UNIVERSITÉ DU BURUNDI
GRENIER DU SAVOIR DU BURUNDI
Dépôt institutionnel officiel
https://repository.ub.edu.bi

Screening phytochimique, isolation,essai de purification et de caractérisation des tannins des feuilles de spermacoce princeae (Umunyovunyovu) de Kagurutsi en commune Mugina

Bizimana, Jean Marie; Sous la direction de : Prof. Hari Léonard

2009-09
UB, FS : Chimie
https://repository.ub.edu.bi/handle/123456789/2253

Document téléchargé depuis le **Grenier du Savoir du Burundi** — https://repository.ub.edu.bi

UNIVERSITE DU BURUNDI

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

SCREENING PHYTOCHIMIQUE, ISOLATION, ESSAI DE PURIFICATION ET DE CARACTERISATION DES TANNINS DES FEUILLES DE *SPERMACOCE PRINCEAE* (UMUNYOVUNYOVU) DE KAGURUTSI EN COMMUNE MUGINA

Par

BIZIMANA Jean Marie

Sous la direction de :

Prof. HARI Léonard

Mémoire présenté et défendu publiquement en vue de l'obtention du grade de **Licencié en Sciences Chimiques**

Bujumbura, Janvier 2009

« Ignorées à certaines époques de l'histoire et même dépréciées à d'autres ; les plantes médicinales depuis des millénaires, attendent patiemment et sans bruit que les êtres humains s'intéressent à elles pour les connaître, les étudier, les utiliser et pourquoi pas les aimer. »

- Dr Georges Roger -

DEDICACE

A Mes parents,

A mes frères et sœurs,

A ma Fille Fany-Chryssie,

A ma chère épouse Furaha,

Je dédie ce mémoire.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, la joie nous échoit d'exprimer nos vifs remerciements à tous ceux qui ont prêté main-forte à sa réalisation.

Nous tenons tout d'abord, d'une façon particulière à exprimer nos vifs remerciements au Professeur HARI Léonard ; Promoteur et Directeur de ce travail. Sa disponibilité, ses conseils, sa franche collaboration et suggestions nous ont été d'un grand service.

Nos remerciements vont également à tous les professeurs de la faculté des sciences en général et à ceux du département de chimie en particulier pour la formation tant morale qu'intellectuelle dont ils nous ont doté. Que le personnel de ce département trouve ici nos sentiments de gratitude pour leur collaboration.

Nous pensons à tous les éducateurs qui ont contribué à notre formation depuis l'école primaire jusqu'à l'université pour avoir fait de nous, ce que nous sommes aujourd'hui. Nous leur disons merci.

Que tous nos amis soient rassurés de notre reconnaissance pour leur soutien et avoir agrémenté notre séjour à l'Université.

Nous aimerions remercier aussi certaines personnes qui n'ont pas participé scientifiquement à ce travail, mais qui nous ont soutenu pendant sa réalisation, entre autres : mon grand frère IRANYIBUTSE Célestin ainsi que Messieurs BIZIMANA Sylvestre ; BAYIREME Abraham ; ICISHAKA Edouard ; SINDAYIGAYA Gilbert ; BIGIRIMANA Wilson et HEZUMURYANGO André.

Que toutes les personnes qui, de près ou de loin ; ont contribué, d'une façon ou d'une autre, à l'aboutissement de ce travail y trouvent l'expression de notre reconnaissance.

BIZIMANA Jean Marie

RESUME

Dans ce travail, nous nous sommes penché à des recherches qui nous ont permis de connaître certaines substances actives se trouvant dans les feuilles de *Spermacoce princeae* et d'extraire, d'isoler et caractériser les tannins ; substance active pouvant être utilisée en médecine traditionnelle contre les maladies diarrhéiques.

Le présent travail comprend trois parties essentielles.

- La première partie débute par une brève introduction générale dans laquelle nous passons en revue les origines sur la médecine traditionnelle et quelques problèmes, tout en soulignant l'intérêt du sujet et l'aperçu sur la plante. En second lieu, nous montrons quelques généralités sur les tannins végétaux. La définition, le rôle et la répartition dans la plante, la classification, l'état naturel, les usages et les propriétés des tannins sont brièvement exposées.
- La deuxième partie se rapporte à l'expérimentation. Le screening phytochimique nous a révelé que les feuilles de *Spermacoce princeae* contiennent uniquement cinq principes actifs à savoir : les tannins, les flavonoïdes, les terpènes/ stéroïdes, les anthraquinones et les leucoanthocyanes. Vu les propriétés des tannins et leur abondance dans les feuilles de cette plante, cela nous a poussé à les extraire, les isoler et les caractériser. Après le dégraissage par macération de la poudre des feuilles de *Spermacoce princeae* dans l'hexane pendant 48 heures, l'extraction a été faite par l'acétone-eau (4 :1 v/v) grâce à l'appareil de Soxhlet.

L'isolation et la purification sont réalisées à l'aide de la chromatographie sur couche mince (CCM) et sur colonne (CC) dans le système acétate d'éthyle-acide formique-eau (18 : 1 : 1 v/v).

Le test avec le réactif de $FeCl_3$ 3% a révélé la présence des tannins catéchiques. L'essai de cristallisation a été fait avec l'acétone-acide acétique (7 : 3 v/v) comme solvant de cristallisation et des cristaux bruns ont été obtenus. Leur température de fusion est de 203°C, ce qui se situe dans l'intervalle de températures (180°C-210°C) données dans la littérature.

- La troisième partie est consacrée à la conclusion et quelques recommandations en émettant le souhait de voir pousser loin des recherches sur cette plante.

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableaux

Tableau 1 : Variation du poids de l 'échantillon en fonction du temps 24
Tableau 2 : Résultats du screening phytochimique portant sur les feuilles de *Spermacoce princeae* 28
Tableau 3 : Différentes valeurs de Rf et différentes colorations de spots dans la lumière visible et sous la lampe UV 39
Tableau 4 : Valeurs de Rf et nombre de tâches obtenus avec différents systèmes de solvants 42
Tableau 5 : Résultats du Test de solubilité 45

Figures

Figure 1 : Photo de *Spermacoce princeae* 5
Figure 2 : Carte de la commune MUGINA 6
Figure 3 : Variation du poids de l'échantillon en fonction du temps de séchage 25
Figure 4 : Schéma de l'appareil de Soxhlet 31
Figure 5 : Chromatogramme de l'extrait total des tannins dans le système acétone-eau (3 :2 v/v) 36
Figure 6 : Chromatogramme de l'extrait total des tannins dans le système acétate d'éthyle-acide formique-eau (18 :1 :1v/v) 36
Figure 7 : Chromatogramme de l'extrait total des tannins dans le système benzène- méthanol (95 :5 v/v) 37
Figure 8 : Chromatogramme de l'extrait total des tannins dans le système acétone – n- butanol (4 :1 v/v) 37
Figure 9 : Chromatogramme de l'extrait total des tannins dans le système benzène- acide acétique (5 :2 v/v) 38
Figure 10 : Chromatogramme de l'extrait total des tannins dans le système toluène-méthanol (95 :5 v/v) 38

TABLE DES MATIERES

DEDICACE ii
REMERCIEMENTS iii
RESUME iv
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES vi
TABLE DES MATIERES vii

I^ére^ PARTIE : GENERALITES THEORIQUES 1

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE 1

I.1. Médecine traditionnelle 1
I.2. Problématique de la médecine traditionnelle en Afrique 2
I.3. Aperçu sur la plante 4
I.4. Localisation du lieu de récolte 5

CHAPITRE II. GENERALITES SUR LES TANNINS 7

II.1. Introduction 7
II.2. Définition des tannins 8
II.3. Répartition et rôle des tannins dans la plante 9
II.3.1. Répartition des tannins dans la plante 9
II.3.2. Rôle des tannins dans la plante 9
II.4. Etat naturel des tannins 10
II.5. Classification des tannins 10
II.6. Propriétés des tannins 18
II.6.1. Propriétés physico-chimiques des tannins 18
II.6.2. Propriétés physiologiques des tannins 19
II.7. Usages des tannins 20
II.7.1. En thérapeutiques 20

II.7.2. Dans l'industrie 20
II.7.3. Dans l'industrie alimentaire 21
II.7.4. Dans l'industrie de vins 21
II.7.5. En teinture textile 21
II.7.6. En médecine 22

DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION 23

CHAPITRE I. SCREENING PHYTOCHIMIQUE 23

I.1. Préparation préliminaire de l'échantillon 23
I.1.1. Récolte et séchage 23
I.1.2. Détermination de la variation de la perte en eau au cours du séchage 23
I.2. Screening phytochimique 26
I.2.1. Définition 26
I.2.2. Méthodes de détection de quelques grandes classes de principes actifs ... 26
I.3. Interprétation des résultats du screening phytochimique 29

CHAPITRE II. EXTRACTION, ISOLATION, PURIFICATION ET CRISTALLISATION DES TANNINS 30

II.1. Extraction des tannins 30
II.2. Isolation et purification des tannins par la méthode chromatographique 32
II.2.1. Introduction 32
II.2.2. Chromatographie sur couche mince 32
II.2.3. Chromatographie sur colonne 40
II.3. Essai de cristallisation 43

CHAPITRE III. ESSAI DE CARACTERISATION DES CRISTAUX DE LA SUBSTANCE ISOLEE 44

III. 1. Hydrolyse acide 44

III.2. Détermination de la température de fusion 44

III. .3. Test de solubilité 45

TROISIEME PARTIE : CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS 47

1.Conclusion générale 47

2. Recommandation 48

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 49

ANNEXES

I^{ére} PARTIE : GENERALITES THEORIQUES

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE

I.1. Médecine traditionnelle

Aussitôt paru sur la terre, l'homme s'est mis à gagner sa vie, à la sueur de son front, tombé dans un environnement hostile et inhospitalier, il devait trouver les armes pour se défendre, les aliments pour se nourrir, des remèdes pour se soigner et se maintenir en bonne santé.

Depuis la préhistoire, l'être humain recherche dans son environnement (plantes, animaux, pierres, esprit...) de quoi soulager les maux et traiter les blessures. La médecine ou encore mieux le système thérapeutique est donc une des valeurs forcément les plus anciennes mais aussi les plus importantes parmi l'ensemble du patrimoine du peuple (SENKIMA, D., 2003).

De nos jours, la phytothérapie et l'étude des plantes médicinales suscitent un intérêt réel dans le monde. Depuis quelques décennies, la médecine traditionnelle a provoqué des réactions extrêmes, allant du mépris le plus total à l'enthousiasme le plus aveugle (SIBOMANA, R., 1994).

Plusieurs raisons motivent le recours aux traitements par les substances naturelles, l'action d'un extrait brut de la plante n'est pas toujours identique à celle du produit qui en a été isolé ou qui a été synthétisé. Le médicament végétal est généralement mieux toléré par l'organisme par rapport aux substances de synthèse qui sont physiologiquement très actives, mais présentant parfois des effets secondaires imprévus (BRUNETON, J., 1999).

Dans les pays en voie de développement, la majorité de la population continue à utiliser la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins primaires en matière de soins de santé, le lourd fardeau de la crise économique met ces populations dans l'impossibilité de bénéficier des acquis de la médecine moderne.

I.2. Problématique de la médecine traditionnelle en Afrique

En Afrique, l'Eglise et la colonisation avec ses techniques modernes ont souvent mis à l'écart les pratiques traditionnelles du continent sans épargner la médecine traditionnelle. Nous assistons aujourd'hui à la disparition progressive du patrimoine ancestral et avec lui, les tradipraticiens (SOFOWOLA, A. 1996). C'est ainsi qu'une prise de conscience a fait naître dans la plupart des gouvernements africains le désir de sauvegarder le patrimoine culturel du continent.

En Afrique noire, la médecine traditionnelle est basée principalement sur l'utilisation des plantes. Mais dans certaines régions, elle exploite aussi l'apithérapie, c'est-à-dire « le traitement des maladies par des produits récoltés, transformés ou sécrétés par l'abeille, et tout particulièrement pour l'heure : le pollen, la propolis, le miel, la gelée royale et le venin d'après l'Agence de coopération culturelle et technique (A.C.C.T., 1989).

Au Burundi, la médecine traditionnelle utilise non seulement des plantes mais aussi des peaux de certains animaux comme le léopard, le lapin, les serpents venimeux, des ailes de certains oiseaux comme des hérons, de l'argile...

Actuellement, les plantes sont de plus en plus utilisées pour l'extraction de substances naturelles physiologiquement actives et pouvant être transformées en

médicaments. Les extraits végétaux sont également utilisés dans la parfumerie, l'agro-industrie comme additifs (PARIS , R. R. et MOYSE, H. 1976). Le mode végétal est capable de multiples synthèses dont les mécanismes sont à peine entrevus. Ainsi, la plupart des gouvernements africains soutiennent les projets de valorisation de la thérapeutique traditionnelle en vue d'apporter des solutions pratiques intéressantes aux problèmes de fournitures de médicaments proposés par la médecine moderne (A.C.C.T. 1989).

Toutefois, la médecine occidentale, malgré son efficacité en bien des domaines, conduit à des difficultés à cause de son coût et de la lourdeur des équipements techniques. Aussi, de nombreuses personnes se tournent-elles vers la médecine traditionnelle ; un temps délaissée et, ont-elles recours aux plantes médicinales qui en est l'un des moyens thérapeutiques (RWANGABO, P., 1993).

En fin de compte, des diverses études sur les plantes médicinales ont été faites en vue d'améliorer leurs emplois. Ce sont ces raisons qui militent en faveur d'une étude approfondie de ces plantes très utilisées traditionnellement et qui ont motivé le choix et objet de notre travail concernant le screening phytochimique, l'isolation et essai de purification et de caractérisation des tannins de spermacoce princeae (UMUNYOVUNYOVU).

I.3. Aperçu sur la plante

I.3.1. Systématique

Le *Spermacoce princeae* dont le nom vernaculaire est UMUNYOVUNYOVU est systématiquement décrit de la façon suivante :

Règne	: Végétal
Embranchement	: Spermatophytes
Classe	: Dicotylédones
Famille	: Rubiaceae
Genre	: Spermacoce
Espèce	: *Spermacoce princeae*

I.3.2. Description botanique de la plante

Le *Spermacoce princeae* est une plante vivace, rhizomateuse, dressée, de 30 à 60 cm de haut, à fleurs blanchâtres. Le limbe foliaire linéaire ne dépasse pas 0,6 cm de large (TROUPIN, G. 1985)

C'est une plante poussant sur les sols sablonneux tout au long des chemins et parfois vivant dans des marais à végétation parsemée et pionnière au bord de l'eau. Ses tiges, souvent de teinte pourpre-foncée, quadrangulaires, supportent des feuilles opposées à limbe elliptique ovale, long de 1 à 6 cm. Les feuilles à calice en tube et corolle blanche cylindrique s'épanouissant en lobes oblongs ; le fruit est une capsule oblongue-ellipsoïdale longue de 5 à 6 mm (BERNARD, J., 1976). La figure suivante représente une photo de *Spermacoce princeae* de KAGURUTSI.

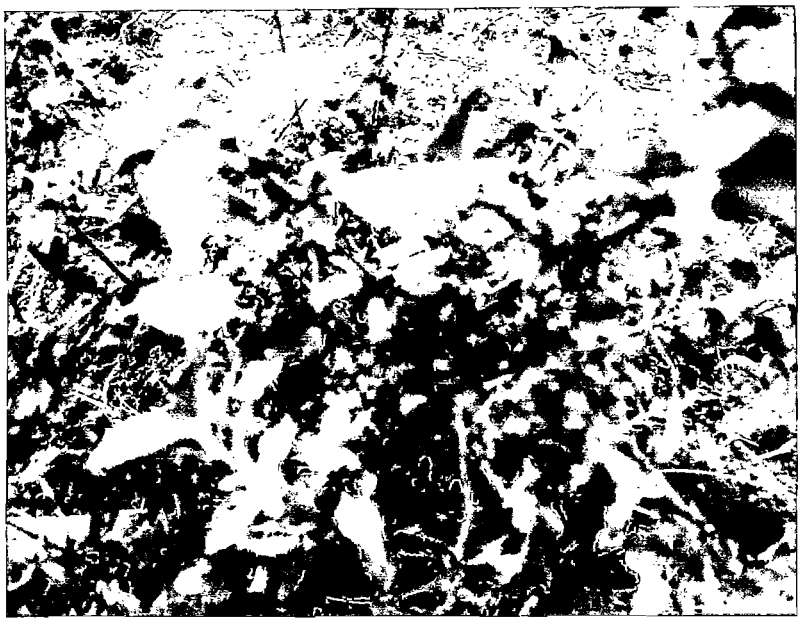


Figure 1. Photo de *Spermacoce princeae*

I.3.3. Intérêt de la plante en phytothérapie

Le *Spermacoce princeae* est une plante très utilisée dans le traitement de la diarrhée au Burundi. Le *Spermacoce princeae* dont le nom vernaculaire UMUNYOVUNYOVU est utilisé comme remède traditionnel pour certaines maladies qui attaquent surtout les enfant au niveau des testicules et souvent les enfants porteurs de cette maladie n'ont pas de cheveux.

Broyées et macérées, les feuilles de *spermacoce princeae* sont utilisées dans le traitement des plaies(blessures).

I.4. Localisation du lieu de récolte

Notre échantillon a été récolté dans la vallée de NYARUSEKE, localité NYANDEREMA sur la colline KAGURUTSI en commune MUGINA province CIBITOKE.

La carte de la page suivante nous donne les zones de la commune MUGINA.

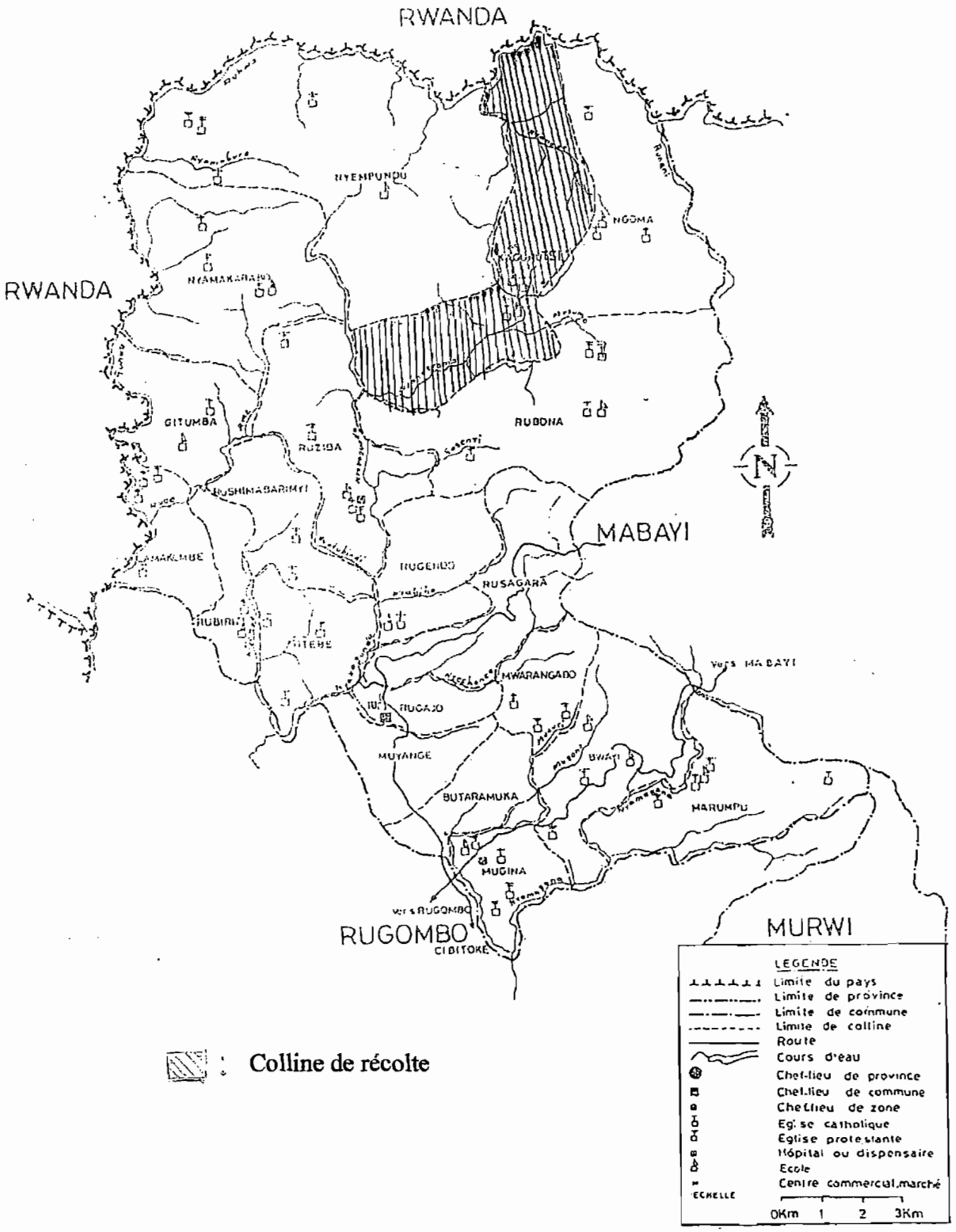


Figure 2. Carte de la commune MUGINA

CHAPITRE II. GENERALITES SUR LES TANNINS

II.1. Introduction

Historiquement, les composés produits par les plantes ont été divisés en deux grandes catégories principales : les métabolites primaires et secondaires.

- La première catégorie regroupe toutes les matières indispensables à la croissance de la plante dans lesquelles elle puise son énergie et sans lesquelles elle dépérirait. Ce sont des produits du métabolisme primaire comme les sucres simples, les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques et les lipides.
- La deuxième catégorie comprend les produits du métabolisme secondaire. Il s'agit des substances de composition chimique complexe que la plante ne produit qu'exceptionnellement sous forme de sécrétion ou qu'elle accumule comme réserve.

On peut citer quelques exemples de produits du métabolisme secondaire comme la lignine, les terpénoïdes, les stéroïdes, les saponosides, les quinones, les huiles essentiels, les flavanoïdes, les baumes, les tannins, les alcaloïdes... (GIRRE, 1985)

Il existe des milliers de substances actives dans la nature. Les plus couramment intéressantes sont les alcaloïdes, les tannins les saponosides, les flavanoïdes, les stéroïdes et terpènes, les anthraquinones, les leucoanthocyanes. Les tannins seront l'objet du présent travail.

II.2. Définition des tannins

Plusieurs auteurs ont tenté de définir les tannins, voici quelques exemples :

- « Les tannins peuvent être définis comme des substances non azotées, de structure phénolique, solubles dans l'eau, l'alcool, l'acétone mais insolubles dans l'éther, de saveur astringente, ils possèdent la propriété de tanner la peau » (PARIS, R.R. & MOYSE, H., 1971).
- « Les tannins sont des substances phénoliques de structures variées, de saveur astringente, ayant en commun, la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 » (PARIS & HURABIELLE, 1980).
- « Les tannins sont des composés phénoliques hydrolysables ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présentent à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines. » (BATE ; 1962 cité par BRUNETON 1993).
- « Les tannins sont des composés phénoliques présents à des concentrations relativement élevées dans les feuilles ligneuses très diverses » (RAVEN, 2000).
- « Tannins : nom générique de substance végétale de nature colloïdale, d'odeur spéciale, de saveur astringente, possédant la propriété de précipiter l'albumine de ses solutions ainsi que divers alcaloïdes, de rendre imputrescibles les peaux. » (DUVAL, C. 1978 & DUVAL, R.).

II.3. Répartition et rôle des tannins dans la plante

II.3.1. Répartition des tannins dans la plante

Les substances phénoliques sont présentes dans presque toutes les plantes et s'accumulent dans toutes parties de l'organisme (racine, tiges, fleurs et fruit)

Les proportions en tannins sont très variables suivant le type de plante, ces différentes parties et son usage par exemple, les tannins sont extraits en concentrations relativement élevées dans les feuilles des plantes ligneuses très diverses. Les tannins sont souvent isolés dans la vacuole et les cellules à vacuoles tannifères sont présentes dans les organes (exemple : Parenchyme). Elles sont dispersées, groupées en modules ou constituent de véritables réseaux.
Outre les lignines, d'autres composés du groupe des tannins sont souvent déposés dans les parois cellulaires (ROBERT, D. et ROLAND, J.C., 1998).

II.3.2. Rôle des tannins dans la plante

Le rôle des tannins dans la plante est mal connu. Les tannins s'accumulent le plus fréquemment dans les organes destinés à mourir et parfois caduques (feuilles âgées, le cœur de bois, péricarpes) ce qui leur confère un caractère de déchet (GUIGNARD, J-L., 2000). Les tannins constituent généralement des défenses statiques contre les agents pathogènes et elles sont présentes en permanence dans les portions de plantes où elles se rencontrent.

Ils défendent les plantes contre les prédateurs en se combinant avec les protéines. Ils produisent un goût astringent qui fait reculer les insectes, les animaux herbivores, les reptiles, les oiseaux et les animaux supérieurs et d'autres invasions phytopathogéniques. Ils sont responsables du noircissement rapide des feuilles de certains végétaux après cueillette et de la couleur de certains fruits (PARIS, R.R., et al., 1989).

A la limite, les prédateurs peuvent mourir si la plante a une teneur élevée en tannins car ces derniers dénaturent les enzymes digestives (RAVEN et EICHHORN, E. et al., 2000).

Dans le bois, les tannins augmentent l'imputrescibilité (ROBERT et CATESSON, A.M., 2000).

En fin d'un côté, dans les plantes pour les denrées et les boissons ; les tannins réduisent la saveur nutritionnelle. Ils sont responsable du vieillissement des vins et ont des effets toxiques. D'un autre côté dans les plantes médicinales polyphénoliques, les tannins exercent une action constructrice de petits vaisseaux, inhibent l'action des mutagènes et jouent un rôle de défense chimique (BRUNETON, J., 1993).

II.4. Etat naturel des tannins

Les tannins sont rarement libres dans les cellules, ceci explique leur absence d'influence tannante pour les protéines des cellules qui les contiennent. Souvent, ils constituent l'aglycone d'hétérosides, du glucose et d'autres oses réagissant sur les fonctions acides libres du tannin. Ils se combinent aussi très facilement aux alcaloïdes (complexe caféine-tannin), aux mucilages, aux gommes et à la cellulose (GUIGNARD, J-L., 2000).

II.5. Classification des tannins

Depuis longtemps, le tannage était effectué en faisant recours aux tannins végétaux, tel était le cas du tannin du châtaignier, du tannin de chêne, du tannin de galle etc... De nos jours, le tannage est en général obtenu par des composés minéraux et synthétiques sauf si on veut obtenir des cuirs destinés à des usages spécifiques comme par exemple en maroquinerie (BRUNETON, J., 1993).

Notre travail étant centré sur une plante médicinale nous nous limitons à la classification des tannins végétaux. Les informations sur les tannins synthétiques et minéraux sont relatées dans l'annexe 1.

Les tannins végétaux sont des substances naturelles amères, contenues dans les différentes parties de certaines plantes. Ils s'accumulent beaucoup dans les écorces âgées et les tissus d'origine pathologique. Chez les végétaux supérieurs, on distingue deux groupes de tannins différents par leur origine biogénétique (BRUNETON,1993).

- les tannins hydrolysables
- les tannins condensés

II.5.1. Les tannins hydrolysables

Ce sont des polyesters d'acides phénoliques et de glucides. Ils sont facilement scindés par les acides minéraux ou les enzymes (tannases ou diastases hydrolysantes) en oses et en acide phénol.

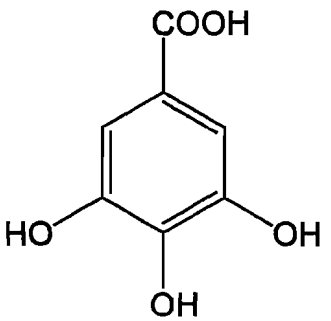
Les tannins hydrolysables sont caractéristiques des Dicotylédones : on les rencontre notamment chez les Rosideae, dans tous les organes (racines, tiges, feuilles avant maturité) alors que les tannins condensés sont présents aussi bien chez les fougères que chez les Gymnospermes. Dans les parenchymes, ils sont localisés au niveau des cellules particulières, isolées en amas ou formant de véritables réseaux (GUIGNARD J-L., 2000) ;

Parmi les tannins hydrolysables, on distingue trois classes :

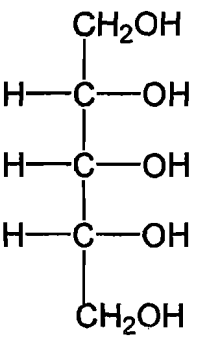
- les tannins galliques
- les tannins ellagiques
- les depsides

1. Tannins galliques

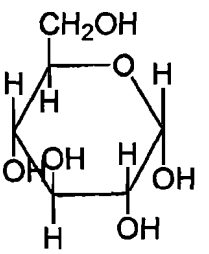
Les tannins galliques sont des esters de l'acide gallique avec les oses (BRUNETON, 1993)



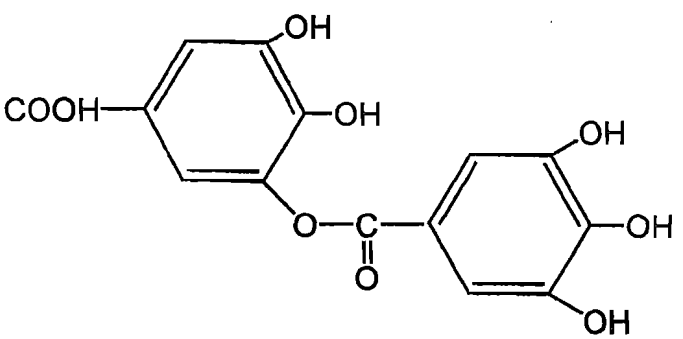
Acide gallique



Ribitol

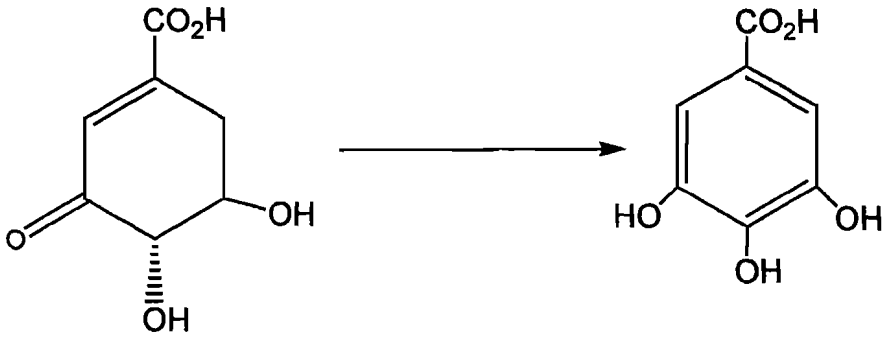


Glucose



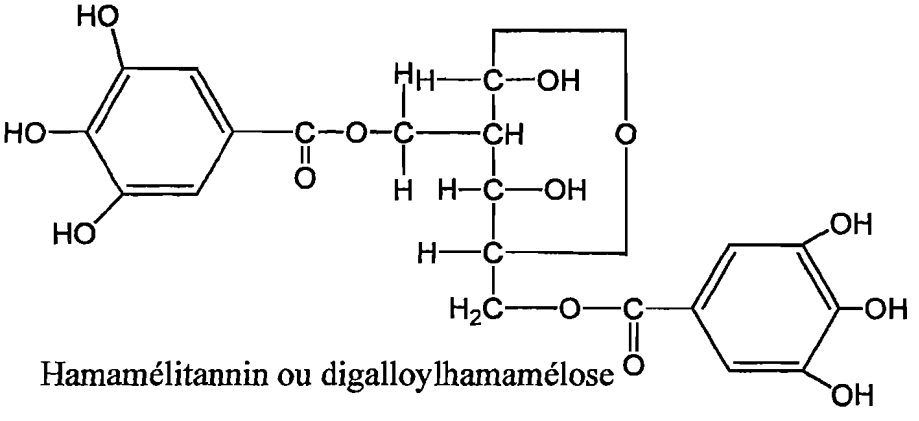
Acide digallique

Les tannins galliques ou gallotannins sont des tannins qui donnent par hydrolyse de l'acide gallique ou digallique et des oses généralement le glucose et le hamamélose. La réaction suivante montre la biosynthèse d'un tannin gallique via l'acide 3-déshydroshikimique transformé en acide gallique.



Acide 3-déshydroshikimique Acide gallique

Exemple d'un tannin gallique



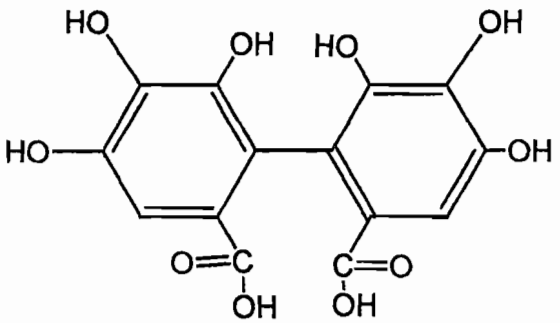
Hamamélitannin ou digalloylhamamélose

(extrait des feuilles d'Hamamelis virginiana)

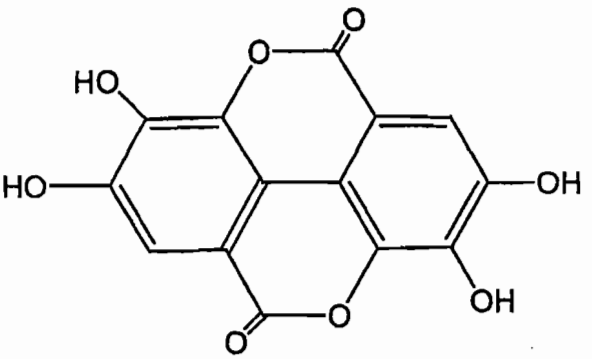
2. Tannins ellagiques

Les tannins ellagiques sont des esters des sucres (généralement glucose) et des acides Hexahydroxydiphéniques (H.H.D.P) et ses dérivés d'oxydation (BRUNETON, 1993).

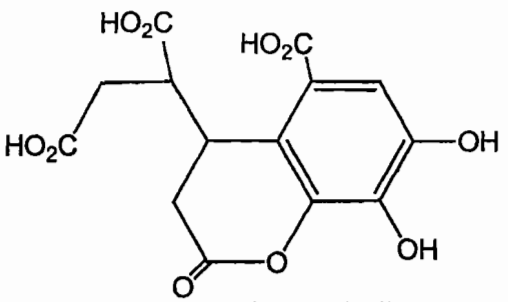
L'acide H.H.D.P fournit l'acide ellagique par lactonisation, lors de l'hydrolyse des tannins. L'un des dérivés de l'acide H.H.D.P est l'acide chébulique dont la fraction aliphatique est un reste de l'acide gallique réduit et dégradé.



Acide Hexahydroxydiphenique
(H.H.D.P)

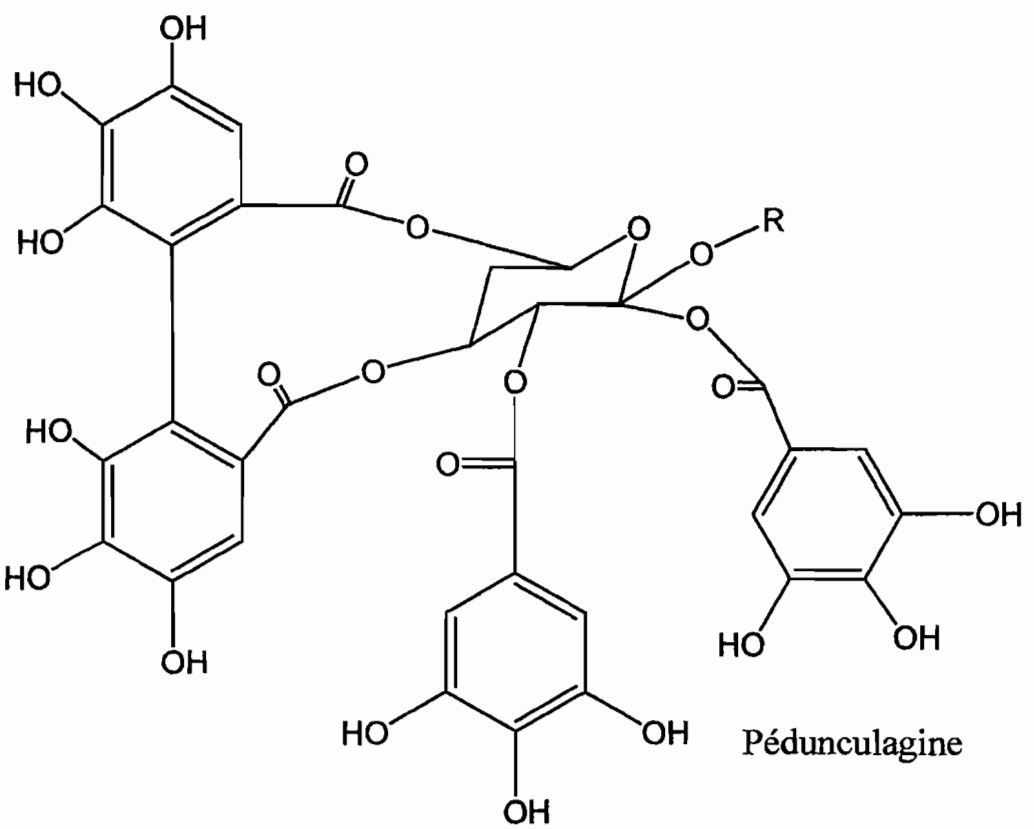


Acide ellagique



Acide chébulique

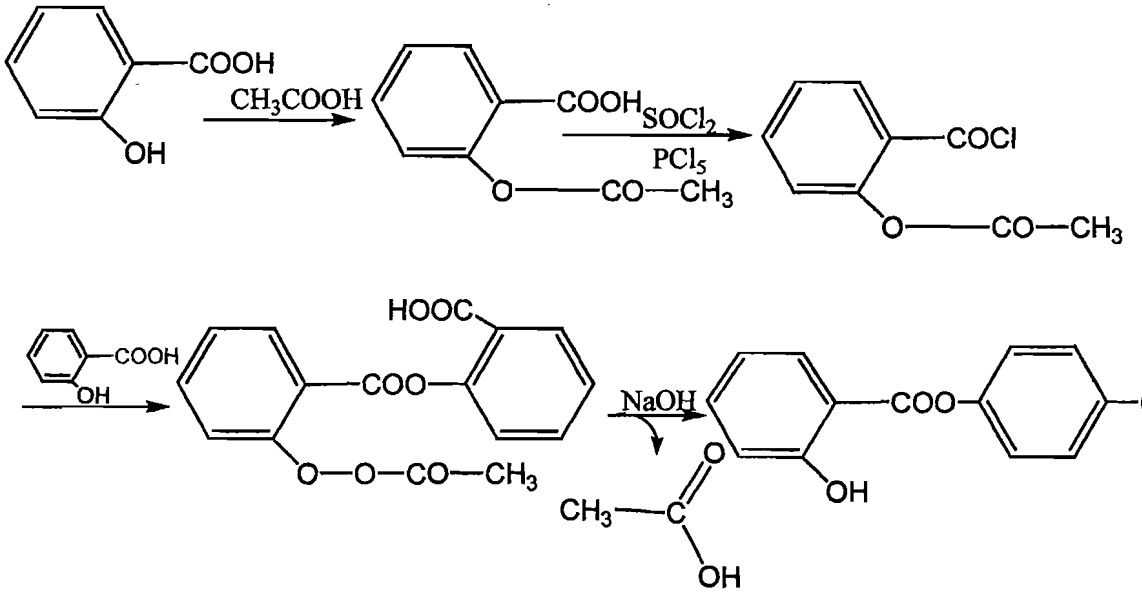
Exemple d'un tannin ellagique



Pédunculagine

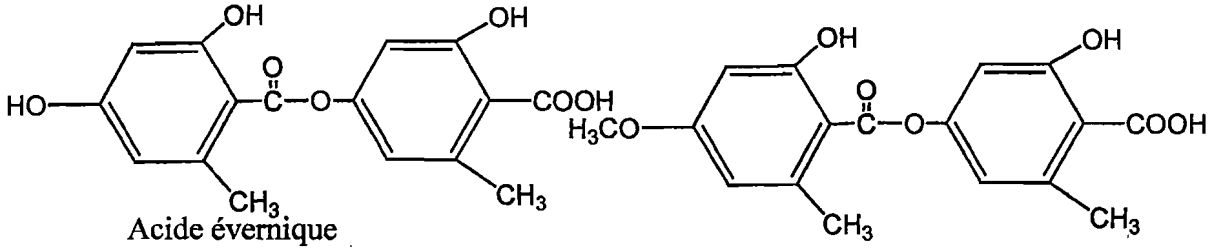
3. Les Dépsides

Ce sont des produits de condensation des acides phénoliques entre eux-mêmes et sont pour la plupart des produits synthétiques.



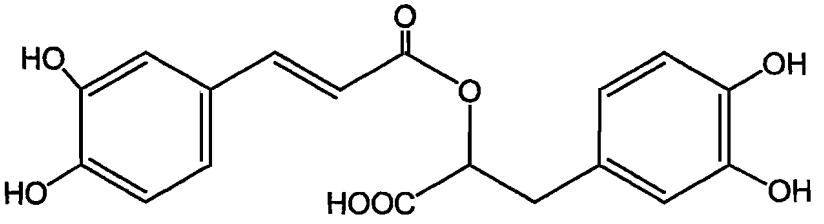
Les depsides à leur tour, peuvent se condenser selon la nécessité avec l'acide gallique pour former soit un anhydride, un acide, un ester ou un éther. Les depsides proviennent de l'estérification naturelle de deux acides phénoliques (WILLEMART A. et al., 1958 : PARIS, R.R. et al., 1971)

Les depsides naturels les plus connus sont :



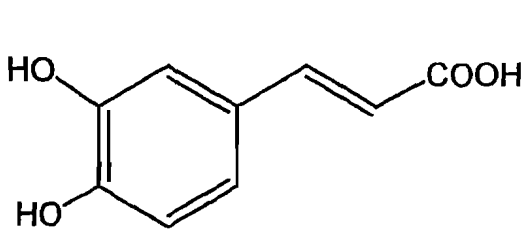
Acide évernique

Acide leucanorique

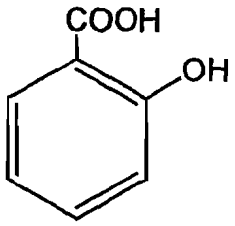


Acide rosmarinique

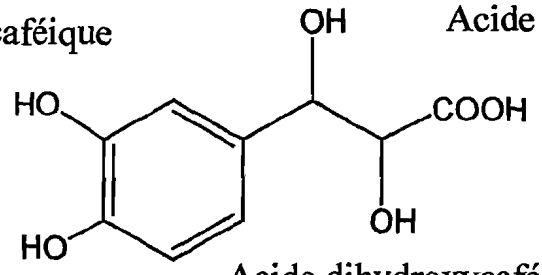
L'acide rosmarinique, trouvé dans Rosmarinus officinalis L..., est un depside de l'acide caféique. Ce depside est un dérivé de l'acide salicylique (WILLEMART, A. et al, 1958).



Acide caféique



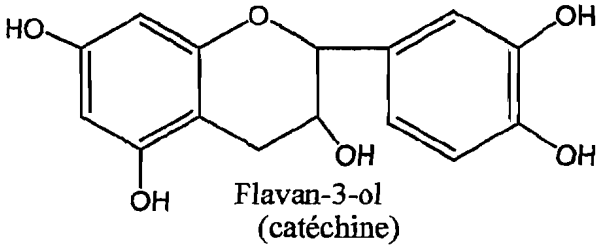
Acide salicylique



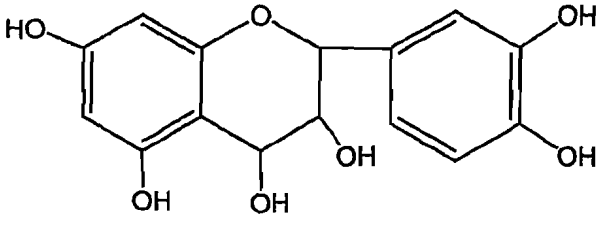
Acide dihydroxycaféique

II.5.2. Tannins condensés

Les tannins condensés encore appelés tannins catéchiques ou proanthocynadols sont non hydrolysables et proviennent de la condensation des flavonoïdes (ce sont des esters flavaniques). Les flavan-3-ols (catéchines) et les flavan-3,4-diols (leucoanthocyannes) sont les principaux éléments structuraux de base de ces polymères (BRUNETON, 1999)



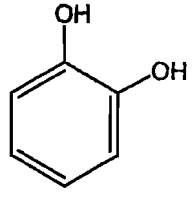
Flavan-3-ol
(catéchine)



Flavan-3,4-diols
(Leucoanthocyane)

Leur faible degré de polymérisation (<50) leur permet de former, dans les vacuoles, des solutions pseudocolloïdes, mais ils peuvent aussi se fixer au niveau des lignines dont ils renforcent l'imputrescibilité (bois de cœur) (BRUNETON, J., 1993).

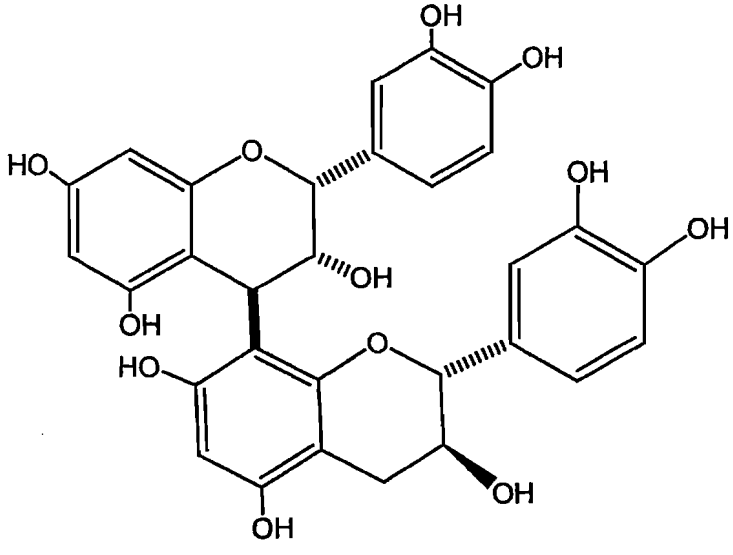
Ces tannins sont souvent désignés sous le nom de tannins catéchiques car leur distillation sèche aboutit à la pyrocathéchine (ou pyrocatéchol).



D'après Freudenberg, chez les végétaux, les flavanes résultent d'une activité métabolique dans les tissus où ils sont déposés (bois, écorces) et se polymérisent lentement (GUIGNARD,J. L., 1959).

Les acides forts à chaud ou les agents d'oxydation convertissent ces tannins en substances rouges ou brunes (phlobaphènes) insolubles dans la plupart des solvants.

Un exemple de tannin condensé ; le procyanidol B-1 (BRUNETON, J., 1999).



II.6. Propriétés des tannins

II.6.1. Propriétés physico-chimiques des tannins

II.6.1.1. Solubilité des tannins

Les tannins sont des produits brun-clairs généralement amorphes, solubles dans les solvants polaires (eau, alcool, acétone, acétate d'éthyle...) mais leur solubilité varie selon le degré de polymérisation ; elle diminue lorsque celui-ci augmente. Les tannins sont insolubles dans les solvants non polaires (Benzène, éther, chloroforme). La solution aqueuse des tannins est dextrogyre et légèrement acide (BRUNETON, J., 1993).

II.6.1.2. Réaction de précipitation des tannins

Les tannins ont la propriété de précipiter les protéines, d'où leur usage en tannerie de cuir. Ils sont aussi précipités de leur solution aqueuse par les sels de métaux lourds (Fe, Cu, Hg, Pb, Zn, Sn), l'eau de chaux, l'eau de baryte, molybdate d'Ammonium, le tungstène de sodium (Réactif de BRAEMER), la gélatine... .
Les tannins peuvent aussi être précipités par les protéines, alcaloïdes, albumine de blanc de l'œuf et par le Sérum sanguin (PARIS, R.R., 1971).

Avec les sels ferriques ($FeCl_3.6H_2O$ par exemple), les tannins hydrolysables donnent un précipité bleu-noir et les tannins catéchiques, un précipité brun-verdâtre. Cette différence de coloration nous permet de distinguer les deux sortes de tannins.

II.6.1.3. Réaction d'altération des tannins

Les tannins sont facilement oxydables surtout en milieu alcalin. Cette oxydation s'accompagne d'une coloration rouge lorsqu'ils sont exposés à l'ai, par fixation de l'oxygène.

Enfin, les tannins sont peu stables et facilement altérés. A l'abri de l'air, ils se conservent pendant quelques temps sans altération mais en contact de l'air, ils fixent peu à peu d'oxygène, puis brunissent, se décomposent en libérant des acides galliques, les acides ellagiques et le glucose (oses). De même exposés à la lumière, les tannins secs se colorent peu à peu en jaune, même lorsqu'ils sont conservés en vase clos (Thurzova, L., 1984).

II.6.2. Propriétés physiologiques des tannins

Les applications des drogues à tannins sont assez restreintes et découlent de leur affinité pour les molécules protéiques. Par voie externe, elles imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont aussi un effet vaso-constricteur sur les petits vaisseaux superficiels.

En limitant la perte des fluides et en empêchant les agressions extérieures, les tannins favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle ou de brûlure. Par voie interne, ils exercent un effet antidiarrhéique certain. Quelle que soit la voie d'administration l'effet antiseptique (antibactérien ou antifongique) est clairement démontré pour ces molécules (BRUNETON, 1993).

II.7. Usages des tannins

II.7.1. En thérapeutiques

Les drogues à tannins servent par leurs propriétés astringentes à l'extérieur et antidiarrhéiques en usage interne (PARIS, R.R. et MOYSE, H., 1972). Sur la peau et les muqueuses, elles provoquent une sorte de tannage rendant les couches superficielles moins perméables et protégeant ainsi les couches sous-jacentes. D'où leur emploi contre les hémorroïdes, les blessures superficielles.

Les extraits tanniques sont anti-inflammatoires dans les cas des brûlures (SCHAUENBERG, P. et al, 1977).
A l'intérieur les drogues à tannins sont employés contre les diarrhées. A l'action ralentissante intestinale, s'ajoute l'action antiseptique ; on préfère employer les combinaisons tanniques ou mieux les extraits végétaux complexes qui libèrent graduellement leurs tannins au cours de la digestion (PARIS, R.R. et MOYSE, H., 1972).

Les tannins sont des contrepoisons (antidote chimique) pour les alcaloïdes, les métaux lourds, car ils les précipitent de leurs solutions et facilitent ainsi leur élimination (SCHAUENBERG, P. et al, 1977).

II.7.2. Dans l'industrie

On se sert des tannins pour la fabrication de l'encre. En effet, l'encre est une solution aqueuse d'acide gallique ou des tannins contenant $FeSO_4$, H_2SO_4 dilué, gomme arabique et un colorant H_2SO_4 empêche l'oxydation de $FeSO_4$ par l'oxygène moléculaire (BRUNETON, J., 1993).

II.7.3. Dans l'industrie alimentaire

Les tannins sont utilisés comme antioxydant car ils manifestent une plus grande affinité pour l'oxygène et préservent les corps gras alimentaires du rancissement contre la formation des péroxydes. Les tannins peuvent être utilisés pour clarifier le vin rouge (SCHAUENBERG, P. et al, 1977).

II.7.4. Dans l'industrie de vins

Pendant l'opération de tamisage, on additionne du tannin à un moût dans le but d'aider à la dissolution de la matière colorante (vins rouges) ou dans le but de clarification (vins blancs) par une précipitation d'un trouble tanno-protéique, tanno-pectique etc... suivie d'une filtration (DUVAL, C., 1978). Les tannins de vins sont des oligomères résultant de la condensation des catéchines et des leucoanthocyanidines se trouvant dans la plante d'origine (VOGEL, P., 1997).

II.7.5. En teinture textile

Les tannins sont employés comme mordants qui sont des substances capables de se fixer à la fois sur une fibre (sur celle du coton) et sur le colorant. Dans l'industrie des colorants, ils sont utilisés comme adjuvant ou comme stabilisant pour les résines, peintures et pesticides. Les écorces riches en tannins mélangés à l'urée puis chauffées et additionnées de formol et acidifiés à pH=1 donnent une sorte de résine utilisable comme engrais (BRUNETON, J., 1999).

II.7.6. En médecine

L'acide ellagique est utilisé comme produit tonicardiaque et antirhumatismal. D'autre part, l'acide gallique et l'acide chlorogénique sont des cholagogues (PARIS, MOYSE, 1972).

DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION

CHAPITRE I. SCREENING PHYTOCHIMIQUE

I.1. Préparation préliminaire de l'échantillon

I.1.1. Récolte et séchage

La récolte de l'échantillon (c'est-à-dire les feuilles de Spermacoce princeae) a été effectuée dans la vallée de NYARUSEKE sur la colline KAGURUTSI en commune MUGINA dans la province de CIBITOKE au mois d'octobre 2007. 832g de feuilles de *Spermacoce princeae* ont été récoltées. Ce poids a été mesuré avec une balance technique du laboratoire du département de chimie.

Ces feuilles ont été séchées sur la paillasse et à l'air libre dans le laboratoire du CRUPHAMET (Centre de Recherche Universitaire en Pharmacopée et Médecine Traditionnelle).

Le séchage était surveillé par retournement régulier de l'échantillon. Ce dernier était régulièrement pesé jusqu'à ce qu'il atteigne une masse constante (196 g).

I.1.2. Détermination de la variation de la perte en eau au cours du séchage

Les feuilles de *Spermacoce princeae* pesées 24 heures après la récolte avaient une masse de 832g. C'est à ce moment que nous avons commencé le séchage.

Nous avons pesé l'échantillon toutes les 24 heures et lorsque nous constations de faibles variations de masse nous avons fait des pesées rapprochées par erreurs dues aux interférences atmosphériques.

Le tableau suivant nous montre la variation du poids de l'échantillon en fonction du temps de séchage.

Tableau n°1. Variation du poids de l 'échantillon en fonction du temps

Temps en jours	Poids de l'échantillon en gramme	Perte de poids de l'échantillon en gramme
1	832	0
2	538	294
3	408	130
4	319	89
5	238	81
6	222	16
7	203	19
8	201	2
9	197	4
10	196	1
11	196	0
12	196	0
13	196	0
15	196	0

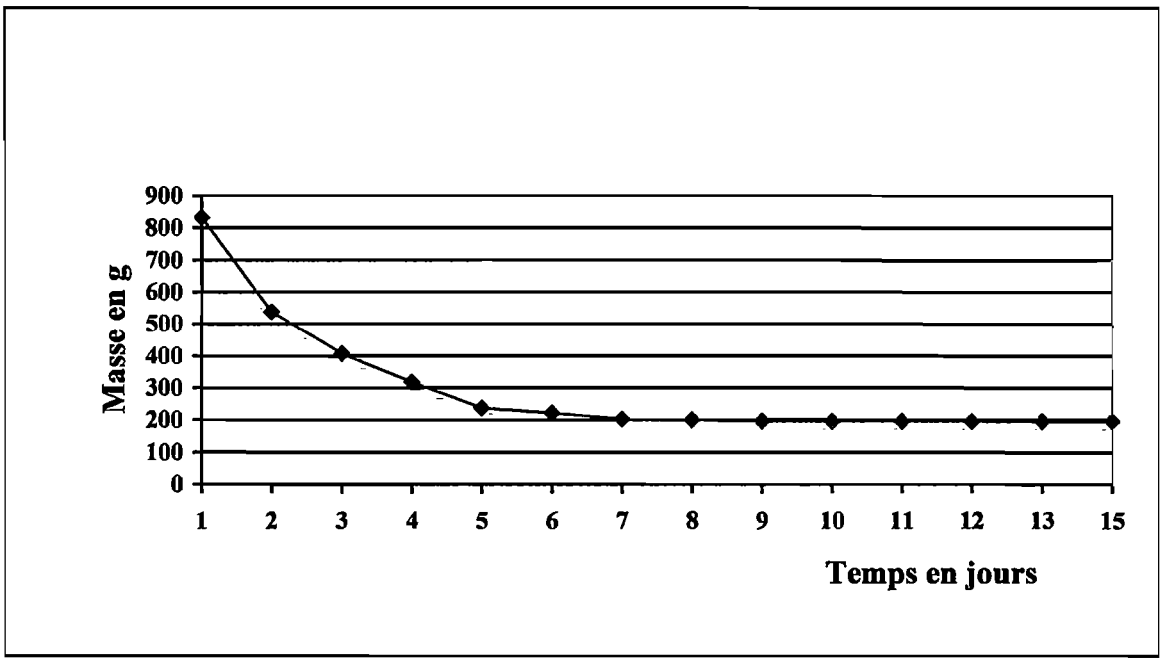


Figure 3. Variation du poids de l'échantillon en fonction du temps de séchage

I.1.3. Calcul de la perte en eau dans les feuilles de Spermacoce princeae

Le séchage a donc pour but d'abaisser la teneur en eau de telle sorte que les réactions enzymatiques ne puissent plus avoir lieu. En général, celles-ci n'interviennent plus pour une teneur en eau inférieure à 10%. Elle permet aussi d'éviter la prolifération sur les drogues des bactéries et des moisissures (MASUMBUKO, N., 2005).

La perte en eau pendant le séchage

$$= \frac{Poids\ à\ la\ \ récolte - poids\ \ mésuré\ \ à\ la\ \ fin\ du\ \text{sec}hage}{Poids\ à\ la\ \ récolte} \times 100\,\%$$

$$= \frac{832\,g - 196\,g}{832\,g} \times 100\% = 76{,}4\%$$

Après le séchage, nous avons procédé au broyage de ces feuilles dans un mortier en bois avec un pilon de même nature. Pour obtenir une poudre de faible granulométrie, nous avons effectué le tamisage à l'aide d'un tamis dont les pores

U. B.

sont de dimensions d'environ 50 µm (micromètre) de diamètre. La fine poudre ainsi obtenue a été conservée dans un flacon pour les analyses ultérieures.

I.2. Screening phytochimique

I.2.1. Définition

Le screening phytochimique (criblage phytochimique selon SOFOWOLA A., 1996) consiste à effectuer des tests chimiques simples pour détecter qualitativement la présence des substances pharmacologiquement intéressantes appelés principes actifs (IOAN,C. 1982).

Parmi les nombreuses substances que les plantes élaborent, les plus étudiées sont les suivantes :

- Les tannins
- Les alcaloïdes
- Les anthocyanes (Les leucoanthocyanes)
- Les flavonoïdes
- Les saponosides
- Les terpènes et les stéroïdes
- Les quinones (anthraquinones)

I.2.2. Méthodes de détection de quelques grandes classes de principes actifs

Pour détecter les principes actifs contenus dans les feuilles, nous nous sommes inspirés des modes opératoires proposés dans les ouvrages de FUMBA G. 1983, SOFOWOLA, A., 1996, CIULEI. et RWANGABO P.C, 1983.

I.2.2.1. Détection des Tannins

1. Mode opératoire

On prépare l'infusé à 5% en mettant 5g de poudre dans 100 ml d'eau chaude. Après, on ajoute du $FeCl_3$ 3% à quelques ml du filtrat.

Une coloration brun-verdâtre indique la présence des tannins catéchiques également appelés tannins condensés, tandis que les tannins galliques (hydrolysables) sont indiqués par une coloration bleue-noire.

2. Test de confirmation

On met en contact l'infusé à 5% de la poudre avec la gélatine salée (1% de la gélatine et 10% de NaCl dans l'eau).

Une solution « blanc » contenant 10% dans NaCl utilisée parallèlement à la gélatine salée permet d'éliminer les réactions faussement positives. La réaction est considérée comme positive quand avec l'infusé, il se forme un précipité blanc en présence de la gélatine sans que ce précipité apparaisse avec de NaCl seul.

Ce précipité est un complexe formé par les protéines composant la gélatine avec les composés phénoliques multihydroxylés constituant les tannins. Ce dernier flocule d'abord et précipite par après (BRUNETON, J., 1993).

II.2.2.2. Détection des autres principes actifs

Le screening phytochimique ne peut pas se limiter à la détection des tannins seuls. Nous avons également détecté d'autres grandes familles de substances bioactives à savoir :

Les alcaloïdes, les anthocyanes, les flavonoïdes, les saponosides, les terpènes et stéroïdes ainsi que les anthraquinones tels que cités au deuxième point de ce chapitre. Les modes opératoires sont rapportés en annexe 2.

Les résultats du screening phytochimique sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Résultats du screening phytochimique portant sur les feuilles de *Spermacoce princeae*

PRINCIPE ACTIF	TEST DE BASE		Confirmation
1. Tannins	+++		+++
2. Alcaloïdes	M	-	-
	W	-	-
	D	-	-
3. Anthraquinones	(+)		(+)
4. Saponosides	-		-
5. Flavonoïdes	+++		+++
6. Terpènes et stéroïdes	++		++
7. Leucoanthocyanes	+		+

Barème utilisé :

- : Absence du principe actif recherché
(+) : présence du porincipe actif sous forme de traces
\+ : présence du principe actif en faible quantité
++ : présence du principe actif en quantité moyenne
+++ : présence du principe actif en très grande quantité.

Abréviations utilisées dans le tableau :

M : Le réactif de Mayer

W : Le réactif de Wagner

D : Le réactif de Dragendorff

Les modes opératoires pour la préparation de ces réactifs sont en annexe 3.

I.3. Interprétation des résultats du screening phytochimique

Les analyses préliminaires que nous venons de mener sur les feuilles de *Spermacoce princeae* et, dont les résultats sont rassemblés dans le tableau 2, nous permettent de constater que les feuilles de *Spermacoce princeae* contiennent cinq principes actifs à savoir : les tannins, les flavonoïdes en grande quantité, les terpènes et stéroïdes en quantité moyenne, les leucoanthocyanes et les anthraquinones en petite quantité.

CHAPITRE II. EXTRACTION, ISOLATION, PURIFICATION ET CRISTALLISATION DES TANNINS

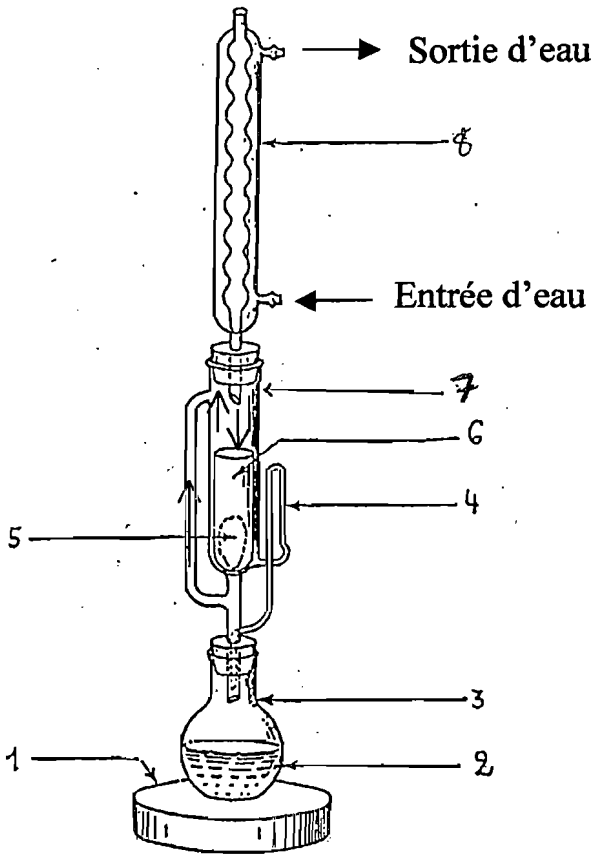
II.1. Extraction des tannins

Avant l'extraction, nous avons d'abord fait le dégraissage qui consiste à enlever les graisses végétales contenues dans la poudre issue des feuilles de *Spermacoce princeae.*

Le dégraissage a été réalisé à l'aide d'un solvant approprié, le n-hexane par macération de la poudre pendant 48 heures. La poudre préalablement épuisée par le n-hexane a été soumise à l'extraction proprement dite.

Dans le présent travail, sachant que les tannins sont solubles dans les solvants polaires, l'extraction a été réalisée à l'aide d'un système de solvant acétone-eau (4/1 v/v), dans l'appareil de Soxhlet avec 110g de poudre.

L'extrait ainsi obtenu a été concentré par un évaporateur rotatif. La solution concentrée a été conservée à l'abri de la lumière (dans une bouteille brune bien fermée) et de la chaleur au frigo.



Légende

1. Manteau chauffant
2. Solvant
3. Ballon
4. Tube en siphon
5. Echantillon
6. Cartouche contenant la poudre à extraire
7. Soxhlet
8. Réfrigérant

Figure 4: Schéma de l'appareil de Soxhlet

II.2. Isolation et purification des tannins par la méthode chromatographique

II.2.1. Introduction

Deux types de chromatographie vont nous aider dans notre travail, il s'agit de :

- La chromatographie sur couche mince
- La chromatographie sur colonne

II.2.2. Chromatographie sur couche mince

Pour faire notre analyse chromatographique sur couche mince , nous avons suivi le mode opératoire proposé dans l'ouvrage « Chimie analytique expérimentale » de CHAVANNE M. et al, 1991. En effet cet ouvrage résume l'opération en quatre grandes étapes à savoir :

- Préparation de la cuve chromatographique
- Dépôt de l'échantillon sur la plaque
- Développement du chromatogramme dans la cuve
- Révélation et calcul du Rf.

II.2.2.1. Préparation de la cuve chromatographique

Des cuves en verre, en forme de parallélépipède rectangle de dimension 22 X 11 X 22 cm ont été bien lavées et séchées. Parmi les systèmes de solvants proposés dans la littérature chimique pour isoler les tannins, huit seulement ont été essayés. La liste de ces systèmes de solvants proposés est la suivante :

- benzène-méthanol (95 : 5 v/v)
- acétone-eau (3 : 2 v/v)
- ethanol-acétone-eau (6 : 5 : 1 v/v)
- méthanol-toluène (9 : 1 v/v)
- butanol-1-acide acétique-eau (2 : 1 : 1 v/v)
- acétone-acide acétitique (7 : 3)
- acétate d'éthyle-acide formique-eau (18 : 1 : 1 v/v)
- méthanol-eau (95 : 5 v/v)
- benzène-acétone-acide acétique (4 : 4 : 1 v/v)
- toluène-eau (95 : 5 v/v)
- benzène-acide acétique (5 : 2 v/v)
- toluène-acétate d'éthyle (1 : 1 v/v)
- toluène-formiate d'éthyle (1 : 1 v/v)
- chloroforme-méthanol-eau (65 : 30 : 1 v/v)
- toluène-méthanol-eau (2 : 1 : 1 v/v)
- n-butanol-acide acétique-eau (3 : 1 : 1 v/v)
- acétone-n-butanol (4 : 1 v/v)
- n-hexane-acétone-acide acétique (4 : 4 : 1 v/v)
- acétone-eau-chloroforme (3 : 1 : 1 v/v)
- n-hexane-acide acétique (8 : 5 v/v)
- n-hexane-acide formique-eau (5 : 3 : 2 v/v)
- butanol-acide acétique-eau (4 : 2 : 1 v/v)
- n-hexane-acétone (3 : 2 v/v)
- dichlorométhane-méthanol-eau (70 : 30 : 3 v/v)
- toluène-acétate d'éthyle-acide acétique (1 : 1 : 1 v/v)

(RANDERATH, K., 1971).

Nous avons utilisé l'acétone-eau (3 : 2 v/v), benzène-méthanol (95 : 5 v/v), acétate d'éthyle-acide formique-eau (18 : 1 : 1 v/v), acétone-n-butanol (4 : 1 v/v), benzène-acide acétique (5 : 2 v/v), toluène-méthanol (95 :5 v/v), méthanol-eau

(95 : 5 v/v), toluène-eau (95 : 5 v/v). Chaque système était mis dans la cuve deux heures avant l'opération de chromatographie. La cuve était bien fermée en vue de sa saturation en vapeur des solvants.

Parmi les systèmes essayés, le système acétate d'éthyle-acide formique-eau (18 : 1 : 1 v/v) nous a semblé meilleur.

II.2.2.2. Dépôt de l'échantillon sur les plaques

Au cours de notre travail, nous avons utilisé des plaques localement préparées en étalant sur des plaques de dimensions 5 X 20 cm, 10 X 20 cm et 20 x 20 cm, une mince couche d'une bouillie de silicagel (60 F_{254}) contenant 10% d'amidon servant de liant.

Après l'activation des plaques dans l'étuve à 110°C pendant 30 minutes, l'échantillon est déposé sur la ligne de départ, tracée à 2 cm au bord inférieur de la plaque sous forme de tache d'environ 3 à 5 mm de diamètre.

Enfin, la plaque est séchée à l'air libre pendant quelques minutes avant de la déposer dans la cuve de développement.

II.2.2.3. Développement de la plaque chromatographique dans la cuve

Dans les cuves contenant chacune un système de solvant éluants, les plaques sont placées en position verticale et les cuves sont fermées. Ces plaques sont retirées chaque fois que le système de solvants éluant a parcouru une distance de 15 cm (3/4 de la plaque).

II.2.2.4. Révélation et calcul de Rf

1° Révélation

La couche mince permet de déterminer le système qui est efficace pour la séparation nette du mélange des substances en plusieurs taches.

La séparation des substances colorées est facilement observable sur une plaque chromatographique à la lumière du jour sous forme des taches de couleurs variées. Dans le cas des substances incolores, les taches sont rendues visibles par l'examen à la lampe UV et par la pulvérisation des réactifs spécifiques etc.

Pour le présent travail, nous avons localisé les différents constituants distribués sous forme de spots par observation à la lumière du jour d'abord, sous la lampe UV. Nous avons enfin pulvérisé une solution de $FeCl_3$ (3%) pour localiser les spots correspondant aux tannins.

Le développement des chromatogrammes dans les différents systèmes de solvants choisis est illustré par les figures 5 à 10 suivantes.

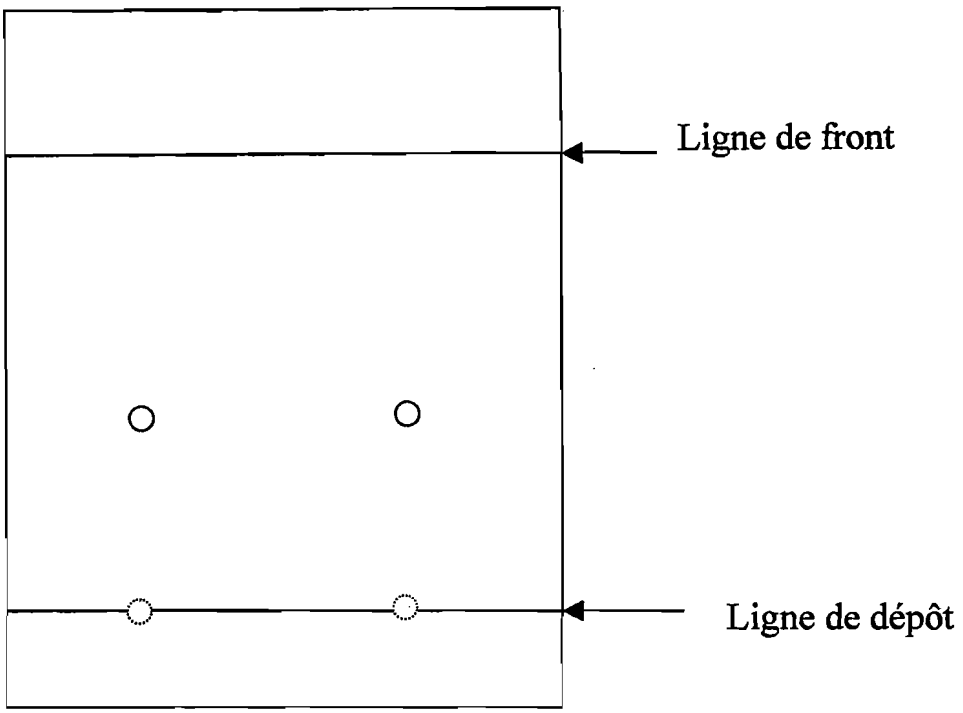


Figure 5 : Chromatogramme de l'extrait total des tannins dans le système acétone-eau (3 :2 v/v)

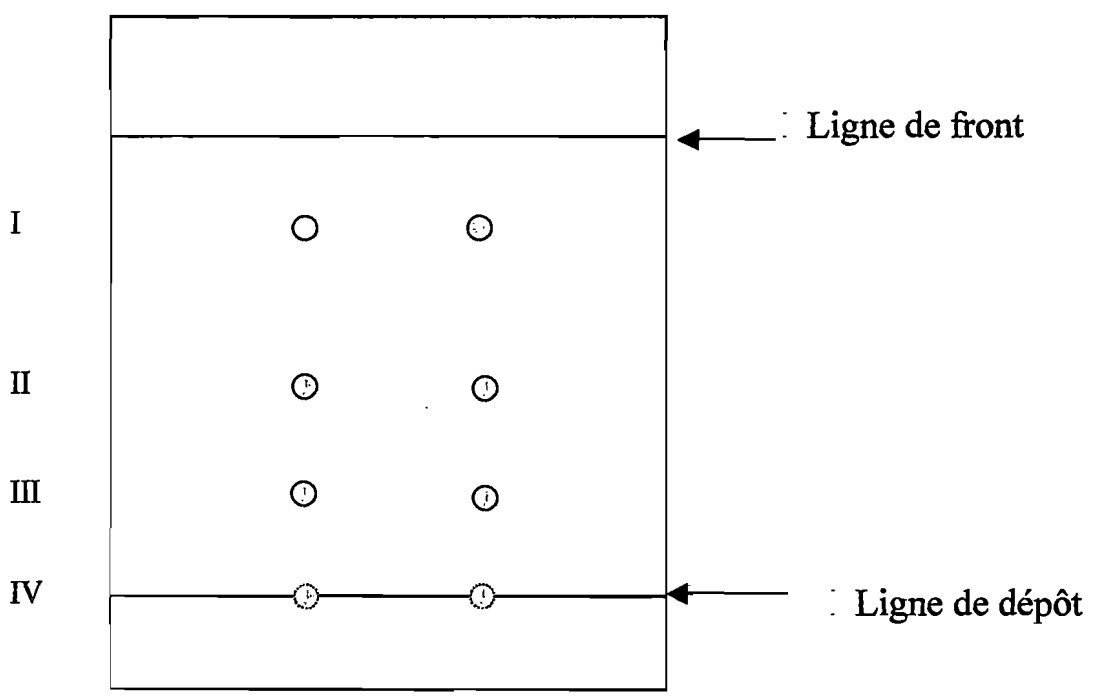


Figure 6. Chromatogramme de l'extrait total des tannins dans le système acétate d'éthyle-acide formique-eau (18 :1 :1v/v).

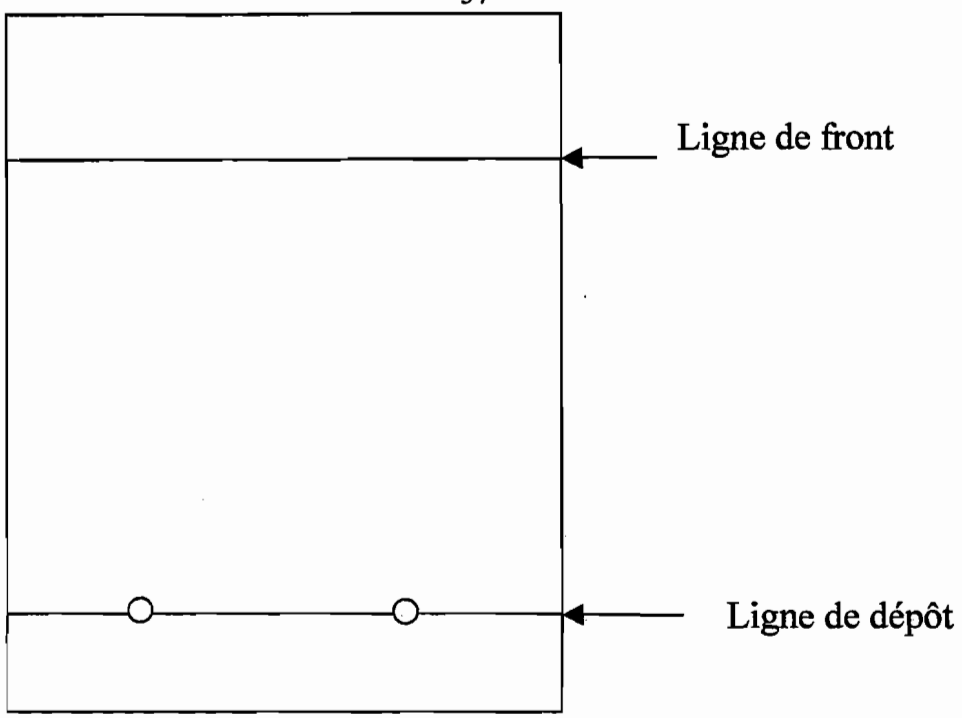


Figure 7 : Chromatogramme de l'extrait total des tannins dans le système benzène- méthanol (95 :5 v/v)

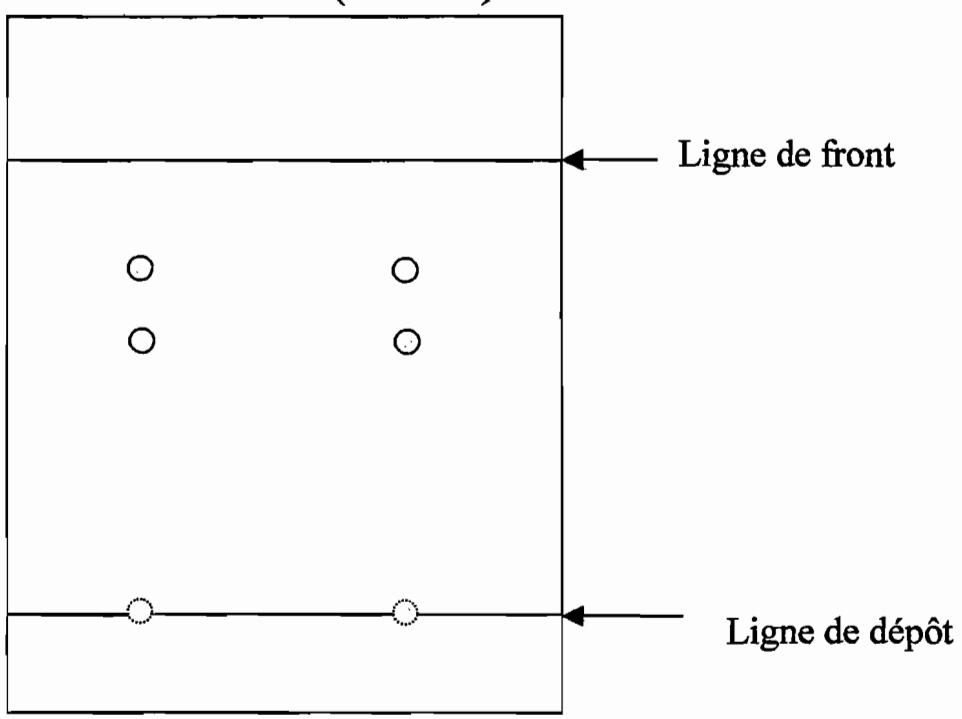


Figure 8 : Chromatogramme de l'extrait total des tannins dans le système acétone – n- butanol (4 :1 v/v)

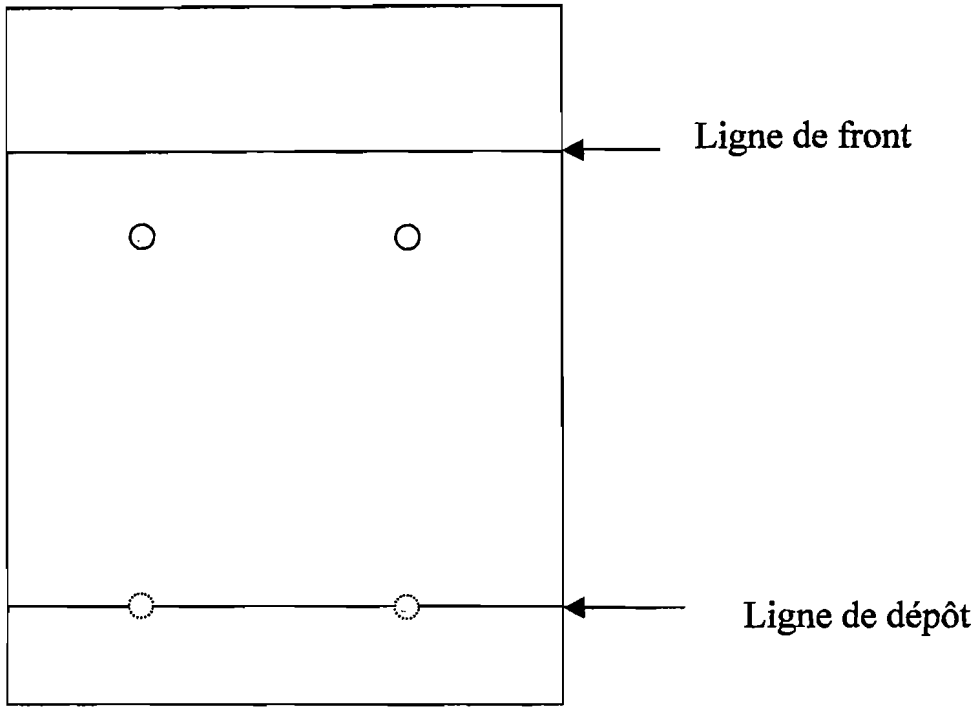


Figure 9 : Chromatogramme de l'extrait total des tannins dans le système benzène- acide acétique (5 :2 v/v)

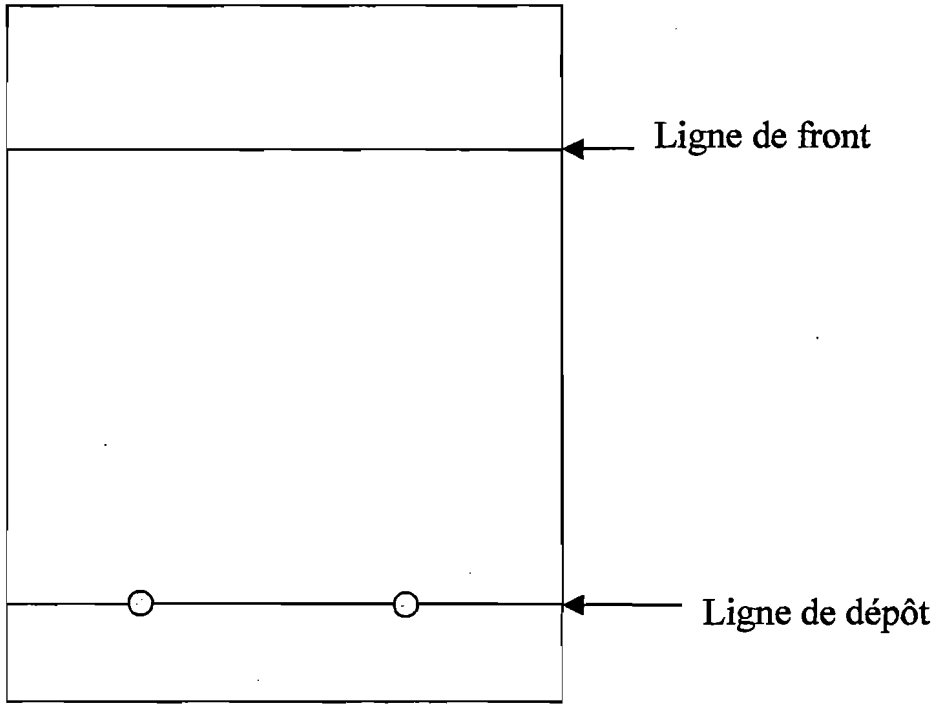


Figure 10 : Chromatogramme de l'extrait total des tannins dans le système toluène-méthanol (95 :5 v/v)

En analysant les différents chromatogrammes précédents, nous trouvons qu'une bonne séparation s'est révélée sur la figure 6 avec le système acétate d'éthyle-acide formique-eau (18 :1 :1 v/v). Ainsi le système acétate d'éthyle-acide formique-eau (18 :1 :1 v/v) a été choisi pour la chromatographie sur colonne.

2° Calcul du Rf

Le terme Rf provient de l'abréviation de l'expression anglaise : « Retarding Factor » une traduction adoptée pourrait être : « Rapport Frontal » (CHAVANNE, 1991).

Rf d'un composé est défini par :

$$Rf = \frac{\textit{distance parcourue par la substance}}{\textit{distance parcourue par le solvant}}$$

Le tableau suivant nous illustre les différentes valeurs de Rf et différentes colorations des spots dans le visible et sous la lampe UV.

Tableau 3. Différentes valeurs de Rf et différentes colorations de spots dans la lumière visible et sous la lampe UV

Système	Spot	Coloration dans la lumière visible		Coloration dans la lumière U.V		Rf
acétate d'éthyle-acide formique-eau (18 :1 :1 v/v).		Avant la révélation	Après la révélation	Avant la révélation	Après la révélation	
	I	-	-	Blanc	Blanc	0,68
	II	Jaune	Jaune	Jaune foncé	Jaune foncé	0,49
	III	Brun	Brun-vert	Brun	Brun-vert	0,34
	IV	-	-	Blanc	Blanc	0,0

Le système acétate d'éthyle-acide formique-eau nous a montré 4 spots, l'un reste sur la ligne de dépôt. Avec la pulvérisation d'une solution de $FeCl_3$ 3% sur

la plaque, seul le spot III s'est coloré en brun-vert. On en déduit que le spot III représente les tannins catéchiques confirmés lors du screening phyto-chimique.

II.2.3. Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est une technique qui nous permet de séparer les substances d'une façon quantitative.

II.2.3.1. Remplissage de la colonne

La colonne utilisée est un tube en verre de forme cylindrique de 60 cm de longueur et de 3 cm de diamètre. Le remplissage de la colonne peut se faire soit par voie humide, soit par voie sèche.

Pour notre travail, nous avons choisi la voie humide qui a l'avantage de permettre l'élimination des bulles d'air souvent présentes et sources d'irrégularités (MAHUZIER et HAMON, 1990).

Nous nous sommes servis d'une burette munie d'un robinet comme colonne et, le remplissage par voie humide s'est fait suivant le protocole ci-après :

- Fermer le robinet de la colonne et obstruer sa partie inférieure avec un tampon d'ouate.
- Former une couche de sable d'environ 1 cm pour éviter que l'extrémité inférieure de la colonne soit bouchée.
- Faire une bouillie homogène de l'adsorbant (silicagel) et du système éluant acétate d'éthyle-acide formique-eau.

- Remplir la colonne jusqu'à 2/3 par de petites portions de la bouillie, bien tasser en frappant les parois de la colonne.

Lorsque l'adsorbant (Silicagel) est bien tassé, introduire une deuxième couche de sable et maintenir une certaine colonne de l'éluant au-dessus de sa surface.

II.2.3.2. Introduction de l'échantillon

Avant l'introduction de l'échantillon, le robinet de la colonne est ouvert et quand l'éluant a franchi la deuxième couche de sable, l'échantillon y est introduit en une fois au moyen d'une pipette. Quant à son tour, l'échantillon a traversé cette couche de sable, l'éluant est ajouté, d'abord en petites portions, ensuite d'une façon continuelle en le maintenant au même niveau au moyen d'une ampoule à décanter.

II.2.3.3. Développement de la colonne chromatographique

Après ajustement du débit en bas de la colonne, nous avons recueilli les différentes fractions à la sortie de la colonne dans 11 flacons. Toutes ces fractions numérotées de 1 à 11 dans leur ordre de remplissage ont été soumises au test de coloration par le $FeCl_3$ 3 % pour déterminer ceux qui contiennent les tannins. Seuls les quatre premiers flacons ont donné une coloration brun-verte caractéristique des tannins catéchiques.

III.2.3.4. Test de pureté

Les quatre flacons ayant donné un résultat positif avec le $FeCl_3$ 3% ont été soumis aux essais de purification par la chromatographie sur couche mince avec

les plaques de dimensions 20 X 20 cm. La phase fixe était toujours constituée par le silicagel.

Ainsi trois systèmes de solvants ont été séparément utilisés à savoir :

- Méthanol-eau (95/5 v/v)
- Acétone-eau (3 :2 v/v)
- Benzene-Acétone-Acide acétique (4 :4 :1 v/v)

Pour chaque fraction, les différents Rf obtenus avec différents systèmes ainsi que le nombre de taches et leurs colorations sont données dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Valeurs de Rf et nombre de tâches obtenus avec différents systèmes de solvants

Système	N° du flacon	Nombre de tâches	Coloration des spots	Rf
Méthanol-eau (95 :5 v/v)	1 2 3 4	1	Brune	0,15
Acétone-eau (3 :2 v/v)	1 2 3 4	1	Brune	0,20
Benzene-Acétone-Acide acétique (4 :4 :1 v/v/v)	1 2 3 4	1	Brune	0,22

II.3. Essai de cristallisation

Pour faciliter la conservation du produit et la réalisation des différents tests envisagés dans le chapitre suivant, nous avons essayé de cristalliser le produit obtenu.

En effet, toutes les fractions contenant le produit ont été rassemblés et évaporés dans un évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un produit visqueux collant sur les parois du ballon utilisé.

Nous avons pu obtenir une poudre en utilisant le système acétone –acide acétique (7 :3 v/v). La substance isolée s'est cristallisée lentement d'abord à l'air libre ensuite dans un réfrigérateur en formant des cristaux bruns.

Après cinq jours nous les avons séparés du système de solvant et nous les avons séchés et conservés dans un petit flacon pour les analyses que nous exposons au chapitre IV.

CHAPITRE III. ESSAI DE CARACTERISATION DES CRISTAUX DE LA SUBSTANCE ISOLEE

III. 1. Hydrolyse acide

Nous avons pris l'extrait total de notre échantillon et avons mélangé avec le HCl dilué(0,01M) chauffé. Nous avons homogénéisé le mélange et avons ajouté du chloroforme. Nous avons obtenu deux phases : l'une aqueuse et l 'autre organique. La phase aqueuse a été mise en réaction avec la liqueur de Fehling et nous avons chauffé jusqu'à l'ébullition.

Observation : Nous avons assisté à la formation d'un précipité lors de l'addition de la solution de HCl chauffé à la solution tannante. La réaction de la phase aqueuse avec le liqueur de Fehling nous a donné un précipité rouge brique.

Conclusion : Notre solution renferme de sucres (monosaccharides). La réaction entre l'hydrolysant et le chlorure de phénylhydrazine nous a conduit à la formation d'un précipité. Ce qui montre qu'il renferme le groupement carbonyl. Le produit renferme des glycosides des procyanidols.

III.2. Détermination de la température de fusion

La température de fusion est une caractéristique physique propre à une substance. Nous avons déterminé la température de Fusion à l'aide d'un appareil de Thiele muni d'un thermomètre. Pour notre cas, nous avons mis une petite quantité de produit dans cet appareil. Les cristaux fondent et le thermomètre marque une température à 203°C.

Selon BRUNETON J. (1993), la température de fusion pour les tannins se situe entre 180° et 210°C

III. .3. Test de solubilité

La solubilité est une propriété qui nous permet d'obtenir des renseignements sur la nature de notre composé isolé. Nous avons effectué des tests d'abord avec des solvants non polaires et suivant un gradiant croissant de constantes diélectriques (ε) ensuite avec des solvants polaires en suivant toujours l'ordre croissant des constantes diélectriques.

Pour notre cas, nous avons pris quelques mg de cristaux dans 2 ml de solvant et les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 5 : Résultats du Test de solubilité

Solvants non polaires	Solvant	ε	Solubilité
	1. n-hexane	1,88	-
	2. Benzène	2,28	-
	3. Toluène	2,38	-
	4. Ether diéthylique	4,31	-
	5. Chloroforme	4,806	-
Solvants polaires	6. Acétate d'éthyle	6,01	+
	7. Acide acétique	6,23	+
	8. Acétone	20,72	++
	9. Méthanol	32,7	++
	10.Acide formique	56,02	+++
	11.eau	78,38	+++

Légende : - : Insoluble

+ : Faiblement soluble

++ : Moyennement soluble

+++ : Fortement soluble

Les valeurs des constantes diélectriques sont tirés de « Chimie Analytique » (MAHUZIER, G.,1990).

En se référant aux résultats du tableau 5, on se rend compte que notre substance isolée est soluble dans les solvants polaires ou moyennement polaires et insolubles dans les solvants non polaires.

TROISIEME PARTIE : CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS

1. Conclusion générale

L'aspect chimique qui constituait le fil conducteur de notre recherche nous a permis d'extraire, d'isoler et de caractériser les tannins des feuilles de *Spermacoce princeae*, substance pouvant expliquer son usage en médecine traditionnelle contre les maladies diarrhéiques.

Pour notre travail, nous avons commencé par le screening phytochimique des feuilles de cette plante, ce dernier nous a permis de mettre en évidence cinq principes actifs à savoir : les tannins, les flavonoïdes, les terpènes et stéroïdes en quantité suffisante et les leucoanthocyanes et les anthraquinones en petites quantités.

Ensuite l'extraction, isolation et la purification des tannins ont été réalisées successivement à l'acétone-eau avec l'appareil de Soxhlet et à l'aide des méthodes chromatographiques (chromatographie sur couche mince et sur colonne) en utilisant le système Acétate d'éthyle-Acide formique-eau (18 :1 :1 v/v/v)

Les résultats de la chromatographie nous ont permis de conclure que la substance isolée est un tannin catéchique par la présence d'une seule tache de couleur brun-verdâtre après pulvérisation de la plaque avec le $FeCl_3$ 3%

La température de fusion au moyen de l'appareil de Thiele se situe entre 202 et 203°C. Elle se rapporte à l'intervalle des températures de fusion des tannins (180-210°C) consigné dans la littérature.

2. Recommandation

Dans le cadre de la valorisation du patrimoine végétal burundais, nous recommandons au gouvernement et aux autorités de l'Université du Burundi :

- de créer un centre d'extraction des substances naturelles d'intérêt industriel ou pharmaceutique ;
- d'encadrer les guérisseurs locaux par une collaboration étroite avec les services de santé pour améliorer les médicaments traditionnels ;
- d'équiper les laboratoires en achetant tout le nécessaire afin que les futurs chercheurs identifient la structure des substances isolées et la commercialisation des médicaments issus de ces recherches.

Nous encourageons la recherche des principes actifs d'autres plantes largement utilisées au Burundi mais n'ayant fait objet d'aucun screening phytochimique et d'approfondir celle ayant déjà fait objet d'analyse.

Afin de faciliter les recherches ultérieures sur les plantes médicinales à nos successeurs, les autorités burundaises devraient équiper les laboratoires et surtout penser à installer une unité d'extraction des substances à propriétés pharmaceutiques intéressantes.

Ce travail est un cri. Mais sans doute, seuls ceux qui sont à l'écoute de la recherche scientifique pourront l'entendre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. A.C.C.T: Médecine traditionnelle et pharmacopée, Bulletin de liaison, Paris, 1989.
2. BERNARD, J., LEVY, J.P. et VARET, B. : Hématologie Flamation Médecine- Sciences, Paris, 1976.
3. BOUNIAS, M. : Analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince, Masson, Paris, 1983.
4. BRUNETON, J. : Elément de phytochimie et de pharmacognosie, 2e édition, Lavoisier, Paris 1993.
5. BRUNETON, J. : Eléments de phytochimie et de pharmacognosie, Techniques et documentation, Lavoisier, Paris, 1987.
6. BRUNETON, J. : Pharmacognosie-phytochimie-plantes médicinales, 3eme édition, Lavoisier, Paris, 1999.
7. CHAVANNE, M., JULIEN, A., BEAUDOUIN, G.J., FLAMAND, E. : Chimie organique expérimentale, 2eme édition, Mont-Royal, Québec, 1991.
8. CUILEI, I., Pratical manuels on the indistrial utilization of medicinal and aromatic plants, Methodology for analysis of vegetable drugs, I.P.A.C Romania, Bucharest, 1982.
9. DUVAL, C. et DUVAL R., Dictionnaire de la chimie et de ses applications, 3ème édition, Technique et documentation, ISBN, Paris, 1978.
10. FUMBA, G. Plantes médicinales antivenimeuses au Burundi, les Presses de l'avenir, Arlon, Belgique, 1983.
11. GIRRE, L., Nouveau guide des vieux remèdes naturels, Ouest-France, de Boeck université, 1985.
12. GRIGNARD V., DUPONT G., LOQUIN R. et BAUD P. ; Traité de chimie organique, tome VI, Masson et Cie, Paris, 1959.
13. GRIGNARD, V., DUPONT, G., LOQUIN, R. et BAUD, P. ; Traité de chimie organique, tome V, Masson et Cie, Paris, 1955.

14. GUIGNARD, J.L, Abrégé de chimie végétale, 2eme édition, Dunod, Paris, 2000.

15. IOAN, C. Pratical manuals of medical on the industrial utilization of medical and aromatic plants. Methodology for analysis of vegetable drugs, Faculty of Pharmacy, Bucharest. Romania 1982.

16. MAHUZIER, G. et HAMON, M. Abrégé de Chimie analytique, Tome 2, Masson, Paris, 1990.

17. MASUMBUKO, N., Extraction et identification des tannins des feuilles de l'Aloé sp. de Kibumbu, Mémoire UB, Bujumbura, 2005.

18. PARIS, M. et HURABIELLE, M. : Abrégé de matière médicale, Tome 1, Masson, Paris, 1980.

19. PARIS, R.R. et MOYSE, H. : Matière médicale, Tome 3, 2emeédition, Masson, Paris 1971.

20. PARIS, R.R. et MOYSE, H. : Précis de matière médicale, Tome 1, 2emeédition, Masson, Paris 1976.

21. RAVEN et EICHHORN : Biologie végétale. Traduction de la 6emeédition américaine par Jules Bouharmont avec la collaboration scientifique de Charles-Marie, Eurand, 2000.

22. ROBERT, D. et CATESSON, A.M. : Organisation végétale. Nouvelle édition Doin, 2000.

23. ROBERT, D. et ROLAND, J.C. : Organisation cellulaire. Nouvelle édition Doin, 1998.

24. RWANGABO, P.C.: La médecine traditionnelle au RWANDA, Edition KARTHALA et A.C.C.T, Paris 1983.

25. SCHAUENBERG, P. F., DELACHAUX, NIESTLE et PARIS: Guide des plantes médicinales, 2ème édition, S.A. Newchâtel Suitzerland, Paris, 1977.

26. SENKIMA, D. : Inventaire des plantes utilisées dans le traitement des diarrhées en médecine traditionnelle, Mémoire, U.B, Bujumbura, 2003.

27. SIBOMANA, R., : Contribution à l'étude des plantes traitant les diarrhées, les mycoses et le paludisme dans la médecine traditionnelle burundaise, Mémoire UB, Bujumbura, 1994.

28. SOFOWOLA, A. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, Edition KARTHALA, 1996.

29. THURZOVA, L. ; Les plantes-santé qui poussent autour de nous, Bordas, 1984.

30. TROUPIN, G. Flore du RWANDA-Spermatophytes, annales de Musée Royal de l'Afrique centrale- Tervuren, Belgique, Série IN-8°, Sciences économiques n°9, vol1 ; 1978.

31. VOGEL ; P. : Chimie organique, méthodes et modèles. De Boeck université, Paris Bruxelles ; 1997.

32. WILLEMERT, A. et CHAUX R. : Les grandes fonctions de la chimie organique et leurs principales applications. 2emeédition, Paris Dunond, 1958.

ANNEXES

Annexe 1 : Tannins synthétiques et tannins minéraux

1. Tannins synthétiques

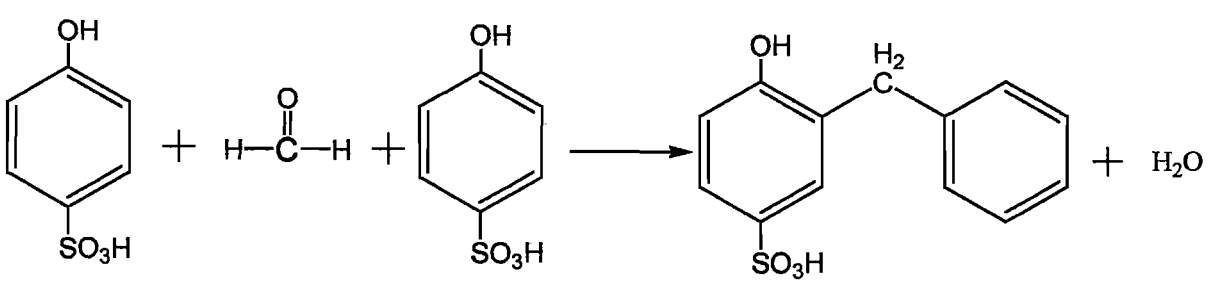
On appelle tannins synthétiques, un certain nombre de produits organiques plus ou moins définis, possédant la propriété de se combiner, comme les tannins végétaux. Aux matières protéiques telle la gélatine et la peau en donnant naissance à des composés imputrescibles présentant une certaine résistance) à l'eau et même à l'alcool (GRIGNARD V. et al., 1959 ; WILLEMART A. et al., 1958)

Ce sont des produits de remplacement possédant certaines propriétés des tannins végétaux mais ne peuvent pas les remplacer complètement. Les premiers tannins synthétiques ont été préparés par SCHIFF en 1871, par condensation de l'acide gallique, de l'acide pyrogollol sulfonique et même du phénol salfonique.

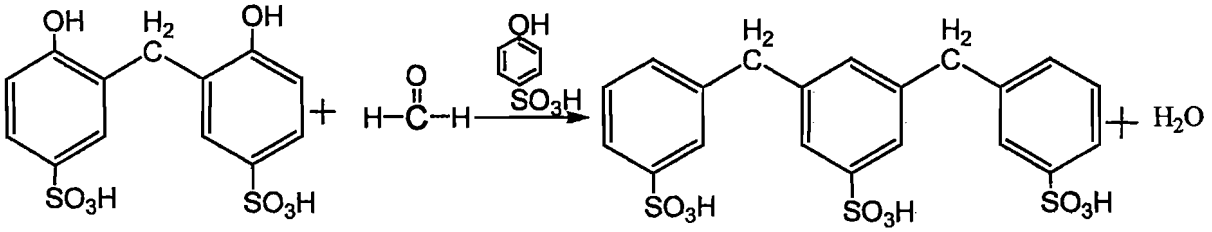
Les tannins synthétiques peuvent être préparés à partir de :

- La condensation des hydrocarbures sulfonés sur eux-mêmes
- La condensation des hydrocarbures aromatiques sulfonés avec aldéhydes

La réaction qui permet de comprendre ces préparations est la suivante :



Le produit formé peut encore se condenser avec le formol.



Les tannins synthétiques sont, en général, employés en mélange avec les tannins végétaux dont ils augmentent la rapidité de diffusion dans la peau. En outre, ils maintiennent en solution les phlobaphènes des tannins catéchiques et permettent d'obtenir des cuirs tannés de couleur claire.

Les phlobaphènes sont des produits rouges obtenus par action des ferments oxydants sur les tanides ou tanosides resultant du dédoublement des tanoïdes (=rouge de tannin) (DUVAL C., et al, 1978)

2. Tannins minéraux

Ces produits diffèrent des autres par le fait qu'ils sont obtenus à partir des composés minéraux. Les plus employés sont les sels de chrome, les sels d'aluminium et les sels de fer.

- **Tannage au Fer**

En solution aqueuse le sulfate de fer est traité avec Na_2CO_3 pour donner un sulfate basique.

$$Fe_2(SO_4)_3 + Na_2CO_3 + H_2O \longrightarrow 2FeSO_4(OH) + Na_2SO_4 + CO_2$$

Néanmoins, une peau tannée de cette façon ne résiste pas à l'action de l'eau et se détanne au lavage sous l'action des sels alcalins.

- **Tannage au sel d'aluminium**

La substance utilisée est le $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$ ou l'Alun $Al_2(SO_4)_3$. En solution aqueuse, il se passe la réaction suivante :

$6Al_2(SO_4)_3.18H_2O + 18H_2O \longrightarrow 12Al(OH)_3 + 18H_2SO_4$

Le H_2SO_4 produit attaque les groupements basiques du collagène et provoque un gonflement acide $Al(OH)_3$ forme avec le sulfate non associé des sulfates qui sont précipités par les fibres par absorption plus ou moins stable.

- **Tannage au chrome**

On utilise $Cr_2(OH)_2$ et Cr_2O_3 ou leur sel. Le procédé Dennis part de $CrCl_3.6H_2O$ obtenu en dissolvant $Cr_2(OH)_6$ dans HCl dilué et en transformant ce chlorure en chlorure basique $CrCl(OH)_2$.

1) $2CrCl_3.6H_2O + 2Na_2CO_3 + H_2O \longrightarrow 2CrCl(OH)_2 + 4NaCl + 2H_2CO_3$

$2CrCL_3.6H_2O + 2Na_2CO_3 \longrightarrow 2CrCl_2OH + 2NaCl + H_2CO_3 + 4H_2O.$

ANNEXE 2

Méthodes de détection des principes actifs

1. **Détection des alcaloïdes**

Les méthodes de détection des alcaloïdes consistent en l'extraction au moyen d'un acide minéral suivie de l'addition d'un réactif spécifique pour les alcaloïdes dans la plante. Les réactifs auxquels on fait recours sont :

- Le réactif de Mayer ou solution neutre de mercuriodure de potassium.
- Le réactif de Dragendorff ou solution iodo-bismuthite de potassium.
- Le réactif de Wagner ou solution d'iodure de potassium iodé.

Pour détecter les alcaloïdes, on fait macérer 5g de poudre dans 50 ml de HCl 5%. Après 24h, filtrer et ajouter quelques gouttes de réactif de Dragendorff, de Mayer et de Wagner.

On filtre après avoir divisé ce dernier en trois portions dans ces trois cas, il y aura :

- Formation d'un complexe insoluble (précipité rouge-orange) avec le réactif de Dragendorff.
- Formation d'un complexe avec le réactif de Wagner (précipité brun).
- Formation d'un précipité blanc-jaunâtre (produit d'addition) avec le réactif de Mayer

2. Recherche des flavonoïdes : Méthode de Willstater

On réduit la cétone en position 4 par le Magnésium en milieu acide, cette réaction étant suivie d'une déshydratation, la formation d'un sel coloré en rouge constitue un test positif.

Pour les tester, on prend 5g de la poudre sèche, on ajoute 50 ml d'eau bouillante. On laisse infuser pendant quelques minutes et on filtre. A 3 ml du filtrat, on ajoute 3 ml du mélange HCl, Méthanol, H_2O (1: 1: 1 v/v) et quelques tournures de magnésium.

La solution se colore en rouge en présence des flavonols, en orange en présence des flavones et en violet ou rose quand il s'agit des flavanones.

3. Recherche des leucoanthocyanes

L'infusé de la plante à 5% est mis en contact avec HCl 2N. On chauffe au bain-marie pendant quelques instants après ébullition. En présence des leucoanthocyanes, il apparaît une coloration rouge violacée due à la formation des anthocyanes par conversion de ces premiers en milieu acide.

4. Recherche des Anthraquinones

Pour la détection des Anthraquinones, on a souvent recours à la réaction de Bonträger. On humecte 2g de poudre avec une solution de HCl 10%. On laisse ensuite macérer pendant 24h dans 5 ml d'un mélange $CHCl_3$ et d'éther (75 :25 v/v).

On filtre et on traite 1 ml du filtrat avec 1 ml de NaOH 10%. Une coloration rouge ou violette signale la présence des quinones.

5. Recherches des saponosides

La détection des saponosides est basée sur leur pouvoir moussant. La partie de la molécule formée par les sucres est soluble dans l'eau tandis que le noyau stéroïde ou triterpénique ne l'est pas. Les parties génines ont tendance à se rassembler à la surface de la solution aqueuse tandis que la partie osidique est dissoute dans l'eau. Ceci augmente la superficie de la surface de la solution et cause l'apparition d'une mousse.

Pour détecter, on prend 10 ml de l'infusé à 5% dans un tube à essai. On agite pendant 10 sec et on mesure la hauteur de la mousse persistante après 20 minutes.

6. Recherche des terpènes et stéroïdes

Pour leur détection, on utilise la réaction de Liebermann-Burchard. Il s'agit d'une réaction d'oxydation et de déshydratation formant un chromophore important.

Un gramme de poudre sèche est mis à macérer dans 20 ml d'éther pendant 24 heures. Après filtration, quelques gouttes de la solution sont évaporées sur une plaque. Le résidu est ensuite dissout dans quelques gouttes d'anhydride acétique. L'addition de 2 ou 3 gouttes de H_2SO_4 conc. Produit en présence des terpènes-stéroïdes une coloration mauve qui tourne au verre.

ANNEXE 3 :

Les modes opératoires de préparation de quelques réactifs (IOAN,C. 1982 ; DAVID, R. et al 1992)

1. Réactif de Mayer

Dissoudre 1,358g de chlorure de Mercure (II) dans 60 ml d'eau et verser la solution obtenue dans un fiole contenant 5g de KI dans 10 ml d'eau. Porter le volume total à 100 ml avec de l'eau.

2. Réactif de Dragendorff

- Dissoudre 0,85g de $Bi(NO_3)_3$ dans 10 ml de CH_3COOH avec 40 ml de l'eau.
- Dissoudre également 8g de KI dans 20 ml d'eau.

- Mélanger ensuite les deux solutions à volume égal et conserver dans un flacon sombre.

3. Réactif de Wagner

Mélanger 2g d'I_2 avec 6g de KI dans 100 ml d'eau.

4. Réactif à la gélatine salée

Il se prépare en dissolvant un gramme de gélatine coupée en petits fragments dans 100 ml d'eau et en chauffant, on ajoute ensuite 10g de NaCl.

5. Liqueur de Fehling

- Solution A : 34,66 g de $CuSO_4.6H_2O$ + 5 ml d'eau
- Solution B : 173 g de tartrate double de K et de Na

Ajouter 50 g de NaOH dans l'eau et porter à 500 ml

Mélanger A et B à volumes égaux au moment de l'emploi.