisidine, de Krebs....etc.

Dans ce travail, nous avons fait appel à des chauffages, sans lumière, de l'huile d'argan (formes alimentaire et esthétique) en plus de l'huile de tournesol à 37 °C et à 63,5 °C. C'est un test connu sous le nom du test de l'étuve, ainsi, tout au long du chauffage, nous avons déterminé pour ce test de stabilité oxydative à 37°C et à 63,5 °C, les valeurs des hydroperoxydes et les valeurs de p-anisidine (p-Av). Les diènes conjugués (CD) sont estimés selon le protocole de Chan and Levett, 1977 in Ulrich *et al.*, 2000.

Les protocoles des dosages des hydroperoxydes, des diènes conjugués et des produits secondaires sont détaillés dans Matériels et Méthodes.

V-4-1- Test de l'étuve à 37 °C

Quelle que soit la forme de stockage, les paramètres les plus influençants sont la lumière, l'air, les traces de métaux et la température comme nous l'avons déjà susmentionné.

Nous avons tenté d'étudier ce dernier paramètre en fonction des caractères organoleptiques ainsi que les changements physiques qui en découlent.

La température de 37 °C pendant une période de 30 à 35 jours affecte légèrement l'huile d'argan durant le stockage, nous n'avons pas noté de période d'induction avant 16 jours, à cette température, pour la variété esthétique et non plus avant 18 jours pour la variété alimentaire, les différences étant statistiquement significatives ($p < 0,05$) (figure 77).

On entend par période d'induction une valeur en hydroperoxydes supérieure à 20 meq O₂/ kg d'huile (Economou, 1991).

La figure 78, illustre l'évolution à des intervalles de temps réguliers de 5 jours, des valeurs des peroxydes, on note l'absence de rancissement (détérioration de l'odeur). Les valeurs des peroxydes ou Vp sont inférieurs à 70 meq/Kg. Nous avons constaté que sur un cycle de 35 jours, le taux des hydroperoxydes devient à peu près constant à partir du 20^{ème} jour, et renseigne sur le début de leur décomposition en produits secondaires (deuxième stade de l'oxydation) pendant que la peroxydation de l'huile se poursuit donc progressivement.

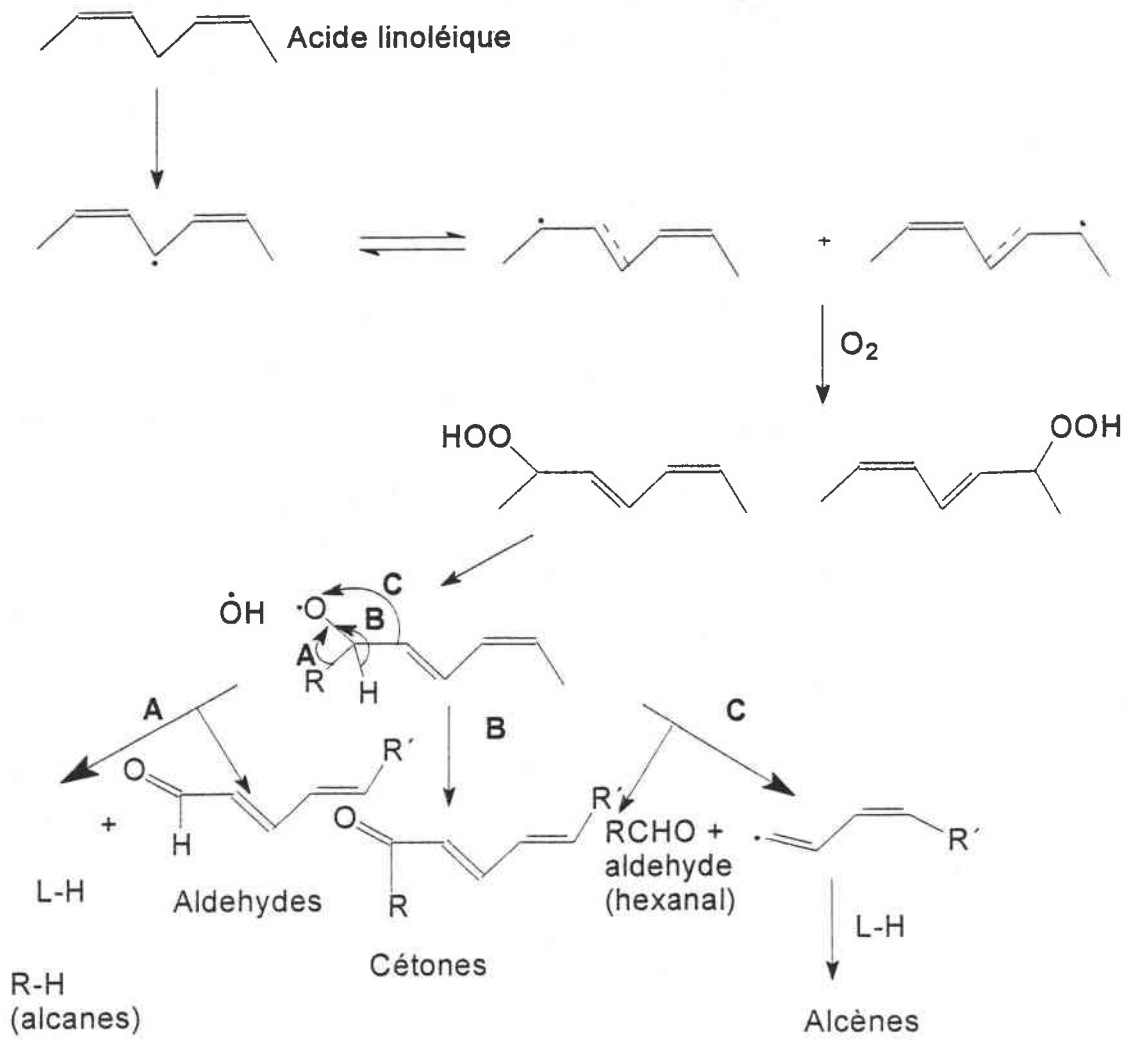


Figure 77: Autoxydation des huiles type linoléique

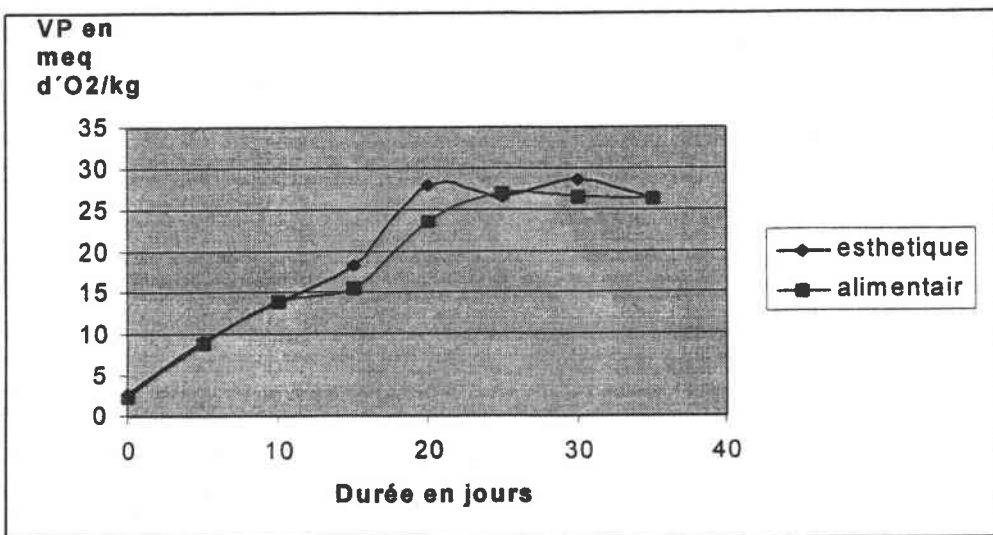


Figure 78: Cinétique de valeurs des peroxydes formés dans l'huile d'argan à 37 °C

V-4-2- Test de l'étuve à 63,5°C

A cette température, les phénomènes d'oxydation se voient amplifiés par rapport à la température de 37 °C. Les valeurs de p-anisidine ou VpA ont été déterminées en faisant agir en milieu acide acétique, la p-anisidine sur les aldéhydes formés, l'adduit formé est suivi par spectrophotométrie à 350 nm et indique par conséquent l'évolution des produits secondaire du deuxième stage d'oxydation de l'huile (figure 79).

Les valeurs de diènes conjugués ou CD (figure 80) représentent aussi un indicateur plus rapide et plus simple que la détermination des Vp et pAv. L'oxydation des huiles est accompagnée par une augmentation d'absorbance en UV. L'examen spectrophotométrique UV nous a fourni des informations utiles sur la qualité de l'huile d'argan, sur son état de conservation et sur certaines modifications dues au processus de dégradation, les absorptions mesurées, aux longueurs d'ondes prévues sont dues à la présence de systèmes diéniques et triéniques formés. L'oxydation de l'huile d'argan sous la condition de ce test à 63,5 °C, exprimée en valeur des peroxydes à différents intervalles de temps est représentée dans la figure 81.

Sur la base de ces courbes obtenues [pAv] (figure 79), [CD] (figure 80) et [Pv] (figure 81), en fonction du temps, l'huile d'argan semble être plus résistante par rapport à l'huile de tournesol qui est étudiée aussi par nos soins dans les mêmes conditions, en effet les valeurs des hydroperoxydes pendant toute la cinétique d'oxydation de l'huile d'argan sont inférieures à 150 meq O₂/Kg à la température de 63,5 °C.

La formation des produits secondaires ne commence qu'à partir du 5^{ème} jour, et suit une cinétique semblable à celle des hydroperoxydes, la valeur de p-anisidine atteint une valeur maximale de 8,7 au 24^{ème} jour, une légère chute de l'absorbance peut être due au fait que les produits d'oxydation formés se volatilisent.

Il convient toutefois de souligner que l'on a mesuré des valeurs d'hydroperoxydes relativement fortes au début du traitement (figure 81) et ceci pour les deux formes esthétique et alimentaire, ceci peut être attribué au fait que les huiles ont été conservées à peu près 4 mois au frais (4 °C) avant manipulation, ce qui suppose qu'il ait pu y avoir initiation à la dégradation pendant le stockage, mais la valeur maximale des hydroperoxydes ne dépasse pas 150 meq d'O₂/kg, donc nous tentons attribuer cette stabilité à la présence d'antioxydants, tels que les vitamines, squalène déjà identifiés mais aussi des polyphénols.

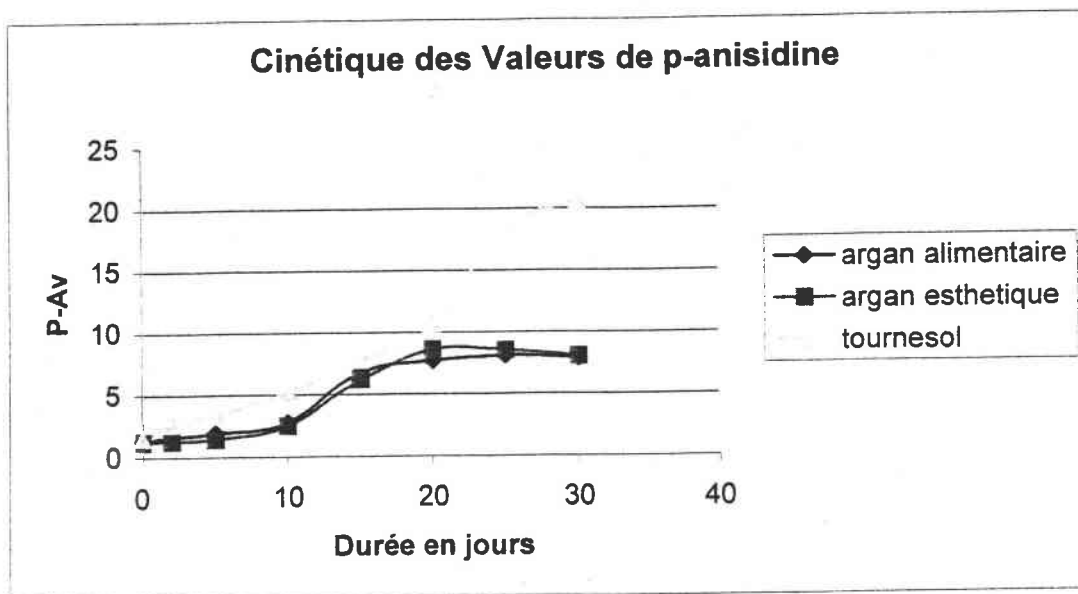


Figure 79: Cinétique des valeurs de p-anisidine à 63,5 °C

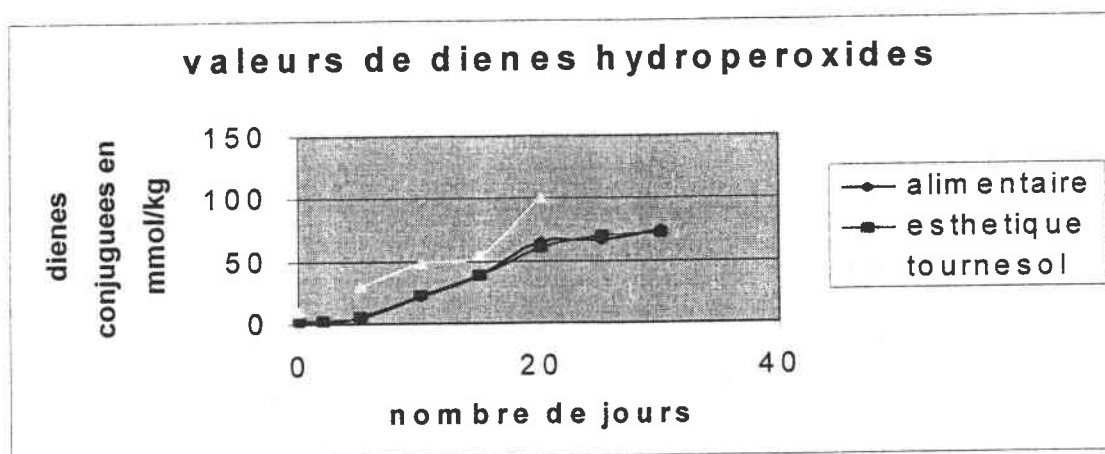


Figure 80: Evolution des dièneshydroperoxydes à 63,5 °C

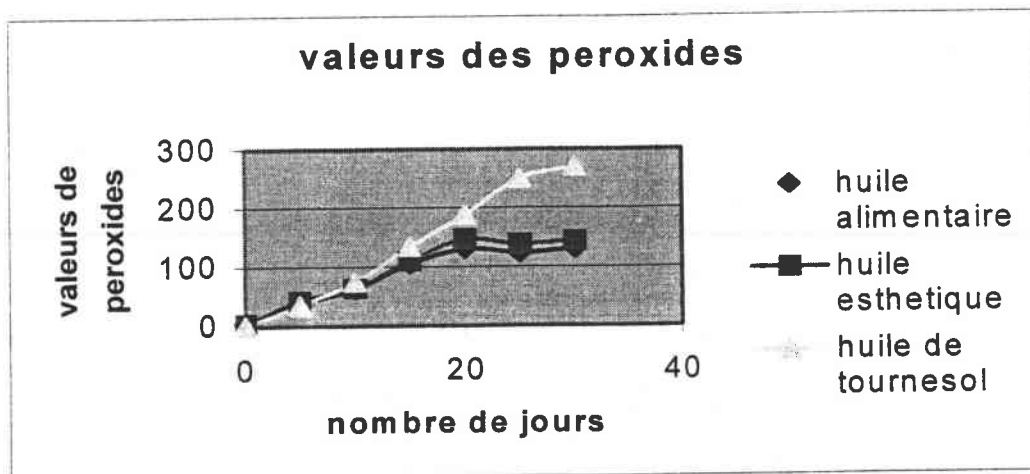


Figure 81: Cinétique de valeurs des peroxydes formés dans l'huile d'argan à 63,5 °C

La stabilité de l'huile d'argan ne saurait toutefois signifier une absence de dégradation de l'huile due au chauffage, en effet tous les indices étudiés (Pv, p-Av, DC) évoluent proportionnellement avec la durée du stockage. Une remarque importante par rapport à l'huile de tournesol est que pendant nos dosages, les valeurs trouvées se tassent toujours vers une valeur constante que ce soit par rapport au CD, pAv ou Pv. Nous concluons qu'au cours de l'activation oxydative due au traitement thermique, on assiste à une stabilité d'hydroperoxydes de nature oléiques et linoléiques dans l'huile d'argan.

L'observation de l'indice de p-anisidine des deux formes d'huile esthétique et alimentaire, au cours du chauffage et en la comparant par rapport à l'huile de tournesol (figure 79), permet de relever une stabilité marquée pendant le deuxième stage d'oxydation de l'huile d'argan, car les valeurs de p-anisidine ne sont pas très fortes. Le maximum est au-dessous de 9, au cours du traitement thermique utilisé pour les deux formes de l'huile. La chute légère de cet indice au 20^{ème} jour, explique l'évaporation des produits de dégradation, et peut être aussi due à la polymérisation des acides gras qui prend place à partir du 20^{ème} jour. Enfin, nous avons remarqué que par rapport aux trois indices suivis, les tendances pour les deux formes esthétique et alimentaire étudiées à 63,5 °C sont similaires, sous des différences statistiquement non significatives.

Les tests que nous avons utilisés ne sont pas d'un emploi courant, et ne sont pas encore normalisés, en revanche des tests dit de Rancimat, sont parmi les tests figurants dans les cahiers de charges des sociétés mais demandent un matériel adéquat qui nous a empêché de les réaliser.

Il est aussi délicat d'extrapoler nos résultats par rapport à la stabilité oxydative de l'huile d'argan dans les conditions normales ou naturelles, en effet les voies de formations des hydroperoxydes ne seraient pas les mêmes et donc les produits secondaires qui en résultent sont différents et n'ont pas forcément les mêmes impacts sur les qualités organoleptiques des matières grasses, en revanche, nos tests sont tout à fait adaptés à la détermination de l'efficacité comparée des antioxydants qui peuvent se trouver dans l'huile. De plus, il est suggéré que chaque jour sous le test à l'étuve à 63,5 °C est équivalent à un mois de stockage à température ambiante (Evans *et al.*, 1973).

Ces résultats, constituent par conséquent une contribution nouvelle qui permet de situer la stabilité thermique de l'huile d'argan peu connu par rapport à d'autres huiles végétales communément connues comme l'huile d'arachide, l'huile d'olive et l'huile de tournesol.

V-5- Application de la RMN pour l'étude de la stabilité de l'huile d'argan et sa composition triglycéridique

V-5-1- RMN du proton

Peu de travaux exploitant la RMN du proton, pour l'étude de la composition et la stabilité thermique des huiles ont été rapportés. Notre démarche nous a confirmé que la méthode RMN est une technique performante dans la caractérisation thermique des huiles, en particulier celle de l'huile d'argan, les spectres enregistrés (figure 82), correspondent aux résonances du proton de l'huile totale alimentaire. Deux enregistrements ont été accordés à cette forme en duplicat au cours de la cinétique de conservation de l'huile pendant 30 jours et à intervalles de temps réguliers de 5 jours.

La figure 82 représente le spectre de RMN ^1H de l'huile d'argan à température ambiante. L'avantage de cette technique RMN ^1H par rapport à la RMN ^{13}C , et que cette dernière nous permet d'obtenir des informations sur les produits minoritaires et plus particulièrement les produits formés par oxydation tels que les aldéhydes, alcools, cétones, époxydes...etc. En haut de cette figure est représenté le spectre de RMN ^1H de l'huile d'argan (forme alimentaire) après 35 jours à 63,5 °C. Sur cette figure, on détecte après 35 jours la formation des produits secondaires ($\delta = 8$ ppm) correspondants aux produits du deuxième stage d'oxydation de l'huile d'argan.

Les attributions en RMN ^1H (enregistré dans CDCl_3 à 250 MHz) des protons des différents triacylglycérols contenus dans l'huile d'argan mettent en évidence:

Des protons oléfiniques sous forme de multiplets, se situant entre 5,2 et 5,5 ppm, le proton 2 du glycérol résonne vers 5,26 ppm.

H_1 et H_3 du glycérol résonnent respectivement à 4,1 et 4,3 ppm, ces deux signaux peuvent être interchangeables.

Les protons bis-allyliques et méthylènes allyliques des chaînes poly-insaturés apparaissent respectivement à 2,78 et 2,05 ppm.

Les CH_2 en α de $\text{C}=\text{O}$ sont observables à 2,35-2,25 ppm, les CH_2 allyliques résonnent entre 2,1-1,9 ppm, les protons d'acylglycérol (H_1 et H_3) résonnent à haut champs par rapport à leurs homologues non acylés c à d les protons du glycérol dont les déplacements se situent respectivement à 2,3 et 1,6 ppm. Les protons méthylènes se situent vers 1,2 ppm, les protons des méthyles saturés se situent vers 0,8 ppm.

Une fois le spectre du proton de l'huile d'argan alimentaire est dépouillé, nous avons suivi par intégration l'évolution de ses protons, bis-allylique, oléfiniques et aliphatiques

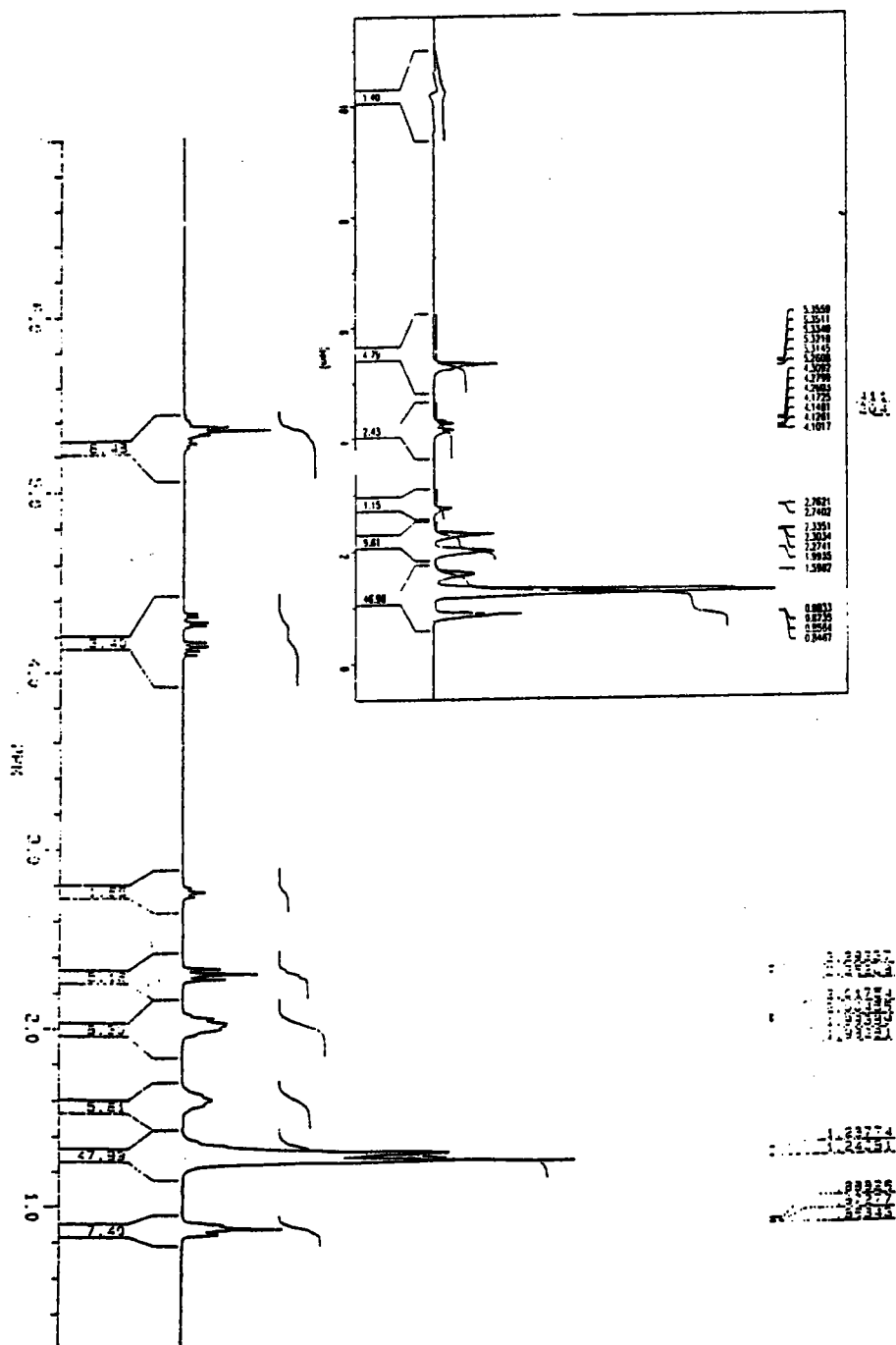


Figure 82: RMN ^1H de l'huile d'argan (variété alimentaire) dans CDCl_3 à 250 MHz.

durant 30 jours afin de pouvoir estimer la stabilité de ses acides gras dans le temps. En effet la spectroscopie de RMN ^1H donne habituellement une relation satisfaisante entre les surfaces des pics intégrées et le nombre des noyaux sous ces surfaces.

La figure 83 illustre les rapports d'évolution des protons aliphatiques et oléfiniques ainsi que le rapport des protons aliphatiques et protons diallylméthylènes de l'huile d'argan alimentaire.

Adhvarhyo en 2000, rapportent que plus le rapport entre les CH_2 saturés et le pourcentage des CH_2 bis allyliques est grand plus l'énergie d'activation de la réaction d'oxydation est grande et plus l'huile résiste à l'oxydation. Les méthylènes bis-allyliques sont les plus sensibles à l'oxydation.

Une augmentation en oléfinique diminue l'énergie d'activation à l'oxydation. Le tableau 31 récapitule les différents pourcentages des rapports aliphatiques/oléfiniques R_{ao} et aliphatiques/bisallyliques R_{ad} . D'après ce tableau, l'huile d'argan est l'huile où le rapport entre le pourcentage des méthylènes saturés est le plus grand, on note aussi le pourcentage le plus faible des méthylènes bis allyliques suivi de l'huile de canola.

Les spectres obtenus en dupliquant pour cette variété alimentaire démontre clairement une résistance à l'oxydation par rapport aux autres huiles étudiées de la même manière par Udaya *et al.*, 1995, s'agissant de l'huile de canola et de l'huile de soja, en effet le rapport des aliphatiques et oléfiniques est presque constant dans le cas de l'étude de l'huile d'argan alors que le rapport des diallylméthylènes et aliphatiques augmentent entre le 25 et le 30^{ème} jour, cette tendance caractérise le deuxième stage de l'oxydation, càd la formation d'endoperoxydes intermédiaires. Un réarrangement probable permet de générer des produits carbonylés.

Tableau 31 : Les différents pourcentages (aliphatiques, oléfiniques et allyliques de l'huile d'argan en comparaison avec d'autres huiles végétales)

Huiles végétales	% C oléfiniques	% CH ₂ saturés	% Bis allyliques	% αCH ₂ C=O	% CH ₂ allylique
Canola ^a	8,31	54,96	1,61	5,95	10,85
Carthame	11,15	48,35	4,25	6,04	10,86
Soja ^a	10,26	51,71	4,13	6,15	10,40
Tournesol	10,15	51,1	3,85	5,87	9,56
Argan	6,49	60,38	1,6	6,21	10,63

^a: Udaya *et al.*, 1995

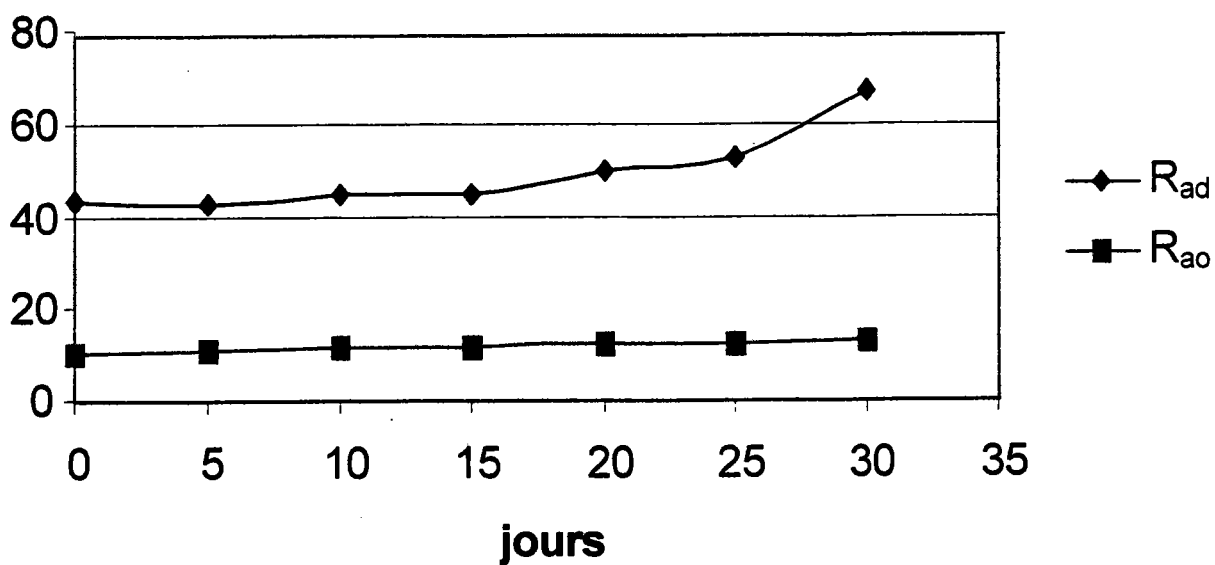


Figure 83: Changement des rapports entre les intégrales des protons aliphatiques et protons diallylméthylènes et les intégrales des protons aliphatiques et oléfiniques (Rad et Rao respectivement), évoluant à 63,5 °C

V-5-2- RMN du Carbone 13

La distribution des acides gras sélectivement sur les trois positions du glycérol requiert une série de processus biochimiques (hydrolyse de l'acylglycérol et puis sa purification par CLHP) suivie par d'autres analyses chromatographiques généralement en phase inverse (Dotson *et al.*, 1992 et Kallio *et al.*, 1994).

La méthode la plus courante consiste à traiter l'acylglycéride purifié à l'aide d'une lipase clivant spécifiquement la liaison ester de la partie centrale du triglycéride et à caractériser l'acide gras libéré, ceci permet une distinction entre les positions extérieures (1 et 3) et la position interne du triglycéride. Il est donc clair que ces expériences biochimiques sont longues, difficiles et consomment une quantité importante d'échantillon.

Les méthodes chromatographiques directes s'avèrent aussi laborieuses et nécessitent non seulement l'analyse chromatographique mais en plus, des calculs mathématiques et des répartitions statistiques selon lesquelles le nombre des carbones et la nature des acides gras qui forment le triglycéride sont pris en considération. En effet le nombre des triglycérides que renferme un corps gras naturel se différencie entre eux par la nature des acides gras qui les composent et par la position de ces derniers sur le glycérol. Globalement, ceci se traduit par des différences au niveau du poids moléculaire et de l'insaturation. En ne considérant que les chaînes grasses, il est d'usage de parler du nombre de partition NP, c à d la condensation en carbone dont on soustrait deux fois le nombre de double liaison de la molécule : $NP = Nc - 2n$ où Nc : carbones et n : nombre de doubles liaisons. Par exemple, la trioléine possède un nombre NP égale à 48.

Il est connu depuis assez longtemps que la chromatographie de partage à polarité inverse (c à d phase apolaire fixe et phase mobile polaire) permet de séparer les chaînes grasses en fonction de leur nombre de partition (NP).

En CLHP, il est souvent fait usage de silices de faible granulométrie avec greffons octadécyles et utilisant des mélanges binaires à base d'acétone ou d'acétonitrile, mais l'un des problèmes majeurs rencontrés est la détection des solutés compte tenu de la structure des triglycérides, en effet la réfractométrie s'impose mais n'est pas très sensible et l'utilisation de la phase mobile reste limitée puisqu'un mode isocratique s'impose aussi. Ces méthodes sont toutefois grossières, car d'une part on observe fréquemment que des triglycérides de compositions différentes possèdent des nombres

de partitions identiques, et d'autre part, il arrive que des inversions apparaissent au niveau des éluions dans le processus de séparation des triglycérides.

Nous avons donc jugé utile de confirmer la répartition des différents acides gras sur le glycérol de l'huile d'argan et l'étude de leurs régiospécificités Sn1,3 ou Sn 2 dans le glycérol, par résonance magnétique nucléaire (RMN), ceci permet d'éviter des méthodes chromatographiques longues comme la CLHP et surtout la GC qui demande le changement répété de colonnes quand on affaire aux séparations des triglycérides.

Dans la pratique de la RMN, c'est la RMN à haute résolution à 150, 9 MHz qui permet d'étudier mieux la structure moléculaire des huiles.

En RMN ^{13}C , la fréquence de résonance n'est pas identique pour les différents carbones de chaque molécule, celle-ci se trouve évidemment influencée par l'environnement. Il s'ensuit des déplacements caractéristiques par rapport à un composé de référence. C'est donc cette méthode que nous avons utilisée pour l'analyse totale des triglycérides de l'huile d'argan en nous nous inspirant des conditions de la littérature (Mannina *et al.*, 1999).

Des dépouillements partiels des résonances des carbones ^{13}C du triester du glycerol ont été déjà rapportés dans la littérature (Gunstone *et al.*, 1990 ; Wollemborg *et al.*, 1990, Liken *et al.*, 1995 a,b ; Liken *et al.*, 1997 et O'Connor *et al.*, 1999), cependant ils ne possèdent aucune preuve de leurs exactitudes.

Mannina *et al.*, 1999 avait cependant, fait l'effort d'étudier en plus de la régiospécificité, l'influence d'un certain nombre de paramètres tels que la concentration de l'huile en fonction des valeurs des déplacements chimiques. Ce même auteur affirme aussi que la résonance dans la région des carbonyles était la plus affectée par la position des différents acides gras qui constituent le triglycéride.

Dans notre travail, les spectres de RMN ^{13}C des deux formes alimentaire et esthétique de l'huile d'argan enregistrés dans les mêmes conditions rapportées par Mannina *et al.*, 1999, sont présentés par la figure 84. Le dépouillement de ces deux spectres met en évidence des carbones oléfiniques qui sont observés entre 130,3 et 127 ppm. Ces oléfiniques sont particulièrement attribués aux chaînes d'acide gras oléiques et linoléiques pour l'huile d'argan, puisque sur la base de sa composition, ce sont ces deux acides gras mono- et di-insaturés majoritairement présents dans l'huile, le αCH_2 de $\text{C}=\text{O}$ est observé entre 34,3 et 33,6 ppm, les carbones cis allyliques résonnent entre 27,5-26,5 ppm, les trans allyliques s'observent vers 32,5 ppm, les bis allyliques résonnent entre vers 26-25 ppm, les 3 $\beta\text{-CH}_2$ du carbonyle résonnent à 25-24 ppm, les 3

méthyles terminaux résonnent entre 14,5-13,5 ppm et enfin les carbones du glycérol se situent entre 60 à 72 ppm. Ces attributions ont été déduites des travaux d'Adhvarhyo *et al.*, 2000 concernant l'identification par RMN de l'huile d'olive.

Les données disponibles dans la littérature (Mannina *et al.*, 1999), et de notre propre étude systématique sur les triglycérides de l'huile d'argan démontrent en haute résolution de la RMN ^{13}C , et dans la région relative aux carbonyles, que ces synthons carbonyles sont effectivement capables de discerner entre les chaînes acylées saturées de leurs homologues insaturés et aussi ils permettent rapidement la détermination de la position de l'estérification.

Sur le spectre de RMN du carbone 13 (figure 84), enregistré dans CDCl_3 de l'huile d'argan à 500 MHz, nous distinguons les signaux C-2 et C-1,3 des chaînes triglycéridiques et ils sont attribués sur la base de l'intensité du signal relatif de la région des carbonyles évoluant dans le rapport 2 :1.

Ces carbonyles se situent dans deux ensembles de résonances différents, les plus déblindés (vers 173 ppm) représentent les acylglycérols estérifiés en 1 et 3, les plus blindés (172 ppm) sont attribués aux 2-acylglycerols.

La RMN du carbone 13 nous a donc offert une alternative rapide et une procédure simple dans l'évaluation de la composition chimique des triglycérides de l'huile d'argan.

Pour le dépouillement du spectre de RMN ^{13}C de l'huile d'argan et ainsi la détermination sur les positions Sn 1,3 et Sn 2 des quatre acides gras majoritaires. Nous devons considérer que :

1- Les carbonyles dans les positions différentes de glycérol ont des déplacements chimiques différents.

2- Le déplacement chimique dépend de différents types de chaînes d'acides gras à l'exception de certains acides gras saturés qui font heureusement partie de l'huile d'argan. Ainsi et sous réserve que nous connaissons les acides gras qui composent l'huile d'argan qui sont l'oléique, le linoléique et les acides gras saturés :

Les signaux dans la position Sn 1,3 :

1- Le signal à 173,22 ppm est dû aux chaînes saturées : Stéarique et palmitique, représenté par S dans la figure 84.

2- Le signal à 173,21 ppm est attribué à l'acide eicosénoïque et vaccénique

3- Le signal à 173,19 ppm est dû à l'acide oléique

4- Le signal à 173,18 ppm est attribué aux chaînes d'acides gras linoléiques

Les signaux dans la position Sn 2 :

1- Le signal à 172,28 est dû à la présence d'acide oléique

2- Le signal à 172,22 ppm est dû à l'acide linoléique.

Pour calculer le pourcentage d'acide gras, il nous a suffi de mesurer l'intensité des signaux carbonyles à 173 et à 172 ppm pour les six signaux obtenus dans l'huile d'argan. Par conséquent et après intégration relative des signaux de résonance des deux variétés esthétique et alimentaire, les pourcentages molaires des différentes chaînes d'acides gras présentes dans l'huile et la distribution de leurs positions dans le glycérol est la suivante :

Chaînes Sn-1.3

	Variété alimentaire	Variété esthétique
Saturés	20,5 %	20,7 %
Oléique	28,9 %	30,3 %
Eicosénoïque	1%	0,9 %
Acide linoléique	18,4 %	19,4 %

Chaînes Sn-2

Oléique	17,2 %	15,3 %
Linoléique	13,9 %	13,3

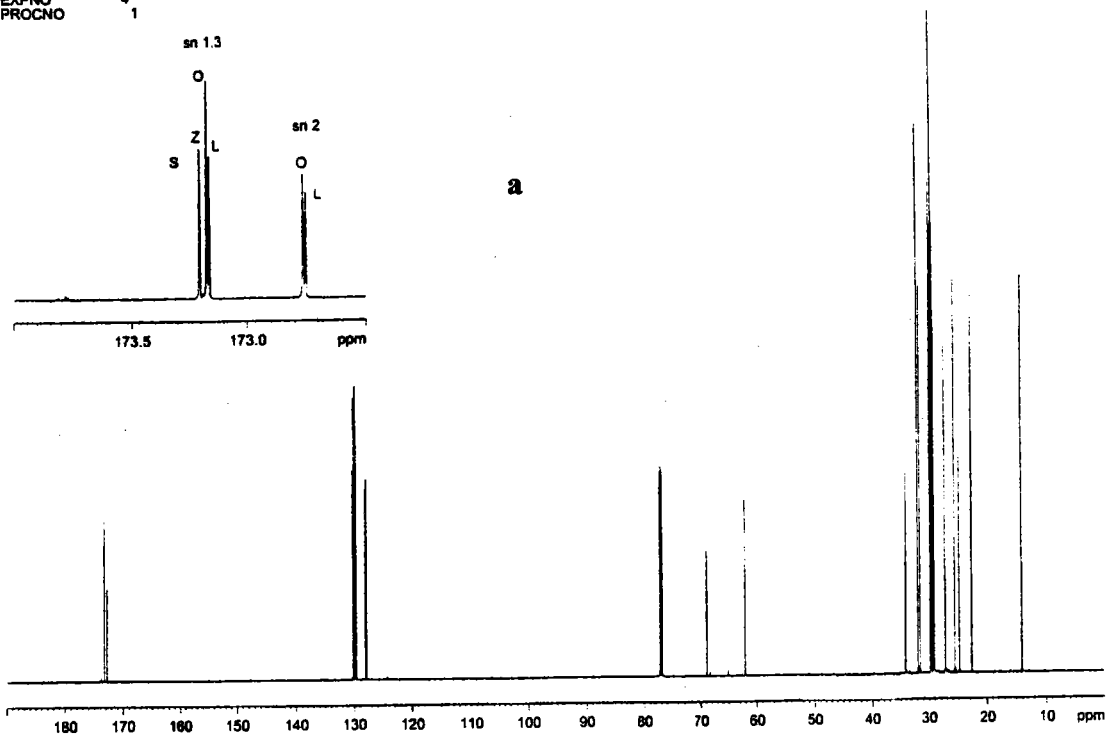
La répartition des différents acides gras sur les trois positions du glycérol est une caractéristique fine des corps gras. Dans ce travail, le plus important n'était pas de reconstruire tout le profil triglycéridique, mais plus spécifiquement, de donner la répartition des acides gras dans les deux positions interne et externe du triglycéride par RMN. Pour l'huile d'argan, les acides gras saturés stéarique et palmitique estérifient principalement la position 1 et 3 du glycérol.

Nous soulignons aussi que l'acide oléique et l'acide linoléique estérifient préférentiellement la position interne du glycérol.

Ces caractéristiques seraient un outil précieux dans la détection des adultérations de l'huile d'argan. Très strictes les normes du Conseil Oléicole International (CIO) limitent à 2 % la teneur des acides gras saturés dans la position 2 du glycérol. L'acide linoléique reste indétectable par RMN et ceci confirme aussi nos analyses par GC/MS.

Current Data Parameters
NAME oil01fard
EXPNO 4
PROCNO 1

¹³C Spectrum - Sample 2: Esthetic variety



Current Data Parameters
NAME oil01fard
EXPNO 2
PROCNO 1

¹³C Spectrum - Sample 1: Food variety

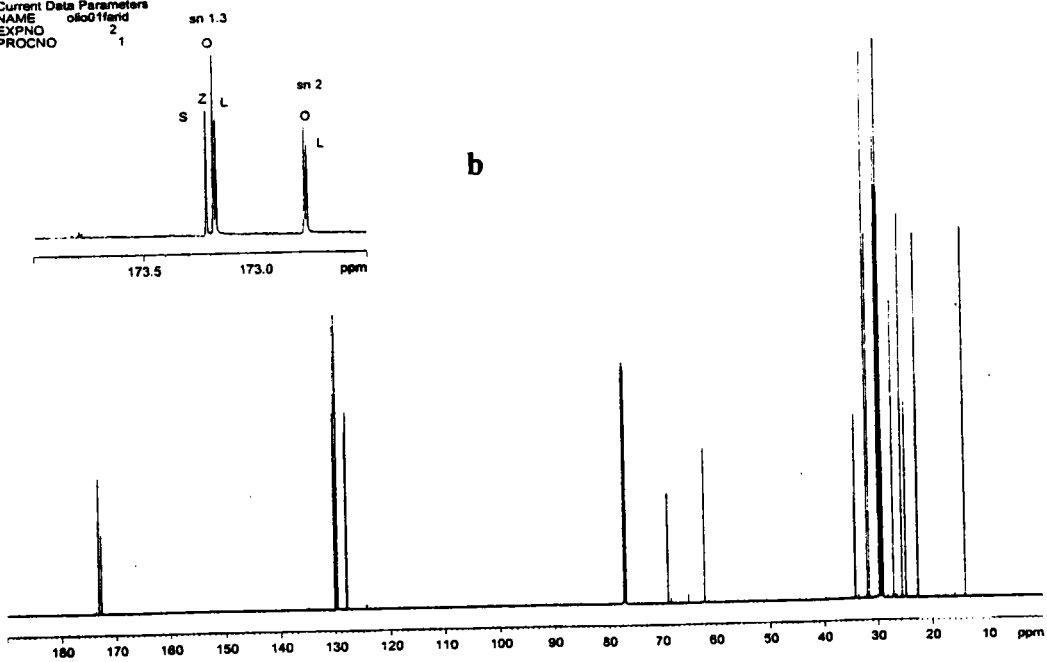


Figure 84: RMN ¹³C de l'huile d'argan a: esthétique et b: alimentaire dans CDCl₃, à 500 MHz. L: acide linoléique, O: acide oléique, S: acides gras saturés et Z: acide vacénique (isomère de l'acide oléique).

Dans ce paragraphe, nous avons pu mettre en évidence la prépondérance des 4 acides gras déjà identifiés par GC/MS, par RMN. Nous notons que les acides gras insaturés sont présents dans tous les triglycérides constituant l'huile d'argan, en revanche, les acides gras saturés sont absents ou très faiblement présents dans la position 2 du glycérol.

Nos résultats sont concomitants avec les travaux déjà rapportés par Maurin *et al.*, 1992, aussi, ce résultat représente un agrément fort quant à la biosynthèse lipidique générale établit par Gustone, 1967.

La mise en parallèle de nos résultats avec ceux déjà obtenus par GC/MS révèlent cependant quelques divergences. En effet, alors que nous décelons de manière indubitable l'acide eicosénoïque et l'acide cis-Vaccénique, la GC/MS ne peut pas les mettre en évidence, au moins dans les conditions utilisées, des co-élutions sont en effet à craindre dans ce genre d'analyse. Une identification optimale par RMN est donc utile. Cette étude nous a fourni encore d'autres informations quant à la composition chimique de l'huile d'argan. La mise en évidence de la technique de RMN pour l'élucidation structurale des corps gras reste encore limitée à quelques Laboratoires très spécialisés dans ce domaine. De plus, cette analyse peut être un complément à la distribution des acides gras pour le contrôle et l'authenticité d'une matière grasse, deux raisons encore et pour lesquelles nous avons opté pour cette analyse de l'huile d'argan.

V-6- Composition chimique de l'huile d'argan en composés polyphénoliques

V-6-1- Introduction

La vitamine E était le premier phénol étudié, plusieurs études ont montré son utilité contre l'oxydation des lipoprotéines et donc par inférence la prévention contre l'atherogenèse. La régénération de l' α -tocophérol dans les LDL humaines a aussi été observé non seulement en présence d'acide ascorbique mais aussi en présence de composés phénoliques doses dépendantes. Une activité antioxydante importante a été aussi observée dans le cas de la consommation de l'huile d'olive (Katsouyanni *et al.*, 1986 ; Berry *et al.*, 1991). L'une des sources naturelles des polyphénols sont les huiles végétales, une particularité est réservée à l'huile d'olive qui contient aux alentours de 800 mg/kg (Owen, 2000a, b et c).

Après avoir étudié la régiospécificité des triglycérides et la composition de l'insaponifiable. Nous avons situé les conséquences d'un stress thermique sur l'huile d'argan afin de déterminer sa stabilité par différentes méthodes, les résultats nous ont démontré une bonne qualité d'huile d'argan par rapport à d'autres huiles végétales. Dans ce paragraphe, nous étudierons les composés phénoliques de l'huile d'argan. La littérature montre que les huiles de graines ne contiennent pas de composés phénoliques, toutefois, il a été cité par Chimi *et al.* en 1988 que l'huile d'argan en contient aux alentours de 56 mg/kg dont l'acide caféique et l'oleuropeine ont été déjà identifiés.

V-6-2- Extraction et identification

Tout d'abord, l'extraction des phénols a été effectuée selon le protocole d'Owen, *et al.*, 2000a, b et c. Le schéma 4 illustre les étapes d'extraction des phénols. Brièvement 2 g de l'huile d'argan alimentaire (en triplicat) sont extraits chacun à l'aide de 10 ml de méthanol, après avoir vortexé (2 min), une centrifugation (5000 rpm pendant 30 min) a été nécessaire, l'extrait méthanolique est par la suite aspiré à l'aide d'une pipette pasteur, séché sous vapeur d'azote, puis repris par l'acétonitrile (2 ml) et extrait 3 fois par l'hexane (1 ml). La fraction acétonitrile, séchée sous vapeur d'azote, reprise dans du méthanol (1 ml), a fait l'objet de travaux ultérieurs.

L'hydrolyse, la GC/MS et la CLHP sont les techniques que nous avons utilisées pour l'identification et l'analyse de cet extrait méthanolique à partir de l'huile d'argan qui est susceptible contenir des polyphénols.

50 µl de la fraction méthanolique sans hydrolyse préalable sont dérivatisés en présence de 100 µl de BSTFA, les siloxanes formés pendant 15 min à 37 °C (temps total de réaction) sont analysés rapidement. Une deuxième fraction de l'extrait méthanolique (10 µl) est hydrolysée en milieu acide ou basique selon le protocole décrit dans Matériels et Méthodes. L'hydrolyse en milieu acide a donné des résultats plus intéressants qu'en milieu basique dans notre cas.

L'analyse de cette fraction méthanolique avant et après hydrolyse en utilisant des techniques développées telles que la CLHP couplée à un détecteur à barrettes de diodes n'ont pas permis de détecter des composés de natures phénoliques en nombre intéressant, le profil de chromatographie liquide analytique nous a permis d'avoir les informations nécessaires sur le contenu de certains phénols, identifiés par rapport aux temps de rétention de leurs homologues standards dans les mêmes conditions de l'analyse (figure 85).

L'extraction à l'aide d'un mélange hydrométhanolique (50/50) dans les mêmes conditions n'a pas donné non plus des résultats exploitables.

Par ailleurs et pour leurs détections et leurs confirmations finales, non seulement la GC/MS s'est avérée plus sensible et donc a été utilisée mais en plus une hydrolyse acide a été nécessaire. Utilisant cette technique, les composés majoritaires identifiés sont l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide ferulique plus le tyrosol (chromatogrammes présentés par la figure 86). L'acide p-Hydroxybenzoïque, l'acide 3,4 dihydroxybenzoïque, la vanilline, le p-hydroxybenzaldehyde ont été aussi détectés à l'état de traces.

Nous n'avons identifié l'acide ferulique qu'après hydrolyse de l'extrait méthanolique, ce qui suggère probablement sa forme glycosylée. Les différents phénols ont été quantifiés par rapport à leurs homologues standards par étalonnage externe, les réponses obtenues (analysées en double), sont retrouvées linéaires entre les aires des pics et les concentrations des composés recherchés. Les différentes réponses entre les aires des pics et les différentes concentrations étudiées après dérivation par le TMS de l'acide syringique et du tyrosol (de 0 – 30 µg/ml), et pour les acides vanillique et ferulique (de 0 à 50 µg/ml), sont présentées par la figure 87. Le dosage (SI) en mode Scan par GC/MS de ces différents produits phénoliques montre que leurs concentrations sont faibles en comparaison avec celles de l'huile d'olive (tableau 32). Les spectres de masse des produits majoritaires qui sont l'acide vanillique, syringique, ferulique et le tyrosol

sont présentés par la figure 88. Nous avons par la suite, tenté une extraction à partir d'une masse d'huile plus importante pour l'obtention des produits phénoliques.

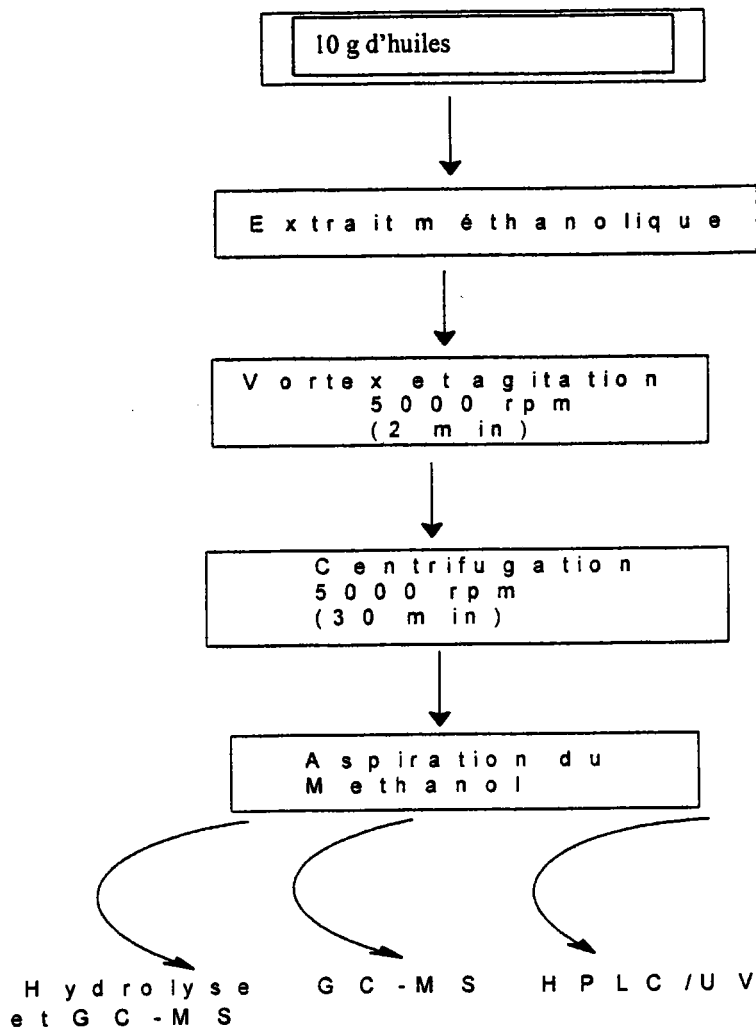


Schéma 4 : Extraction et analyse des polyphénols de l'huile d'argan alimentaire

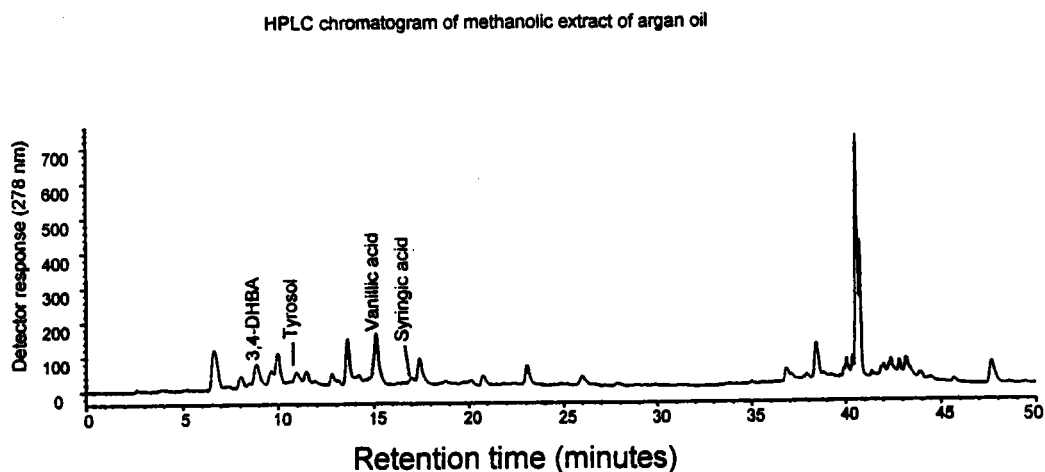


Figure 85: Chromatogramme CLHP/UV/DAD de l'extrait méthanolique de l'huile d'argan, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque, l'acide vanillique et syringique ont été détectés, conditions de séparation (montpr

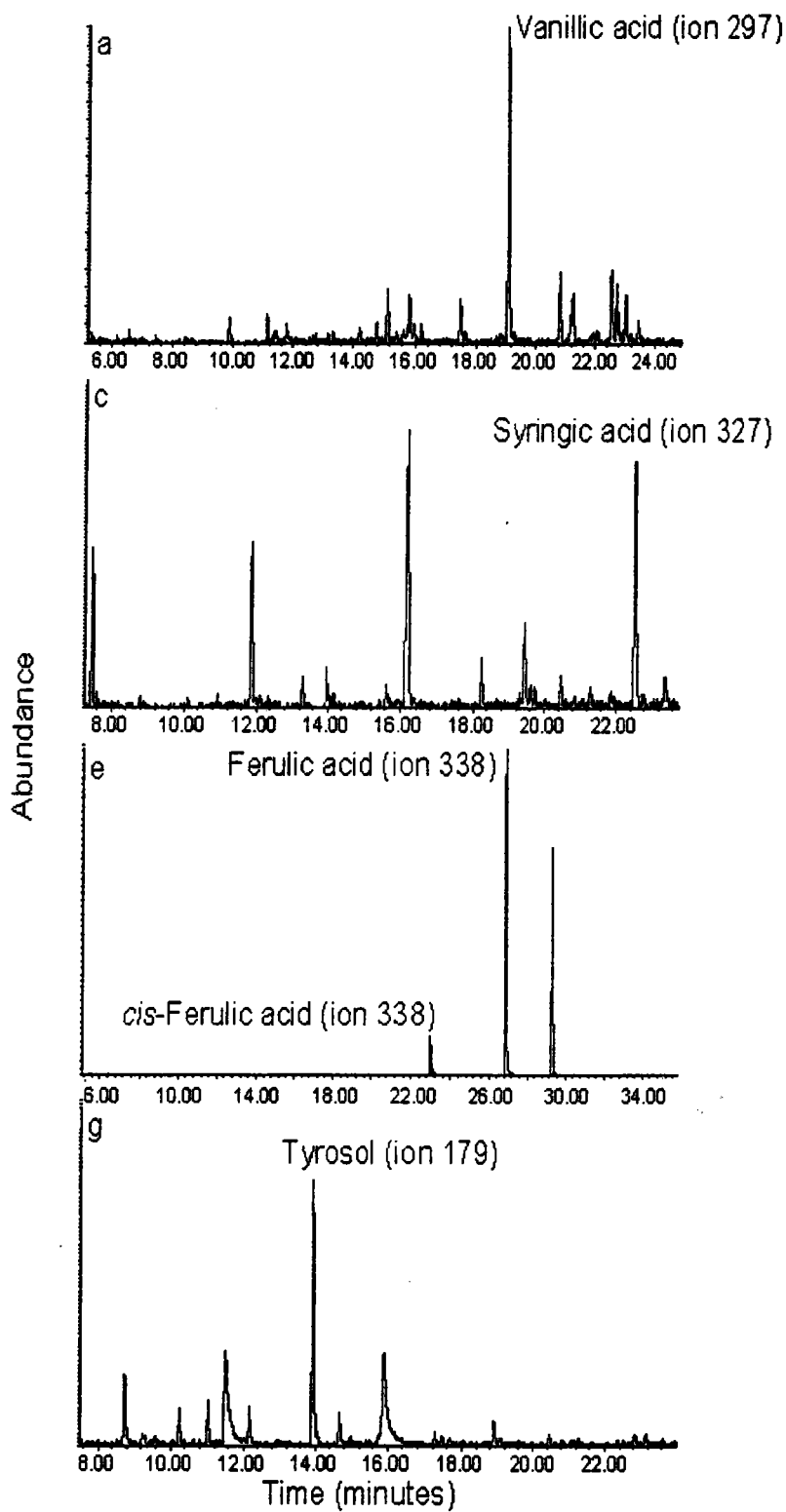
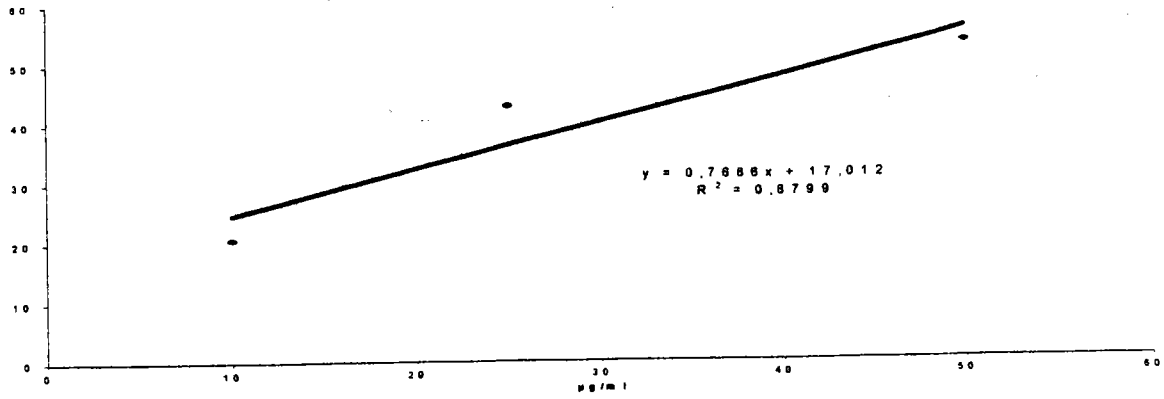
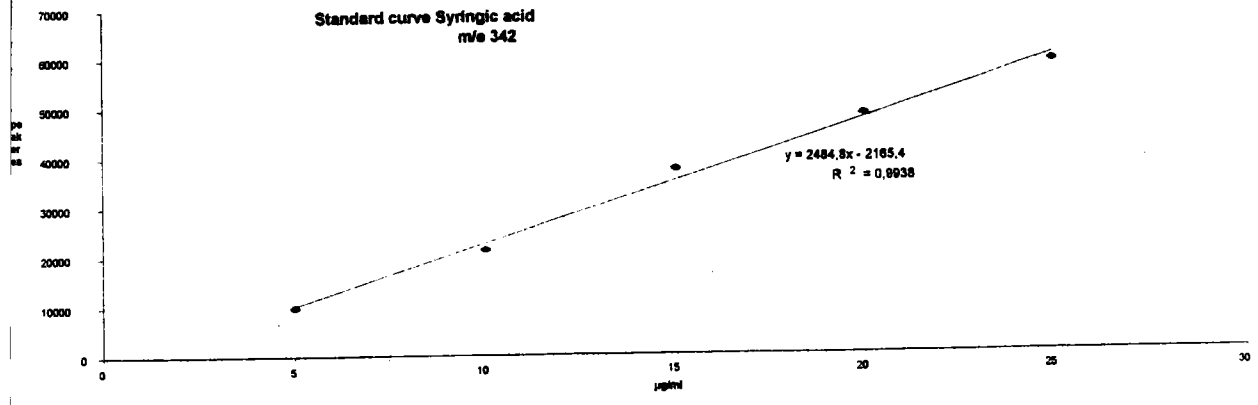


Figure 86: Chromatogramme GC/MS (mode SIM) montrant les différents composés phénoliques majoritaires détectés dans l'huile d'argan

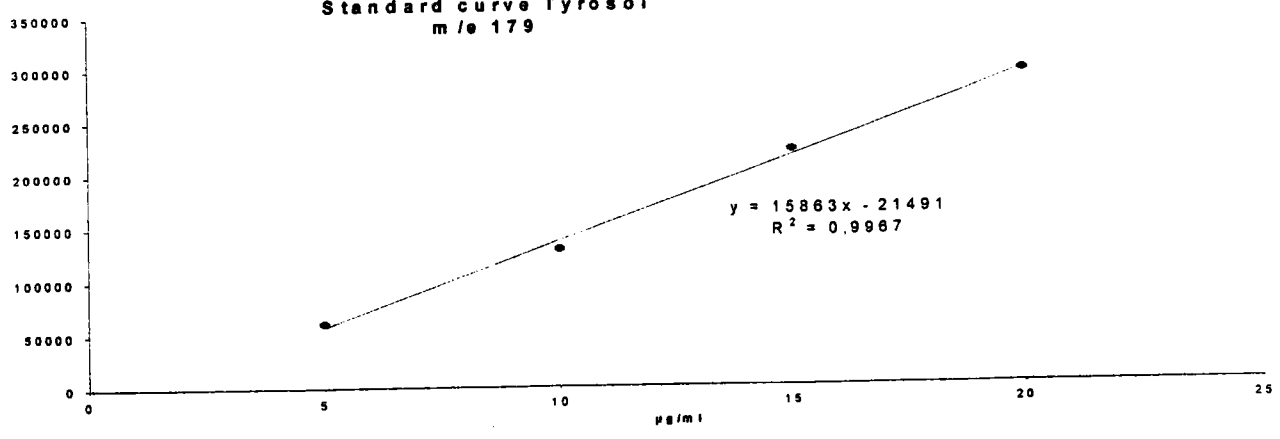
Ferulic acid



Standard curve Syringic acid
m/e 342



Standard curve Tyrosol
m/e 179



Vanillic acid

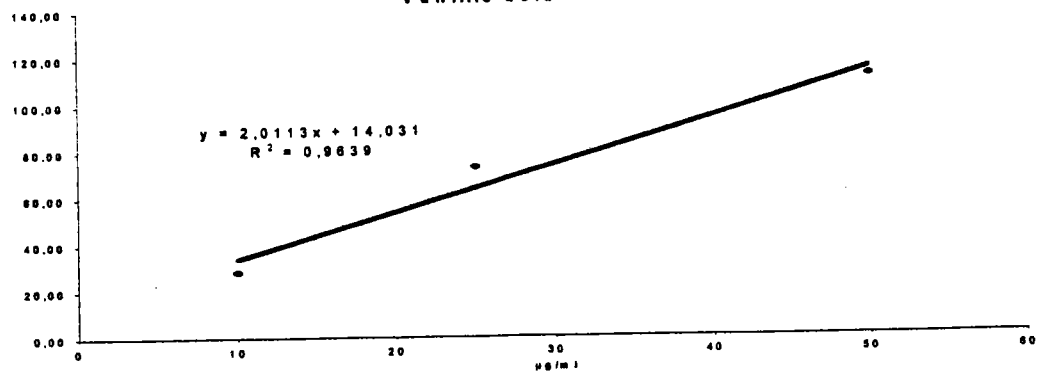


Figure 87: Courbes d'étalonnage externes obtenues par GC/MS (en duplicat) des phénols simples détectés dans l'huile d'argan

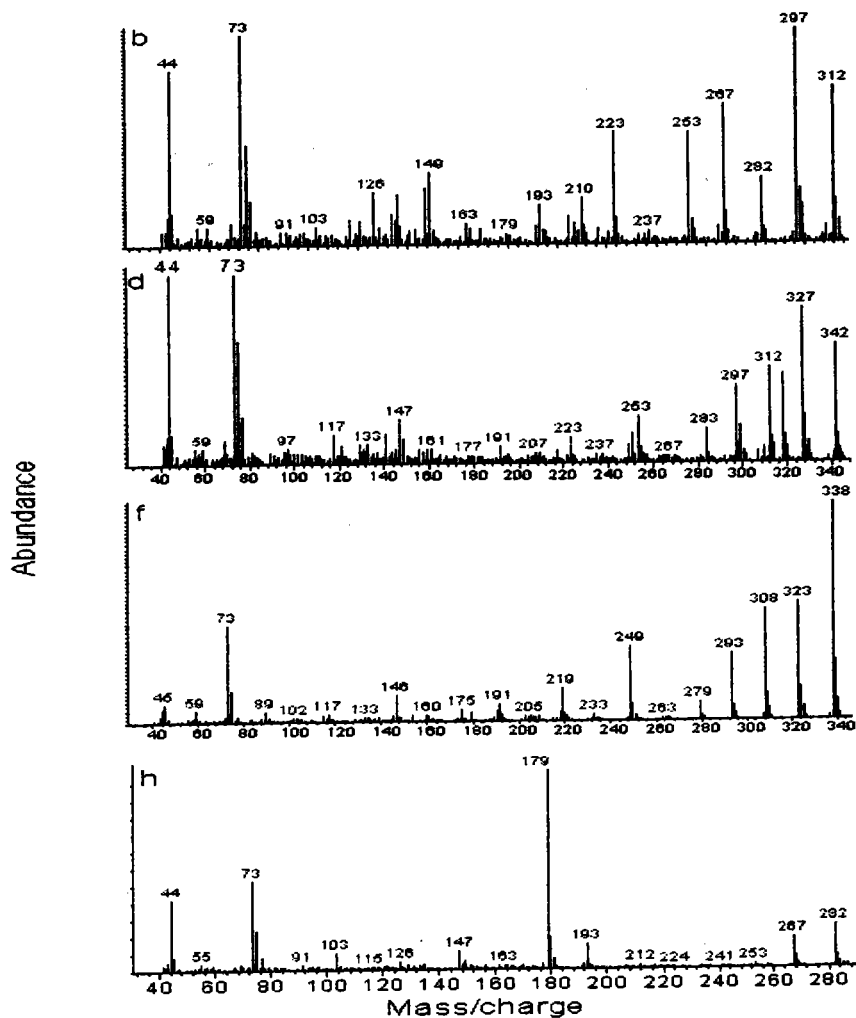


Figure 88: Spectres des masses respectifs des produits phénoliques majoritaires identifiés dans l'huile d'argan, f : acide ferulique, d : acide syringique, h : tyrosol, b : acide vanillique

Tableau 32 : Contenu en phénols détectés dans les huiles

	Composés phénoliques					Total
	acide Vanillique	acide Syringique	acide Ferulique*	Tyrosol	autres	
Argan (alimentaire)	67 ± 3	37 ± 5	3147 ± 20	12 ± 1	0	3263 ± 29
Argan (esthétique)	6 ± 1	0	3211 ± 5	3 ± 0	0	3220 ± 6
Argan (commerciale)	123 ± 12	68 ± 4	3470 ± 13	52 ± 2	0	3713 ± 31
Olive (extra-vierge)	359 ± 7	0	51 ± 2	19573 ± 37	773000 ± 53**	792983 ± 99
Tournesol	0	0	0	0	0	0

Données exprimées en $\mu\text{g}/\text{kg} \pm \text{SEM}$ sont déterminées par rapport à deux essais par GC-MS relativement au courbes standards de témoins authentiques aux concentrations allant de 0 à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

*Détectés dans l'extrait méthanolique uniquement après hydrolyse acide et inclus l'isomère *cis*.

** hydroxytyrosol, secoiridoïdes, lignanes et flavonoïdes déterminés par CLHP (Owen *et al*, 2000ac).

Nous avons entamé cette extraction à l'aide du méthanol et le protocole est représenté dans le schéma 5.

L'expérience a été conduite sur 209 g de l'huile d'argan dans 50 ml de méthanol, sous agitation forte durant 2 h. Lors, de nos prépurifications, la phase méthanolique obtenue après filtration a fait l'objet de travaux phytochimiques ultérieurs.

La séparation des constituants a été menée par chromatographie sur colonne CC en utilisant le système de solvant (DCM, MeOH, 0, 1, 2,5, 5, 10, 20, 30 et 50 %), le volume de chaque fraction de l'éluat est de 250 ml.

Une délipidation à l'aide de l'hexane et du dichlorométhane ont été aussi nécessaires avant d'utiliser le gradient d'éluat choisi.

Nous avons utilisé une prépurification par chromatographie sur colonne, les fractions ont été recueillies manuellement pour chaque système d'éluat utilisé. Elles sont analysées directement par CLHP-UV.

- L'éluat hexanique n'a pas été étudié, en effet, il ne contient pas de phénols.
- L'éluat dichlorométhanique est concentré jusqu'à consistance huileuse et n'a pas été non plus étudié, le profil CLHP ne renseigne sur aucune structure phénolique.

Les polyphénols déjà identifiés ont été retrouvés dans les fractions obtenues à partir de 2,5 et 5 % du méthanol dans dichlorométhane. Ces dernières fractions contiennent en plus certains composés qui ne sont pas de nature phénolique, on assiste néanmoins à des absorbances maximales vers 278 nm (figure 89) mais leurs masses respectives ne renseignent sur aucune structure recherchée, d'autres composés ne sont pas détectés en UV à 278 nm, mais apparaissent clairement sur les traces SIM (voir profil GC/MS p. 142) et en CLHP/UV/DAD (figure 89), ces structures méritent une attention particulière en perspective de nos recherches. Nous continuerons nos travaux afin de pouvoir les identifier. Les extraits méthanoliques obtenus à partir de 200 autres grammes de l'huile par la même méthode d'extraction ont servi pour l'évaluation de l'activité antioxydante dans le système hypoxanthine/xanthine oxidase au chapitre VI suivant.

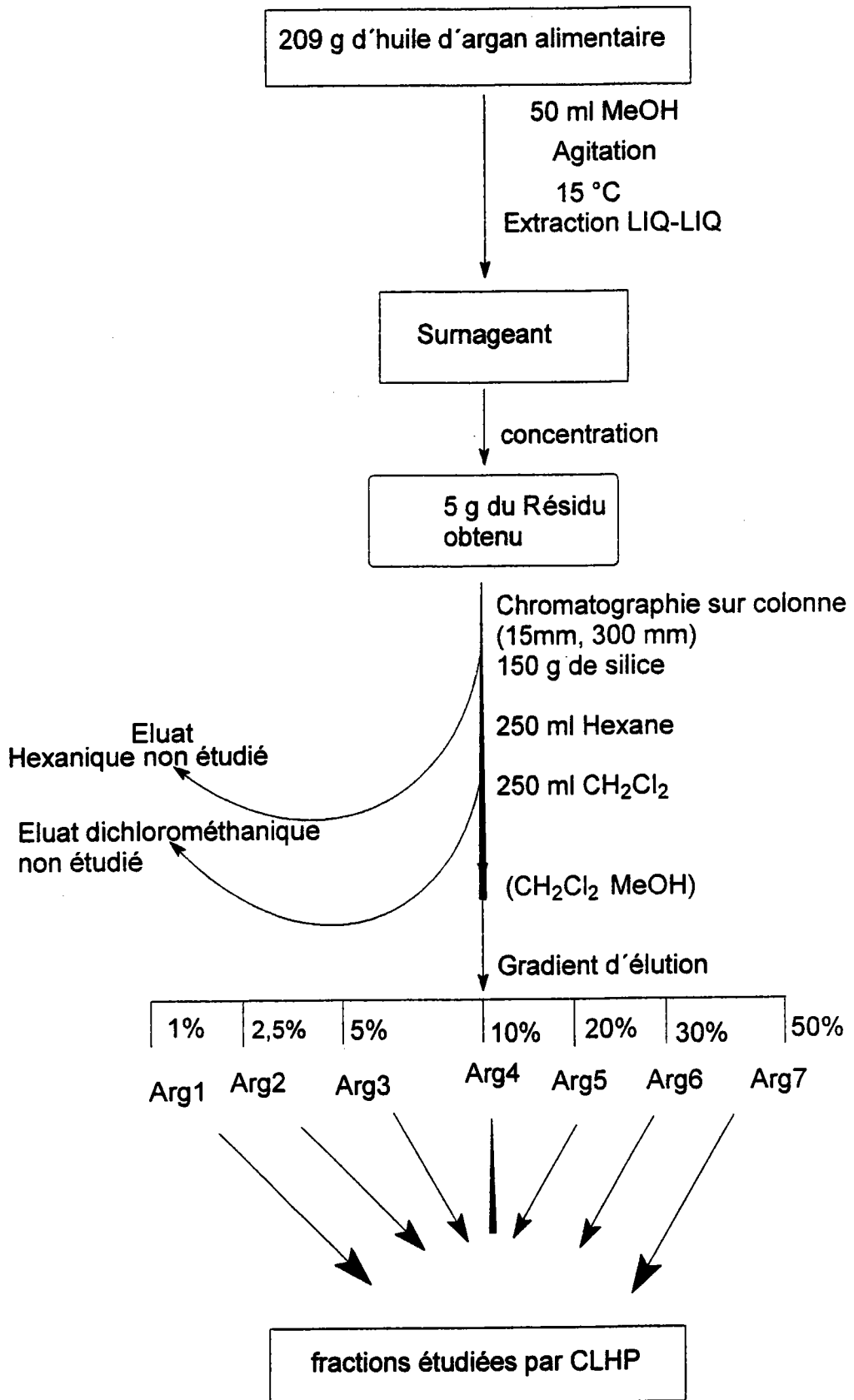


Schéma 5 : Protocole d'extraction et de séparation par Chromatographie sur colonne des fractions polyphénoliques obtenues suite à la chromatographie sur colonne (CC) de l'extrait méthanolique de l'huile d'argan

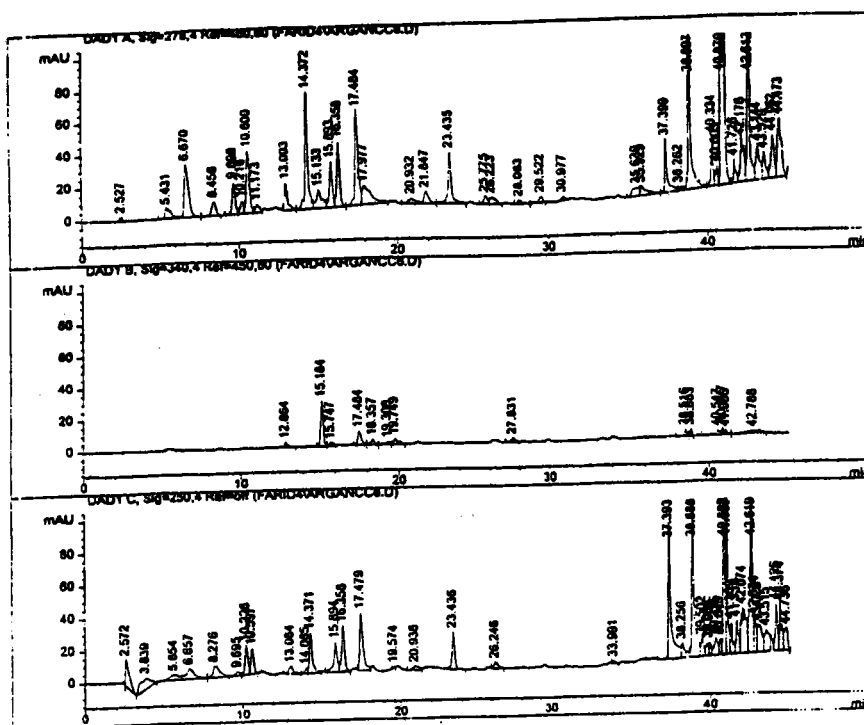


Figure 89: Chromatogrammes CLHP de la fraction Arg₃ obtenus par Chromatographie sur colonne des phénols de l'huile d'argan montrant l'étendu des composés absorbants à 278 nm, colonne Latek, C-18, 25 cm, di. 4 mm, 5 µm, gradient MeOH, CH₃COOH (2%)

VI- 7- Conclusion

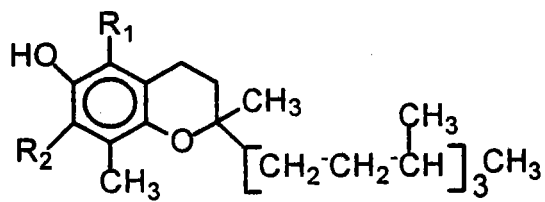
Les structures des molécules identifiées dans l'huile d'argan, sont schématisées dans la figure 90. L'identification des acides gras et l'étude des effets du stress thermique sur les caractéristiques organoléptiques de l'huile, l'étude de la régiospécificité des triglycérides dans l'huile d'argan, l'identification et dosage des tocophérols, des stérols ainsi que du squalène dans l'huile et enfin, la caractérisation des phénols détectés dans l'huile d'argan et leurs quantifications, ont fait l'objet d'étude lors de ce travail.

Pour la caractérisation de ces structures, leurs profils par GC/FID, GC/MS et par CLHP/UV/DAD ont été accomplis. L'identification aussi à l'aide de la LC/MS/DAD a permis un travail d'identification plus approfondie.

D'après Chimi *et al.*, en 1988, il a été rapporté dans cette huile, la présence d'un seul acide phénol, l'acide caféique et d'un secoirridoïde : l'oleuropeine. Alors que l'acide caféique est un produit naturel très antioxydant, l'oleuropeine ne manifeste aucune activité antioxydante dans le système xanthine oxidase (Owen *et al.*, 2000a). Durant nos travaux, d'autres composés ont pu être identifiés, tels que l'acide syringique, ferulique et vanillique en plus du tyrosol. En revanche l'oleuropeine et l'acide caféique sont

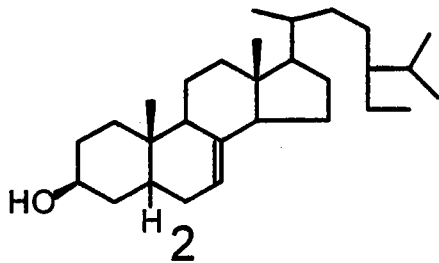
indéfectables, aussi bien dans la variété alimentaire que dans la variété esthétique mais aussi dans la variété commerciale. Donc dans notre recherche concernant les différents phénols de l'huile d'argan, nos résultats apportent de nouvelles données importantes complétant les études réalisées auparavant, en particulier celle de Chimi *et al*, 1988, on pourrait supposer que l'absence d'identification de ces phénols par les travaux précédents soit liée au fait que le stade de maturité du fruit de l'Arganier n'était pas suffisant d'un point de vue métabolique. On pourrait suggérer également que le temps de conservation avant l'extraction de l'huile peut aussi influencer sur la quantité et sur la qualité des phénols, nous supposons que, la récolte des fruits et l'extraction de l'huile qui nous ont été données ont été effectuées sur un stade avancé de maturité, en effet l'acide caféique est un précurseur de l'acide ferulique par méthylation qui peut être d'une origine chimique ou enzymatique. Le tyrosol que nous avons identifié est aussi un produit d'hydrolyse de l'oleuropeine. Les phénols identifiés par GC/MS avec certitude sont : le tyrosol, l'acide vanillique, l'acide ferulique et l'acide syringique. Nous avons détecté aussi l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide-3,4-dihydroxybenzoïque, le p-hydroxybenzaldehyde et la vanilline mais à l'état de traces.

Dans cette étude, nous notons aussi la présence inattendue et surtout majoritaire de la forme γ -tocophérol, ce qui est à notre connaissance n'a pas été rapporté par les données de la littérature.

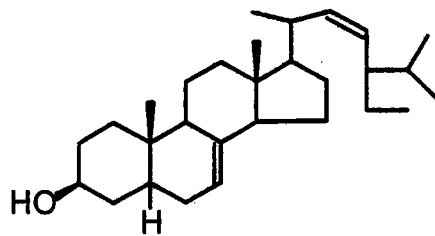


Alpha = $-R_1 + R_2 = CH_3$
 Gamma = $-R_1 = H, R_2 = CH_3$
 Delta = $-R_1 + R_2 = H$

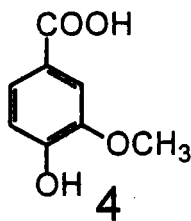
1



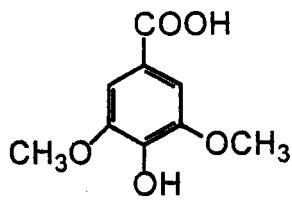
2



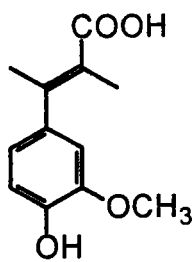
3



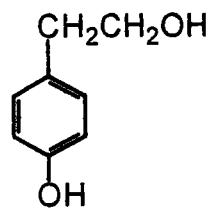
4



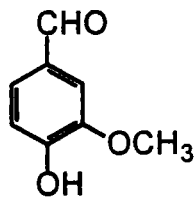
5



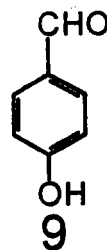
6



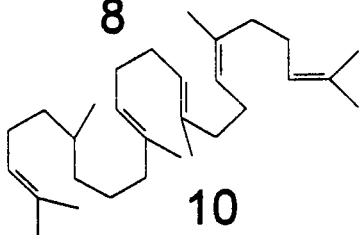
7



8



9



10

Figure 90: Structures identifiées dans ce chapitre dans l'huile d'argan

1. Tocophérols, 2. schottenol, 3. spinasterol, 4. acide vanillique, 5. acide syringique, 6. acide ferulique, 7. tyrosol, 8. vanilline, 9. acide p-hydroxybenzoïque, 10. squalène

CHAPITRE VI- RECHERCHES DES ACTIVITES ANTIRADICALAIRES

VI-1- Introduction

Durant la lipoperoxydation, les antioxydants agissent par différentes voies en se liant aux ions métalliques et en jouant le rôle d'éboueurs de radicaux libres. Ils interviennent donc dans la décomposition des peroxydes. Toutefois *in vivo*, les radicaux libres formés peuvent endommager les biomolécules tels que l'ADN et les protéines surtout membranaires.

Le pouvoir antioxydant dépend de plusieurs facteurs au titre desquels la structure du milieu joue un rôle important. Dans les systèmes aqueux, l'appariement de l'électron libre du radical α,α' -dipicrylphenylhydrazine ou DPPH fait intervenir une coloration du violet au jaune et renseigne sur la présence de molécules donneurs d'hydrogène dans les milieux testés. Dans le cas du modèle exploitant le dynamisme de l'activité de la xanthine oxidase, (modèle étudié dans ce travail), les substances testées renseignent sur un pouvoir antioxydant préventif. En système lipidique, la méthode d'oxygène actif ou AOM (Actif Oxygen Method) est communément la plus pratiquée, cette dernière méthode est utilisée dans le cas des huiles végétales et au cours de laquelle on détermine les valeurs de Vp, DC et p-Av que nous avons étudiées pendant ce travail (Chapitre V). On peut citer également, en émulsion aqueuse, les tests du β -Carotène, TBARS, Krebs.... Etc. qui sont souvent utilisés.

Nous nous sommes fixés pour objectif dans ce chapitre, de rechercher les activités antioxydantes et antiradicalaires des extraits méthanoliques des plantes congolaises étudiées. Nous nous sommes fixés également l'objectif de doser l'activité antioxydante d'extraits méthanoliques de l'huile d'argan et aussi de sa fraction insaponifiable dite Farsap et de ses différents phénols pris isolément et qui sont identifiés dans ce travail. Ceci permet de confirmer ou d'infirmer les vertus thérapeutiques et cosmétiques de cette huile. L'huile d'argan est une huile type oléique-linoléique et l'existence d'une concentration non négligeable d'acide linoléique (acide gras poly-insaturé), rend l'hypothèse de sa faible résistance à l'oxydation par rapport à d'autres huiles végétales. Or l'expérimentation nous a montré que sa capacité de résistance est relativement marquée même si elle reste toujours inférieure à celle de l'huile d'olive, en effet nous avons démontré que sa période d'induction se situe aux alentours de 3 jours. Pour l'huile d'olive, la période d'induction à la température de 63,5 °C a été évalué par Yan *et al.*, 1998 à 4 jours.

Pour étudier ces activités antiradicalaires, plusieurs systèmes sont possibles comme nous l'avons déjà mentionné, en effet un composé peut être antioxydant dans un système et pro-oxydant dans un autre. Les types de réactions et d'antioxydants sont variables.

VI-2- Méthode de l'Estimation des TBARS

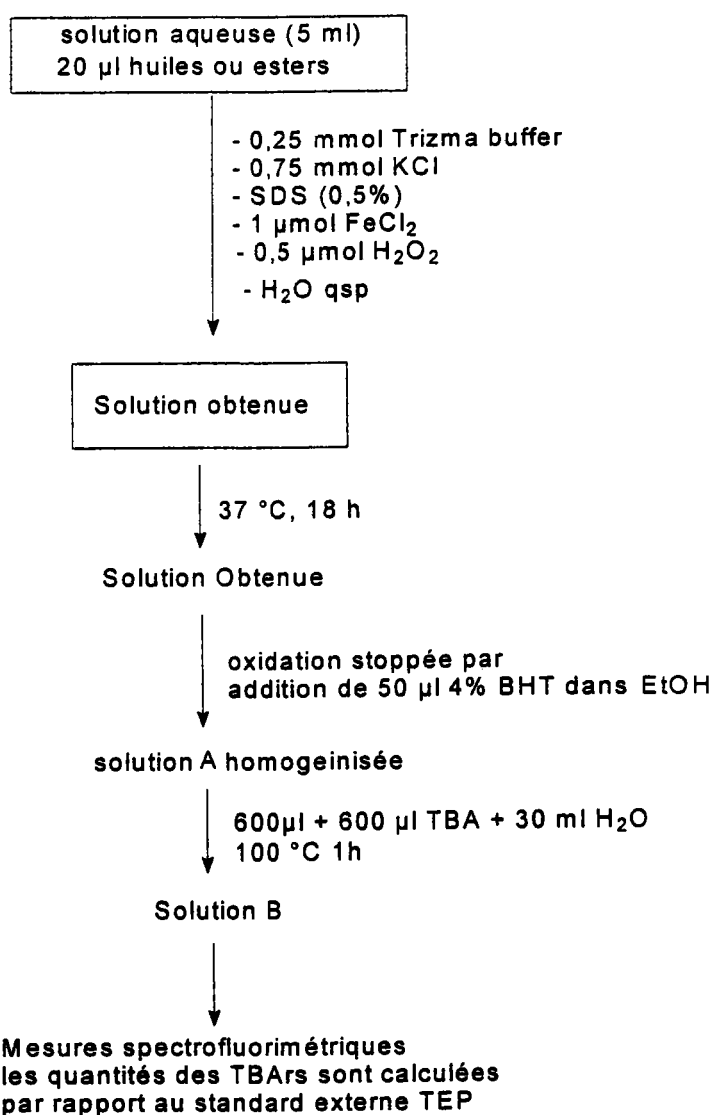
Dans ce paragraphe, nous avons développé une méthode pour la détermination de la peroxydation lipidique dans les huiles et en particulier l'huile d'argan. La méthode est inspirée de la mesure des TBARS, dosés par spectrofluorimétrie selon le procédé de Wasowicz *et al.*, 1993, alors que le milieu dispersé et dans lequel évolue les produits d'oxydation est celui préconisé par Nishiyama *et al.*, 1994, ce milieu ainsi que la détection spectrofluorimétrique sont détaillés dans la partie "Matériels et Méthodes". Brièvement, nous avons préparé six solutions aqueuses en triplicat de 5 ml de volume final chacune. Ces solutions contiennent respectivement 20 µl de l'huile esthétique, huile alimentaire, acide linoléique et son ester, l'ester linoléique en plus de l'ester arachidonique et évoluant chacune dans le milieu susmentionné (schéma 6). Ensuite ces solutions subissent une peroxydation durant 18 h, à 37 °C en présence ou sans le réactif de Fenton, 600 µl de chaque milieu réactionnel sont additionnés à 600 µl d'une solution TBA (Acide thiobarbiturique) préparée à partir de (TBA 14,5 mM ; Acide acétique 8,75 M) et 30 µl H₂O. Après des essais temps, la réaction de condensation a nécessité une heure à 100 °C, respectée souvent par plusieurs auteurs, en effet la formation de l'adduit appréciée par la fluorescence se révèle plus concentrée et plus stable après 1 heure. L'adduit de MDA-TBA absorbe à 532 nm et émet à 553 nm mais dans nos conditions, l'adduit de MDA absorbe à 526 nm et émet à 541 nm. Le chauffage, le temps de réaction et le pH du milieu peuvent être la cause d'une surestimation des TBARS dans ce cas. Dans notre cas, nous avons travaillé dans un milieu de pH égale à 7,4.

Les fluorescences obtenues sont rapportées, plus elles sont grandes, plus l'appareil est sensible et les valeurs sont rapprochées.

La courbe de calibration a été obtenue en faisant agir 30 µl du mélange tetraethoxypropane (TEP, 10⁻⁵ M ±vH₂O) + 600 µL H₂O + 600 µL d'acide thiobarbiturique (TBA) (6 points en double correspondants à des concentrations allant de 0 à 100 ng/ml ont été choisis), une très bonne corrélation a été trouvée en suivant la fluorescence en fonction de la concentration de l'adduit ($r^2 = 0.9936$, $y = 0,3532x + 3,8016$) (figure 91).

Sur l'histogramme (figure 92) sont ainsi présentées, les valeurs de la peroxydation des différents substrats utilisés en présence du réactif de Fenton, en l'occurrence, les quantités

des TBARS formées à partir de l'acide linoléique et son ester éthylique ainsi que l'ester linoléique et l'ester arachidonique. Enfin, dans les mêmes conditions, l'huile d'argan esthétique et l'huile d'argan alimentaire subissent la même réaction et les résultats indiquent que par rapport à la même quantité (20 µl du corps gras), l'huile d'argan (les deux formes) se retrouvent moins sensibles par rapport aux acides ou aux esters d'acides gras étudiés. Les valeurs des TBARS calculées à partir de l'huile d'argan sont retrouvées égales à 34 ± 5 ng/µl. D'après ce qui précède, il semble évident que les résultats obtenus dépendent fortement des paramètres expérimentaux. Pour améliorer la reproductibilité de cette méthode, il nous a semblé qu'une commande stricte des paramètres expérimentaux tels que la synchronisation de la réaction et la température doivent être soigneusement contrôlés.



Le blanc est constitué avec la même solution B en absence du réactif de Fenton

Schéma 6 : Protocole expérimental de peroxydation des corps gras en utilisant le réactif de Fenton

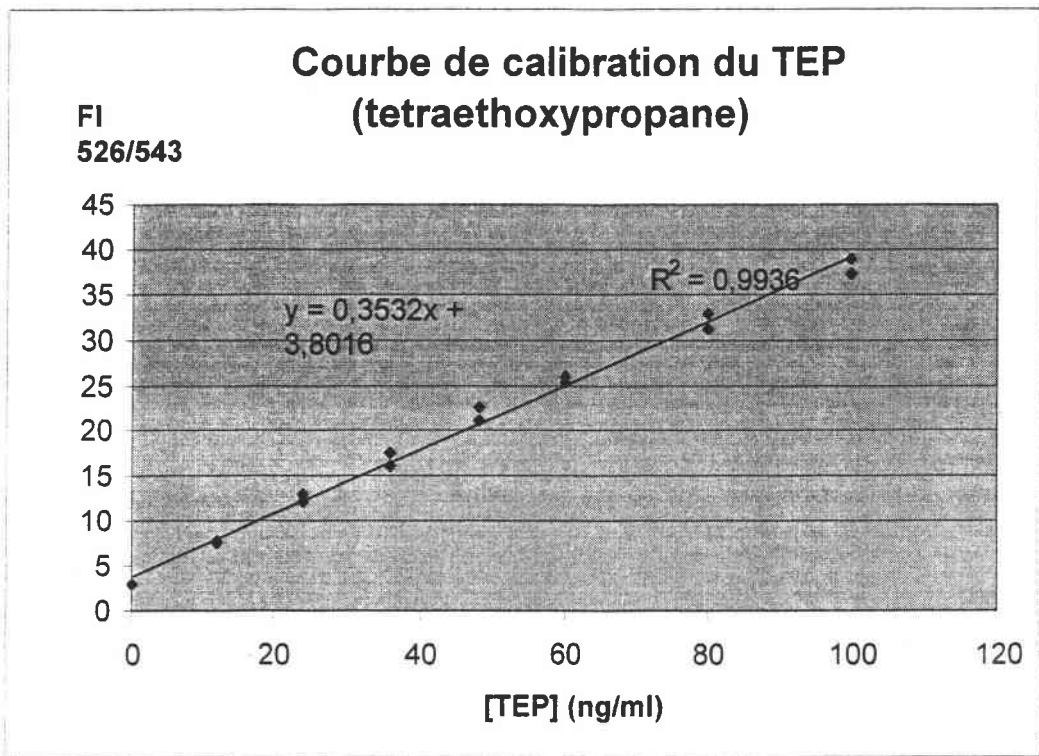


Figure 91: courbe standard (analyse en triplicat) du tetraethoxypropane

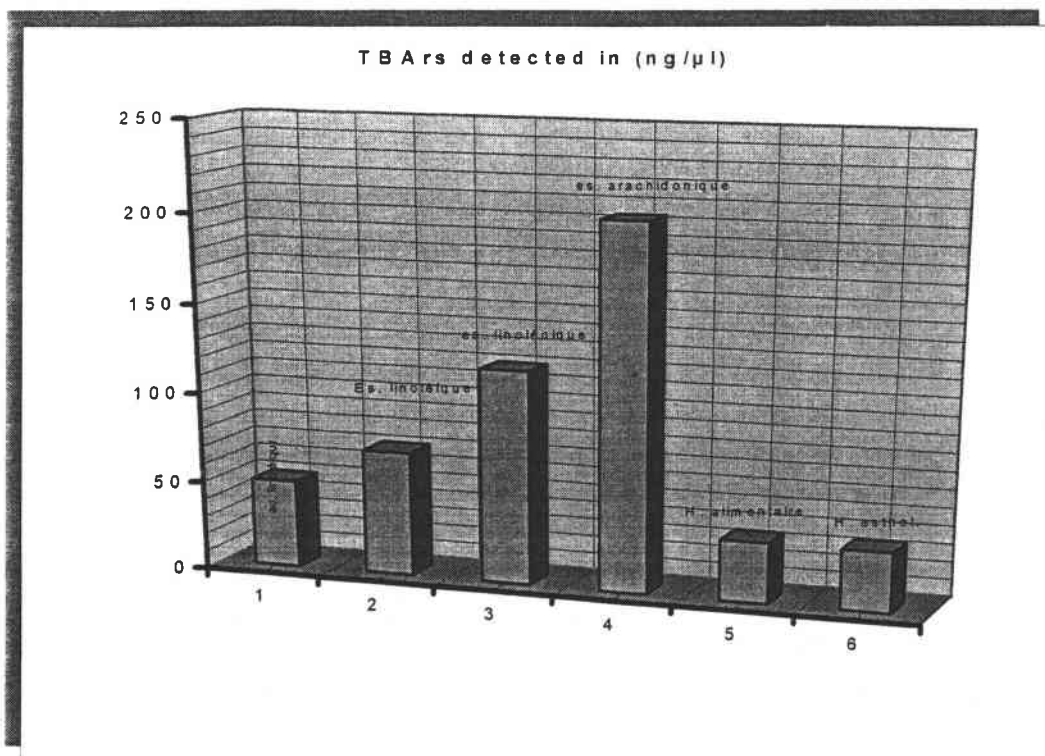


Figure 92: Estimation des TBArS par spectrofluorimétrie des différents corps gras étudiés

VI-3- Evaluation de l'activité antioxydante des phénols de l'huile d'*A. spinosa*, de l'extrait méthanolique d'*A. dichostyla* et d'*A. cuneata* en utilisant le modèle de la xanthine oxidase

VI-3-1- Principe et validation de la méthode

Malgré que l'oxygène soit essentiel pour la vie, il représente une substance toxique pour l'organisme, en effet il fait état de toxicité due à un excès de formation de superoxydes. Le système enzymatique hypoxanthine/xanthine oxidase (XO) est connu pour produire l'ion superoxyde et l'hydrogène peroxyde en présence d'oxygène. Ce système joue un rôle important dans le catabolisme des purines et est largement distribué dans les espèces (des bactéries à l'homme) et dans divers tissus de mammifères. La XO est une source importante de radicaux libres d'oxygène, en catalysant la formation des ions superoxydes O_2^- , elle s'implique dans la voie principale de conversion de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique libérant spécifiquement O_2^- .



Alors que plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour produire l'anion superoxyde, c'est le cas par exemple des réactions enzymatiques utilisées dans le domaine biochimique, le couple xanthine/xanthine oxidase constitue un système de choix performant en biochimie pour l'étude des réactions mettant en jeu l'anion superoxyde.

Notre expérience est conduite *in vitro* selon le procédé d'Owen *et al.*, 1996. Les mécanismes de production des radicaux hydroxyles sont décrits par la figure 93. Dans cette figure, le mécanisme global de la réaction proposée pour la xanthine oxidase incluant les étapes de conversion et/ou du catalyse des produits formés est élucidé.

Quand on inclut le fer dans ce système, l'ion superoxyde réduit le fer III en fer II et le fer II-chélaté réagit avec du peroxyde d'hydrogène pour produire le radical hydroxyle fortement réactif avec les biomolécules. L'approche la plus souhaitée est d'utiliser des molécules aromatiques telles que l'acide salicylique pour détecter ces radicaux hydroxyles. Dans notre modèle, les produits formés de l'attaque du radical hydroxyl sur l'acide salicylique incorporé dans le système sont l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque et 2,3-dihydroxybenzoïque acide obtenus dans le rapport 5:1.

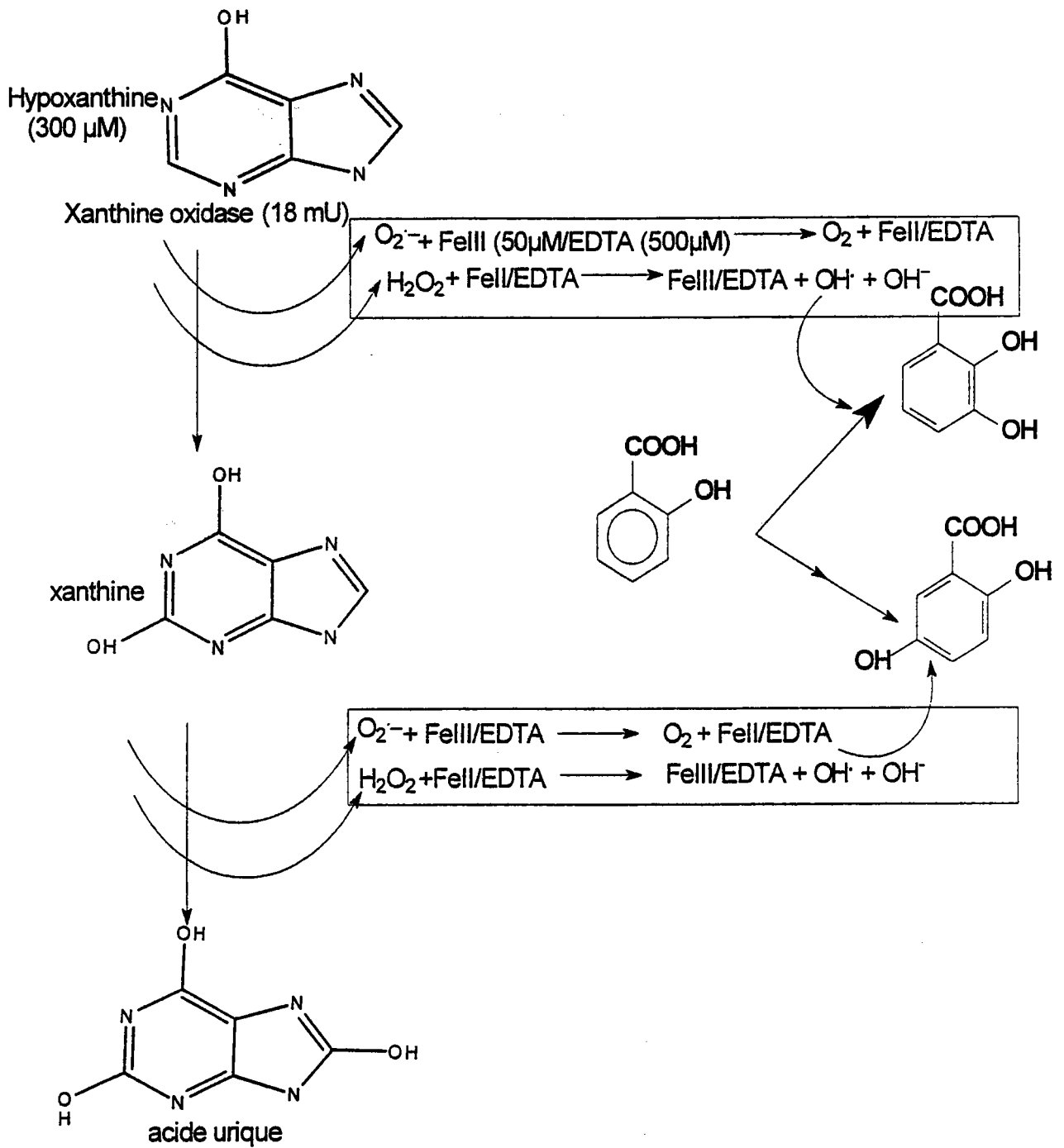


Figure 93: Figure illustrant les réactions de la génération des espèces réactives d'oxygène dans le système hypoxanthine/xanthine oxidase (Owen *et al.*, 1996)

Cette méthode a été déjà utilisée par Halliwell *et al.*, depuis 1978 et il a été démontré qu'en utilisant la colorimétrie, la détection des produits hydroxylés d'acide salicylique (utilisé comme précurseur d'hydroxylation) avait présenté différents inconvénients, que ce soit par rapport à la chimie de la réaction ou aussi par rapport à la sensibilité de la méthode. Notre approche était de relier la méthode de chromatographie ionique à haute performance (CLHP) à la quantification des produits d'hydroxylation dans le système hypoxanthine/xanthine oxidase.

Cette méthode CLHP semble être une méthode idéale pour suivre le dynamisme de l'hypoxanthine/xanthine oxidase et ainsi l'hydroxylation de l'acide salicylique et de l'hypoxanthine. Les conditions chromatographiques et les profils CLHP obtenus respectivement de l'acide salicylique et de ses produits d'hydroxylation, acide salicylique (22 min), acide 2,3-dihydroxy benzoïque (13,6 min) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (10,5 min) ainsi que celui de l'hypoxanthine et ses produits d'hydroxylation et leurs temps de rétention respectifs sont reproduits par nos soins et sont concomitants avec les résultats obtenus par Owen *et al.*, 1996. Ils sont par ailleurs présentées dans le chapitre II sous les paragraphes II-8-2 et II-5-3-3.

Alors que la détection à la longueur d'onde λ à 325 nm a été effectuée pour suivre l'hydroxylation de l'acide salicylique, l'hydroxylation de l'hypoxanthine et la formation de l'acide urique ont été suivies à $\lambda = 278$ nm.

Les courbes de calibration obtenues en duplicat après quantification des dérivés hydroxylés sans la présence d'antioxydants sont présentées par la figure 94.

Les aires des pics ont été enregistrées en fonction des concentrations des acides dihydroxybenzoïques et de l'acide urique entre 0 à 1000 μ M (5 points en double). Un exemple des résultats obtenus est détaillé dans ce qui suit pour l'extrait méthanolique d'*A. cuneata* (EMAC).

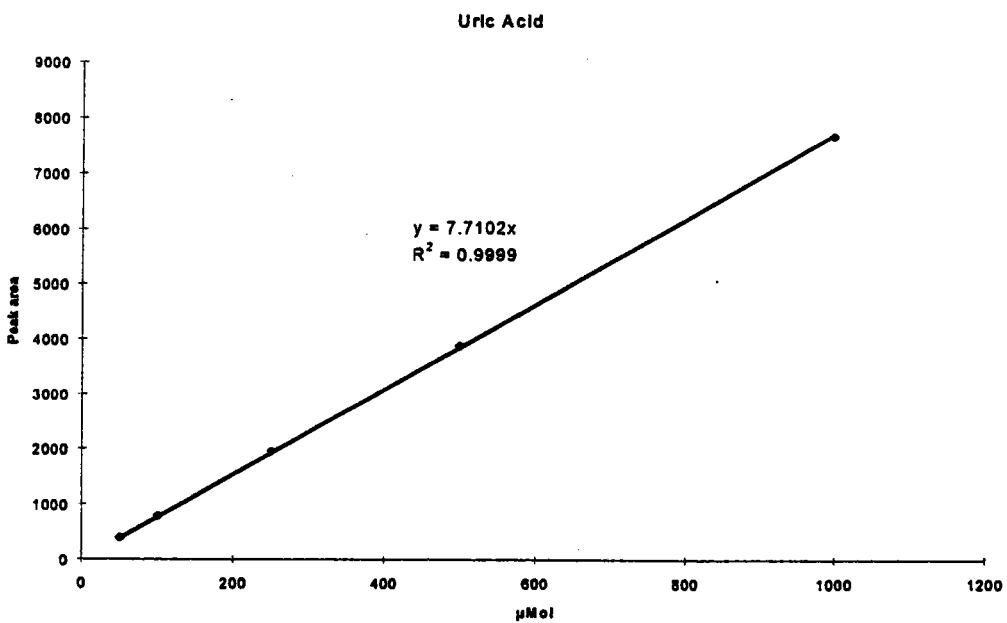
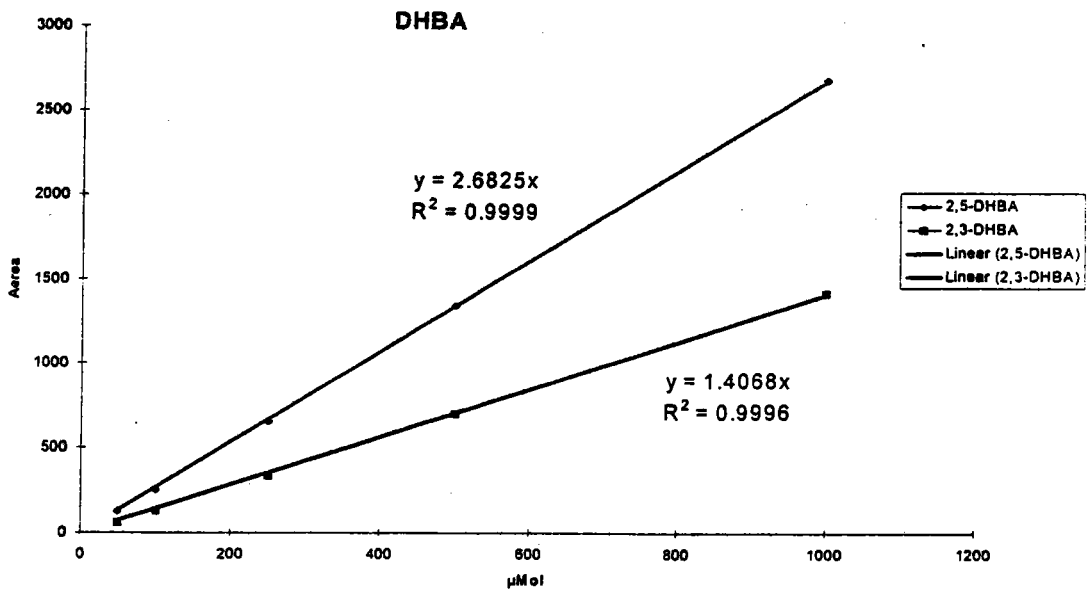


Figure 94: Courbes de calibration (analyse par CLHP en duplicat) des acides benzoïque (2,5-DHBA et 2,3-DHBA) et de l'acide urique

VI-3-2- Extrait d'*A. cuneata* Oliv.

Dans ce paragraphe, nous allons évaluer par la technique utilisant le dynamisme de la xanthine oxidase, le pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique d'*A. cuneata* (EMAC).

Les deux produits (2,3- ; 2,5-DHBA) issus de l'hydroxylation de l'acide salicylique sont quantifiés par étalonnage externe, dans les mêmes conditions en présence d'EMAC. Les volumes utilisés de cet extrait EMAC sont de 0-500 µl. Les produits finis de l'hydroxylation de l'acide salicylique ont été suivis à 325 nm.

Les résultats sont récapitulés dans le tableau 33. Dans ce tableau, la somme des aires des pics relative à l'acide- 2,3- et 2,5- dihydroxybenzoïque, ainsi que les concentrations calculées à partir des volumes testés et enfin les pourcentages d'inhibition sont rapportées.

L'inhibition de l'extrait méthanolique des écorces des racines d'*Annona cuneata* sur la formation des radicaux libres formés par le système xanthine oxidase est représentée dans la figure 95. Sur cette figure, l'extrait EMAC semble peu efficace et confirme ainsi les résultats précédents, en effet, son profil en matière de composés polyphénoliques est pauvre par rapport à l'extrait méthanolique d'*A. dichostyla* (EMAD) que nous étudierons aussi dans ce chapitre.

La figure 96 montre que l'extrait EMAC abaisse relativement le signal obtenu et la CI_{50} est calculée à 72 µl par la table utilisant le programme "Jendel Scientific Programm".

Tableau 33: Tableau récapitulatif donnant en µM les concentrations des acides benzoïques obtenus en fonction des volumes d'EMAC utilisés

Volume (µl)	Aire des pics (2,5-DHBA)	2,5-DHBA (µM)	Aire des pics (2,3-DHBA)	2,3-DHBA (µM)	DHBA (µM)	Moyenne DHBA (µM)	RSD	% DHBA
0	348	130	215	152	282	283	0,24	100
	355	132	212	150	283			
5	329	123	205	145	268	263	4,68	93
	321	120	196	139	259			
10	279	104	176	125	229	226	3,17	80
	281	105	166	118	223			
25	261	97	152	108	205	204	1,31	72
	254	95	152	108	203			
50	198	74	117	83	157	159	2,31	56
	199	74	123	87	161			
100	158	59	99	70	129	124	5,17	44
	136	51	96	68	119			
250	107	40	60	43	82	88	5,47	31
	104	39	77	55	93			
500	62	23	54	38	61	65	3,79	23
	88	33	51	36	69			

RSD : déviation standard relative

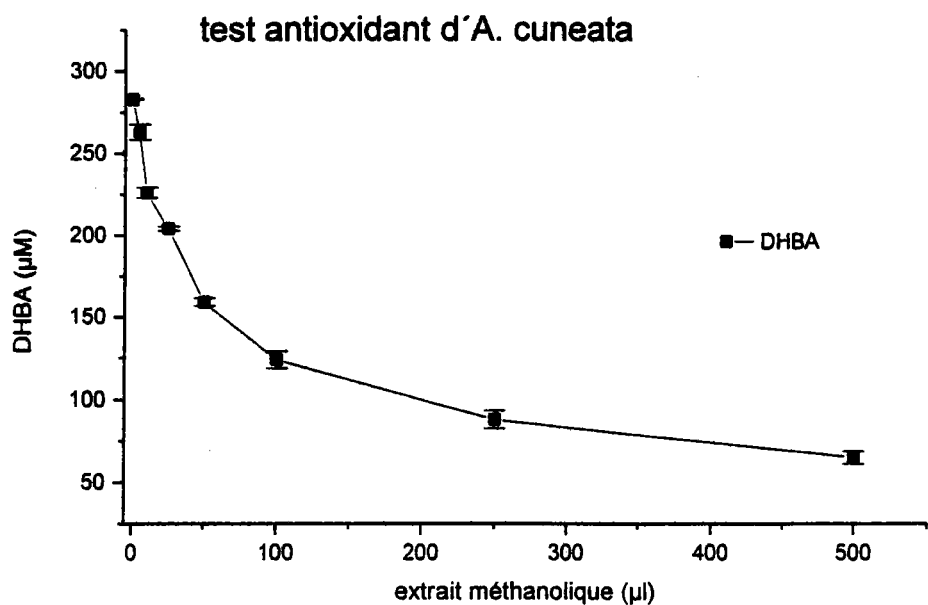


Figure 95: Inhibition de la xanthine oxydase par l'extrait méthanologique d'*Annona cuneata*.

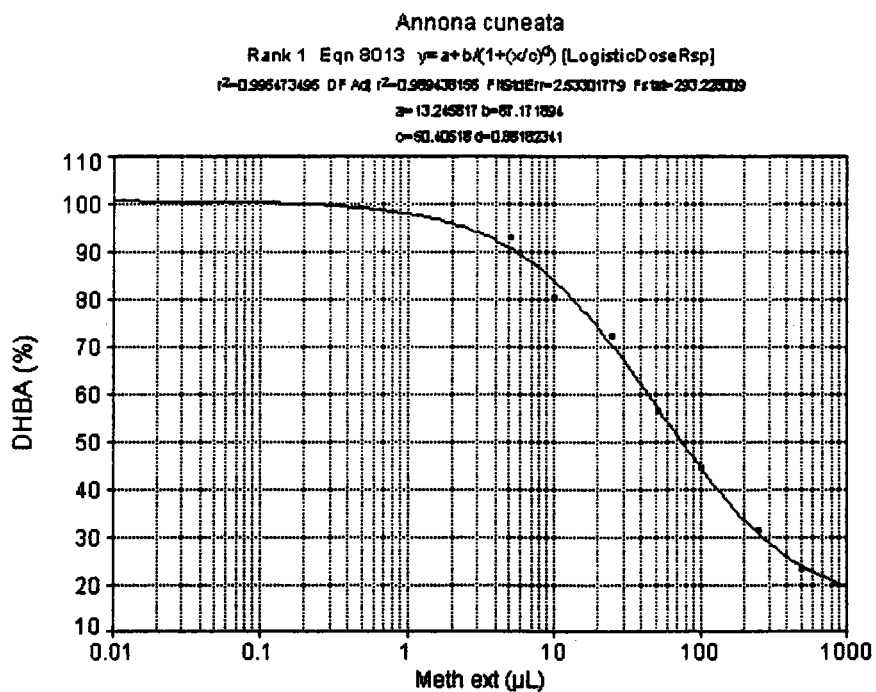


Figure 96: Signal montrant l'inhibition des espèces réactives d'oxygène dans le système HX/XO par EMAC ($IC_{50} = 72 \mu l$)

VI-3-3- Extrait méthanolique d'*Anisophyllea dichostyla*

La figure 97 représente l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique total d'*A. dichostyla* (EMAD) mesurée dans le système enzymatique HX/XOD et permettant de déterminer la capacité de cet extrait à piéger les radicaux libres $O_2^{\cdot -}$ générés par le système xanthine oxidase. Les volumes d'extrait méthanolique testés sont de 0 à 500 μ l. Nous distinguons immédiatement la forte capacité antioxydante de cet extrait méthanolique par rapport à celui d'*A. cuneata*.

Ces résultats indiquent que l'extrait EMAD démontre une excellente activité antiradicalaire et possède une CI_{50} faible de l'ordre de 46 μ l pour l'inhibition de la formation des acides, 2,5- et 2,3-dihydroxybenzoïque (DHBA) et de seulement 7,44 μ l pour inhiber de 50 % la formation de l'acide urique produit à partir de l'hydroxylation de l'hypoxanthine.

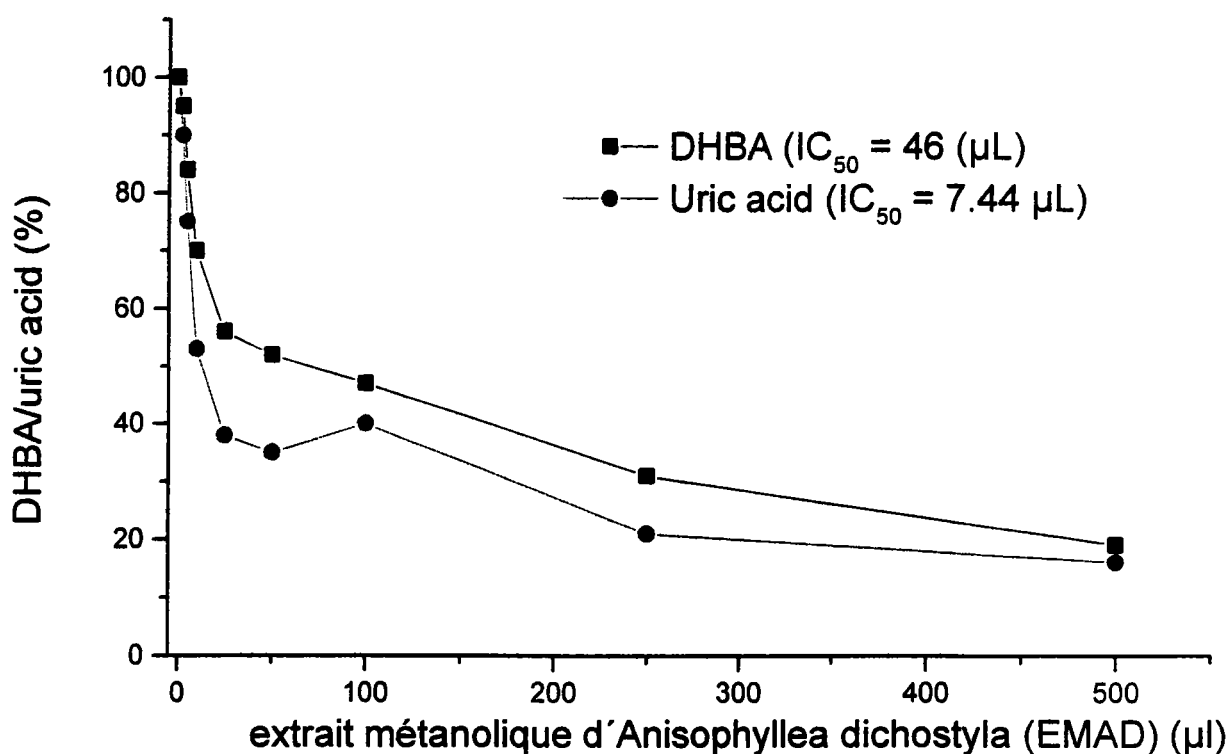


Figure 97: Inhibition de la xanthine oxidase par l'extrait méthanolique EMAD (en μ l) obtenu de l'écorce des racines d'*A. dichostyla*

VI-3-4- Extraits d'huile d'argan

L'évaluation basique du potentiel antioxydant des extraits méthanoliques des 3 formes de l'huile d'argan a été aussi étudiée par nos soins.

Avec ces 3 formes, l'activité antiradicalaire des extraits méthanoliques issus de l'huile d'olive extravierge, de l'huile de tournesol et des différents acides phénols qui ont été identifiés dans l'huile d'argan ont été aussi étudiés. Pour cette étude le témoin vitamine E sous une forme soluble (Trolox) a été utilisé.

La forme Trolox, n'est autre que la vitamine E, dont on a substitué la chaîne phytyle par un groupement carboxylique le rendant soluble dans le système aqueux tel que le nôtre.

Les résultats sont représentés sur la figure 98.

L'extrait méthanolique total, ainsi que chaque phénol détecté dans l'huile d'argan interviennent dans la production *in vitro* des espèces réactives d'oxygène et donc principalement contre l'anion superoxyde généré par le système hypoxanthine/xanthine oxidase utilisé.

Ces résultats démontrent que les extraits de l'huile d'argan alimentaire, et la variété commerciale sont plus antioxydants, que l'extrait méthanolique de l'huile esthétique, mais très clairement moins efficaces que l'extrait méthanolique de l'huile d'olive, toutefois, l'extrait méthanolique de l'huile d'argan est plus actif que l'extrait méthanolique à base de l'huile de tournesol.

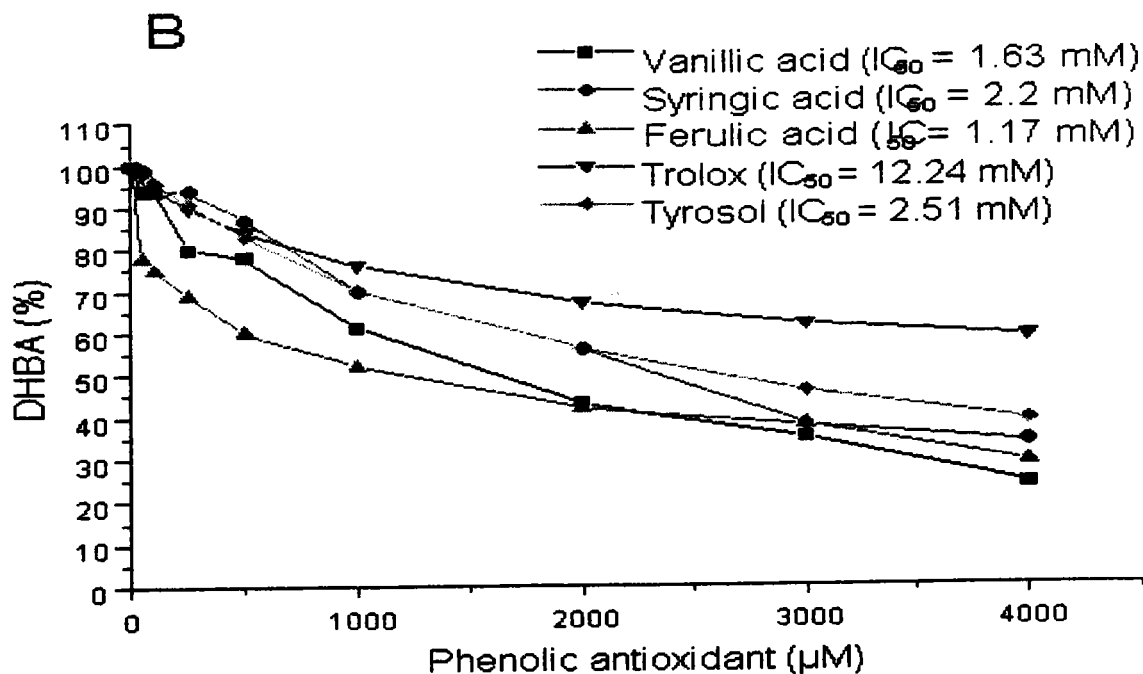
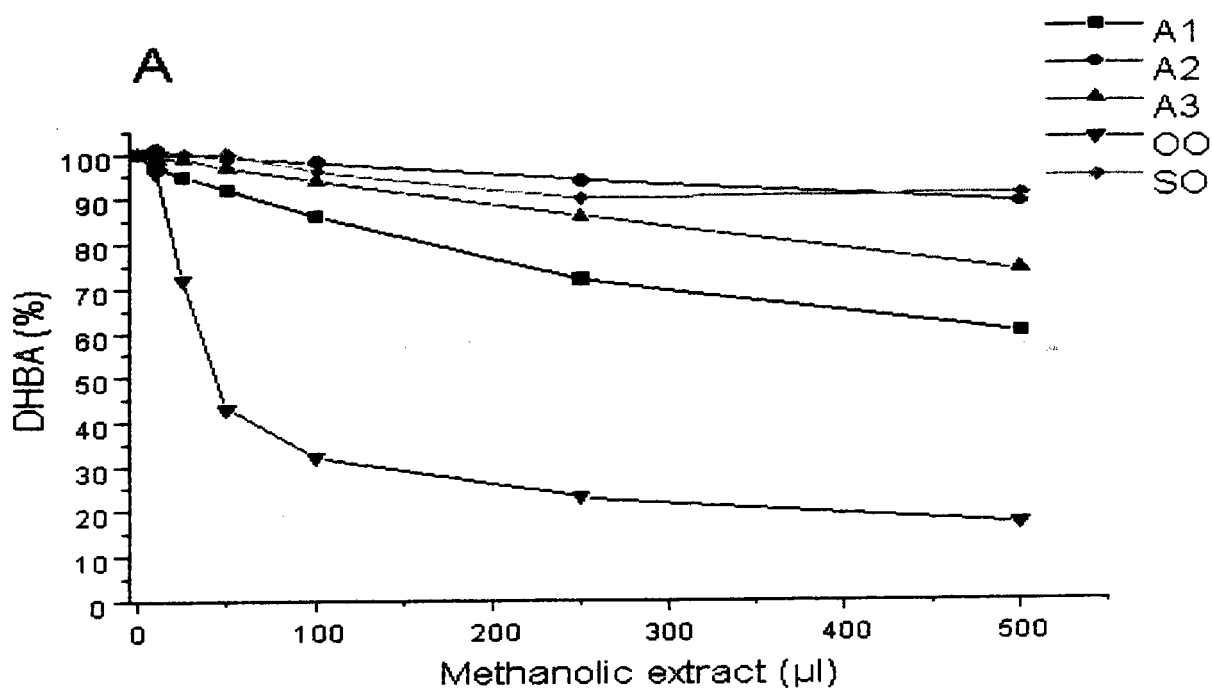
Les 4 phénols majoritaires détectés dans l'huile d'argan sont plus antioxydants que la forme Trolox, mais le potentiel antioxydant de l'extrait méthanolique total de l'huile d'argan ne semble pas corrélérer avec les différents phénols identifiés dans l'huile. (figure 98).

Les valeurs des CI_{50} décrivent cette situation et sont récapitulées dans le tableau 34.

Les CI_{50} calculées utilisant la table du modèle statistique "Jendel Scientific Programm" sont répertoriées dans le tableau 34. Comparées ainsi à celle du Trolox, elles sont respectivement pour le tyrosol, l'acide vanillique, l'acide syringique et l'acide ferulique et enfin le trolox égales à 2,51; 1,63 ; 2,2 ; 1,17 ; 12,24 mM. Ce qui permet de classer les différents acides phénols par ordre d'activité décroissante suivante : acide ferulique > acide vanillique > acide syringique > tyrosol > trolox. L'effet réduit de l'acide vanillique par rapport à l'acide ferulique semble être justifié. En effet l'absence du noyau hydroxycinnamique limite l'activité antiradicalaire.

La synergie et l'additivité des activités antiradicalaires des différents acides phénols identifiés n'ont pas été observées dans notre cas. Nous avons effectué et étudié l'activité

antiradicalaire de l'acide vanillique, syringique, ferulique plus le tyrosol afin d'évaluer aussi leur potentiel contre les radicaux hydroxyles dans le système hypoxanthine/xanthine oxydase.



Figures 98: Détection de l'atténuation des espèces réactives d'oxygène par A: les différents extraits méthanoliques des huiles étudiées: A₁. Argan alimentaire, A₂. Argan esthétique, A₃. Argan commerciale, OO. Huile d'olive, SO. Huile de tournesol, B: les différents acides phénols majoritaires détectés dans l'huile d'argan. Le TROLOX a été utilisé comme antioxydant témoin dans cette étude

Tableau 34: Concentration inhibitrice des acides phénols individuels de l'attaque des ROS sur l'acide salicylique dans le modèle *in vitro* hypoxanthine/xanthine oxidase

Composés phénoliques	CI ₅₀ (mM)
Tyrosol	2,51
Acide vanillique	1,63
Acide syringique	2,2
Acide ferulique	1,17
Trolox	12,24

VI-4- Evaluation de l'activité antioxydante de la fraction Farsap en utilisant le modèle (β -Carotène-acide linoléique)

La réaction des composés organiques avec l'oxygène de l'air est un processus chimique important. Dans le cas des huiles, les oxydations se déclarent au niveau des doubles liaisons lipidiques. La facilité avec laquelle une huile s'oxyde dépend du nombre d'insaturation et de leurs réarrangements. A degrés d'insaturations égales, les huiles végétales sont plus stables que les huiles d'origine animale, ceci est dû à la présence dans les premiers des produits antioxydants en qualités supérieures.

En général, deux mécanismes existent pour définir les réactions non enzymatiques entre l'oxygène et les acides gras insaturés. Il s'agit de l'autoxydation et l'oxydation photochimique sensibilisée, le premier a été plus abondamment décrit car il se déroule dans des systèmes purement chimiques alors que le deuxième nécessite l'intervention d'un initiateur qui est souvent une molécule biologique.

Avant que l'oxygène et l'acide gras n'interagissent, l'un des deux doit être activé :

Soit le composé oléfinique est convertit en radical allylique stabilisé par résonance, c'est le cas de l'autoxydation.

Soit l'oxygène est élevé à l'état singulet, plus réactif, c'est le cas de la photosensibilisation. Alors que la photosensibilisation est un phénomène rapide, ne nécessitant ni formation de radicaux libres ni période d'induction, l'autoxydation est régit par un mécanisme radicalaire procédant en 3 étapes : Une initiation, une propagation et enfin la terminaison. Nous avons opté pour le choix cette dernière méthode pour l'évaluation de l'activité

antioxydante des extraits de l'huile d'argan et plus particulièrement, sa fraction insaponifiable que nous nommons désormais Farsap.

Sur le plan pratique, le dosage a été réalisé par mesure de la densité optique de solutions à 100 mg/l d'extraits méthanoliques de l'huile esthétique et alimentaire, des huiles entières ainsi que de la fraction Farsap de l'huile d'argan. Le temps de dosage est estimé à 120 mn. La lecture des densités optiques a été faite toutes les 15 mn.

Cette méthode comporte la préparation de β -carotène, l'acide linoléique et l'extrait à doser dans une émulsion aqueuse enrichie d'oxygène et placée dans un bain thermostaté à 50 °C. Ces conditions correspondent à des conditions optimales de température, d'oxygène et de lumière favorisant l'oxydation de l'acide linoléique et accélérant la production des produits d'oxydation réactifs et par conséquent la réaction de décoloration du β -carotène.

Les courbes donnant la densité optique en fonction du temps pour les extraits sont représentées sur la figure 99. Des essais préliminaires sur un antioxydant modèle (α -tocophérol) ont été effectués pour vérifier la répétabilité de la méthode. La répétabilité a été calculée à 4,8 % par rapport à 15 essais utilisant 20 mg/l d' α -tocophérol. Un tube témoin sans antioxydant est aussi préparé dans les mêmes conditions.

Ces essais nous ont permis d'estimer le temps total du dosage à 100 mn, temps au bout duquel nous ne notons plus d'évolution significative de la valeur de la densité optique (DO), néanmoins, les DO à 120 mn ont été aussi enregistrées.

Avec la fraction Farsap, nous avons rencontré un problème lié à la solubilité dans l'émulsion aqueuse, cependant la concentration de 100 mg/l de Farsap est à la fois soluble dans le méthanol que dans le milieu réactionnel. Le méthanol, en effet, ne pose pas de problème par rapport au milieu dispersé utilisé (Acide linoléique-Eau-Tween 40).

Nous avons également rapporté la courbe de densité optique en fonction du temps, correspondant à une solution témoin sans antioxydant, ainsi que celle d' α -tocophérol (TOC) que nous avons fixée arbitrairement à 20 mg/l.

La figure 99 montre une série de courbes régulières dont les allures reflètent le pouvoir antioxydant de chacun des extraits et il est possible de classer les produits sans ambiguïté selon leurs activités antioxydantes ou leurs coefficients d'activité (la méthode de calcul est décrite dans Matériels et Méthodes).

Nous avons observé sur cette figure, 3 types de courbes d'allures différentes.

La première série de courbes se situe juste au niveau de la courbes représentant l' α -tocophérol soit juste au-dessous. Ces courbes correspondent à des extraits présentant une

activité antioxydante élevée à la concentration à laquelle nous avons travaillé, de plus nous avons remarqué une stabilité de la décoloration du carotène à partir de 60 min et ce jusqu'à la fin du dosage.

La deuxième série de courbes correspond à des courbes qui déclinent plus rapidement, ce qui traduit une activité plus faible.

Enfin le contrôle et les huiles entières correspondent à une absence d'activité antioxydante.

Nos résultats appellent à quelques commentaires :

L'huile d'argan esthétique et alimentaire ne manifeste pas une activité antioxydante (HE, HA respectivement dans la figure 99, mais, ses extraits Farsap et phénoliques (EMHC, EMHA respectivement de la variété commerciale et alimentaire) représentent des fractions antioxydantes. Ceci est jugé par l'inhibition significative de la décoloration du β -carotène suivie par spectrophotométrie UV à 470 nm.

Pour classer les différents extraits selon leurs pouvoirs antioxydants, nous avons établi à partir des courbes une échelle d'activité antioxydante attribuant pour chaque extrait un coefficient d'activité dont les valeurs sont déterminées et colligées dans le tableau 35, et implique le classement par ordre d'activité décroissante suivant : Farsap > TOC > EMHA > EMHE.

Farsap de l'huile alimentaire a manifesté une activité plus importante que l'extrait méthanolique de l'huile à 100 mg/l. L'extrait méthanolique, quoiqu'il présente une activité antioxydante relativement marquée, semble contenir de faibles concentrations en composés phénoliques dérivés d'acide cinnamique, à l'exception d'acide ferulique qui est le composé majoritaire dans cette fraction méthanolique.

Cependant, après hydrolyse, l'extrait méthanolique présente une activité importante que celui de l'extrait méthanolique sans hydrolyse, en effet l'hydrolyse consiste à libérer les différents phénols rattachés aux sucres, et donc le pouvoir réducteur des différents produits augmente pour piéger les différents radicaux libres formés ce qui est très probablement le cas puisque l'acide ferulique a été identifié après hydrolyse suggérant ainsi sa glycosylation.

La fraction Farsap susceptible de contenir un taux élevé d'antioxydant parmi lesquels le γ -tocophérol est le composé qui justifie de par ses propriétés pharmacologiques plus intéressantes que la forme alpha, et valorise ainsi l'endémicité et le pouvoir bénéfique de l'huile d'argan pour son utilisation alimentaire et cosmétique. Dans notre étude la fraction dite Farsap surpasse l' α -tocophérol en terme d'activité antioxydante et pourrait donc offrir

une alternative faisable quant à la commercialisation de cette fraction comme antioxydant alimentaire.

Tableau 35: paramètres utilisés pour l'étude des propriétés antioxydantes des extraits de l'huile d'argan en utilisant le modèle du β -carotène-acide linoléique
 Farsap est le plus actif dans l'ensemble ($p < 0,05$) par rapport l' α -tocophérol

Echantillons	Paramètres		
	A _A (%)	R _{OR}	C _{AA}
Contrôle	0,00	1,0000	0
EMHA ^a	38,50	0,0046	126,90
EMHE ^b	52,00	0,0059	470,10
Farsap	88,50	0,0011	706,60
Tocophérol	79,18	0,0020	486,68

^a : extrait méthanolique de l'huile alimentaire après hydrolyse, ^b : extrait méthanolique de l'huile esthétique après hydrolyse

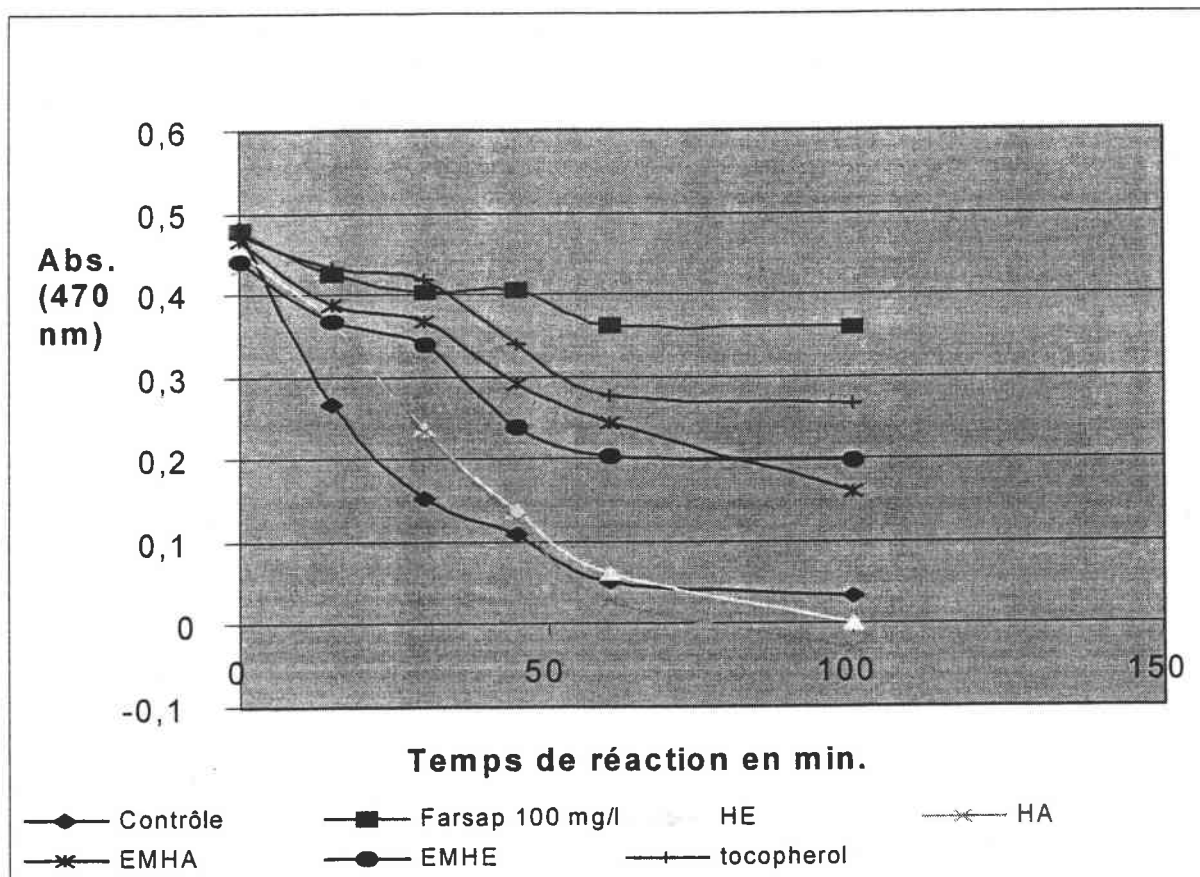


Figure 99: Courbes de densités optiques en fonction du temps indiquant la décoloration des carotènes en présence ou sans antioxydants issue de l'huile d'argan
 HE : Huile Esthétique ; HA : Huile alimentaire ; EMHA : Extrait méthanolique de l'huile alimentaire ; EMHE : Extrait méthanolique de l'huile esthétique ; Farsap

VI-5- Etude de la toxicité aiguë de l'huile d'argan

Les animaux, répartis en 4 lots de 10 souris chacun, reçoivent par voie orale un traitement d'huile. Les témoins reçoivent seulement l'eau distillée pure dans les mêmes conditions. Le volume administré est respectivement: 0, 50, 100 et 150 ml/kg. Immédiatement après le gavage gastrique à l'aide des volumes choisis de l'huile d'argan, les souris ont été placées dans des cages individuelles avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Une demi-heure après le traitement, le comportement de l'animal (activité locomotrice, caractère, démarche...), son aspect extérieur (peau, les yeux, fourrure...) ainsi que les fonctions (respiration, selles, et urines) sont enregistrés. Aucune mortalité n'a été comptabilisée durant nos expériences pour les 4 doses utilisées. Les animaux ont été observés et pesés toutes les heures, après 4 heures, 1 jour, 2 jours et jusqu'au 7^{ème} jour.

Pour Chaque lot, nous avons comparé les observations faites sur les animaux traités par rapport au lot témoin.

Les résultats ont montré que l'huile d'argan administrée par voie orale, aux doses de 50 à 150 ml/kg, ne présente aucun effet indésirable. La seule constatation pouvant être relevée, concerne l'activité motrice qui diminue très visiblement pour les doses 100 et 150 ml/kg (durant les 15 premières minutes après l'injection).

Nous n'avons relevé aucune différence de poids pour les souris du lot traitées comparés au lot témoin durant 24 heures après le traitement.

Les toxicités aiguës de l'extrait aqueux d'*Anisophyllea dichostyla* et d'*Annona cuneata* ont été déjà réalisé par Konda *et al.*, 2000, résultats non encore publiés et n'ont montré à leurs tours aucun signe de toxicité aiguë sur les animaux.

VI-6- Conclusion

Dans ce chapitre, l'évaluation basique de l'activité antiradicalaire en utilisant le système Hypoxanthine/Xanthine Oxidase a été faite pour les différents extraits méthanoliques d'*A. cuneata*, d'*A. dichostyla* et ainsi que les extraits méthanoliques des différents formes de l'huile d'argan et enfin les composés phénoliques individuels présents dans l'huile d'argan. Nous avons observé en conséquence, un effet antioxydant remarquable de l'extrait méthanolique d'*A. dichostyla* ($CI_{50} = 7,4 \mu l$).

La fraction dite Farsap a été aussi étudiée par le modèle de décoloration du β -carotène et elle nous a permis aussi d'observer d'autres propriétés antioxydantes remarquables, avec un coefficient d'activité qui a atteint plus de 706.

Les différents phénols détectés dans l'huile ont montré un effet suppresseur majeur de l'activité de la xanthine oxydase même si nous n'avons pas observé d'effet de synergie ou d'additivité pour ces phénols identifiés. Or la xanthine oxydase est une enzyme qui intervient dans la carcinogénèse et on a montré que ses inhibiteurs ont un effet chimio-préventif sur les cellules cancéreuses (Owen *et al.*, 2000b).

L'huile d'argan contient un nombre de composés structurellement hétérogènes, présents à faibles concentrations. Ces substances en majorent la stabilité et sont bénéfiques pour la santé en prévenant des processus d'oxydation par les radicaux oxygènes. La présence de ces composés vient s'ajouter à la composition bénéfique de l'huile en acides gras de telle manière que l'on puisse recommander l'huile d'argan comme l'une des principales sources de matières grasses de l'alimentation quotidienne.

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique des écorces des racines d'*A. dichostyla* est mesurée vis-à-vis des espèces oxygénées telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et montre une activité antioxydante très prononcée, en effet cet extrait contient des dérivés d'acides éllagiques et des procyanidines, et démontre immédiatement sa forte capacité antiradicalaire par rapport aux autres extraits et produits purs isolés et testés dans ce travail.

Les composants mineurs de l'huile d'argan qui ont été évoqués plus haut ne se limitent pas à avoir des effets bénéfiques sur la santé : ils sont également importants pour la durée de conservation et la stabilité de l'huile d'argan. Des études ont montré, indépendamment les unes des autres, qu'il existe une forte corrélation entre la teneur de l'huile d'olive extravierge en composés phénoliques et sa stabilité (Baldioli *et al.*, 1996 Gutierrez *et al.*, 1999 et Apparicio *et al.*, 1999). Cette hypothèse est confirmée aussi dans ce travail puisque les extraits méthanoliques des écorces des racines d'*A. cuneata* et de l'huile d'*A. spinosa* ne semblent pas être très efficaces et cela est justifié par rapport à leurs compositions qualitatives et quantitatives comparées à celle d'*A. dichostyla*.

Les activités antioxydantes de la fraction Farsap et l'extrait EMAD sont bien établies et sont rigoureusement vérifiées, il nous appartient pour les confirmer d'étudier leurs comportements en milieu cellulaire pour se rapprocher des conditions *in vivo*. Ce travail fera l'objet des perspectives de ces recherches.

CHAPITRE VII : DISCUSSIONS ET CONCLUSION GENERALE

La médecine traditionnelle a longtemps été décrite comme désuète et inefficace face à une médecine moderne en plein essor. Actuellement, les chercheurs tendent à porter de l'importance aux traitements utilisés par ces peuples "primitifs" qui utilisent des cocktails de plantes pour guérir leurs maux (Haslam *et al.*, 1998). Une attention particulière a été donnée à des tribus provenant d'Amérique utilisant des plantes riches en polyphénols. Elles sont utilisées principalement en tant qu'anti-inflammatoires, digestifs, diurétiques et dans le traitement de l'hypertension artérielle. Des études ont montré des différences pharmacologiques en fonction de différentes classes de polyphénols (Xu *et al.*, 1994, Okuda *et al.*, 1999 et 2000). Il a été démontré que les peuples utilisant une alimentation riche en antioxydants sont moins exposés à certaines formes de cancer (Hertog *et al.*, 1999) ou à des maladies cardiovasculaires (Hertog *et al.*, 1993 ; Vinson *et al.*, 1995).

De ce fait, l'ingestion des polyphénols peut aider à la prévention de certaines maladies (Vinson *et al.*, 1995 ; Bohm *et al.*, 1998). Une étude épidémiologique dans divers pays a montré que la consommation du vin rouge qui contient des quantités importantes d'anthocyanes et de procyanidines pourrait être à l'origine d'une réduction du risque de mortalité due aux maladies cardio-vasculaires (Renaud *et al.*, 1992). Ces composés pourraient réduire les perturbations oxydatives variées qui aggravent les maladies chroniques et les états physiopathologiques comme par exemple l'infarctus et l'athérosclérose. Néanmoins, la question de la potentialité pharmacologique de ces constituants en tant que médicaments reste toujours soulevée. En effet, Spencer *et al.* en 1988, rapporte que les polyphénols consommés en quantité importante de manière quotidienne (50 à 100 mg/j) peuvent grâce à leur caractère polyphénolique interagir avec les protéines de surface des cellules, récepteurs, enzymes et de ce fait, être à l'origine d'activités non spécifiques sur de nombreux processus physiologiques. Par ailleurs, la plupart des polyphénols après administration orale, sont éliminés rapidement sous formes de dérivés conjugués. Cela signifie que la quantité de substance administrée *peros* doit être extrêmement élevée pour atteindre un niveau sanguin suffisant eu égard à la biodisponibilité. Les polyphénols et plus particulièrement les tannins ont la particularité de se complexer aux protéines et aux polysaccharides (Cheynier *et al.*, 1992 ; Haslam *et al.*, 1988). Ces composés possèdent une multitude de groupements hydroxyles, capables de former des liaisons hydrogènes avec plusieurs sites des protéines ou de polysaccharides. Si

ces molécules sont capables de se complexer avec les protéines, il est possible qu'ils puissent bloquer les sites actifs des enzymes, inhibant ainsi leur activité. Selon Haslam *et al.* en 1998, toutes les enzymes sont inhibées par les polyphénols *in vitro*.

Depuis 1980, on note une renaissance de l'intérêt des polyphénols dû aux énormes progrès dans le développement des méthodes de screening biologique utilisant des enzymes et des systèmes cellulaires. Ainsi qu'au nombre accru d'études *in vivo* et des études cliniques. Parmi les enzymes les plus intéressants affectés par les polyphénols, Middleton *et al.* en 1993 cite la protéine-kinase C, la protéine kinase dépendante de l'AMPcyclique, la cyclooxygénase, la lipoxygénase, l'enzyme de conversion de l'angiotensine, l'adénylate cyclase, la transcriptase inverse, la protéinase HIV I, et la topoisomérase.....

Les mastocytes, basophiles, neutrophiles, éosinophiles, plaquettes, macrophages, lymphocytes, cellules hépatiques, neurones et cellules cancéreuses figurent parmi les principaux types cellulaires modulés par les polyphénols.

Les travaux de Bors *et al.* en 1995 ont signalé l'effet antioxydant et piègeur de radicaux libres de ce groupe de métabolites. Des méthodes utilisées pour déterminer le pouvoir antioxydant d'une substance consistent à mesurer l'inhibition d'espèces radicalaires engendrées par la peroxydation lipidique enzymatique ou non enzymatique. D'autres méthodes utilisent la stimulation des phagocytes (leucocytes) qui libèrent des radicaux libres variés et l'inhibition est mesurée par la méthode de chimiluminescence. Des méthodes physico-chimiques comme la résonance paramagnétique électronique (RPE) permettent de mesurer le potentiel redox d'une substance. Une autre approche est la détermination de l'effet inhibiteur de la 5-lipoxygénase provenant de leucocytes de porc ou de préparations enzymatiques végétales. Les polyphénols ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'autoxydation (Okuda *et al.*, 1989, Teissedre *et al.*, 1996, Bohm *et al.*, 1998 ; Debra *et al.*, 2001). Si l'on considère des relations structures/activité, une moitié catéchol dans le noyau B, une fonction 4-céto avec une double liaison 2,3 et des groupes OH libres en position 3 et 5 sont des caractéristiques structurales pour une activité antioxydante optimale.

Les polyphénols préviennent l'initiation (ou la mutation) et la promotion(ou progression), deux phénomènes qui interviennent durant le processus de développement d'une tumeur carcinogénèse (le cas d'hydroxytyrosol est représenté par la figure 100), mais sans doute, ces métabolites ont aussi fait l'objet de nombreuses controverses. Une cinquantaine de

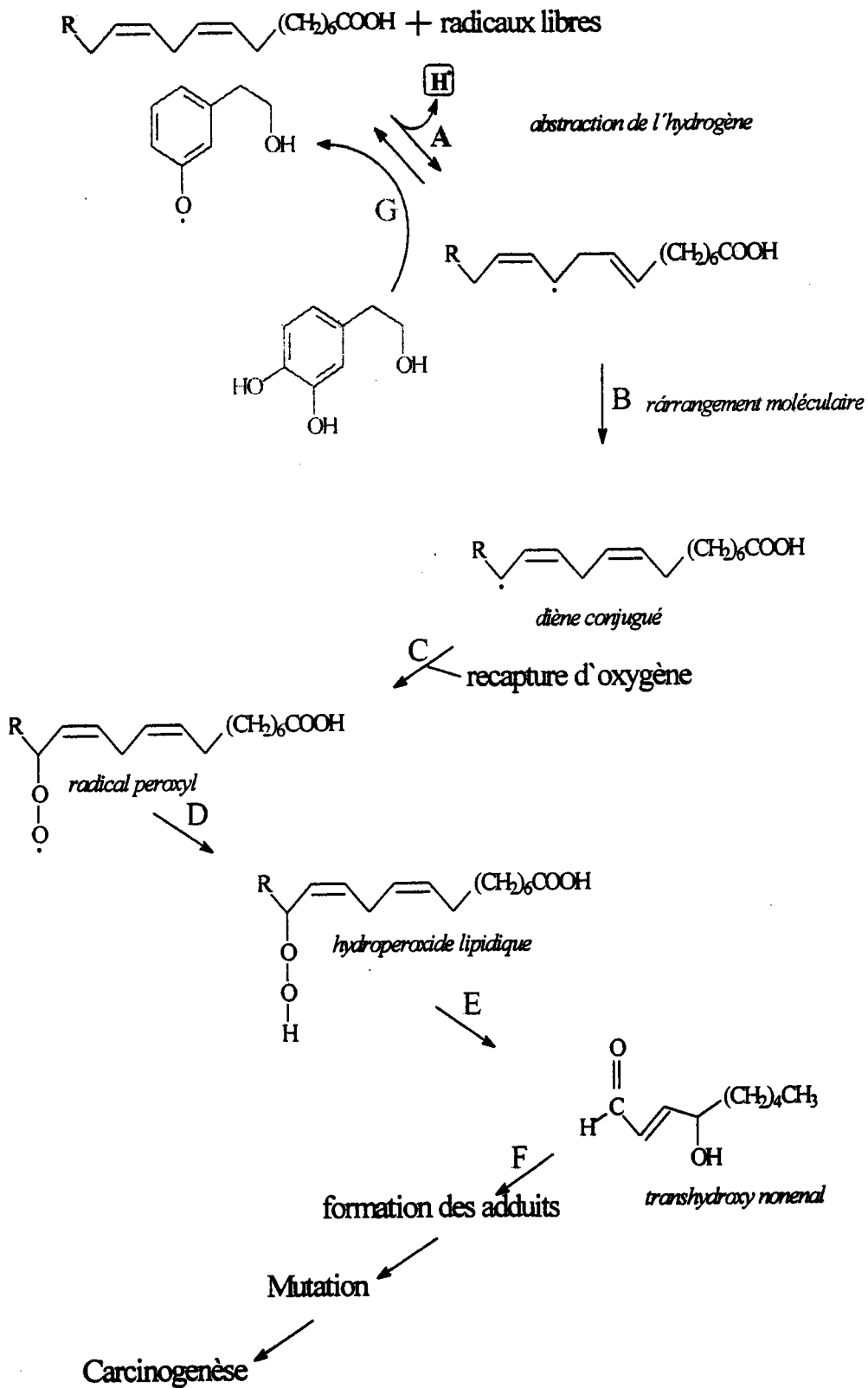


Figure 100: Voies proposées de la lipoperoxydation de l'acide linoléique et l'intervention des antioxydants polyphénoliques (cas de l'hydroxytyrosol).

flavonoïdes ont présenté une action mutagène principalement *in vitro* dont les plus actifs sont la myricétine et la quercétine (Shamon, 1994).

Le cancer, mais aussi l'athérosclérose, le vieillissement sont autant de processus vitaux affectés par les polyphénols. La chimio-prévention constitue donc un domaine d'intérêt largement exploité au cours des dernières années. L'effet biologique et pharmacologique des polyphénols est évalué principalement à l'aide de nouvelles techniques de pharmacologie, de biochimie et de biologie moléculaire (*in vivo* et *in vitro*). En outre, les thérapies utilisées dans le traitement des maladies sont souvent accompagnées d'effets secondaires aussi débilissants et même plus dans certains cas que les effets de la maladie elle-même. Les études montrent que les antioxydants naturels peuvent prévenir sinon soulager certaines formes de ces maladies. Des travaux, actuellement en cours, aussi bien que des futures recherches, apporteront des éléments supplémentaires sur le rôle spécifique des antioxydants naturels dans la prévention et le traitement des cancers par exemple sans effets secondaires.

Nous ne pouvons pas situer les effets chimio-préventifs des polyphénols sans décrire certaines autres activités physiologiques qui leurs sont aussi attribuées, notamment comme diurétiques (fleurs de genêt), antiulcères gastriques, anti-inflammatoires (racines de réglisse). Ceux-ci possèdent également des propriétés vitaminiques P agissant essentiellement sur l'insuffisance veineuse : diminution de la perméabilité et augmentation de la résistance des capillaires (Ikan *et al.*, 1969).

Concernant l'activité anti-inflammatoire, associée aux inhibiteurs de la cycloxygénase, les plus efficaces sont la galangine d'*Alpinia officinarum* avec une $CI_{50} = 5 \mu M$ (Indométacine : $CI_{50} = 1,15 \mu M$), la wogonine, une 8-méthoxyflavone de *Scutellaria baicalensis* ($CI_{50} = 5,6 \mu M$), la morusine, flavonoïdes prénylés de *Morus alba* ($IC_{50} = 10 \mu M$) et ensuite par activité décroissante quercétine, (+)catéchine, phlorétine, lutéoline et morine.

L'activité antihypertensive potentielle a été démontrée, le mécanisme fait intégrer de puissants inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Des glycosides procyanidiques de *Rhamnus lycioides* ont présenté des effets antihypertenseurs puissants chez le rat à la dose de 3 mg/Kg en I.V. voisins de ceux du captopril (20 $\mu g/Kg$ en I.V.) (Terrencio *et al.*, 1991).

A partir de *Carthamus tinctorius*, plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise dans le traitement des maladies cardio-vasculaires a été isolée la tinctoramine (glycoside de quinochalcone contenant un azote (Mesehly *et al.*, 1995). Cette molécule a montré, dans un

test utilisant une électrophysiologie sur des myocytes ventriculaires de chien, une inhibition sélective du courant calcique d'environ 42 % à une concentration de 10^{-5} M qui est proche de celle du dithiazem ($CI_{50} = 6.10^{-6}$ M).

Guenjev en 1977 a rapporté aussi les effets cardio-vasculaires et notamment la résistance capillaire, obtenue avec un mélange purifié de mono-C-glycosyl flavones et de leurs dérivés O-glycosylés extraits de feuilles de *Crataegus monagyna* jack (Rosaceae).

Nombreux sont aussi des flavonoïdes qui ont été évalués pour leurs actions antivirales, les virus impliqués dans les maladies respiratoires (virus coxsachie), les virus de l'hépatite B, de l'herpes simplex, de l'herpes génital et le virus HIV-1, sont parmi ceux ayant suscité le plus d'intérêt dans les études réalisées. Il a été montré par (Che *et al.*, 1991) que la catéchine présentait aussi des activités *in vivo* contre le virus de l'hépatite B et le virus de l'herpes simplex.

La plupart des composés destinés à inhiber les rétrovirus sont considérés comme des inhibiteurs de la transcriptase inverse. Parmi les composés testés par une équipe japonaise, flavones et flavonols ont présenté une forte activité anti-HIV-RT dose-dépendante avec une $CI_{50} < 0,5 \mu\text{g/ml}$ (Ono *et al.*, 1990).

Les boissons, légumes, fruits, huiles végétales sont les principales sources d'antioxydants naturels. Il a été démontré que le thé vert avait d'excellentes propriétés antioxydantes (Vinson *et al.*, 1995 ; Benzie *et al.*, 1999 ; Labenbrik *et al.*, 1999 ; Miketova *et al.*, 2000) dues d'une part, à ses catéchines qui ont la propriété de neutraliser les radicaux $\cdot\text{OH}$ et $\cdot\text{OOH}$ grâce à leur potentiel redox bas. Les catéchines sont aussi les polyphénols principaux et les plus significatifs dans le thé (Graham *et al.*, 1992). Une revue plus récente a suggéré que les effets bénéfiques du thé seraient reliés à une consommation élevée chez les populations à haut risque (Kohlmeier *et al.*, 1997). Cette hypothèse appuie les récentes conclusions que cette consommation serait associée à une diminution d'incidence de cancer du sein de stage I et II chez les femmes au Japon (Nakachi *et al.*, 1998).

Cette synthèse montre bien les effets inhibiteurs des polyphénols sur la formation des carcinogènes réactifs en bloquant certaines réactions d'oxydation produisant un ADN anormal. Ils inhibent par conséquent la formation d'un produit stable, le 8-hydroxy-désoxy-guanosine (8-OHDG), un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN.

D'autres études ont regardé d'autre part, le potentiel anticarcinogène de l'acide ellagique (2,3,7,8-tetrahydroxy[1]benzopyrano[5,4,3,-cde]benzopyran-5,10-dione), ce composé possède une place privilégiée et est souvent rencontré dans les fruits (Shahrzad *et al.*, 1996, Versari *et al.*, 1997). L'acide ellagique entre autres dérivés connus possède des vertus

chimio-protectrices (Gerhäuser *et al.*, 2003). L'acide ellagique est plus efficace que la quercétine. Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer son inhibition de la cancérogenèse. Les topoisomérases sont des enzymes entraînant des torsions de l'ADN pendant la réplication et la transcription, responsables du développement de la tumeur. La quercétine est antagoniste des topoisomérases I et II produites par les cellules tumorales. Sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses, la quercétine a induit l'apoptose (mort cellulaire programmée) dans des cellules tumorales, aboutissant à la fragmentation de leur noyau et à la condensation de la chromatine nucléaire. L'acide ellagique plus que la quercétine provoquait une augmentation significative du glutathion réduit et une diminution de la lipoperoxydation. L'acide ellagique s'est montré donc plus efficace, ce qui pourrait expliquer qu'il ait de meilleures propriétés anticarcinogènes que la quercétine (Khanduja *et al.*, 1999).

Nous avons focalisé ce travail sur la recherche des produits susceptibles de présenter une activité antiradicalaire en prospectant quelques arbustes médicinaux africains originaires du Maroc et du Congo. Après des screenings phytochimiques, les plantes ou parties de plantes renfermant des polyphénols ont fait l'objet d'étude d'activité antioxydante en exploitant la technique de la xanthine oxidase, une enzyme impliquée dans la carcinogenèse (Owen *et al.*, 1996, 2000b). Pour les composés lipophiles, le modèle chimique de l'acide linoléique et le β -carotène a été utilisé.

Les tannins condensés et les ellagitannins isolés dans ce travail à partir d'*A. dichostyla* représente une famille de flavonoïdes rares, mais sont aussi parmi les groupes de métabolites les plus antioxydants et les plus actifs biologiquement. Les ellagitannins ont démontré un large spectre d'activités antitumorales (Kashiwada *et al.*, 1992 ; 1993).

Les monomères condensés et plus particulièrement la catéchine ont démontré de très fortes activités antiradicalaires contre la peroxydation lipidique (Kondo *et al.*, 1999), ainsi que des effets protecteurs contre certaines maladies telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires (Hertog *et al.*, 1993).

L'effet protecteur de la catéchine est amplement décrit par Brown, 1980 et Ames, 1983 dans les plus prestigieuses revues scientifiques.

En outre les dérivés qui contiennent une structure galloylée, comme l'epicatéchine gallate qui est aussi isolée d'*A. dichostyla* ont déjà montré une très forte activité contre les anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) (Ricardo-dasilva *et al.*, 1991 ; Cheynier *et al.*, 1992 ; Potterat *et al.*, 1997 et Plumb *et al.*, 1998). La taille des proanthocyanidines polymériques joue aussi un rôle important. Les dimères, trimères et tetramères ont une activité antioxydante plus forte

que les oligomères de taille supérieure (Plumb *et al.*, 1998 ; Ursini *et al.*, 2001). Dans ce travail, des oligomères dimers et trimers de la catéchine et de l'épicatéchine ont été aussi identifiées.

Anisophyllea dichostyla est utilisée au Congo principalement contre l'anorexie. Les troubles cliniques tels que l'anorexie se manifestent surtout chez les femmes et sont associés à des conséquences médicales graves (Wiseman *et al.*, 1998). Le jeûne chronique qui caractérise l'anorexie peut mener à des anomalies endocriniennes, à l'ostéoporose, à l'hypotension, à l'hypothermie, à l'anémie et à une diminution de la croissance durant l'adolescence (Wiseman *et al.*, 1998). Parmi les problèmes psychologiques que doivent affronter les personnes souffrant de l'anorexie, mentionnons la dépression, une diminution de la libido, un sommeil perturbé et de l'irritabilité (Yager *et al.*, 1994). Dans d'autres travaux, les données biochimiques et symptomathologiques des bovins intoxiqués par les plantes sont bien connues, les auteurs ont associé cette intoxication à des tannins présents dans les glands des chênes et qui rendent souvent l'animal anorexique. Mais l'on ne sait pas encore si ces intoxications sont dues à la présence de tannins galliques ou de leurs métabolites (Savey *et al.*, 1985 ; Lorgue *et al.*, 1987).

Les différents tannins extraits, isolés, purifiés puis identifiés et confirmés dans *A. dichostyla*, dérivent de deux noyaux de tannins différents : l'acide gallique dimérisé (ou acide ellagique) : l'acide-3-O-méthyl ellagique, l'acide- 3,3'-di-O-méthyl ellagique, l'acide-3'-O-méthyl-3,4-méthylendioxy ellagique, l'acide ellagique 4-O-rhamnoside et l'acide-3'-O-méthyl ellagique- 4-O- β -D-xylopyranoside, l'acide-3'-O-méthyl-3,4-méthylendioxy-ellagique- 4-O- β -D-glucoside et des proanthocyanidines monomérique, telles que la catéchine, l'épicatéchine et l'épicatéchine gallate ainsi que les dérivés dimer et trimer qui sont aussi parmi les principaux constituants identifiés dans ce travail. Cette identification nous a permis de confirmer que les proanthocyanidines présentes dans *A. dichostyla* sont de la famille des procyanidines ainsi que de tannins ellagiques et non des tannins galliques présumés affaiblir et provoquer l'anorexie chez l'animal. Ces derniers se métabolisent par voie d'hydrolyse afin que la biogenèse des ellagitannins prenne place. La séparation chromatographique à basse pression des composés phénoliques d'*A. dichostyla*, nous avait fait apparaître d'autres structures se rattachant aux tannins condensés monomériques et oligomériques. De plus, nous avons aussi identifié une substance triterpénique se rattachant à l'acide bryonolique. La spectroscopie nous a permis d'avoir toutes les informations utiles sur cette molécule extrêmement rare dans la nature et rencontré spécialement dans la famille des cucurbitacées (Tabata *et al.*, 1993).

Akihisa *et al.*, 1994, ont démontré que l'acide bryonolique agit sur l'inflammation induite chimiquement. Il a été aussi rapporté que ce triterpène a induit une activité antiallergique supérieure à celle de l'acide glycyrrhétinique isolé de la réglisse. 600 mg/kg de l'acide bryonolique injectés par voie intrapéritonéale sur des rats ont démontré une hypersensibilité retardée et sensiblement absente également chez les souris contrairement à l'acide glycyrrhétinique.

En outre et contrairement à l'acide glycyrrhétinique, l'acide bryonolique n'a montré non seulement peu de toxicité mais aucun effet secondaire évident sur des souris sans altérer l'activité de leur enzyme hépatique (δ -4-oxidoreductase-4,5- β -dihydrocortisone) impliquée dans le catabolisme des stéroïdes (Tanaka *et al.*, 1991).

Mais, il reste à savoir, dans quelle mesure les composés polyphénoliques ou triterpéniques que l'on a isolés d'*A. dichostyla* peuvent contribuer pharmacologiquement contre l'anorexigène.

De cette plante, nous avons aussi quantifié tous les 16 produits isolés afin de pouvoir prendre connaissance de l'effet-dose de cette plante. L'épicatéchine étant le composé majoritaire.

Nous notons que dans *Anisophyllea dichostyla*, des dérivés de l'acide ellagique, méthoxylés et glycosylés sont aussi abondants.

En plus de ses vertus biologiques et pharmacologiques, l'acide ellagique est utilisé depuis 1996 comme antioxydant alimentaire au Japon (MHW, 1996). Donc la recherche de dérivés d'acide ellagique dans des ressources naturelles et le développement d'une méthode de leurs caractérisations qui soit sensible et optimale sont nécessaires.

Dans le cadre des études pharmacologiques antérieures (résultats de notre Laboratoire, non encore publiés), l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique d'*Anisophyllea dichostyla* a été testée sur des 22 souches microbiennes provenant des prélèvements pathologiques des malades des Centres Hospitaliers à l'Hôpital de Thionville (France) et qui sont souvent impliquées dans les affections pulmonaires, gastro-intestinales et urogénitales. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de chaque germe testé ont été calculées. L'extrait méthanolique avait globalement un spectre d'action particulièrement large sur l'ensemble des souches testées. Le pouvoir antimicrobien le plus prononcé a été révélé sur 72,7% de bactéries gram+ (CMI = 5 mg/ml), alors que 62,5% de bactéries gram- ont une CMI égale à 10 mg/ml.

Des études de toxicité aiguë ont aussi été réalisées dans notre Laboratoire et révèlent une absence de toxicité aux doses testées de l'extrait méthanolique des écorces des racines d'*A. dichostyla* (Konda *et al.*, 2000, résultats non publiés).

Notre travail consistait donc en l'identification de polyphénols de ressources naturelles végétales de trois buissons de la flore africaine. Ce travail représente à part entière un large examen dans lequel d'autres métabolites tels que les huiles essentielles quand elles existent ont été identifiées dans ces plantes. L'huile essentielle d'*A. cuneata* était plus riche en dérivés sesquiterpéniques (19,7 % de l'huile) que son homologue du même genre qu'est *Annona senegalensis* et est constituée aussi de plus de 39 % de sabinène. L'identification de tous les produits avec leurs spectres de masses respectives et de leurs indices de Kovats a été faite. Le *p*-cymène est le monoterpène le plus abondant dans l'huile essentielle d'*A. senegalensis*. Cette différence dans l'abondance entre *p*-cymène et *Z*-sabinène, permet la différenciation entre ces deux espèces : *Annona cuneata* et *Annona senegalensis*. Cette étude pourrait en effet être utile dans des études sur la systématique du genre *Annona*.

Dans ce travail, d'autres structures polyphénoliques plus particulièrement des acides phénols dérivés d'acide benzoïque mais aussi de l'acide cinnamique ont retenu notre attention, d'une part par rapport à leurs champs d'activités biologiques larges, et d'autre part à leurs lipophilicités. Les screenings phytochimiques préalables nous avaient amené à sélectionner *Argania spinosa* pour cette étude.

Dans le Sud Ouest Marocain (région de Souss), cette espèce *Argania spinosa* (l'Arganier) est endémique du Maroc. C'est une plante oléagineuse qui est source de biosynthèse lipidique et d'antioxydants lipophiles.

Elle fournit une huile alimentaire et esthétique et est recherchée par l'industrie cosmétique pour ses substances bienfaisantes. Nous avons ainsi recensé les principales classes chimiques de son huile, identifié et étudié leurs propriétés antiradicalaires. Des données locales ethnobotaniques assez détaillées ont aussi fait l'objet d'un travail de terrain pour la première fois sur cette espèce.

La consommation des lipides est positivement corrélée pour provoquer plusieurs maladies, plus particulièrement le cancer du colon (Armstrong and Doll, 1975), le cancer du sein (Lavechia *et al.*, 1988), le cancer de la prostate (Chan *et al.*, 1998), le cancer de l'ovaire (Rish *et al.*, 1994) ou aussi l'athérosclérose (Kuller *et al.*, 1997) ainsi que les maladies coronariennes (Gerber *et al.*, 1994). Récemment, cependant des données épidémiologiques ont démontré que non seulement la quantité des lipides consommés, mais aussi le type des corps gras qui sont importants dans l'éthiologie de certaines formes de cancers (Bartsch *et*

al., 1999). L'huile extraite des amandes des fruits de l'Arganier, constitue environ 25 % de l'apport en corps gras dans l'alimentation du Sud-Ouest du Maroc (Collier et Lemaire, 1974). L'huile extraite du fruit de l'Arganier possède en effet, de très bonnes qualités diététiques. Nous avons démontré que les acides gras de cette huile sont à plus de 80 % des acides gras mono- et polyinsaturés et donc possèdent des fonctions multiples pour la santé. Les acides gras de l'huile d'argan sont à chaînes longues, l'acide linoléique qui est un acide gras polyinsaturé est précurseur des prostaglandines, prostacyclines, leukotriènes et thromboxanes, hormones que l'on connaît depuis les années 30, produites par des organismes tels que la prostate d'où leur nom et dont on sait qu'elles contrôlent de nombreux processus dans notre organisme, dont la pression sanguine, l'hémostase ou aussi comme traitement préventif contre les maladies cardio-vasculaires. Les acides gras essentiels tels que l'acide linoléique présent dans l'huile d'argan, intervient aussi bien dans l'activité mitotique, que dans le maintien de l'intégrité des membranes des kératinocytes épidermiques et de la kératinisation, et on lui a attribué également la fonction de barrières et de perméabilité de l'épiderme. La correction d'une carence en acide linoléique permet de retarder le vieillissement cutané puisque celui-ci est lié pour une part à cette carence et aussi dans le développement cérébral, cet acide gras, possède également des propriétés hypocholestérolémiantes et antiathérogènes. Il a été rapporté, que chez l'animal carencé en acides gras essentiels, l'effet de l'huile d'argan, après application locale une fois par jour et pendant 4 jours (0,3 ml d'huile), avait démontré une diminution de la perspiration cutanée et l'atteinte de la valeur normale a nécessité seulement 9 jours (Boukhobza *et al.*, 1988). Cet acide doit donc figurer dans l'alimentation suivant des proportions respectives qui optimisent son intégration dans les voies métaboliques.

Quelques études réalisées essentiellement sur les aspects chimiques, physiques et technologiques de l'huile ont été déjà réalisées. Cependant, l'huile d'argan a fait l'objet d'un nombre relativement réduit de travaux. Il a été rapporté par Farines *et al.*, 1984a, sur un échantillon d'huile recueilli par extraction au soxhlet, les caractéristiques physico-chimiques telles que la masse volumique, l'indice de réfraction, l'indice d'acide, l'indice de saponification, l'indice d'iode, la teneur en eau ainsi que la teneur en insaponifiable, nos résultats sont tout à fait concomitants avec ces études et les valeurs respectives sont répertoriées dans le chapitre V.

Dans la fraction glycéridique, les glycérides di- et tri-insaturés sont majoritaires (Berrada, 1972 ; Huyghubaert et Hendricks, 1974) et les principaux acides gras sont l'acide oléique C18 :1 (45,2%), l'acide linoléique C18 :2 (34,6%), l'acide palmitique C16 :0 (13,5 %),

l'acide stéarique C18 :0 (5,7%). L'acide linoléique C18 :2, l'acide arachidique C20 :0 et l'acide myristique, C14 :0 sont retrouvés à l'état de traces (Maurin *et al.*, 1992, Charrouf *et al.*, 1999). Le rapport du pourcentage des acides gras polyinsaturés (linoléique + linoléique) à celui des acides gras saturés (myristique + palmitique + stéarique) est de 1,8 et est très voisin du rapport 1,50 recommandé par les nutritionnistes.

Farines *et al.*, 1984a ; Maurin *et al.*, 1992 et Rezanka *et al.*, 1999 ont aussi étudié ces triglycérides par chromatographie en phase gazeuse. Selon leurs études, l'huile renfermerait 94,5 % de triglycérides, 0,68 % de diglycérides, 0,65 % de monoglycérides et 0,9 % d'insaponifiable. Dans ces mêmes études, il a été signalé que par rapport à la répartition des acides gras sur les positions Sn du glycérol, l'huile d'argan aurait un profil qui se rapproche de l'huile d'arachide, ainsi respectivement 42,8 %, 50,0 % et 34,6 % des acides gras estérifient préférentiellement la position Sn-1, Sn-2 et la position Sn-3.

Si l'huile est constituée pour l'essentiel (99 %) de triglycérides, elle contient, par ailleurs, un nombre non négligeable d'autres composants.

La fraction insaponifiable, qui représente en poids environ 1 % de l'huile, possède des caractéristiques physiques et organoleptiques spécifiques, en particulier une odeur de noisette et une couleur brune. Cette fraction a fait l'objet de recherches, elle contient des stérols (20%), le schotténol et le spinastérol étant majoritaires, des hydrocarbures non identifiés en plus des carotènes (37,5%), des tocophérols (7,5%), des xanthophylles (Boukhobza *et al.*, 1988) et des méthylstérols (20%) (Farines *et al.*, 1981).

Des triterpènes (Oulad-ali *et al.*, 1996), des triterpènes saponines (Charrouf *et al.*, 1992 et Alaoui *et al.*, 2002) ont été identifiés à partir du tourteau.

Les structures triterpéniques identifiées dans l'huile d'argan sont : le lupéol, le butyrospermol, le tirucallol, β -amyrine, le méthylène-24- cycloartanol et le méthylstérol : le Citrostadiénol et enfin le 7 avénastérol et le stigmastadiène 8,22 ol-3- β -(24 S) (in Boukhobza *et al.*, 1988) (Farines *et al.*, 1984b).

L'étude analytique qualitative et quantitative de l'insaponifiable par des techniques chromatographiques et électrochimiques a révélé la présence en quantité appréciable de tocophérols sous forme α , β , γ et δ -tocophérols dont la forme α a été rapportée comme dominante (in Boukhobza *et al.*, 1988). Par ailleurs, l'insaponifiable d'une huile d'argan extraite avec des solvants organiques avait une teneur en tocophérols totaux variable selon les auteurs, de 167 mg/kg (Berrada, 1972, Huyghebaert et Hendricks, 1974) à 635 mg/kg (in Boukhobza *et al.*, 1988).

Selon Boukoubza *et al.* en 1988, le dosage de ces tocophérols a été réalisé par la méthode d'Emmerie-Engel modifiée en utilisant le pouvoir réducteur des tocophérols en présence des sels ferriques. La teneur en tocophérols a été calculée et était retrouvée égale à 620 mg/Kg. L'identification des différents tocophérols a été effectuée par chromatographie liquide haute performance, la fraction insaponifiable débarrassée des caroténoïdes par passage sur terre à foulon est chromatographiée sur une colonne analytique de silice, les résultats ont montré 70 % d' α -tocophérol par rapport au totum tocophérolique. Les 30 % restantes rassemblent les isomères β , δ , et γ , que Charrouf *et al.*, 1999, les considéraient comme les isomères le plus efficaces du point de vue propriétés antioxydantes.

L'identification des isomères α -, β -, γ - et δ -tocophérol avait cependant fait l'objet de controverses, certains auteurs rapportaient 70 % d' α -tocophérol et environ 30 % du mélange β , γ et δ (Boukhobza *et al.*, 1988 ; Rahmani *et al.*, 1989) tandis que d'autres trouvent une majorité de δ -tocophérol (70%) et environ 30 % du mélange α , β et γ -tocophérol (résultats non publiés). Par ailleurs, l'huile d'argan semble être pauvre en caroténoïdes et, par conséquent, en provitamine A (Huyghebaert et Hendricks, 1974, Collier et Lemaire, 1974).

Le limbe de la feuille, la tige et l'épine de l'Arganier ont été récemment identifiés comme étant très riches en flavonoïdes (Tahrouch *et al.*, 1998).

D'autres études se sont concentrées sur les propriétés pharmacologiques de l'huile ou des substances qui y sont présentes. En effet, du tourteau, les saponines triterpéniques, ont révélé une activité molluscicide, fongicide, antibactérienne et larvicide. L'étude de l'activité anti-inflammatoire des saponines a été menée *in vivo* sur des œdèmes de différentes origines et a révélé un pouvoir anti-inflammatoire atteignant celui de l'indométacine, les saponines se sont révélées être des analgésiques périphériques puissants de type acide acétylsalicylique, mais dénuées de toute activité analgésique centrale de type morphine. Les saponines peuvent être utilisées en association avec des anti-inflammatoires non-stéroïdiens inhibiteurs de la cycloxygénase dont les effets seraient ainsi réduits pour une égale efficacité (Alaoui *et al.*, 1998).

L'extrait aqueux lyophilisé des feuilles d'*Argania spinosa* (L.) Skeels. a été testé sur des modèles de stress validés dans notre Laboratoire (résultats non publiés) et a provoqué après administration intraperitonéale chez la souris, une augmentation significative de la latence (40 mg/kg ($p < 0.001$) et 80 mg/kg ($p < 0,01$) ; vs contrôle) et une diminution des transitions à la dose de 80 mg/kg ($p < 0,01$) par contre aucune modification sur le paramètre

locomotion n'a été enregistrée, ce qui laisse suggérer que pour ces paramètres, l'extrait aqueux des feuilles d'*Argania spinosa* a un effet chlorazépat-like avec un effet anxiolytique probable. Cependant, cet extrait reste sans effet sur les redressements et la relataence.

Dans ce travail nous avons étudié tout le profil chimique de l'huile, y compris sa fraction triglycéridique. Ainsi, en utilisant une méthodologie RMN, la régiospécificité des différents acides gras dans le glycérol a donné des résultats qui sont concordants avec les résultats de la littérature (Maurin *et al.*, 1992 et Rezanka *et al.*, 1999), en effet le dépouillement des spectres des carbones en exploitant la région des synthons carbonyles nous a permis de reconstruire aisément les positions des acylglycérols. Cette méthode s'avère être rapide dans le cas de l'étude des huiles hybrides ou d'autres huiles végétales non encore étudiées et permet ainsi d'éviter des méthodes plus longues comme nous l'avons déjà signalé.

La présence de monoacylglycérols, composés largement utilisés comme émulsifiants, additifs alimentaires et pharmaceutiques, a été aussi confirmée par GC/SM dans ce travail. Leurs préparations industrielles par action de la lipase ont été rapportées par Bornsheuer *et al.*, 1995.

Les produits terminaux de la lipoperoxydation (LPO) représentés par les TBARS (substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique), ont été aussi étudiés. L'augmentation significative des TBARS ($P < 0,05$) mesurés par spectrofluorimétrie de l'acide linoléique comparativement à l'huile d'argan nous a fourni une information utile quant à la présence éventuelle d'antioxydants dans l'huile.

Nous avons aussi démontré que la fraction Farsap de l'huile d'argan possède aussi un fort potentiel antiradicalaire dans le modèle chimique, avec un coefficient d'activité qui dépasse 706 et probablement dû à une synergie de ses composants vitaminiques.

Pour cette fraction Farsap, les perspectives sont prometteuses dans la mesure où la vérification de ce synergisme s'exprime encore mieux dans un milieu physico-chimique et physiologique différent (pH, présence de coenzymes...Etc.). L'étude du comportement de cette fraction en milieu cellulaire pour se rapprocher des conditions *in vivo* est programmée en perspective de ces recherches.

Le but final de notre étude complète de trois formes de l'huile d'argan est que la vitamine principale est le γ -tocophérol et non l' α -tocophérol, et est donc clairement en désaccord avec les rapports de la littérature (Boukhobza et Pichon Prum, 1988). La raison de cette non-conformité est probablement méthodologique, parce que dans notre étude, les

structures des vitamines ont été confirmées par GC/MS et par CLHP et leurs nominations sont claires.

Manifestement, la quantité des tocophérols présents dans l'huile est fonction de plusieurs facteurs. Bien que les données scientifiques sur ce point soient relativement minces, il semble que la variété de l'amande de l'Arganier et sa maturité ainsi que les conditions et la durée de la conservation jouent un rôle capital. L'huile d'argan contient le γ -tocophérol à des teneurs allant jusqu'à 75 % du total des tocophérols.

Des données récentes *in vivo* (Jiang *et al*, 2000) indiquent que le γ -tocophérol peut être un antioxydant beaucoup plus important que l' α -tocophérol. Tant le γ -tocophérol et son métabolite 2,7,8-triméthyl-2-(β -carboxyethyl)-6-hydroxychroman (γ -CEHC) qui est principalement excrété dans l'urine, à la différence de l' α -tocophérol et son métabolite correspondant, inhibent l'activité de la cyclooxygénase. Aussi, il est remarquable que le supplément avec de fortes doses de l' α -tocophérol épuise le plasma et les tissus du γ -tocophérol. Par contre le supplément en γ -tocophérol augmente toutes ces deux formes (Jiang *et al*, 2000).

Il est fortement probable que les régimes fournissant les quantités substantielles de γ -tocophérol protègent contre les espèces réactives d'oxygène médiateurs de l'inflammation. *In vitro*, il est difficile de comparer l'efficacité relative des tocophérols avec d'autres antioxydants phénoliques. *In vivo*, les tocophérols sont incorporés dans les membranes des cellules et leurs capacités d'antioxydants sont modulées par la concentration de la vitamine C. Dans le cas d'antioxydants phénoliques, le maintien d'un environnement antioxydant exige un apport en continue de ces substances phénoliques, mais dans le cas des tocophérols, l'incorporation stable dans la membrane de la cellule et la régénération de la semi-quinone (produite après l'interaction des espèces réactives d'oxygène) au composé parental par la vitamine C (Halliwell and Gutteridge, 1993) rendent leur pharmacologie plutôt différente et leur demi-vie beaucoup plus longue. Par conséquent l'huile d'argan représentant une source diététique principale de γ -tocophérol peut conférer des effets pharmacologiques et biochimiques favorables pour la santé de la population marocaine qui la consomme, dans une façon quelque peu différente de celui de pays dans le bassin Méditerranéen où un apport en continue d'antioxydants phénoliques obtenus d'olives, des fruits, des céréales et de l'huile d'olive s'impose.

Le γ -tocophérol est pharmacologiquement plus intéressant que la forme α quant à son activité antiradicalaire et prévient aussi et plus spécifiquement contre les radicaux

peroxynitrites. Par conséquent l'huile d'argan avec un taux élevé de γ -tocophérol pourrait exercer un effet biologique important contre les maladies dégénératives. En effet, il a été démontré que le γ -tocophérol est le tocophérol le plus efficace dans la neutralisation des effets néfastes de l'ozone et l'oxyde nitrique (Cooney *et al.*, 1993 ; Jiang *et al.*, 1997). Les principaux agents polluants alimentaires, les nitrosamines, font partie des substances les plus cancérigènes chez l'homme.

La vitamine E constitue toujours une molécule efficace contre le cancer provoqué par des lésions oxydatives. Dans de nombreux modèles animaux, il a été montré que la vitamine E protège contre les cancers de diverses localisations (Shklar *et al.*, 2000). De plus, des études chez l'homme ont montré que les faibles taux sériques ou plasmatiques de vitamine E, s'accompagnent d'une élévation du risque de cancer du poumon, du col de l'utérus et de la prostate. Les essais d'intervention conduits chez l'homme jusqu'à présent ont eux aussi donné des résultats initiaux prometteurs.

Outre ses effets bénéfiques prévus dans les maladies des cancers et depuis les années 1980, plusieurs études épidémiologiques ont été menées pour évaluer le lien entre la prise de vitamine E et les maladies cardio-vasculaires. Il a été noté une inhibition de l'agrégation plaquettaire après prise de vitamine E à des doses supérieures à 270 mg d' α -tocophérol/jour (Freedmann *et al.*, 1996). Ces résultats indiquent que la vitamine E pourrait exercer des effets bénéfiques à l'égard des maladies cardio-vasculaires par divers mécanismes. Cependant, comme ces études ont été conduites avec des suppléments en vitamine E synthétique à hautes doses, il reste à savoir si ces effets peuvent se manifester avec une prise de vitamine E naturelle aux doses naturellement présentes dans des aliments tels que l'huile d'argan.

Jusqu'à présent, l' α -tocophérol fut considéré comme étant la forme la plus active de vitamine E. Cependant, les récentes recherches suggèrent que non seulement l' α -tocophérol mais le γ -tocophérol est aussi actif biologiquement, et que les produits à base de vitamine E devraient contenir ces deux tocophérols pour en tirer le maximum de ses bienfaits (Christens *et al.*, 1997 et Jiang *et al.*, 2000).

Un autre point semblable à l'huile d'olive, l'huile d'argan (comparé à beaucoup d'autres huiles) contient un taux en squalène relativement élevé qui est suggéré être protecteur contre le cancer de peau.

L'huile d'argan pourrait être utilisée comme émoulliente et comme source d'ingrédients bénéfiques en cosmétique, le taux du squalène est à raison de 321 mg/100 g, l'huile

d'argan esthétique en contient quelque 2 % de plus avec donc un taux supérieur à 0,3 % de l'huile. Les hydrocarbures dans les huiles sont présents en quantité généralement inférieure à 0,2 %, l'exception est faite sur l'huile d'olive qui contient 0,5 % et constitué aussi et principalement de squalène (Owen *et al.*, 2000a).

Il apparaît qu'une bonne partie du squalène apportée par l'alimentation est effectivement convertie en cholestérol chez l'homme. Cependant, cette majoration de la synthèse du cholestérol ne s'accompagne pas d'élévations sensibles des taux sériques de cholestérol, peut-être parce qu'il y a simultanément augmentation de l'élimination fécale (Standberg *et al.*, 1990). Une étude particulièrement intéressante indique que l'addition de squalène à un protocole thérapeutique utilisant la pravastatine à faible dose a majoré l'efficacité de ce médicament pour abaisser la cholestérolémie (Chan *et al.*, 1996). La plupart de ces études ont étudié l'effet du squalène appliqué localement ou administré par voie systémique sur des cancers chimiquement induits de la peau, du côlon et du poumon chez la souris. Dans leur ensemble, les résultats montrent clairement que le squalène alimentaire exerce d'incontestables effets anticarcinogènes (Rao *et al.*, 1998 ; Smith *et al.*, 1998). D'autres essais ont montré que là où il est pris comme supplément en diététique, l'évidence a prouvé aussi qu'il a des effets préventifs contre la carcinogenèse (Newmark *et al.*, 1997).

Le squalène est supposé être partiellement responsable de l'effet bénéfique de l'huile d'argan car d'autres recherches renforcent son effet chimio-préventif contre certaines formes de cancers (Rao *et al.*, 1998). Kohno *et al.*, 1995 ont rapporté que le squalène est la cible première éboueure des radicaux superoxydes sur la surface de la peau.

Nous savons que le squalène est un produit communément connu, mais sa présence dans la majorité des ressources végétales reste à l'état de traces.

De plus, les effets des stérols contenus dans l'huile d'argan et plus particulièrement le spinastérol sont documentés pour provoquer une réduction certaine du taux de cholestérol dans le plasma et le foie des souris, modulés aussi par une augmentation de l'excrétion fécale (Uchida *et al.*, 1983). Le potentiel antitumorigène du spinastérol a été aussi bel et bien démontré par villasenor *et al* en 2000, tandis que le schotténol est démontré être un anticancérigène avec un potentiel cytotoxique prononcé (Arizawa *et al.*, 1985), ces deux stérols rares dans les huiles végétales se retrouvent dans l'huile d'argan.

La quantité totale des stérols dans l'huile d'argan vierge varie dans notre étude de 272 à 357 mg/100g. Parmi les facteurs, qui influent sur cette teneur, figurent probablement aussi la variété des amandes et leur degré de maturité. Dans l'huile d'argan, les principaux

stérols, sont le spinastérol (100 à 151 mg/kg) et le schotténol (137 à 163 mg/kg) qui représentent jusqu'à 88 % du totum stérolique.

La vitamine E est le composé majoritaire dans l'huile d'argan, et il est très probable qu'en raison d'effets de synergie, l'association de ce micronutriment avec des autres composants mineurs (stérols, squalène et acides phénols) présents dans l'huile d'argan exercent des effets bénéfiques plus importants que la somme des différents composants pris isolément.

La classe des phénols présente dans l'huile d'argan regroupe des composés phénoliques simples comme l'acide vanillique, l'acide ferulique, le tyrosol et l'acide syringique. En moyenne, ces phénols simples sont présents à une concentration totale inférieure à 5 mg/kg d'huile d'argan.

D'après leurs structures, les phénols de l'huile d'argan ne sont pas des chélateurs de métaux, ils peuvent agir seulement comme des donneurs d'hydrogène, et leur efficacité peut aussi être due à leur lipophilie, laquelle peut faciliter leur incorporation dans des domaines lipophiliques des membranes du liposome et donc confère une activité protectrice. Les chélateurs de métaux, en effet, sont généralement hydrophiles et peuvent causer une inhibition non significative dans les systèmes lipidiques à n'importe quelle concentration.

L'effet des monophénols contre la lipoperoxydation est fortement amélioré par une ou deux substitutions par un groupement méthoxy en para ou ortho de l'hydroxyle. L'acide ferulique et vanillique sont suggérés donc être des antioxydants forts. Néanmoins l'acide ferulique est détecté sous sa forme hétérosidique dans l'huile d'argan avant hydrolyse, toutefois, les phénols *in vivo* seront transférés et hydrolysés à leurs formes aglycones dans des conditions spécifiques similaires qu'*in vitro*. Des flavonoïdes glycosylés ont été rapportés être hydrolysés enzymatiquement à leurs formes génines durant le métabolisme d'absorption, et l'aglycone résultant agit comme antioxydant *in vivo* (Ioku *et al.*, 1998).

Ainsi, sa teneur élevée en phytostérols, en acide oléique et en tocophérols et la présence de quelques phénols antioxydants est une caractéristique intéressante de l'huile d'argan, qui contribue à ses effets favorables sur la santé et lui confère des effets chimio-préventifs.

En conclusion, notre organisme est en permanence soumis à un stress oxydant, associé au métabolisme de l'oxygène dans nos cellules. Ce métabolisme est utile pour la production d'énergie, la défense des micro-organismes pathogènes ou la détoxification de molécules toxiques. Mais il a aussi des effets délétères sur les tissus et induit une augmentation du risque entre autres pathologies, des cancers et des maladies cardio-vasculaires. La

consommation d'antioxydants naturels tels que les polyphénols contribue à limiter ce stress antioxydant et probablement réduire ces pathologies.

L'étude sur des plantes dans notre Laboratoire, nous a conduit à choisir *Anisophyllea dichostyla*, comme plante extrêmement intéressante vue son profil polyphénolique qu'elle représente. Nous avons aussi abordé, les recherches sur les huiles essentielles des écorces du tronc et des tiges de deux espèces d'*Annona*, deux plantes congolaises de la famille des Annonacea.

Notre étude a été poursuivie dans un deuxième par des investigations physico-chimiques et phytochimique de l'huile du fruit d'*Argania spinosa*, sa valorisation par ailleurs par le biais de ces substances antioxydantes peut être un moyen de relancer durablement son exploitation.

En ce qui concerne cette huile, les travaux que nous avons réalisés ont permis d'approfondir largement les connaissances acquises et celles jamais encore rapportées dans la littérature, c'est ainsi qu'il a été mis en évidence la présence inattendue dans l'insaponifiable de la forme γ des tocophérols qui était majoritaire (environ 75 %). L' α -tocophérol déjà cité dans la littérature était minoritaire et ne représentait au maximum, pas plus de 46 mg/kg. Ce résultat a été confirmé non seulement par CLHP couplée à un détecteur de diodes d'array, mais aussi par GC/SM en SI en mode Scan et en travaillant parallèlement sur d'autres types d'huiles végétales tels que l'huile d'olive et l'huile de tournesol.

L'identification des différents phénols majoritaires dans l'huile reste un challenge et leur confirmation a mis en évidence, l'acide vanillique, syringique, l'acide ferulique et enfin le tyrosol en quantités plus appréciables que d'autres retrouvés à l'état de traces.

Nous rapportons également la présence en concentration importante par rapport à d'autres huiles végétales du squalène dans l'huile d'argan.

Les extractions et les analyses ont été couplées par des tests d'activités antioxydantes réalisés en parallèle sur les extraits qui ont permis de révéler une activité biologique importante pour ces plantes médicinales, à savoir, l'activité antiradicalaire des différents composés plus particulièrement ceux de nature polyphénoliques.

Ce travail nous a donc permis de réaliser un modèle d'étude scientifique pouvant être suivi pour traiter une grande quantité d'information concernant les enquêtes réalisées sur les plantes médicinales renfermant des structures polyphénoliques ou sur des plantes oléagineuses sources de composés antioxydants, il peut aussi être exploité comme sources d'analyses de routine des antioxydants polyphénoliques naturels.

Les écorces des racines et des troncs d'*A. cuneata*, d'*A. senegalensis* et d'*A. dichostyla*, ont été classées puis préparée par séchage et broyage avant d'être soumises à des épuisements successifs, différents les uns des autres par les résultats souhaités: des extraits hexaniques, méthanoliques ainsi que des huiles d'*Argania spinosa*, ont été obtenus, identifiés et ainsi couplés à des tests d'activités antiradicalaires.

Pour chacune des plantes ou parties de plantes utilisées, ont été fractionnés et étudiés par hydrodistillation et / ou par méthodes chromatographiques (CC, CCE, CLHP/DAD, GC-FID ou GC-MS ou encore pour des analyses plus pointues la LC/ESI/MS/DAD) les extraits susmentionnés.

Les structures obtenues ont été caractérisées par des méthodes physiques combinées, plus particulièrement la spectroscopie de résonance magnétique, la spectroscopie de masse, et la spectrophotométrie UV selon la masse du lot du produit obtenu. La RMN bidimensionnelle principalement COSY45, COSY DQF, ROESY QFS, NOESY et COLOC ont été aussi utilisées et nous ont apportées des données spécifiques sur quelques points importants des structures isolées.

Nous avons dégagé les particularités des techniques de préparation et d'analyse des plantes étudiées.

Les observations concernant la relation "groupe de métabolites / maladies" peuvent être utiles pour orienter un travail de recherche dans le domaine chimique ou clinique pour ces matières premières végétales étudiées.

Toutefois l'utilisation des antioxydants alimentaires ne peut être efficace que par l'étude *in vivo* de la bio-disponibilité, de l'absorption, du métabolisme et enfin de la pharmacocinétique pour arriver à extrapoler tous les résultats *in vitro* à des situations humaines *in vivo*, à notre connaissance aucune étude sur le métabolisme *in vivo* des antioxydants naturels alimentaires n'a été faite.

La recherche de ressources renouvelables, abondantes et moins chers de composés antioxydants suscitent aussi un intérêt attractif mondial. Les antioxydants naturels sont spécialement prometteurs à cause de leurs prix modestes. Cependant d'autres recherches sur l'optimisation des extractions, sur la connaissance du mécanisme d'action *in vivo* et sur l'assimilation des produits naturels antioxydants restent toujours nécessaires à décortiquer. Ce travail a fait l'objet de trois publications dont deux sont publiées dans des revues internationales à comités de lecture et une troisième soumise et a aussi fait l'objet d'un prix de la meilleure communication affichée lors d'un Congrès International.

Références bibliographiques

- Abû Obaid al-bikri (1965) - Description de l'Afrique septentrionale (texte arabe traduit par Mack Guckin de Slane). Ed. Librairie d'Amérique et d'Orient Adrien, Maisonneuve, Paris, 405 p.
- Adams R. P. (1990) - Identification of essential oil by ion trap Mass Spectroscopy Academic press Sandiego.
- Adamson G. E., Lazarus, S. A., Mitchell A. E. and Prior R. L. (1999) - HPLC method for the quantification of procyanidins in Cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4184-4188.
- Adhvarhyo A., Erham Z.S., Liu Z.S. and Perez J. M. (2000) - Oxidation kinetic studies of oils derived from unmodified and genetically modified vegetables using pressurized differential scanning colorimetry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Thermochimica acta*, 364, 87-97.
- Akihisa T., Kokke WC., Tamura T. and Nambara T. (1992) - 7-Oxodihydrokarounidiol [7-oxo-D:C-friedo-olean-8-ene-3 alpha,29-diol], a novel triterpene from *Trichosanthes kirilowii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40, 1199-1202.
- Alali, F.Q. Liu X.-X. and McLaughlin J.L. (1999) - Annonaceous acetogenins: recent progress, *Journal of Natural Product*, 62, 504-540.
- Alaoui A., Charrouf Z., Soufiaoui M., Carbone V. M., Antonio P. and Cosimo P.S. (2002) - Triterpenoid saponins from the shells of *Argania spinosa* seeds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4600-4603
- Alaoui K., Lagorge J F., Cherrah Y., Hassar M., Amarouch H. and Roquebert J. (1998) - Analgesic and anti-inflammatory activity of saponins of *Argania spinosa*, *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 56, 220-228
- Al-Hassan bin Mohammd W. Z. (1515) - Description de l'afrique (traduit de l'italien par Paulard A. E.). Ed. Librairie d'Amérique et d'Orient Adrien, maisonneuve, Paris 1981, 681p.
- Amaro M. I., Orfila L. and Colman T. (1998) - Cytotoxic effects *in vitro* of the extracts of plants from annonaceous in tumoral and normal cell, *Toxicology Letters*, 95, 153
- Ames B.M. (1983) - Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases, *Science*, 221, 1256-1263.
- AOAC (1990) - Official Method of Ananalysis of the Association Analytic chemist, chapter 4, 956, 15th Edit. K. Helrich, Chem Inc. Arlington, Virginia.
- Aparicio R., Roda L., Albi MA. and Guttierez F. (1999) - Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4150-4155.
- Arizawa M., Kinghom AD., Cordell GA., Phoebe CH. and Fansworth NR. (1985) - Plant anticancer agents: Schottenol glucosides from *Bacharis cordifolia* and *Ipomopsis aggregata*. *Planta medica*, 6, 544-545.
- Armstrong B. K. and Doll R. (1975) - Environmental factors and the incidence and mortality from cancer in different countries with special reference to dietary practice, *International journal of cancer*, 15, 617-631.
- Atta-Ur-Rahman, Ngounou F.N., Choudhary M.I., Malik S., Makhmoor T., Nur-E-Alam M., Zareen S., Lontsi D., Ayafor J.F. and Sondengam BL (2001) - New antioxidant and antimicrobial ellagic acid derivatives from *Pteleopsis hylo dendron*, *Planta Medica*, 67, 335-339
- Aubreville A. (1950) - Forestière Sudano-Guinéenne Ed. Société d'éditions géographiques maritimes et coloniales.
- Ayad A. (1989) - Représentation générale de l'Arganeraie. Dans "formation forestière continue", station de recherche forestière, Rabat, 13-17 Mars, 9-18.
- Bae YS., Burger JF., Steynberg JP., Ferreira D. and Hemingway R.W. (1994) - Flavan and procyanidin glycosides from the bark of blackjack oak, *Phytochemistry*, 35, 473-478

- Baldioli M., Servili M., Perretti G. and Montedoro G.F. (1996) - Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil, *Journal of the American Oil Chemist Society*, 73, 1589-1593.
- Bartsch H., Nair J. and Owen RW. (1999) - Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers, *Carcinogenesis*, 20, 2209-2218.
- Bellakhdar J. (1997) - Thèse de Doctorat de l'Université de Metz, Contribution à l'étude de la Pharmacopée traditionnelle au Maroc, University of Metz (France), 1157 p.
- Benzie I. F. F. and Szeto Y. T. (1999) - Total antioxidant capacity of teas by the Ferric reducing/antioxidant power assay, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 633-636.
- Berrada M. (1972) - Etude de la composition chimique de l'huile d'argan, *Alawamia*, 42, 1-14.
- Berrada Y., Settaf A., Baddouri K., Cherrah A. and Hassar M. (2000) - Experimental evidence of an antihypertensive and hypocholesterolemic effect of oil of argan, *Argania sideroxylon*, *Thérapie*, 55, 375-378.
- Berry E. M., Eisenberg S., Haratz D., Friedlander Y., Norman Y. Kaufmann N. A. and Stein Y. (1991) - Effect of diet rich in monounsaturated fatty acids in plasma lipoproteins- the Jerusalem nutrition study, *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 899-907.
- Bindra RS., Satti NK. and Suri OP. (1988) - Isolation and structures of ellagic acid derivatives from *Euphorbia acaulis*, *Phytochemistry*, 27, 2313-2315
- Bohm H., Boeing H. and Hempel J. (1998) - Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases, *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 37, 147-63.
- Bornscheuer U. T. (1995) - Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols, *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 578-586.
- Bors W., Michel C. and Schikora S. (1995) - Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study, *Free Radical Biology and Medicine*, 19, 45-52.
- Boukhobza M. and Pichon-prum N. (1988) - L'Arganier, ressources économiques et médicinales pour le Maroc, *Phytotherapy*, 27, 21-26.
- Brasseur T. H. and Angenot L. (1986) - Le mélange de diphénylborate d'aminoéthanol - PEG 4000, un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes, *Journal of Chromatography*, 351, 351-355.
- Brown J.P.A. and Brown A. (1980) - review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds, *Mutation Research*, 75, 243-277.
- Chan H. W. and Levett G. (1977) - Autoxidation of methyl linoleate. Separation and analysis of isomeric mixtures of methyl linoleate hydroperoxides and methyl linoleates, *Lipids*, 12, 99-104.
- Chan P., Tomlinson B., Lee CB. and Lee YS. (1996) - Effectiveness and safety of low-dose pravastatin and squalene, alone and in combination, in elderly patients with hypercholesterolemia, *Journal of clinical pharmacology*, 36, 422-7.
- Chan J.M., Stampfer M.J. and Giovannucci E.L. (1998) - What causes prostate cancer A brief summary of the epidemiology? *Seminars in Cancer Biology*, 8, 263-273.
- Charrouf Z. and Guillaume D (1999) - Ethnoeconomical, Ethnomedical, and Phytochemical Study of *Argania spinosa* (L.) Skeels, *Journal of Ethnopharmacology*, 67, 7-14.
- Charrouf Z., Wieruzeski J. M., Fkih-tetouani S., Leroy Y. and Fourmet M. S. (1992) - Triterpenoids saponins from *argania spinosa* L., *Phytochemistry*, 31, 2079-2086.
- Che C., Plants as sources of Potential antiviral agents (1991) - In: Economic and Medicinal Plant Research. Wagner H. and N.R. Farnsworth (Eds). Academic Press. London, 5, 167-251.

- Cheyrier V., Rigaud J. and Ricardo-da-Silva J. M. (1992) - Structure of proanthocyanidin oligomers isolated from grape seeds in relation to some of their chemical properties, *in Plant Polyphenols, synthesis, properties and significance* (P.E.Laks, Ed.), Plenum Press, New-York
- Cheyrier V., Doco T., Fulcrand H., Guyot S., Le Roux E., Souquet J. M., Rigaud J. and Moutounet M. (1997) - ESI-MS analysis of polyphenolic oligomers and polymers, *Analisis Magazine*, 25, 32-37.
- Chimi H., Rahmani M. and Cillard P. (1988) - Etude de la fraction phénolique des huiles d'olive vierge et d'argan du Marocain, *Actes Institut Agronomique et Vétérinaires*, 8, 17-21.
- Chopra R. N., Nayar S. L. and Chopra I. C. (Eds.) (1956) - *Glossary of Indian Medicinal Plants*. C. S. I. R., New Delhi, p. 20.
- Christen S., Woodall AA., Shigenaga MK., Southwell-Keely PT., Duncan MW. and Ames BN. (1997) - gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications, *Proceeding of the natural Academy of Sciences U S A.*, 1, 3217-3222.
- Collier A. et Lemaire B. (1974) - Etude des caroténoïdes de l'huile d'argan, *Cahiers de Nutrition Diéthétique*, 1, 300-301.
- Cui CB., Tezuka Y., Kikuchi T., Nakano H., Tamaoki T. and Park JH. (1992) - Constituents of a fern, *Davallia mariesii* Moore. II. Identification and ¹H- and ¹³C-nuclear magnetic resonance spectra of procyanidin B-5, epicatechin-(4-β-8)-epicatechin-(4-β-6)-epicatechin, and epicatechin-(4-β-6)-epicatechin-(4-β-8)-epicatechin-(4-β-6)-epicatechin, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40, 889-898.
- Daniel EM., Ratnayake S., Kinstle T. and Stoner GD. (1991) - The effects of pH and rat intestinal contents on the liberation of ellagic acid from purified and crude ellagitannins, *Journal of Natural Products*, 54, 946-952.
- Debra A., Pearson H. H. S., Lazarus S. A. and Keen C. L. (2001) - Inhibition of in vitro low-density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present in chocolate and cocoas, *Methods in Enzymology*, 335, 350-60.
- De Freitas V. A. P., Glories, Y., Bourgeois, G., and Vitry, C. (1998) - Characterization of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry, *Phytochemistry*, 49, 1435-41.
- De Pascual-Teresa S., Rivas-Gonzalo J. C. and Santos-Buelga C. (2000) - Prodelphinidins and related flavonols in wine. *International Journal of Food Science and Technology* 35, 33-40.
- De Wild. (1906) - *Ann. Mus. Congo Belge, Bot., Sér. V, I*, p.243.
- Dhingra Bhim S. and Davis A. (1988) - Determination of free ellagic acid by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 447, 284-286
- Ding M., Yang H. and Xiao S. (1999) - Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reverse-phase column liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 849, 637-640.
- Dotson K. D., Jerrel J. P., Picciano M. F. and Perkins E. G. (1992) - High performance liquid chromatography of human triacylglycerol and Gas chromatography of component fatty acids, *Lipids*, 27, 933-939.
- Economou D., Oreopoulou V. and Thomopoulos C.D. (1991) - Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae, *Journal of American Oil Chemists' Society*, 68, 109-113.
- Ekman R. (1976) - Analysis of lignans in Norway Spruce by combined GC/MS, *Bd*, 30, 76-85
- Ekundayo O. and Oguntimein B. (1986) - Composition of the essential oils of *Annona senegalensis* var. *senegalensis*, *Planta Medica*, 3, 202-204.
- Ekundayo O. (1989) - Volatile compounds of the Annonaceae family, *Journal of Essential Oil Research*, 1, 223-245.
- Elghazouli A. (1969) - L'Arganier et l'huile d'argan, *le Maroc agricole*, 7, 5-8

- Encina A., Barceló-Muñoz A., Herrero-Castaño and Pliego-Alfaro F. (1994) - *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. bud explants, *Journal of Horticulture Science*, 69, 1053-1059.
- Farines M., Soulier J., Charrouf M. and Soulier R. (1984a) - Etude de l'huile de graine d'*Argania spinosa*, la fraction glyceridique, *Revue Française des corps gras*, 7-8, 283-286.
- Farines M., Soulier J., Charrouf M. and Soulier R. (1984b) - Etude de l'huile de graine d'*Argania spinosa*, stéroïdes, alcools triterpéniques, méthylstérol de l'huile d'argan, *Revue Française des corps gras*, 31, 443-448.
- Farines M., Soulier J., Charrouf M. and Soulier R. (1981) - The sterols of *Argania spinosa* seed oil, *Phytochemistry*, 20, 2038-2039.
- Fekam B., Amvam Zollo P.H., Menut C., Lamaty G., Bessière J. M. (1996) - Chemical composition of the essential oils of nine *Annona* species, *Flavour and Fragrance journal*, 11, 333-338.
- Fletcher A.C., Fletcher L.J., Porter E., Haslam E. and Gupta R.K. (1977) - Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins, *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, 1, 1628-1638.
- Freedman J. E., Farahat J.H., Loscalzo J., and Keaney J.F. (1996) - α -tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism, *Circulation*, 94, 2434-2440.
- Friedrich W., Eberhardt A., and Galensa R. (2000) - Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry, *European Food Research and Technology*, 211, 56-64.
- Fries R. E. (1939) - Revision der Arten einiger Annonaceen-Gattungen. *Acta Horti Berg*, 12, 289-577.
- Fujimoto Y., Murasaki C., Shimada H., Nishioka H., Kakinuma K., Singh S., Gupta Y.K. and Sahai M. (1994) - Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. Non-adjacent bis-tetrahydrofuranic acetogenins, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42, 1175-1184.
- Fulcrand H., Remy S., Souquet J. M., Cheynier V., and Moutounet M. (1999) - Study of wine tannin oligomers by one-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1023-1028.
- Gerber M. (1994) - Olive oil and cancer. In: Hill M.J., Giacosa A. and Caygill C.P.G., Editors, *Epidemiology of Diet and Cancer*, Ellis Horwood, Chichester pp. 263-275.
- Gerhäuser C., Klimo K., Heiss E., Neumann I., Gamal-Eldeen A., Knauft J., Liu G. Y., Sitthimonchai S. and Frank N. (2003) - Mechanism-based *in vitro* screening of potential cancer chemopreventive agents, *Mutation Research*, 523-524, 163-172.
- Graham H.N. (1992) - Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry, *Preventive Medicine*, 21, 334-350.
- Goris A. and Liot A. (1943) - Pharmacie glénique T1, Edition Masson et Cie.
- Grisebach A. (1987) - La végétation du globe (traduction française par De Tchinatef) Ed. Librairie J. B. Baillière et fils, 762 p.
- Goldberg D.M., Hoffman B., Yang J. and Soleas G.J. (1999) - Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3978-3985.
- Guillen D. A., Barroso C. G. and Perez-Bustamante J. A. (1996) - Selection of column and gradient for the separation of polyphenols in sherry wine by HPLC incorporating internal standards, *Journal of Chromatography A*, 724, 117-124.
- Gunjev Z. (1977) - Experimental myocardial infarction of the rat and stimulation of the revascularisation by the Flavonoïds drug Crataemon, *Arzneim Forschung/Drugs Research*, 27, 1576-1579.

- Gunstone F.D. (1976) - An Introduction to the Chemistry and Biochemistry of Fatty acids and Their glycerides, p. 168-171, Chapman and Hall Ltd. London
- Gunstone, F.D. (1990) - ^{13}C -NMR spectra of some synthetic glycerol esters alone and as mixtures, *Chemistry and Physique of Lipids*, 56, 195-199.
- Gutteridj J. M. C. and Halliwell B. (1994) - Antioxidants in nutrition, Health and Disease, Oxford University Press, Oxford.
- Gutierrez F., Jimenez B., Ruiz A. and Albi MA. E (1999) - effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 121-127.
- Guyot S., Doco T., Souquet J. M., Moutounet M., and Drilleau J.F. (1997) - Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. *Kermerrien*) skin and pulp. *Phytochemistry*, 44, 351-357.
- Häkkinen S., Heinonen M., Kärenlampi S., Mykkänen H., Ruuskanen J. and Törrönen R. (1999) - Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries, *Food Research International*, 32, 345-353
- Halliwell B. (1978) - Superoxyde-dependant formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. Is it a mechanism of hydroxyl radicals production in Biochemical system? *FEBS Letters*, 92, 321-326.
- Halliwell B. and Gutteridje J.M.C. (1993) - Free Radical Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford.
- Hammerstone J. F., Lazarus S. A., Mitchell A. E., Rucker R. and Schmitz H. H. (1999) - Identification of proanthocyanidins in Cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high performance liquid chromatography/mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 490-496.
- Harborne J.B. (1967) - Comparative Biochemistry of the Flavonoids. Academic Press, Londres.
- Haslam E. (1988) - Plant polyphenols (*syn.* vegetable tannins) and chemical defense-a reappraisal, *Journal of Chemical Ecology*, 14, 1789-1805.
- Haslam E (1998) - Practical polyphenolics from structure to molecular Recognition and Physiological Action, Cambridge University Press, New York.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M. Hollman, P.C.H Katan M.B. and Kromhout D. (1993) - Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study, *Lancet*, 342, 1007-1011.
- Hertog M. G. L., Hollman P. C. H. and Van de Putte B. (1993) - Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wine and fruit juices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1242-1246.
- Hughebaert A. et Hendricks H. (1974) - Quelques aspects chimiques, physiques et technologiques de l'huile d'argan, *Oleagineux*, 1, 29-31.
- Ibn al-Baytâr (1877-1883) - Traité des simples (traduit en français par Leclerc), Imprimerie nationale, Paris.
- Ikan N. (1969) - Natural products, A Laboratory Guide. Ed. Academic Press, London and New York.
- Ikan N., Devaraj S. and Jialal I. (1998) - α -Tocopherol enrichment of monocytes decreases agonist-induced adhesion to human endothelial cells, *Circulation*, 98, 2255-2261.
- I.N.E.A.C. (1951) - Flore du Congo Belge et du Ruanda Urundi. Spermatophytes. Volume II. Bruxelles, 609p.
- Ioku K., Pongpiriyadacha Y., Konishi Y., Takei Y., Nakatani N. and Terao J. (1998) - β -Glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 62, 1428-31

- Jackard P. (1925) - L'Arganier Sapotacee Oléagineuse du Maroc, *Pharmaceutica. Acta Helvetica*, 11, 203-209.
- Jiang Q., Elson-S I., Coutemanche C. and Ames B. - (2000) - γ -tocopherol and its major metabolites in contrast to α -tocopherol inhibit cyclooxygenase activity in macrophage and epithelial cells, *Proceeding of the Natural Academic Sciences USA*, 97, 11494-11499.
- Jisaka M., Ohigashi H., Takegaw A., Huffmann M.A., Kushimizu K. (1993) - Antitumoral and antimicrobial activities of bitter Sesquiterpene lactone of *Vernonia amygdalina*, a possible medicinal plant used by wild chimpanzes, *Biosciences Biotechnology Biochemistry*, 57, 833-834.
- Kallio H. and Rua P. (1994) - Distribution of the major fatty acids of human milk between Sn-2 and Sn-1,3 position of triacylglycerol, *Journal of the American Oil Chemist Society*, 71, 985-992.
- Kamal-Eldin A., Görden S., Pettersson J. and Lampi AM. (2000) - Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols: Comparison of different chromatographic columns, *Journal of Chromatography A*, 881, 217-227.
- Kamisako W., Suwa K., Morimoto K. and Isoi K. (1984) - *Organic Magnetic Resonance*, 22, 93-100.
- Karchesy J., Bae Y., Chalker-Scott L., Helm R. F. and Yeap Foo L. (1992) - Chromatography of proanthocyanidins, in *Plant polyphenols : synthesis, properties, significance* (R. W. Hemingway and P. E. Laks, Eds.), New-York.
- Kashiwada Y., Lizuka H., Yoshioka K., Chen R-F, Nonaka G. I. and Nishioka I. (1990) - In the leguminosae plants, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 38, 888-893.
- Kashiwada Y., Nonaka G., Nishioka I., Chang J. -J. and Lee K. -H. (1992) - Antitumor agents, Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents, *Journal of Natural Products*, 55, 1033-1043.
- Kashiwada Y., Nonaka G., Nishioka I., Lee K. J. H., Bori I., Fukushima Y., Bastow K. F. and Lee K. -H. (1993) - Tannins as potent inhibitors of DNA topoisomerase II *in vitro*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82, 487-492.
- Katsouyanni K., Trichopoulos D., Boyle P. and Macmahon B. (1986) - Diet and breast cancer. A case control study in Greece, *International journal of cancer*, 38, 815-820.
- Khac DD., Sung TV., Campos AM., Lallemand JY. and Fetizon M. (1990) - Ellagic compounds from *Diplolanax stachyanthus*, *Phytochemistry*, 29, 251-256.
- Khanduja K. L., Gandhi R. K., Pathania V. and Syal N. (1999) - Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 313-318.
- Kinsella J.E., Frankel E., German J. and Kanner (1993) - Possible mechanisms for the protective role of antioxidants of wine and foods, *Food Technology*, 85-89.
- Koshiura R. and Okuda T. (1993) - Antitumor activities of ellagitannins against sarcoma-180 in mice, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 16, 379-387.
- Kohlmeier L., Weerings K.G.C., Steck S. and Kok F.J. (1997) - Tea and cancer prevention -? An evaluation of the epidemiologic literature, *Nutrition and Cancer*, 27, 1-13.
- Kohno Y., Egawa Y., Itoh S., Nakaoga S., Takahash M. and Mukai K. (1995) - Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging of free radical by squalene in butanol, *Biochimica Biophysica. Acta*, 1256, 52-56.
- Kondo K., Kurihara M., Miyata N., Suzuki T. and Toyoda M. (1999) - Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 362, 79-86.
- Krietechevsky D., Martak D., and Rothblat G. (1963) - Detection of bile acids in thin-layer chromatography, *Analytical Biochemistry*, 15, 388-392.

- Kuller LH. (1997) - Dietary fat and chronic diseases: epidemiologic overview, *Journal of the American Dietetic Association*, 97, S9-S-15.
- Lakenbrink C., Engelhardt U. H. and Wray, V. (1999) - Identification of two novel proanthocyanidins in green tea, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4621-4.
- Lavechia C., Favero A. and Franceschi S. (1998) - Monounsaturated and other types of fat, and risk of breast cancer, *European journal of cancer prevention*, 7, 461-464.
- Lazarus S. A., Adamson G. E., Hammerstone J.-F. and Schmitz H. H. (1999) - High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in food and beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3693-701.
- Lea A. G. H. (1982) - Reversed-phase HPLC of procyanidins and other phenolics in fresh and oxidizing apple juices using a pH shift technique, *Journal of Chromatography*, 238, 253-257.
- Leboeuf M., Cavé A., Bhaunik P. K., Mukherjee B. and Mukherjee R. (1982) - The phytochemistry of the annonaceae, *Phytochemistry*, 21, 2783-2813.
- Lecchi P. and Abramson F. P. (1998) - Analysis of biopolymers by size-exclusion chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 828, 509-513.
- Li XC., Elsohly HN., Hufford CD. and Clark AM. (1999) - NMR assignments of ellagic acid Derivatives, *Magnetic Resonance Chemistry*, 37, 856-859
- Lie Ken Jie, M.S.F. and Lam C.C. (1995) - ¹³C-NMR studies of polyunsaturated triacylglycerols of type AAA and mixed triacylglycerols containing saturated, acetylenic and ethylenic acyl groups, *Chemistry and Physics of Lipids*, 78, 1-13.
- Lie Ken Jie, M.S.F. and Lam, C.C. (1995) - ¹³C-NMR studies of triacylglycerols of type AAA containing (Z) and (E)-monoethylenic acyl groups, *Chemistry and Physics of Lipids* 78, 15-27.
- Lie Ken Jie M.S.F. and Mustafà J. (1997) - High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy-application to fatty acids and triacylglycerols, *Lipids*, 32, 1019-1034.
- Lin L., Kuo Y. and Chou C. (1999) - Immunomodulatory principles of *Dichrocephala bicolor*, *Journal of Natural Products*, 62, 405-408.
- Lorgue G., Lechevet J. et Rivière A. (1987) - Précis de toxicologie vétérinaire, Ed. du point vétérinaire, Maisons-Alfort.
- Mabry T.J., Markham K.R. K, Thomas B. (1970) - The systematic identification of Flavonoïds. Springer Verlag, Newyork, 235-261.
- Maire R. (1925) - Sur une colonie d'arganier des montagnes des Benisnassen, *Bulletin Société Histoire Naturelle Afrique du Nord*, 16, 150p.
- Mannina L., Luchinat C., Carmela Emanuele M. and Segre A. (1999) - Acyl positional distribution of glycerol tri-esters in vegetable oils: a ¹³C NMR study, *Chemistry and Physics of Lipids*, 103, 47-55.
- Maurin R., Fellat-zerrouk K. and Ksir M. (1989) - Huile d'argan « *Argania spinosa* » du Maroc, *Revue Française des Corps gras*, 36, 227-230.
- Maurin R., Fellat-zerrouk K. and Ksir M. (1992) - Positional analysis and determination of triacylglycerol, structure of *A. spinosa* seed oil, *Journal of the American Oil Chemist Society*, 69, 141-145.
- Meshely M.R., Momose Y., Natakeyama N., Kadot S., Hattorri M. and Namba T. (1995) - Effect of tinctormine of contraction and Ca⁺⁺ currents in single cardiomyocytes from dog, *Phytomedicine*, 1, 277-281.
- MHW, Notice No. 120, Official Gazette of Ministry of Health and Welfare, Japan (16 April, 1996).
- Mhirit O., Blerot PH. and Benzyane M. (1999) - Le Grand livre de la Forêt marocaine, Mardaga édit., Sprimont, 280 p.

- Middleton E.J.R. and Kandaswani C. (1993) - The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications of immunity, inflammation and cancer. In: *The flavonoids: advances in research since 1986*. Harborne J.B. (Ed.), Chapman and Hall, London, 619-652.
- Miketova P., Schram K. H., Withney J., Li M., Huang R., Kerns E., Valcic S., Timmermann B. N., Rourick R., and Klohr, S. (2000) - Tandem mass spectrometry studies on green tea catechins, Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea, *Journal of Mass Spectrometry*, 35, 860-869.
- Miyamoto K., Nomura M., Murayama T., Furukawa T., Hatano T., Yoshida T., Morimoto S., Nonaka G. I. and Nishioka I. (1986) - Tannin and related compounds XXXVIII, Isolation and characterisation of flavan-3-ol glucosides and procyanidine oligomers from *Cassia* bark (*Cinnamum Cassia* Blume), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34, 633-642.
- Nakachi K., Suemasu K., Suga K., Takeo T., Imai K., and Higashi Y. (1998) - Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients, *Japanese Journal of Cancer Research*, 89, 254-261.
- Nawwar M.A.M., Buddrus J. and Bauer H. (1982) - Dimeric phenolic constituents from the roots of *Tamarix nilotica*, *Phytochemistry*, 21, 1755-1758.
- Nawwar M.A.M., Hussein SAM. and Merfort I. (1994) - NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*, *Phytochemistry*, 36, 793-798.
- Nawwar M. A. M., Marzouk M. S., Nigge W. and Linscheid, M. (1997) - High-performance liquid chromatographic/Electrospray ionization mass spectrometric screening for polyphenolic compounds of *Epilobium hirsutum*-The structure of the unique ellagitannin Epilobamide -A., *Journal of Mass Spectrometry*, 32, 645-54.
- Newmark H.L. (1997)- squalene, olive oil and cancer risk: A review and hypothesis, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and prevention*, 6, 1101-1103.
- Nishiyama T., Hagiwara Y., Hagiwara H. and Shibamoto T. (1994) - Inhibitory effect of 2''-O-glycosyl isovitexin and alpha-tocopherol on genotoxic glyoxal formation in a lipid peroxidation system, *Food and Chemical Toxicology*, 32, 1047-1051.
- O'Connor C.J. and Barton R.H. (1999) - Quantitative ¹³C NMR assay and assignment of mixtures from lipase digestion of propane-1,2-diol butyrate, *Australian Journal of Chemistry*, 52, 123-127.
- Okuda T. (1999) - Novel aspects of tannins-renewed concepts and structure-activity relationships, *Current Organic Chemistry*, 3, 609-622.
- Okuda T., Yoshida T., and Hatano T. (2000) - Correlation of oxidative transformations of hydrolyzable tannins and plant evolution, *Phytochemistry*, 55, 513-29.
- Okuda T., Yoshida T. and Hatano T. (1989.) - Ellagitannins as active constituents of medicinal plants, *Planta Medica*, 55, 117-122.
- Ono K., Nakane H., Fukushima M., Charmann J.C. and Sinoussi B.F. (1990) - Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerase, *European Journal of Biochemistry*, 190, 469- 476.
- Oulad-Ali A., Kirchner V., Lobstein A., Weniger B., Anton R., Guillaume D. and Charrouf Z. (1996) - Structure elucidation of three triterpene glycosides from the trunk of *Argania spinosa*, *Journal of Natural Products*, 59, 193-195.
- Owen RW., Wimonwatwati T., Spiegelhalder B. and Bartch H. (1996) - A high performance liquid chromatography system for quantification of hydroxyl radical formation by by determination of dihydroxybenzoic acids, *European Journal of cancer prevention*, 5, 233-240.
- Owen RW., Mier W., Giacosa A., Hull W., Spiegelhalder B. and Bartsch H. (2000a) - Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total

- phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene, *Food Chemical Toxicology*, 38, 647-659.
- Owen RW., Giacosa A., Hull W., Haubner R., Spiegelhalder B. and Bartsch H. (2000b) - The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *European Journal of Cancer*, 36, 1235-1247.
- Owen RW., Mier W., Giacosa A., Hull W., Spiegelhalder B. and Bartsch H. (2000c) - Identification of lignans as Major Components in the Phenolic fraction of Olive Oil, *Clinical Chemistry*, 46, 976-988.
- Ozenda P. (1977) - Flore du Sahara. Ed. 2, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 622 p.
- Pakulski G and Budzianowski J. (1996) - Ellagic acid derivatives and naphthoquinones of *Dionea muscipula* from *in vitro* cultures, *Phytochemistry*, 41, 775-778.
- Palomino O., Gomez-Serranillos M. P., Slowing K., Carretero E. and Villar A. (2000) - Study of polyphenols in grape berries by reverse-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 870, 449-451.
- Pharmacopoeae française X^{ème} édition et supplément (1983-1996) - Maisonneuve, S. A. Moulins Les-Metz.
- Plumb G. W., De Pascual-Teresa S. and Santos-Buelga C. (1998) - Antioxidant properties of catechins and procyanidins: effect of polymerization, glycosylation and glycosylation, *Free Radical Research*, 29, 351-358.
- Potterat, O. (1997) - Antioxydants and free radical scavengers of natural origin, *Current Organic Chemistry*, 1, 415-440.
- Rahmani M. (1989) - L'huile d'argans: un produit alimentaire et diététique de qualité, in formation forestière continue, thème: l'arganier, station de recherche forestière, Rabat, 74, 81.
- Rao C V., Newmark HL. and Reddy BS. (1998) - Chemoprotective effect of squalene and colon cancer, *Carcinogenesis*, 19, 287-290.
- Renaud S. and Delorgeril M. (1992) - Wine, alcohol, platelets and the fresh paradox for coronary heart disease, *The Lancet*, 339, 1523-1526.
- Rezanka T. and Rezankova H. (1999) - Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis, *Analytica Chimica Acta*, 398, 253-261
- Ricardo-da-Silva J. M. (1990) - Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance reverse phase liquid chromatography, *Journal of Sciences and Food Agriculture*, 53, 85-92.
- Ricardo-da-Silva J. M., Cheynier V., Souquet J. M. and Moutounet M. (1991) - Interaction of grape seed procyanidin with various proteins in relation to wine fining, *Journal of Sciences and Food Agriculture*, 57, 111-125.
- Ricardo-da-Silva J. M., Darmon N. and Fernandez Y. (1991) - Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1549-1552.
- Rigaud J., Escribo-Bailon M. T., Prieur C., Souquet J. M. and Cheynier V. (1993) - Normal phase high performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cocoa beans and grape seeds, *Journal of Chromatography A*, 654, 255-260.
- Rish H.A., Jain M., Marlett L.D. and Howe G.R. (1994) - Dietary fat intake and risk of epithelial ovarian cancer, *Journal of National Cancer Institute*, 86, 1409-1415.
- Robyns et Ghesq (1934) - *Bulletin Société Royale Botanique Belge*, LXVII, p.39.
- Roedig-pinman A.; Gordon M H. (1998) - Antioxidant properties of myricetin and quercetin in oil and emulsions, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 169-180.

- Rohr G. E., Riggio G., Meier B., and Sticher O. (2000) - Evaluation of different detection modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus* spp. Part II. Liquid chromatography-mass spectrometry, *Phytochemical Analysis*, 11, 113-120.
- Ross A.R.S., Ikonomou M. G. and Orians K. J. (2000) - Characterization of dissolved tannins and their metal-ion complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 411, 91-102.
- Salminen J.-P., Ossipov V., Lojonen J., Haukioja E. and Pihlaja K. (1999) - Characterization of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 864, 283-291.
- Sanoner P., Guyot S., Marnet N., Molle D. and Drilleau J.-F. (1999) - Polyphenol profiles of french cider apple varieties (*Malus domestica* sp.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4847-4853.
- Sato T. (1987) - Spectral differentiation of 3,3'-di-O-methylellagic acid from 4,4'-di-O-methylellagic acid, *Phytochemistry*, 26, 2124-2125.
- Savey M. (1985) - Diagnostic d'une intoxication par les glands, *point vétérinaire*, 17, 365-366.
- Schwarzbach AE. And Ricklefs RE. (2000) - Systematic affinities of Rhizophoraceae and intergeneric relationships within Rhizophoraceae based on chloroplast DNA, nuclear ribosomal DNA and morphology, *American journal of Botany*, 87, 547-564.
- Sevenet T. (1994) - Plantes, moléculaires et médicaments. Dossiers Documentaires. Ed. CNRS, Nattran.
- Shahrzad S. and Bitsch I. (1996) - Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 741, 223-231.
- Shamon L.A. and Pezzutto J.M. (1994) - Plant mutagens : review and strategy for the identification of therapeutically useful agents. In Economic and Medicinal plant research. Wagner H. and Farnsworth (Eds.), Academic Press, London, 6, 235-297.
- Shklar G and OH S.K. (2000) - Experimental basis for cancer prevention by vitamin E, *Cancer Investigation*, 18, 214-222.
- Shin K. H. and Woo W. S. (1981) - Sedative action of Flavonoids and Saponin from the seeds of *Zizyphus vulgaris* var. spinous Bunge. *Soul TachakyoYanguso.*, *Opjukjip*, 20, 82-86.
- Sinha A., Taylor WH., Khan I.H., McDaniel S.T., Esko JD. (1999) - Glycoside primers of *Psittacanthus cucullaris*, *Journal of Natural Products*, 62, 1036-1038.
- Smith T.J., Yang G.Y., Seril D.N., Liao J. and Kim S. (1998) - Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene, *Carcinogenesis*, 19, 703-706.
- Spencer C.M., Cai Y., Martin R., Gaffney S.H., Goulding P.N., Mognolato D., Lilley T.H. and Haslam E. (1988) - polyphenol-complexation-some thoughts and observations, *Phytochemistry*, 27, 2397-2409.
- Suarez B., Picinelli A., and Mangas J. J. (1996) - Solid phase extraction and hplc determination of polyphenols in apple musts and ciders, *Journal of Chromatography A*, 727, 203-209.
- Tabata M., Tanaka S., Cho H.J., Uno C., Shimakura J., Ito M., Kamisako W. and Honda C. (1993) - Production of an anti-allergic triterpene bryonolic acid, by plant cell cultures. *Journal of Natural Products*, 56, 165-174.
- Tahrouch S., Mondolot C. L., Idrissi H.L.M. and Andary C. (1998) - Les flavonoïdes d'*Argania spinosa*. End International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, September 1-30.

- Tanaka T., Fujisaki H., Nonaka G.I. and Nishioka I. (1992) - Tannins and related compounds CXVII. Structures, preparation. High Performance Liquid Chromatography and some reactions of dehydroellagitannin-acetone condensates, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 40, 2937-2944.
- Terencio M.C., Sanz M.J. and Paya M. (1991) - Antihypertensive action of anthocyanins glycoside from *Rhamnus Lycioides*, *Journal of ethnopharmacology*, 31, 109-114.
- Teissedre T. L., Frankel E. N. and Waterhouse A. L. (1996) -Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidant from grapes and wine, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 55-61.
- Uchida K., Mizuno H., Hirota K., Tadeka K., Takeushi N. and Ishikawa Y. (1983) - Effect of spinasterol and sitosterol on plasma and liver cholesterol levels and biliary and fecal sterol and bile acid excretion in mice, *Japanese Journal of Pharmacology*, 33, 103-112.
- Udaya N., W., Shahidi F. and Chet R. Jablonski (1995) - Comparison of standard and NMR methodologies for assessment of oxidative stability of canola and soybean oils, *Food Chemistry*, 52, 249-253.
- Ulrich K., Yasser S., Essaharty B. A., Bettina P. and R. Berger (2000) - Antioxidant activity of extracts from roasted wheat germ, *Food Chemistry*, 71, 91-95.
- Ursini F., Rapuzzi I., Toniolo R., Tubaro F. and Bontempelli G. (2001) - Characterization of antioxidant effect of procyanidins, *Methods in Enzymology*, 335, 338-350.
- Versari A., Biesenbruch S., Barbanti D., Farnell P. J. and Galassi S. (1997) - Effects of pectolytic enzymes on selected phenolic compounds in strawberry and raspberry juices, *Food Research International*, 30, 811-817.
- Villasenor I.M. and Domingo P. (2000) - Anticarcinogenicity potential of spinasterol isolated from squash flowers, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 20, 99-105.
- Vinson J. A., Dabbagh Y. A. and Serry M. M. (1995) - Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using *in vitro* oxidation model for heart disease, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2800-2802.
- Viriot C., Scalbert A., Hervé du Penhoat C. L. M. and Moutounet M. (1994) - Ellagitannins in woods of sessile oak and sweet chestnut dimerization and hydrolysis during wood ageing, *Phytochemistry*, 36, 1253-1260.
- Wagner H., Bladt S. and Zgainski E.M. (1984) - Plant drug analysis, Springer-verlag, Tokyo-Newyork.
- Wasowicz W., Neve J. and Peretz A. (1993) - Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage, *Clinical Chemistry*, 39, 2522-252
- Wiseman C.V., Harris W.A. and Halmi K.A. (1998) - Eating disorders. *Medical Clinics of North America*, 82, 145-159.
- Wollenberg K.F. (1990) - Quantitative high resolution ¹³C nuclear magnetic resonance of the olefinic and carbonyl carbons of edible vegetable oils, *Journal of the American Chemical Society*, 67, 487-494.
- Xu H. X., Kadota S., Wang H., Kurokawa M., Shiraki K., Matsumoto T. and Namba T. A. (1994) - new hydrolysable tannin from *Geum japonicum* and its antiviral activity, *Heterocycles*, 38, 167-175.
- Yan-Hwa C. and Yu-Lang K. (1998) - A study on vegetable oil blends, *Food Chemistry*, 62, 191-195.
- Yager J. (1994) - Psychosocial treatments for eating disorders, review, *Psychiatry*, 57, 153-164.
- Yoshiaki A., Yukiko U., Sumiko T., Hideyuki I., Tsutomu H., Takashi Y. and Yasuhide T. (2002) - Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive, *Food Chemistry*, 77, 47-56.

Zhu J. and Filippich Ng.L. J. (1992) - Determination of tannic acid and its phenolic metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography and Biomedical Applications*, 577, 77-85

WILEY
INTERDISCIPLINARY

Chemical composition of the essential oils of *Annona cuneata* L. and *Annona senegalensis* Pers. stem barks

Farid Khallouki,¹ Chafique Younos,¹ Rachid Soulimani^{1*} and Jean Marie Bessi re²

¹ Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et de Biochimie Pharmacologique (LIMBP), Ethnobotany and Pharmacology Department, University of Metz, Bd. G n ral Delestraint, Campus Bridoux, 57070 Metz, France

² Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, Rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier, France

Received 20 July 2001

Revised 4 January 2002

Accepted 4 January 2002

ABSTRACT: The composition of the essential oils of the *Annona senegalensis* Pers. and *Annona cuneata* L. (Annonaceae) stem barks is reported. GC and GC–MS analyses showed *p*-cymene (36.0%) as the most abundant component of *A. senegalensis*, whilst sabinene (39.9%) was the main component of *A. cuneata*. α - and β -Pinene, (5.1% and 9.2%), β -phellandrene (4.9%), limonene (5.8%) and germacrene D (9.0%), were the major constituents of *A. cuneata*; those of *A. senegalensis* stem bark oil were α -phellandrene (25.0%), α -pinene (8.3%), *Z*-sabinol (6.9%) and limonene (4.8%). Copyright   2002 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: *Annona cuneata*; *Annona senegalensis*; stem bark; essential oil; *p*-cymene; sabinen

Introduction

Annona senegalensis Pers. is cultivated in tropical Africa by seeds, coppicing, or root suckers. In northern Nigeria the ripe fruits are eaten. The inhabitants of the 'savanna belt' of Nigeria use the shoots as signposts and supports for thatched roofs because of their resistance to termites. In traditional medical practice, the seeds are used to eliminate lice¹ the stem bark to kill intestinal worms² and the root bark to treat cancer.³ In Congo, the plant is prescribed as an additive in medicine for asthma and a decoction of the stem barks is used to cure cephalgia.

Various parts of *A. senegalensis* have been found to have antimalarial,⁴ antitumour,³ antitrypanosomal,⁵ macrofilaricidal,⁶ and insect growth-regulatory properties.⁷ The reported chemical components of *A. senegalensis* include tannins and free amino acids from the stem bark,⁸ ent-kaurenoids from the root bark,^{9,10} essential oils from the fruits,^{11,15} and (–)-roemerine¹² from the leaves and acetogenins from the seeds.¹³

A review of the volatiles of Annonaceae spp. have been published by Ekundayo;¹⁴ more than 200 volatile components have been characterized as constituents of Annonaceae spp. thus far. The essential oils consist mainly of mono- and sesquiterpenoids, with typical constituents being α - and β -pinene, myrcene, *p*-cymene,

limonene, linalool and 1,8-cineole. Fekam¹⁵ observed the aroma note in the essential oil of the fruit of nine *Annona* spp. from Cameroon. It is noticeable that the fruits and leaves from *A. senegalensis* are poor in essential oil, in which monoterpenes such as α -phellandrene, α -pinene, myrcene and ocimene predominate.

A decoction of stem barks of *A. cuneata* L. is used against venereal diseases, sexual asthenia and sterility (personal information) but no data have been available about the chemical composition or pharmacological activities of this species until now.

In addition, the genus *Annona* in Senegal is known to be used in traditional medicine for the treatment of various illness, the leaves of *A. muricata* L. are eaten and their decoction is used to cure diabetes and bronchitis.¹⁶ The diverse range of biological activities in *Annona* led us to investigate the chemical composition of the essential oil from the stem barks of *A. cuneata* L. and *A. senegalensis* Pers.

Experimental

Plant Material and Oil Isolation

The stem barks of *A. cuneata* and *A. senegalensis*, were collected around the Lemfu area (Bas Congo) in the Democratic Republic of Congo (DRC), during June 1999. After hydrodistillation (4 h) in accordance with the *European Pharmacopoeia*, essential oils were obtained from *A. senegalensis* and *A. cuneata* in yields of 0.16% and 0.3%, respectively. Voucher specimens

*Correspondence to: Rachid Soulimani, Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et de Biochimie Pharmacologique (LIMBP), Ethnobotany and Pharmacology Department, University of Metz, Bd. G n ral Delestraint, Campus Bridoux, 57070 Metz, France.
E-mail: soulimani@zeus.univ-metz.fr

were deposited in the Herbarium at the Institute of Agromomic Research Studies (INERA) in Kinshasa.

GC Analysis

GC analysis was performed using a 5892 Hewlett-Packard gas chromatograph equipped with an FID detector. 1 µl of the genuine oil was injected in the split mode into a DB-1 (polydimethylsiloxane) fused silica capillary column, 25 m × 0.23 mm, 0.2 µm film thickness.

The chromatographic conditions were as follows: injector temperature, 220 °C; detector temperature, 250 °C; oven temperature programmed from 50 °C (3 min), rising to 200 °C at 3 °C/min, with a final hold time of 30 min; helium was the carrier gas, with a flow rate of 0.9 ml/min.

The relative proportions of individual components were expressed as percentages obtained by peak-area normalization without taking into account relative response factors.

GC-MS Analysis

GC-MS analysis was performed on the Hewlett-Packard GC-quadrupole MS system (Model 8970), fitted with the same GC column programme. It was operated at 70 eV for ionization by electron impact at 200 °C; electron current, 220 µA; vacuum, 10⁻⁵ Torr. Mass spectra were acquired over a 40–450 amu range at 1 scan/s.

Identification of the components was based on MS data in spectrometry library and on comparison of their mass spectra with authentic reference compounds published in the literature.¹⁷

Results and Discussions

After hydrodistillation, the oils were submitted to GC and GC-MS. The results of the GC-MS performed on the stem barks of *A. cuneata* and *A. senegalensis* occurring in the Lemfu area of the DRC are summarized in Table 1. Of 25 components present in the

Table 1. The percentage composition of the essential oil from *A. cuneata* L. and *A. senegalensis* Pers.

Retention Index	Compounds	<i>A. cuneata</i> L. (%)	<i>A. senegalensis</i> Pers. (%)
934	α-Thujene	1.4	2.12
944	α-Pinene	5.1	8.3
977	Sabinene	39.9	—
980	Myrcene	9.2	—
981	β-Pinene	1.0	3.9
997	δ-2-Carene	—	0.5
1008	α-Phellandrene	0.4	25.0
1020	α-Terpinene	0.6	—
1026	p-Cymene	0.8	36.0
1030	Limonene	5.8	4.8
1030	β-Phellandrene	4.9	—
1031	1,8-Cineole	1.1	—
1033	Z-β-Ocimene	—	2.0
1063	γ-terpinene	1.3	—
1080	Sabinene hydrate	1.0	—
1089	Terpinolene	0.3	—
1093	Linalool	3.8	1.6
1181	Terpinen-4-ol	2.3	—
1193	α-Terpineol	1.1	—
1222	Z-Sabinol	—	6.9
1328	Thymol	—	0.4
1341	δ-Elemene	3.0	—
1354	α-Cubebene	—	0.5
1380	β-Cubebene	—	0.4
1381	α-Copaene	0.2	0.9
1394	β-Elemene	3.8	—
1420	β-Caryophyllene	0.9	1.7
1430	E-α-Bergamotene	—	0.5
1446	γ-Elemene	0.3	—
1453	α-Humulene	0.5	0.4
1466	β-Ionone	—	0.2
1472	Germacrene D	—	1.0
1496	α-Muurolene	—	1.0
1527	δ-Cadinene	—	0.4
1540	α-Cadinene	—	0.2
1556	Elemol	1.6	—
1560	Germacrene B	0.4	—
1631	α-Muurolol	—	0.4
1642	α-Cadinol	—	0.6

A. senegalensis oil, 24 were identified, as well as all 26 components in the *A. cuneata* essential oils.

In *A. senegalensis*, 10 monoterpene hydrocarbons were identified, comprising (84.22%) of the oil, and the most abundant components were *p*-cymene (36.0%), α -pinene (8.3%) and limonene (4.8%). Oxygenated monoterpenes, including linalool (1.6%), *Z*-sabinol (6.9%) and thymol (0.4%), were also identified. The sesquiterpenes account for 8.2% of the oil and among them β -caryophyllene (1.7%) showed the highest concentration.

The stem bark from *A. senegalensis* growing in Congo is relatively rich in essential oil (0.16%) compared with the fruits (0.08%) of the same species growing in Cameroon. Ekundayo *et al.*¹¹ have reported, on plant material collected in Nigeria, that the volatile aroma composition varies with the origin of the plant and the part of plant used. The main constituents from the oil were 3-carene, sabinene and cryptone in the fruits and linalool, geraniol, α -farnesene and α -cadinol in the leaves.

In *A. cuneata* essential oils, nine sesquiterpenes (19.7%) were found, with germacrene D (9.0%) as the main component; 17 monoterpenes (about 80%) were identified, with sabinene (39.9%) as the most abundant constituent.

Both essential oils contained α -thujene, α -pinene, β -pinene, α -phellandrene, *p*-cymene, limonene, linalool, α -copaene, α -humulene and germacrene D, but qualitative and quantitative variations were observed in minor and major constituents. The volatile oil from *A. cuneata* was found to be relatively richer in sesquiterpenes (19.7%) than the oil from *A. Senegalensis* (8.2%).

The presence of phenyl derivatives (*p*-cymene, 36.0%) in such a high percentage of the essential oil of *A. senegalensis* makes it strongly odoriferous and thus it could be a valuable raw material for various pharmaceutical and cosmetic preparations.

It is also well known that *p*-cymene is an important product and valuable intermediate in the chemical industry; more particularly, its conversion to *p*-cresol in good yields is significant.¹⁸ The significant difference in the concentration levels of these two major components (sabinene 39.9% in the essential oils stem bark from *A. cuneata* and *p*-cymene 36.0% from *A. senegalensis*) allows an easy differentiation between these two species.

Acknowledgements—The Authors wish to thank Mr A. Kunda Ko, researcher at the Institute of Agronomic Research Studies, for collecting and donating the plant material.

References

- Hirschmann GS, De-Arias AR. *J. Ethnopharmacol.* 1990; 29: 159–172.
- Weiss EA. *Econ. Bot.* 1979; 33: 35–51.
- Durodola JT. *Planta Med.* 1975; 28: 32–36.
- Balansard G, Timan-David P. Patent—France Demande. 2 550 093, 1985.; *Chem. Abstr.* 1985; 103: 42666x.
- Igwe AC, Onabanjo AO. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1989; 83: 527–534.
- Comley JCW. *Trop. Med. Parasitol.* 1990; 41: 1–9.
- Jacobson M, Redfern RE, Mills GD. *Lloydia* 1975; 38: 455–472.
- Bamba D, Balansard G, Maillard C, Dumenil G, Gayte-Sorbier A. *Plantes Med. Phytother.* 1984; 18: 36–45.
- Eshiet ITU, Akisanya A, Taylor DAH. *Phytochemistry* 1971; 10: 3294–3295.
- Adesogan EK, Durodola JI. *Phytochemistry* 1976; 15: 1311–1312.
- Ekundayo O, Oguntimein B. *Planta Med.* 1986; 52: 202–204.
- You M, Wickramaratne MDB, Silva GLH *et al.* *J. Nat. Prod.* 1995; 58: 598–604.
- Sahpaz S, Laurens A, Hocquemiller R, Cave A, Cortes D. *Can. J. Chem.* 1994; 72: 1533–1536.
- Ekundayo O. *J. Essent. Oil. Res.* 1989; 1: 223–245.
- Fekam Boyom M, Amvam Zollo PH, Menut C, Lamaty G, Bessiere JM. *Flavour Fragr. J.* 1996; 11: 333–338.
- Saulnier P. *Plantes Médicinales et Soins en Afrique: Manuel d'Utilisation.* Sepia: Saint Maur, F, 1998; 128.
- Adams RP. *Identification of Oils by Ion Trap Mass Spectrometry.* Academic Press: New York, 1989.
- Buhl D. Support effects in the Pd catalyzed dehydrogenation of terpene mixtures to *p*-cymene. *Applied Catalysis A: General* 1998; 171(1): 1–11.

Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects

F Khallouki¹, C Younos¹, R Soulimani¹, T Oster¹, Z Charrouf²,
B Spiegelhalder³, H Bartsch³ and R W Owen³

The aim of this study was to evaluate the fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic antioxidants in three types of argan oil (Moroccan food, Moroccan aesthetic and a French commercial variety) along with a basic comparison with extra virgin olive and sunflower oil. The fatty acid profiles in the argan oils were very similar, with oleic acid (43%) and linoleic acid (36%) and their respective monoacylglycerols predominating. The major vitamer identified was γ -tocopherol with a mean of 483 ± 11 mg/kg, in contrast to α -tocopherol, which is the major vitamer in olive (190 ± 1 mg/kg) and sunflower oil (532 ± 6 mg/kg). The squalene content of the argan oils was very similar with a mean of 313 ± 4 mg/100 g, which is lower than that of the olive oil (499 mg/100 g) but significantly higher than in the sunflower oil (6 mg/100 g). In contrast to olive and sunflower oils in which β -sitosterol is predominant, the major sterols detected in the argan oils were schottenol (mean 147 ± 10 mg/kg) and spinasterol (mean 122 ± 10 mg/kg). The only phenolic compounds other than the tocopherol vitamers which could be readily detected and quantitated were vanillic, syringic and ferulic (probably conjugated to glucose) acids along with tyrosol.

Introduction

Although data on the incidence of cancer in African countries is sparse and relates mainly to regions, it is evident that the diet of this continent, which is especially high in plant-derived products, confers cancer prevention properties on its inhabitants. For example, the incidence of breast and colon cancer is much lower than in Western Europe and North America (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 1997).

Lipid peroxidation, by the production of harmful reactive oxygen species (ROS) in humans, is now regarded to be a major cause of mutagenesis, carcinogenesis, cardiovascular disease and ageing. Antioxidants are believed to prevent or delay the onset of these processes. A treatise on the role of antioxidants in cancer prevention is given in Bartsch *et al.* (1999, 2002).

A source of antioxidants is seasoning oils, which have a high calorific value and contain varying amounts of

essential fatty acids, such as linoleic acid necessary for the correct development of human tissue (FAO, 1978). An excellent example is extra virgin olive oil, which contains in addition an abundance of phenolic antioxidants including simple phenols, secoiridoids and lignans (Owen *et al.*, 2000a,b,c,d).

Argan oil is a product harvested from the fruits of the argan tree (*Argania spinosa*). Production of argan oil is endemic to south-west Morocco, where it plays a major ecologic and socio-economic role (Charrouf and Guillaume, 1999; Rezanka and Rezankova, 1999). However, in contrast to other seasoning oils, its potential health-protecting properties have been little studied. The traditional method for the production of argan oil is by hand, and is usually conducted by women. The fruits of the tree are harvested and allowed to dry in the sun before the pericarp is removed. The stones (nuts) are broken with rocks and the kernels (3–4 in number) are air-dried in clay containers and slowly roasted. The

In contrast to the extra virgin olive oil (783 mg/kg), the concentration of total phenolic compounds is extremely low (<5.0 mg/kg). Nevertheless, argan oil with its high content of the vitamer γ -tocopherol, squalene and oleic acid is likely to enhance the cancer prevention effects of the Moroccan diet. *European Journal of Cancer Prevention* 12:67–75 © 2003 Lippincott Williams & Wilkins.

European Journal of Cancer Prevention 2003, 12:67–75

Keywords: Antioxidative activity, argan oil, GC-MS, HPLC, long-chain fatty acids, phenolic compounds, squalene, sterols, tocopherols, unseparable fraction

¹Laboratoire D'Ingénierie Moléculaire et de Biochimie Pharmacologique, Université de Metz, Campus Bricouze, Rue Claude Bernard, 57070, Metz, France, ²Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Avenue Ibn Baidou, B.P. 1014, Rabat, Morocco and ³Division of Toxicology and Cancer Risk Factors, German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg, Germany.

Correspondence to: R W Owen, Laboratoire D'Ingénierie Moléculaire et de Biochimie Pharmacologique, Université de Metz, Campus Bricouze, Rue Claude Bernard, 57070, Metz, France.
Fax: (+49) 6221 42 3359. E-mail: r.owen@dkfz-heidelberg.de

Received 30 April 2002 Accepted 5 September 2002

roasted kernels are crushed and kneaded into a paste or dough with hot water. The resulting oil/water mixture is separated, furnishing a brown oil with a hazelnut taste. This is termed 'food' argan, which is used for culinary purposes. An 'aesthetic' variety of argan oil is also produced for cosmetic purposes without roasting the kernels. This form of the oil is used for the treatment of dermatologic disease (e.g. acne), hypercholesterolaemia and atherosclerosis among other maladies.

Argan oil is known to be a rich source of linoleic acid and tocopherols (Boukhobza and Pichon-Prum, 1988) and to contain the phenolic antioxidants caffeic acid and oleuropein (Chimi *et al.*, 1988) along with the δ^7 -sterols schottenol and spinasterol (Boukhobza and Pichon-Prum, 1988). However, definitive data on the lipid and antioxidant content of argan oil is sparse. The objective of this study was to conduct a comprehensive evaluation of the fatty acid, tocopherol, squalene, sterol and phenolic antioxidant content of this nutritionally important seasoning oil endemic to Morocco.

Materials and methods

Standard compounds

Tyrosol (*p*-hydroxyphenyl)ethanol, syringic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, Trolox, vanillic acid, vanillin, α -tocopherol, γ -tocopherol, δ -tocopherol and $\text{Fe}_2\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ferulic acid and ethylenediamine tetra-acetic acid were obtained from Fluka Chemic (Buchs, Switzerland). Acetic acid, methanol, hypoxanthine, xanthine oxidase and salicylic acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Oils studied

The traditional food and aesthetic varieties of argan oil were kindly donated by the Argan Oil Women's Cooperative (Targanine), Tamarar (Essaouira region), Morocco. The commercial French variety was kindly donated by Mille et une Huiles Company, Paris, France. The extra virgin olive oil from Italy (Apulien) was a gift from Zait (67265 Grünstadt, Germany) while the sunflower oil was purchased from a local supermarket in Heidelberg, Germany.

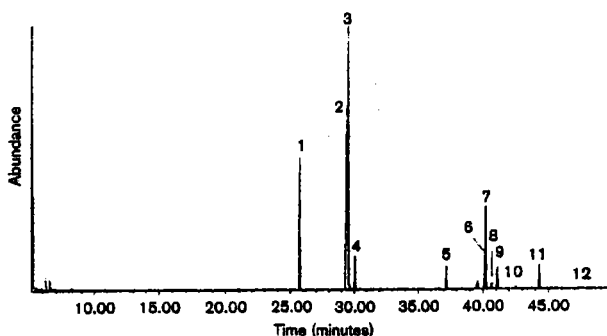
Preparation of extracts

This was conducted as described by Owen *et al.* (2000c) with some modifications. The dry methanolic extracts were suspended in acetonitrile (2.0 ml) and extracted three times with hexane (1.0 ml) to reduce lipid components. The hexane extracts were discarded, and the acetonitrile solutions were dried under a stream of nitrogen and dissolved in methanol (1.0 ml) prior to analysis.

Table 1 Composition of lipids in the argan oils

Fatty acid	Argan oil composition (%)		
	Food	Aesthetic	Commercial
Palmitic acid	18.4	18.5	15.6
Stearic acid	4.2	3.7	8.5
Oleic acid	43.1	45.0	41.2
Linoleic acid	36.4	35.0	37.9
Monoacylglycerols			
Palmitoyl	15.9	14.0	18.0
Stearoyl	4.5	3.4	3.9
Oleoyl and linoleoyl	79.8	82.6	78.2

Fig. 1



The long-chain fatty acid and monoacylglycerol profile (TMS-ethers) in the aesthetic variety of argan oil as determined by GC/MS after saponification with KOH (10%) in distilled water. (1) Palmitic acid, (2) linoleic acid, (3) oleic acid, (4) stearic acid, (5) monoacylglycerol of palmitic acid, (6) monoacylglycerol of linoleic acid, (7) monoacylglycerol of oleic acid, (8) monoacylglycerol of stearic acid, (9) squalene, (10) δ -tocopherol, (11) γ -tocopherol, (12) α -tocopherol.

Table 2 Content of tocopherol vitamins in the oils

Oil type	Tocopherol vitamin			Total
	γ	α	δ	
Argan (food)	480 \pm 7	35 \pm 1	122 \pm 10	636 \pm 18
Argan (aesthetic)	485 \pm 21	44 \pm 3	120 \pm 5	629 \pm 28
Argan (commercial)	504 \pm 4	48 \pm 2	111 \pm 4	660 \pm 2
Olive	26 \pm 1	190 \pm 1	42 \pm 2	257 \pm 3
Sunflower	39	532 \pm 8	11	582 \pm 8

Data expressed in mg/kg \pm SEM from duplicate analyses determined by HPLC.

Acid hydrolysis

This was conducted exactly as described by Owen *et al.* (2000d).

Unsaponifiable matter

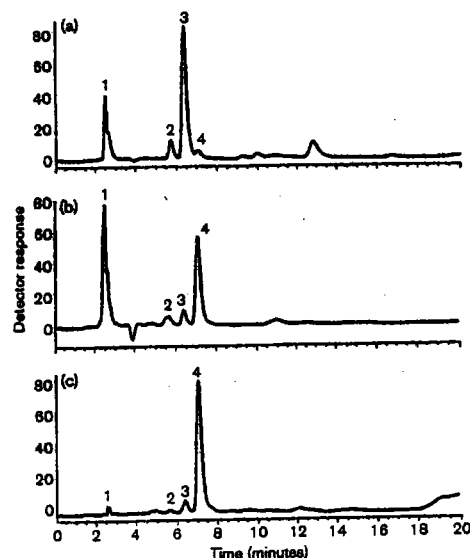
For the preparation of unsaponifiable matter containing predominantly squalene and sterols, each oil (400 mg) was well mixed with KOH (10%) in methanol (50 ml) with the use of sonication in Erlenmeyer flasks (100 ml), and horizontally shaken at 30°C for 24 h. After incubation, distilled water (10.0 ml), ethanol (1.0 ml) and hexane (20.0 ml) were added. The incubates were shaken vigorously in separatory funnels and after partition the hexane layer was collected. The remaining aqueous/alcohol phase was extracted twice more with hexane (20 ml). The hexane extracts were pooled, dried over anhydrous MgSO₄ and the solvent removed *in vacuo*. Dry extracts were suspended in dichloromethane (10.0 ml). Prior to GC-MS, 50 μ l (dried under nitrogen) of these suspensions were derivatized with bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) (100 μ l) at 37°C for 15 min.

For the preparation of unsaponifiable matter enriched in tocopherols, long-chain fatty acids and monoacylglycerols, the concentration of KOH (10%) remained the same but methanol was replaced by distilled water. After a similar incubation period, extraction was conducted with dichloromethane (50 ml) twice. The extracts were pooled, worked-up as before and suspended in methanol (2.0 ml) prior to GC-MS.

High-performance liquid chromatography (HPLC)

Analytical HPLC of the methanolic extracts was conducted on a Hewlett Packard (HP), 1090 liquid chromatograph fitted with a reverse-phase, C-18 column (Latex-Eppelheim, Germany) as described by Owen *et al.* (2000c). Evaluation of the tocopherols (in duplicate), was conducted on the same machine and column using methanol (100%) as the mobile phase run isocratically for 20 min. After each run, the column was washed with dichloromethane for 10 min and the column was reconditioned with methanol also for 10 min prior to the next injection. Instrument control and data handling was by

Fig. 2



The tocopherol profile of the aesthetic variety of (a) argan compared to (b) olive (extra virgin) and (c) sunflower oil as determined by HPLC. (1) Void volume, (2) δ -tocopherol, (3) γ -tocopherol, (4) α -tocopherol.

means of an HP Chemstation operating in the Microsoft Windows™ software environment. Prior to analysis (20 μ l), the oils were dissolved in an equal volume of dichloromethane. The tocopherol content was monitored at 295 nm and quantitated with reference to standard curves of each vitamin in the range 0–500 μ g/ml.

Squalene analysis

Squalene analysis by gas chromatography was conducted as described by Owen *et al.* (2000c).

Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)

This was conducted by the methods of Owen *et al.* (2000c) on a Agilent 5973 mass quadrupole spectrometer coupled to a Agilent 6890 gas chromatograph.

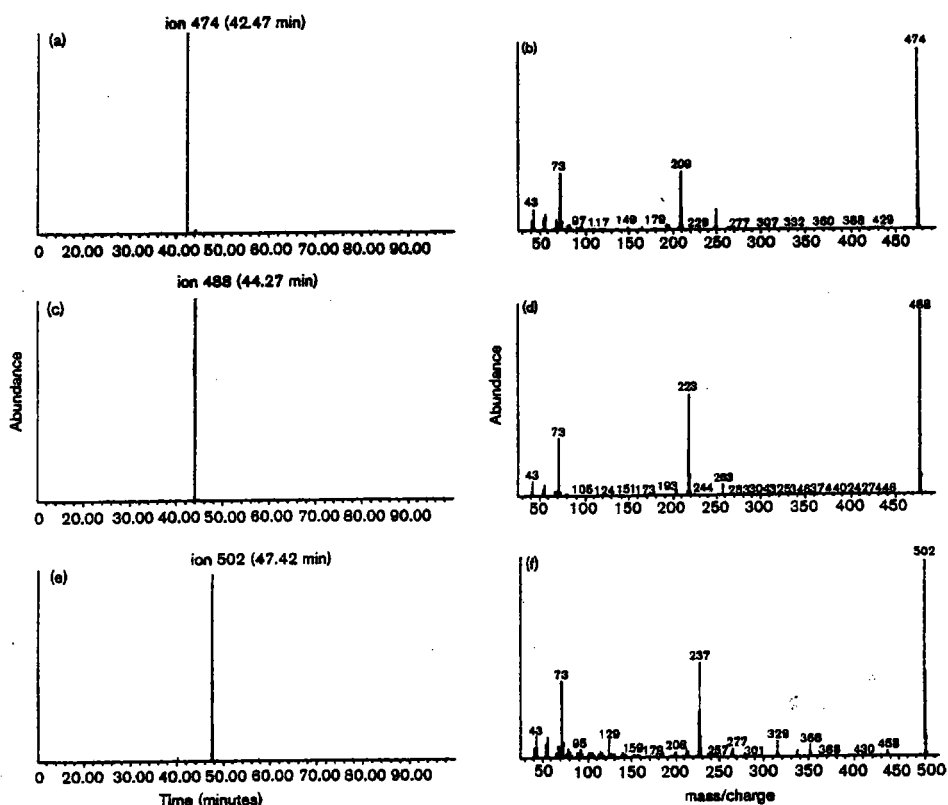
Antioxidant assay

The antioxidant capacity of methanolic extracts of the oils and pure phenolic compounds was assessed as described by Owen *et al.* (1996, 2000c).

Statistics

Differences in the antioxidant parameters were calculated by multiple linear regression. Inhibitory concentra-

Fig. 2



The tocopherol profile in the aesthetic variety of argan oil as determined by GC/MS of the unsaponifiable fraction. (a) Selected ion (m/z 474) of δ -tocopherol and (b) its mass spectrum. (c) Selected ion (m/z 488) of γ -tocopherol and (d) its mass spectrum. (e) Selected ion (m/z 502) of α -tocopherol and (f) its mass spectrum.

tions (IC_{50} values) were determined using the Table Curve programme (Jandel Scientific, Chicago, IL, USA).

Results

Long-chain fatty acid and monoacylglycerol profiles

The profiles of the long-chain fatty acids in the three argan oils (Figure 1) studied were very similar and in accordance with previously published data (Table 1). The major unsaturated fatty acid detected was oleic (C18-1 n -9) followed closely by linoleic acid (C18-2 n -6). Linolenic acid (C18-3 n -3) was not detected. On average, of the saturated long-chain fatty acids, palmitic acid (C16-0) predominated with minor amounts of stearic acid (C18-0), representing 16 and 5.5% of the total respectively.

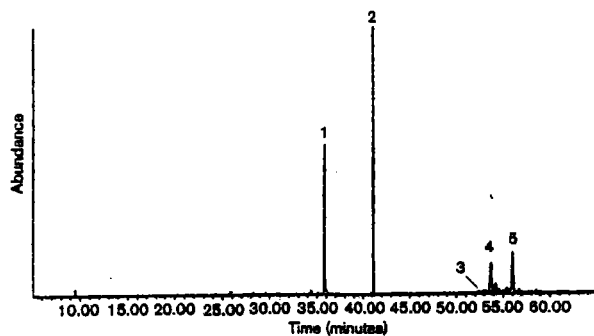
Compared with olive oil (13.5%) argan contains rather more linoleic (36%) but less oleic acid (43 versus 73%). Furthermore, the argan oils contained less linoleic (36% versus 53%) but similar levels of oleic acid (43 versus 39%) compared with sunflower oil.

The profiles of the monoacylglycerols in argan oils closely mirrored those of the long-chain fatty acids (Table 1, Figure 1), with oleoyl and linoleoyl predominating.

Tocopherol profiles

Because saponification of the oils resulted in degradation of the tocopherol vitamins, especially using 10% KOH in methanol, a softer technique was sought so that the

Fig. 4



Squalene and sterol profile of the aesthetic variety of argan oil as determined by GC/MS of the unsaponifiable fraction after saponification with KOH (10%) in methanol. (1) 5β -Androstan-3,17-dione (internal standard), (2) squalene, (3) δ^{22} -stigmastadiene-3- β -ol, (4) spinasterol, (5) schottenol.

Table 3 Content of squalene in the oils

Oil type	Method	
	GC-MS	GC
Argan (food)	314 \pm 1	319 \pm 3
Argan (aesthetic)	321 \pm 6	311 \pm 2
Argan (commercial)	303 \pm 4	275 \pm 1
Olive (extravirgin)	499	nd
Sunflower	6	nd

Data expressed in mg/100 g \pm SEM for duplicate samples. Calculated against the internal standard 5β -androstan-3,17-dione (GC-MS, 50 μ g/ml; GC, 1.0 mg/ml). Correction factor for TIC response = 0.83; for FID response = equivalent. nd, not determined.

absolute values in the oils could be reliably determined. For this we turned to HPLC, and the total amounts of tocopherols detected were very similar in the three types of argan oils (Table 2). Total tocopherol content in the food, aesthetic and a commercial French variety of argan oil represented 636 \pm 18, 629 \pm 28 and 660 \pm 2 mg/kg respectively. This is very close to data previously reported. Until now, however, the major tocopherol reported in argan oil has been α -tocopherol but in the current study, the data show that the predominant tocopherol is actually γ -tocopherol, representing on average 75% of total tocopherols, compared with δ -tocopherol (18%) and α -tocopherol (7%). This is clearly shown by HPLC (Figure 2) of the diluted and by GC-MS (Figure 3c,d) data of the unsaponifiable fraction (KOH (10%) in distilled water) of the oils. As previously reported, the major tocopherol in olive and sunflower oils is α -tocopherol (Figure 2) and the total values determined are very close to those previously published (Table 2).

Squalene

Squalene content of the argan oils was determined by both GLC and GC-MS. Dilution of the oils in dichloromethane and analysis by GLC gave reasonable data but required continual replacement of the column packing material (Owen *et al.*, 2000c). Therefore a GC-MS method was developed. This entails saponification of the fat with KOH (10%) in methanol leaving an unsaponifiable fraction containing predominantly squalene and sterols (Figure 4). Although the squalene content (Table 3) of the three argan oils was very similar (mean 313 \pm 4 mg/100 g), a slightly higher content (321 \pm 6 mg/100 g) was detected in the aesthetic variety. The squalene content of the argan oils was somewhat lower than that of the extra virgin olive oil (499 mg/100 g) but significantly higher than in the sunflower oil (6 mg/100 g) sample.

Sterols

The sterol content (Table 4) of the unsaponifiable fraction was also determined by GC-MS (Figure 4). The major sterols detected in argan oils were, on average, schottenol (48%) and spinasterol (40%) with minor amounts of δ^{22} -stigmastadiene-3- β -ol. This contrasts with the major sterol in olive and sunflower oil, which is β -sitosterol. Olive oil also contains lesser amounts of the dimethyl sterols methylenecycloartenol and cycloeucaenol, while campesterol and stigmasterol are also detected in sunflower oil.

Phenolic compounds

The detection of phenolic compounds in argan oil is a challenge. Using techniques developed for the comprehensive evaluation of phenolic compounds in olive oil

Table 4 Content of sterols in the oils

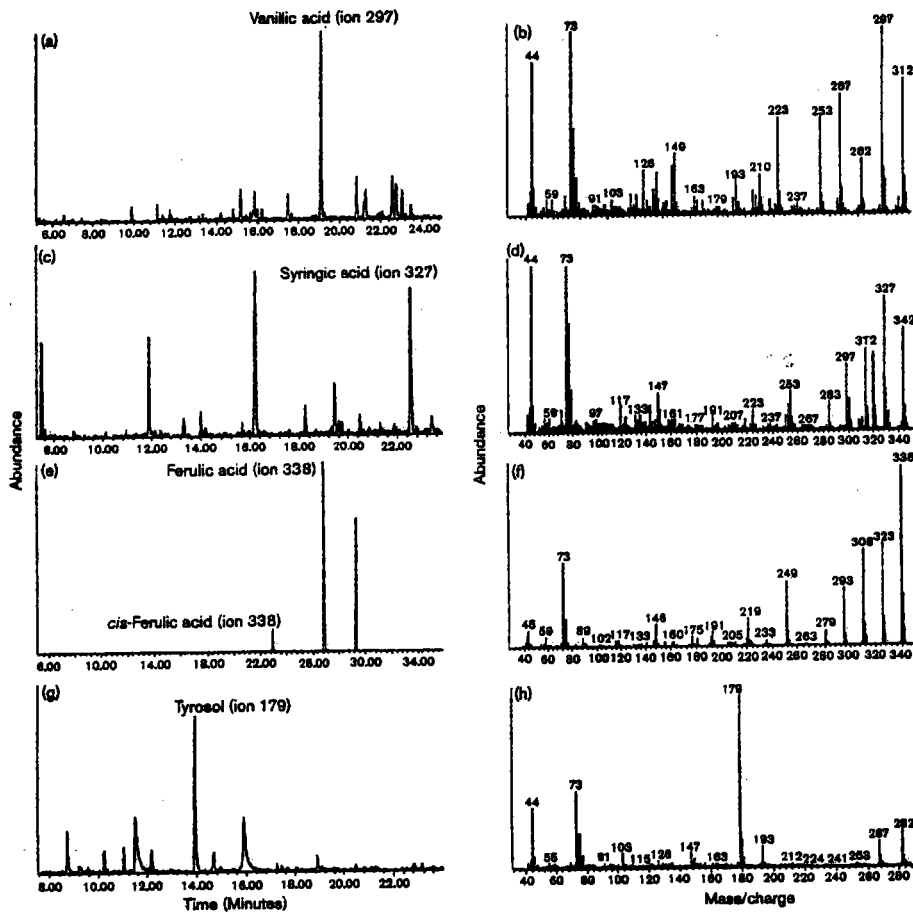
Sterol	Oil type				
	Argan (food)	Argan (aesthetic)	Argan (commercial)	Olive (extra virgin)	Sunflower
Scholesterol	142 ± 11	137 ± 7	163 ± 11	nd	nd
Spinasterol	118 ± 7	100 ± 1	151 ± 9	nd	nd
β - β -Stigmastadiene-3 β -ol	9 ± 1	11	15 ± 1	nd	nd
β -Sitosterol	nd	nd	nd	156 ± 3	312 ± 18
Campesterol	nd	nd	nd	12 ± 1	51 ± 3
Stigmasterol	nd	nd	nd	nd	37 ± 2
Others	29 ± 1	24 ± 2	28 ± 2	161 ± 10*	77 ± 2
Total	296 ± 20	272 ± 10	367 ± 23	319 ± 14	477 ± 23

Data expressed in mg/100 g \pm SEM from duplicate analyses by GC-MS.

*These are the dimethyl sterols 24-methylencycloartenol (47 \pm 3 mg/100 g) and cyclooleucatenol (104 \pm 7 mg/100 g).

nd, not detected.

Fig. 1



GC-MS (TMS ethers) of the phenolic compounds detected in the food variety of argan oil. (a) Selected ion (m/z 297) of vanillic acid and (b) its mass spectrum. (c) Selected ion (m/z 327) of syringic acid and (d) its mass spectrum. (e) Selected ion (m/z 338) of ferulic acid* and (f) its mass spectrum. (g) Selected ion (m/z 179) of tyrosol and (h) its mass spectrum. *Only detected after acid hydrolysis of the methanolic extracts.

Table 5 Content of phenolic compounds detected in the oils

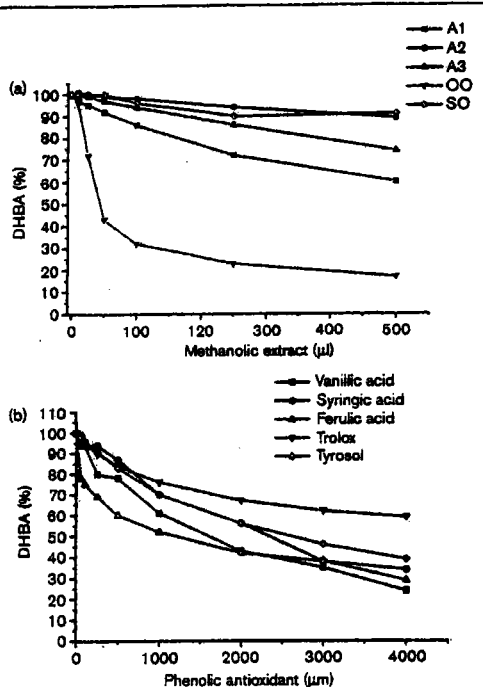
Oil type	Phenolic compound					Total
	Vanillic acid	Syringic acid	Ferulic acid ^a	Tyrosol	Others	
Argan (food)	67 ± 3	37 ± 5	3147 ± 20	12 ± 1	0	3263 ± 20
Argan (aesthetic)	6 ± 1	0	3211 ± 6	3	0	3220 ± 6
Argan (commercial)	123 ± 12	68 ± 4	3470 ± 13	52 ± 2	0	3713 ± 31
Olive (extra virgin)	359 ± 7	0	51 ± 2	19 573 ± 37	773 000 ± 63 ^b	792 983 ± 99
Sunflower	0	0	0	0	0	0

Data expressed in µg/kg ± SEM as determined in duplicate by GC-MS relative to standard curves of the authentic compounds in the range 0–50 µg/ml.

^aDetected in methanolic extracts only after acid hydrolysis and includes the *cis*-isomer.

^bIncludes hydroxytyrosol, secoiridoids, lignans and flavonoids determined by HPLC as described by Owen et al. (2000c,d).

Fig. 6



Attenuation of reactive oxygen species detection. (a) By methanolic extracts of the oils in the hypoxanthine/xanthine oxidase assay. A-1 = food argan oil ($IC_{50} = > 2.0$ ml), A-2 = aesthetic argan oil ($IC_{50} = > 2.0$ ml), A-3 = French commercial argan oil ($IC_{50} = 1.90$ ml), OO = extra virgin olive oil ($IC_{50} = 44$ µl), SO = sunflower oil ($IC_{50} = > 2.0$ ml). (b) By authentic phenolic compounds detected in the oils in comparison to Trolox. Vanillic acid ($IC_{50} = 1.63$ mM), syringic acid ($IC_{50} = 2.20$ mM), ferulic acid ($IC_{50} = 1.17$ mM), Trolox ($IC_{50} = 12.24$ mM), tyrosol ($IC_{50} = 2.81$ mM).

(Owen et al., 2000a,b,c,d), such compounds are not readily detected by HPLC in the methanolic extracts. To detect the phenolic compounds from this matrix it is necessary to subject the methanolic extracts to GC-MS.

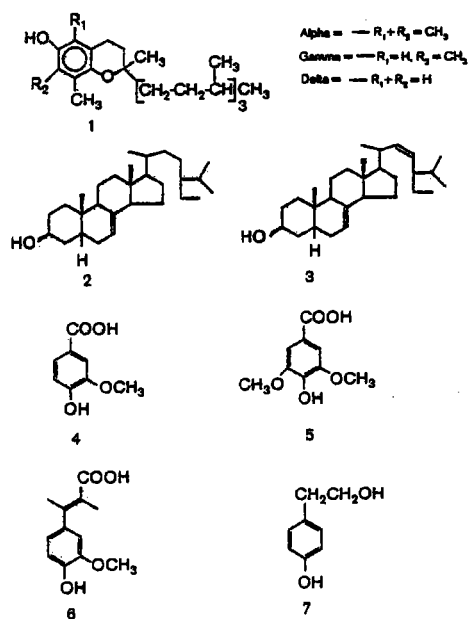
Using this technique the major phenolics were identified (Figure 5) as vanillic, syringic and ferulic acids plus tyrosol. Of these, ferulic acid was detected only in acid hydrolysates of the methanolic extracts suggesting conjugation to a sugar. The amounts determined were extremely low (Table 5) and were similar in crude extracts and after fractionation by silicic acid chromatography. *p*-Hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid and vanillin were also identified in trace amounts in these enriched fractions. In addition, a number of unidentified compounds with UV spectra similar to phenolics were also detected and warrant further investigation.

Antioxidant profiles of the oils

A major benefit, which can be derived from consumption of oils high in phenolic antioxidants is the ability of the latter to scavenge ROS. That the major simple phenols tyrosol and hydroxytyrosol are bioavailable in humans has been shown clearly by the studies of Covas et al. (2002), who demonstrated their presence in urine after daily challenges with olive oil. These data also demonstrate the ability of tyrosol to interact with ROS yielding higher than expected excretion rates of hydroxytyrosol based on the challenge given. This is consistent with the data of Owen et al. (2000a) demonstrating the scavenging by tyrosol of ROS generated by the faecal matrix yielding hydroxytyrosol.

Therefore, a basic evaluation of the antioxidant potential of methanolic extracts was conducted. The data show that of the three types of argan oil, the extracts of the food and French commercial oils are superior to the aesthetic variety. The antioxidant capacity of methanolic extracts of the food and commercial French varieties are clearly lower than that of extra virgin olive oil but moderately better than sunflower oil (Figure 6a). The antioxidant capacity of the four phenolic compounds definitively detected are superior to the soluble form of vitamin E, Trolox (Figure 6b) in the hypoxanthine/xanthine oxidase system, but their content in the oils did not correlate with the antioxidant capacity of the methanolic extracts.

Fig. 7



Structures of various compounds detected in argan oil. (1) Tocopherols, (2) schottenol, (3) spinasterol, (4) vanillic acid, (5) syringic acid, (6) ferulic acid, (7) tyrosol.

Structures

The structures elucidated for some of the compounds detected in argan oil are depicted in Figure 7.

Discussion

The major identifiable end-point of this comprehensive study of argan oils is that the predominant vitamer is γ -tocopherol not α -tocopherol and is therefore clearly at odds with reports in the literature (Boukhobza and Pichon-Prum, 1988). The reasons for this discrepancy are probably methodological, because in our study the structures of the vitamers were confirmed by GC-MS and the assignments are unequivocal.

In vivo data (Jiang *et al.*, 2000) indicate that γ -tocopherol may be a far more important antioxidant than α -tocopherol. Both γ -tocopherol and its metabolite 2,7,8-trimethyl-2-(β -carboxyethyl)-6-hydroxychroman (γ -CEHC), which is mainly excreted in urine, unlike α -tocopherol and its corresponding metabolite inhibit cyclooxygenase activity (Jiang *et al.*, 2000). In addition, it is noteworthy that supplementation with high doses of α -tocopherol depletes both plasma and tissue γ -tocopherol

in contrast to supplementation with γ -tocopherol, which increases both (Jiang *et al.*, 2000). It is highly likely that diets providing substantial amounts of γ -tocopherol protect against ROS-mediated inflammation. *In vitro*, it is difficult to compare the relative efficacy of tocopherol vitamers with other phenolic antioxidants. *In vivo*, the tocopherol vitamers are incorporated into cell membranes and their antioxidant capacity is modulated by the concentration of vitamin C. In the case of phenolic antioxidants, a continuous supply is required to maintain an antioxidant environment, but in the case of the tocopherol vitamers, stable incorporation into cell membranes and regeneration of the quinone radical (produced after interaction with ROS) to the parent compound by vitamin C (Halliwell and Gutteridge, 1993) renders their pharmacology rather different in that their half-life is far longer. Therefore argan oil as a major dietary source of γ -tocopherol may confer health benefit effects on the Moroccan population in a manner somewhat different from that of countries within the Mediterranean basin, where a continuous supply of phenolic antioxidants is obtained from olives and olive oil in addition to those from fruits and vegetables.

Another point to note is that similar to olive oil, argan oil (compared to many other seasoning oils) contains relatively high contents of squalene which is suggested to be protective against skin cancer (Newmark, 1997) and enhances excretion of xenobiotics in rats and mice (Kamimura *et al.*, 1992).

The major sterols identified in argan oils were spinasterol and schottenol, in agreement with the literature data. These sterols are very rare in vegetable oils. In animal studies the effects of spinasterol are documented to be a reduction in plasma and liver cholesterol levels of mice, modulated by increasing faecal cholesterol excretion (Uchida *et al.*, 1983). Antitumorogenic potential of spinasterol has also been demonstrated by Villaseñor and Domingo (2000), whereas schottenol exhibits an anticarcinogenic and cytotoxic potential (Arizawa *et al.*, 1985).

Although the content of phenolic antioxidants in argan oils is extremely low, vanillic, syringic and ferulic (probably glycosylated) acid, along with tyrosol were definitively identified and quantitated. This contrasts with a previous publication (Chimi *et al.*, 1988) which identified caffeic acid and oleuropein as the major phenolic constituents. In the current study these were not detected.

In conclusion, argan oil is shown to contain γ -tocopherol as the major vitamer. The oil is relatively rich in squalene but has very low quantities of phenolic constituents (<5 mg/kg), other than the tocopherol vitamers.

However the definitive presence and quantitation of vanillic, syringic, ferulic acid and tyrosol are described for the first time. The unidentified phenolic-like compounds warrant further investigation.

Acknowledgements

We are grateful to Roswitha Haubner and Gerd Würtele for excellent technical assistance.

References

- Arizawa M, Kinghorn AD, Cordell GA, Phoebe CH, Faneworth NR (1995). Plant anticancer agents XXXVI: echotanin glucosides from *Baccaris cordifolia* and *Ipomopsis aggregata*. *Plant Med* 61:544-545.
- Bartsch H, Nair J, Owen RW (1999). Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colon: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 20:2209-2218.
- Bartsch H, Nair J, Owen RW (2002). Esocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol Chem* 383:915-921.
- Bouthobza M, Pichon-Prum N (1998). L'Arganier, ressource économique et médicinale pour le Maroc. *Phytotherapy* 27:21-26.
- Charrouf Z, Guillaume D (1999). Ethnobotanical, ethnomedical and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *J Ethnopharmacol* 67:7-14.
- Chimi H, Rahmani M, Cillard P (1988). Etude de la fraction phenolique des tuiées d'Olive vierges et d'argan du Marocain. *Actes Inst Agronom Vet* 8:17-21.
- Covas M-I, Mito-Casas E, Fito M, et al. (2002). Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *Eur J Clin Nutr*, in press.
- FAO (1978). *Dietary Fats and Oils in Human Nutrition, Food and Nutrition Paper*. Rome: Food and Agriculture Organization.
- Halliwel B, Gutteridge JMC (1993). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- Jiang Q, Elson-Schwab I, Courtmanche C, Ames BN (2000). Gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11494-11498.
- Kanamura H, Koga N, Oguri K, Yoshimura H (1992). Enhanced elimination of theophylline, phenobarbital and strychnine from the bodies of rats and mice by squalene treatment. *J Pharmacobiodyn* 15:215-221.
- Newmark HL (1997). Squalene, olive oil and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6:1101-1103.
- Owen RW, Winomwatwatee T, Spiegelhalter B, Bartsch H (1998). A high performance liquid chromatography method for quantification of hydroxy radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. *Eur J Cancer Prev* 5:233-240.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, et al. (2000a). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer* 36:1235-1247.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, et al. (2000b). Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol* 1:107-112.
- Owen RW, Mier W, Giacosa A, et al. (2000c). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol* 38:647-659.
- Owen RW, Mier W, Giacosa A, et al. (2000d). Phenolic and lipid components of olive oils: identification of lignans as major components of the phenolic fraction of olive oil. *Clin Chem* 48:978-988.
- Razanka T, Rezakova H (1999). Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis. *Anal Chim Acta* 398:253-261.
- Uchida K, Mizuno H, Hirota K, et al. (1983). Effects of spinasterol and sitosterol on plasma and liver cholesterol levels and biliary and fecal sterol and bile acid excretion in mice. *Jpn J Pharmacol* 33:103-112.
- Vilasecator JM, Domingo P (2000). Anticarcinogenicity potential of spinasterol isolated from squash flowers. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 20:99-105.
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (1997). *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Washington, USA: WCRF.

Résumé :

Au cours du présent travail, trois espèces de plantes appartenant à trois familles différentes dont une d'origine de la flore marocaine et deux d'origine de la flore congolaise ont été investiguées d'un point de vue phytochimique et/ou physico-chimiques. Il s'agit d'*Argania spinosa* (Sapotacées), un arbre endémique du Maroc, et de deux buissons rencontrés en Afrique centrale et occidentale et plus particulièrement au Congo, il s'agit d'*Anisophyllea dichostyla* (Rhizophoraceae) et d'*Annona cuneata* (Annonaceae). Ces trois espèces ont fait l'objet d'une étude ethnobotanique sur le terrain et l'évaluation de la toxicité aiguë de leurs extraits a aussi fait l'objet d'étude lors de ce travail.

Dans le cadre de nos investigations phytochimiques et pharmacologiques, plusieurs composés ont été isolés et caractérisés et leurs profils antiradicalaires ont été étudiés. L'isolement de tous ces composés a été effectué à l'aide des techniques chromatographiques différentes. L'élucidation finale des structures a été surtout réalisée grâce à des moyens spectroscopiques (RMN, SM et UV). Des méthodes chimiques (hydrolyse, dérivatisation) ont été également utilisées pour confirmer certaines de ces structures. Pour *Annona cuneata*, l'identification des huiles essentielles a fait état de présence de vingt cinq composés qui ont été caractérisés par leurs temps de rétention, leurs masses et leurs indices de Kovats. Z-sabinène est le produit majoritaire, α -pinène, myrcène, β -phéllandène, linalool, δ -élémane, β -élémane et garmacrène D sont aussi identifiés), treize autres composés polyphénoliques, principalement des acides phénols simples ont été identifiés (acide p-Hydroxybenzoïque, acide 3,4-dihydroxybenzoïque acide ferulique, acide vanillique syringaldehyde, vanillin et alcool vanillique).

Trois formes de l'huile d'*Argania spinosa* (variétés traditionnelles esthétique et alimentaire et une variété commerciale) ont fait l'objet d'études approfondies. Les investigations physico-chimiques et phytochimiques ont permis de situer l'huile d'*Argania spinosa* par rapport à d'autres huiles végétales étudiées aussi dans ce travail, ainsi, nous avons déterminé les indices de contrôles physico-chimiques tels que les indices des peroxydes, de p-anisidine et des diènes conjugués.....). Une étude par RMN a permis de situer la régiospécificité du profil triglycéridique de l'huile. Les résultats de notre étude ont été concomitants avec les résultats de la littérature qui utilisent d'autres voies d'identification plus laborieuses.

L'utilisation des techniques CLHP/UV, GC/SM et la LC/MS ont permis l'identification de composés supplémentaires pour la première fois dans cette huile d'*Argania spinosa*. L'acide ferulique, vanillique, syringique, le tyrosol, acide p-hydroxybenzoïque, vanilline sont les produits majoritaires des phénols isolés de l'huile.

L'extrait insaponifiable de l'huile, a fait l'objet de controverses par différents auteurs et a donc été étudié par nos soins. Les hydrocarbures de l'huile d'argan ont montré que le squalène était le produit majoritaire. Le schotténol et le spinastérol sont des composés stéroliques qui ont été identifiés et aussi quantifiés et confortent les données de la littérature, cependant, l'étude de la composition en tocophérols a montré que la quantité de l'isomère γ est plus importante que la forme α et est donc en contradiction avec les données de la littérature. Cette étude a été confirmée par GC/MS et par CLHP/UV.

Cet insaponifiable a montré une activité antioxydante à 100 mg/l plus prononcée que l' α -tocophérol, composé témoin dans cette étude.

Pour *A. dichostyla*, l'investigation phytochimique a montré la présence de 26 composés dont les tannins condensés et des ellagitannins respectivement monométhoxylés, diméthoxylés et à pont méthylène, ainsi que leurs sucrosides (rhamnose, glucose et xylopyranose) et les principaux structures sont identifiées respectivement à l'acide 3-O-méthyl ellagique, acide-3,3'-di-O-méthyl ellagique, acide-3'-O-méthyl-3,4-méthylendioxy ellagique, acide ellagique-4-O- β -D-rhamnoside, acide ellagique-3'-O-méthyl-4-O- β -D-xylopyranoside, acide-3'-O-méthyl-3,4-méthylendioxy-ellagique-4-O- β -D-glucoside en plus des proanthocyanidines monomériques et oligomériques, comme la catechine, epicatechine, le gallate d'epicatechine, l'epicatechine dimer et trimer ont été isolés et identifiés dans cette plante et ont démontré le potentiel antioxydant le plus remarquable dans cette étude (7,4 μ l de cette extrait pour 50 % d'inhibition) en utilisant le modèle *in vitro* exploitant le dynamisme de la xanthine oxydase, une enzyme impliquée dans la carcinogenèse. Un triterpène (acide bryonolique) a été aussi isolé et identifié dans cette espèce. La RMN bidimensionnelle nous a permis d'apporter des éléments importants sur la stéréochimie et la configuration de cette molécule.

Abstract

In this thesis, three species of African plants belonging to three different families were investigated from a phytochemical and/or physico-chemical point standpoint. These were *Anisophyllea dichostyla* (Rhizophoraceae) and *Annona cuneata* (Annonaceae) encountered particularly in the democratic Republic of Congo and other west African countries and *Argania spinosa* (Sapotaceae) an endemic tree of Morocco. The oil of *Argania spinosa* and the roots of *Anisophyllea dichostyla* and *Annona cuneata* were studied. The three species were the subject of an ethnobotanic study and also an evaluation of acute toxicity of their extracts and the identification and quantitation of the phenolic antioxidants they contain was evaluated.

Within the framework of the phytochemical and pharmacological investigations, several compounds were isolated and characterized and their antioxidant potential was studied. The isolation of all these compounds was conducted using different chromatographic techniques. The final elucidation of the structures was by spectroscopic means including nuclear magnetic resonance (NMR), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry (LC-MS). Where necessary ultraviolet spectrophotometry and chemical methods (hydrolysis, derivatization) were also used to confirm some of the structures.

In the essential oil of *Annona cuneata* stem barks, twenty-five compounds were identified and characterized by their retention times, their masses and their Kovats Index. *Z*-sabinene is the major component, (α -pinene, myrcene, β -phellandrene, linalool, δ -elemene, β -elemene and germacrene D were also identified). In addition thirteen polyphenolic compounds, mainly simple phenolic acids were identified namely (*p*-hydroxy benzoic acid, dihydroxybenzoic acid, ferulic acid, vanillic acid along with syringialdehyde, vanillin and vanillic alcohol).

Three forms of argan oil (traditional varieties-aesthetic and food plus commercially produced oil) were the subject of thorough studies. The physicochemical and phytochemical investigations made it possible to compare the oil of *Argania spinosa* with other vegetable oils also studied in this work. The physicochemical indices such as the peroxides, *p*-anisidine and conjugated dienes values were compared according to the time of storage, to measure the rancidity and the thermal stability of the oils.

A study by NMR made it possible to locate the triglyceridic regiospecificity of the profile of oil. The results of this study confirm those of the literature but the methodology used is more less time consuming.

Use of HPLC, GC-MS and LC/MS allowed the identification of additional compounds for the first time in the oil of *Argania spinosa*. The phenolic antioxidants ferulic, vanillic, syringic acids along with tyrosol *p*-hydroxybenzoic acid, vanillin were detected.

The unsaponifiable extract of the oil, is the subject of some controversy in the literature. The major phytosterol detected in argan oil was squalene with lower amounts of schottenol and spinasterol. However in contrast to the literature the major tocopherol was found to be gamma-tocopherol and not alpha-tocopherol. The unsaponifiable fractions of the oils showed antioxidant activity at 100 mg/l.

Twenty six compounds (mainly phenolic antioxidants) were detected and identified in *Anisophyllea dichostyla*, comprising tannins and ellagic acid derivatives respectively. These were (3-O-methyl ellagic acid, 3,3'-di-O-methyl ellagic acid, 3'-O-methyl-3,4-methylenedioxy ellagic acid, ellagic acid-4-O-rhamnoside, 3'-O-methyl ellagic acid- 4-O- β -D-xylopyranoside, 3'-O-methyl-3,4-methylenedioxy-ellagic acid- 4-O- β -D-glucoside and monomeric proanthocyanidines, such as catechine, epicatechine and epicatechine gallate along with epicatechine dimer and trimer). The total methanolic extract showed a very remarkable antioxidant capacity (7,4 μ l of this extract for 50 % inhibition) in the hypoxanthine /xanthine oxidase *in vitro* model. A triterpene (bryonolic acid) was also isolated and identified in this species. Two dimensional NMR enabled the elucidation of the stereochemistry and configuration of this compound.

Keywords: African plants, Antiradical activities, GC/MS, HPLC, LC/MS, RMN, UV procyanidins, phenolic acids, ellagitannins, essential oils, acylglycerols, fatty acids, sterols, tocopherols, , *Anisophyllea dichostyla*, *Annona cuneata* et *Argania spinosa*