

1992-02

Screening phytochimique et recherche des substances volatiles dans Euphorbia Hirta

Mbundagu, Vestine

UB, FS

<https://repository.ub.edu.bi/handle/123456789/2309>

Téléchargé depuis le dépôt institutionnel officiel de l'Université du Burundi

UNIVERSITE DU BURUNDI
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

***SCREENING PHYTOCHIMIQUE ET
RECHERCHE DES SUBSTANCES
VOLATILES DANS EUPHORBIA HIRTA***

par

Vestine MBUNDAGU

Sous la Direction de :

Dr. Joseph KATIHABWA
Professeur Associé

Mémoire présenté en vue de l'obtention
du grade de Licencié en Sciences
Chimiques

BUJUMBURA, Février 1992



Dédicace



A nos Parents,

A nos Frères et Soeurs,

*A Toi VYUNGIMANA Frédéric qui n'as rien ménagé pour
l'élaboration de ce travail,*

A Tous ceux qui nous sont chers,

Nous dédions ce mémoire



AVANT-PROPOS



Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué à sa réalisation.

Nous tenons à témoigner particulièrement toute notre reconnaissance à Monsieur Joseph KATIHABWA, Docteur en sciences chimiques et professeur associé à l'U.B. qui, malgré ses lourdes tâches, nous a suggéré le sujet, en a suivi tout le déroulement avec compétence, sagesse et inlassable dévouement. Ses conseils judicieux et sa compréhension nous ont été d'une grande utilité.

Nos remerciements s'adressent également à tous les professeurs du Département de chimie, les professeurs visiteurs ainsi que tous les autres enseignants qui ont contribué à notre formation intellectuelle et morale.

Que le professeur H.DE POOTER de l'université de Gant (Belgique) trouve ici nos vifs remerciements pour avoir réalisé pour nous des analyses par chromatographie en phase gazeuse.

Nous remercions également Madame BIGENAKO Marie-José, Docteur en sciences botaniques pour l'aide précieuse qu'elle nous a apportée dans la détermination botanique de la plante *Euphorbia hirta* que nous avons récolté.

Nous sommes particulièrement reconnaissants à la famille NTUKAMAZINA Marc et à Madame BATAKANWA Immaculée pour l'aide et les encouragements qu'elles nous ont apportés tout le long de nos études; nous sommes heureuses de pouvoir leur exprimer notre respectueuse gratitude.

Que les familles MPFAYOKURERA Emmanuel, MASENGO Edouard, SIBOMANA Thomas ainsi que Monsieur NIBASHIKIRE Cariton trouvent ici l'expression de notre profonde et sincère gratitude. Nous tenons à les remercier pour avoir supporté nos besoins et par conséquent pour avoir contribué à la réussite du présent mémoire.

Nous nous faisons un grand plaisir de remercier ici, Monsieur Frédéric VYU-NGIMANA, pour sa patience, ses encouragements ainsi que son aide morale et matérielle. Sans sa contribution, ce travail n'aurait pas vu le jour.

Nous ne saurions oublier le rôle joué par nos parents tout au long de nos études. Leurs conseils et leurs encouragements nous ont été particulièrement profitables. C'est avec joie que nous leur exprimons ici notre profonde reconnaissance.

A tous les amis, en particulier nos camarades de classe, Mesdemoiselles TANGIRA Génèrose, BUCUKUNDI Félicité, nous disons franchement merci pour la compagnie qu'ils n'ont cessé de nous tenir.

Enfin, à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de ce travail par leur soutien moral ou matériel, nous redisons merci.

E R R A T A.-

Page	! Ligne	! Lire	! Au lieu de
Avant-propos	17	Nous sommes particulièrement reconnaissante reconnaissants ...
1	3	succinctement	succinctement
2	20	triterpènes	triterpères
4	16	Elles sont particulièrement abondantes ...	Elles sont particulièrement abondants ...
	19	Menthes	Menhtes
5	2	gingembre	gigembre
6	7	Elles ont un indice de réfraction élevé ...	Elles ont une indice de réfraction élevée ...
10	Avant-dernière ligne	... ils sont largement utilisé en parfumerie.	... ils sont largement en parfumerie.
12	4	... des taches pourpre-rougeâtres	... des tâches pourpre-rougeâtre
	9 - 10	... caractéristiques des EUPHORBIACEES).	... caractéristiques des (EUPHORBIA).
22	8	On ajoute 2 ml de NH ₄ OH 25%	... 2 ml de NH ₄ OH 25%.
28	17	L'extraction du distillat est faite avec un solvant organique de densité plus grande que l'eau : CH ₂ Cl ₂ (densité : 1.335, point d'ébullition : 40°C) qui est ensuite évaporé	Le distillat (eau + substances volatiles) est extrait avec un solvant de densité plus grande que l'eau avec un point d'ébullition : 40°C, densité : 1.335)....
	dernière ligne	... les moyens dont nous disposons.	... les moyens que ...
29	15	... en utilisant des solvants..	... en utilisant des volvants...
33	8	... de marque Desaga- de marque Dasage ...
34	22	Une série de spots ...	Une série de sports ...

Sommaire

	<u>Pages</u>
Dédicace.....	I
Avant-propos	II
Sommaire	III
Résumé	1
<u>I. INTRODUCTION</u>	2
<u>I.1. Cadre et intérêt de l'étude</u>	2
<u>I.2. Généralités sur les huiles essentielles</u>	4
I.2.1. Définition, état naturel et répartition	4
I.2.2. Caractéristiques générales des huiles essentielles	6
I.2.3. Composition chimique des huiles essentielles	7
I.2.3.1. Les terpènes	7
I.2.3.2. Dérivés oxygénés des Terpènes	10
<u>I.3. Bref aperçu sur l'Euphorbia hirta</u>	12
I.3.1. Description botanique	12
I.3.2. Habitat et distribution botanique	12
I.3.3. Quelques usages médicaux traditionnels	15
<u>II. RESULTATS EXPERIMENTAUX</u>	18
<u>II.1. Récolte, séchage, broyage et tamisage</u>	18
<u>II.2. Screening phytochimique</u>	18
II.2.1. Analyse de l'extrait aqueux de la plante sèche	19
II.2.1.1. Analyse de l'extrait aqueux brut	19
II.2.1.2. Analyse de l'extrait aqueux hydrolysé	21
II.2.2. Analyse de l'extrait éthéré de la poudre	23
II.2.3. Analyse de l'extrait alcoolique de la poudre	23
II.2.3.1. Analyse de l'extrait alcoolique brut	24
II.2.3.2. Analyse de l'extrait alcoolique hydrolysé	25
II.2.4. Analyse de l'extrait aqueux de la poudre	25

II.3. <u>Essai d'extraction des huiles essentielles</u>	27
II.3.1. Différentes méthodes d'extraction des substances volatiles.....	27
II.3.2. Extraction par entraînement à la vapeur	28
II.3.3. Analyse des huiles essentielles	29
II.4. <u>Séparation chromatographique des constituants à partir de l'extrait</u> <u>alcoolique brut</u>	33
II.4.1. Chromatographie sur couches minces (C.C.M.)	33
II.4.2. La chromatographie sur colonne (C.C.)	35
III. <u>DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSION</u>	36
IV. <u>ANNEXES</u>	37
Annexe 1 Décomposition de l'alliine en allicine sous l'influence de l'enzyme, alliinase	37
Annex 2	
a) Les différentes formes de monoterpènes	38
b) Les sesquiterpènes	40
Annexe 3 Biosynthèse des terpènes	41
Annexe 4 Exemple de formation d'artéfacts pendant l'hydrodistillation:	
cas du sabinène	44
Annexe 5 La chromatographie en phase gazeuse	45
a) Analyse à température constante	46
b) Analyse à température programmée	46
Bibliographie	47

RESUME

Ce travail traite le screening phytochimique de l'Euphorbia hirta et la recherche de substances volatiles.

Après avoir exposé brièvement les raisons de l'étude, nous avons parlé succinctement de la description botanique de la plante, de sa distribution géographique ainsi que quelques usages médicaux traditionnels.

La partie expérimentale débute par un screening phytochimique qui a révélé la présence de beaucoup de substances : terpènes et stérols, tannins, quinones, anthocyanes, flavonosides, alcaloïdes, saponosides, composés réducteurs et acides aminés.

L'extraction par entraînement à la vapeur des substances volatiles nous a donné une substance jaune. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de cette dernière nous montre qu'il n'y a pas d'huiles essentielles.

Enfin, nous avons fait une C.C.M. de l'extrait alcoolique.

I. INTRODUCTION

I.1. CADRE ET INTERET DE L'ETUDE.

Le sujet du présent mémoire s'inscrit dans l'effort des recherches entrepris à l'Université du Burundi sur les plantes médicinales en vue de déterminer leurs principes actifs.

La plante (*Euphorbia hirta*), fut choisi en tenant compte de son importance thérapeutique accordée dans divers pays y compris le Burundi (1). Les études ethnobotaniques et phytochimiques antérieures (2), (3) sur cette plante suggère une étude plus approfondie sous les dénominations taxonomiques de *E. hirta* et *E. pilulifera*, cette espèce a fait l'objet de nombreux travaux à travers le monde surtout en Amérique tropicale et en Inde (3).

Les recherches sur les échantillons africains ont été entreprises en France à partir de 1950. Les résultats de ces travaux ont été rappelés par KERHARO ADAM (1974). (4)

Les travaux les plus nombreux concernent la mise en évidence d'une activité antidysentérique. KERHARO, en 1950, signale les expérimentations cliniques concluantes à l'hôpital de Conakry. (4)

Ces études antérieures ont fait connaître la présence d'une gomme de résine, de sucres, de substances volatiles, d'acide malique, d'acide succinique), des alcaloïdes, des sucres réducteurs, des flavonoïdes, des tannins, des saponines et de résines dans la plante fraîche. (1), (4)

De nombreux stéroïls et triterpènes ont été isolés de cette espèce (4): taraxérol, α et β -amyrine, friedéline, β -sitostérol.

Mis à part ces études antérieures, les odeurs dégagées par la poudre de cette plante a attiré l'attention de notre curiosité scientifique. C'est pourquoi nous avons pensé à essayer d'extraire les substances volatiles de la plante en question et d'en faire les analyses afin de connaître leur composition.

" Les plantes médicinales " sont l'objet d'attentions multiples de la part de chercheurs scientifiques issus des horizons les plus divers. (5)

Il n'est peut être pas inutile de rappeler qu'au travers de l'inventaire des ressources du règne végétal, on voit apparaître tout l'intérêt, tant économique que médical, que conservent la chimie des substances Naturelles et la Pharmacognosie. (7), (8)

Malgré les progrès de la pharmacologie moléculaire, il est toujours utile de rechercher inlassablement de nouvelles structures (5). Cet intérêt se traduit d'ailleurs par une recherche internationale tant de la part d'organismes publics que privés.

D'autre part, pour aboutir à des drogues modernes, en tirant parti de notre patrimoine végétal, il est nécessaire et indispensable que des recherches soient effectuées sur nos plantes afin de permettre une meilleure connaissance de leurs usages et de les exploiter convenablement.

I.2. GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES.

I.2.1. DEFINITION, ETAT NATUREL ET REPARTITION.

Les huiles essentielles, appelées communément " essences ", sont des substances odorantes contenues dans les végétaux, d'où leur nom d'huiles volatiles. (9)
p. 176

Leur volatilité les oppose aux huiles fixes qui sont des lipides. Ces huiles essentielles sont des mélanges de constituants plus ou moins nombreux, généralement *liquides*. (9), (10)

Sous le nom d'essences, on désigne aussi quelque fois des produits odorants non préformés chez le végétal, mais provenant de l'hydrolyse enzymatique d'hétérosides tels les essences d'amandes amères, les essences soufrées de crucifères. (9), (11)

Dans l'ail, l'essence dérive, non d'un hétéroside mais d'un amino-acide soufré, l'alliine, seul présent dans la plante fraîche. Celui-ci est décomposé sous l'influence d'une enzyme, l'alliinase, en sulfoxyde, l'allicine, donnant naissance au disulfure d'allyle. (10) (voir annexe 1)

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant, elles sont particulièrement abondants chez certaines familles (9): conifères, Rutacées, Ombellifères, Myrtacées, Labiées.

Tous les organes peuvent en renfermer, surtout les sommités fleuries (9) (Lavandes, Menthes, Mélisse,...) mais encore on en trouve dans les racines ou rhizomes (Vétiver, Gingembre), les écorces (cannelles), le bois (Camphrier, Sassafras), les fruits (Poivres, Badiane, fruits d'Ombellifères, de Citrus), les graines (noix de Muscade).(9)

Il faut noter que pour une même espèce, la composition des essences peut varier d'un organe à l'autre et suivant les conditions de milieu. En climat chaud, la teneur en huiles essentielles est plus élevée. (10)

D'autre part, il existe de véritables "races chimiques" (9) chez beaucoup de plantes à essence: Par exemple, il est bien connu que les essences de Persil allemand et français ont une composition différente, la première étant plus riche en apiol.(9)

IMPORTANCE DES HUILES ESSENTIELLES.

Les drogues à huiles essentielles et en particulier les épices sont connues

depuis l'Antiquité. (11), (12)

Leur trafic reste considérable. Les poivres, le gingembre, la muscade, le girofle, les cannelles sont produits annuellement par milliers de tonnes et ont une grande valeur marchande (13).

Ces épices, en dehors de la saveur qui les fait rechercher pour l'alimentation et la liquoristerie, ont, à faible dose, un effet stimulant favorable sur l'appétit et la digestion.

En outre, elles ont souvent des propriétés bactéricides, et l'usage d'aliments très épicés dans les pays chauds a un intérêt certain pour l'hygiène alimentaire de ces régions. (9), (10), (12).

L'emploi des drogues à essence en thérapeutique est en relation avec les propriétés pharmacodynamiques diverses et souvent marquées. Parmi les plantes à essences, se trouvent des antiseptiques surtout employés dans les maladies des voies respiratoires (9) (Eucalyptus), Niaouli) ou urinaires (9) (Buchu), des eupeptiques et carminatifs, des stimulants du système nerveux central pouvant être convulsivants à haute dose (Anis, Badiane), des stomachiques, (Menthe, Mélisse, Verveine), des antispasmodiques (camomille), des cholérétiques (Romarin) des vermifuges (8) (Tanaisie, Chénopode vermifuge).

Chez d'autres drogues comme la Fougère mâle, l'essence renforce l'action d'autres principes (9), (10).

Beaucoup de drogues à huiles essentielles sont emménagogues à faible dose et abortives à forte dose (9): Thuya, Absinthe, Sabine, Tanaisie. Beaucoup d'essences sont insectifuges. (10), (11)

Pour l'usage externe, on trouve des révulsifs, rubéfiants (essence de térébenthine), des antiseptiques cicatrisants (Lavande), stimulants du cuir chevelu (Romarin), ou des antiinflammatoires, devant leurs propriétés aux azulènes (Matricaire). L'essence de Girofle anesthésie et désinfecte la pulpe dentaire. (9), (11), (12)

Enfin, les industries alimentaires, la parfumerie et la cosmétologie consomment des dizaines des milliers de tonnes de plante à huiles essentielles. (9), (10), (11).

1.2.2. CARACTERISTIQUES GENERALES DES HUILES ESSENTIELLES.

Les huiles essentielles sont généralement liquides à la température ordinaire, d'odeur aromatisée, rarement colorées quand elles sont fraîches (les essences à azulènes: Camomille et surtout Matricaire sont bleues).

Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (voir tableau n° 1). Parmi les essences officinales, seules celles de Cannelle, Girofle et Sassafras sont plus denses que l'eau

Elles ont une indice de réfraction élevée, le plus souvent, sont douées de pouvoir rotatoire. (voir Tableau n°1)

Elles sont volatiles et entraînaibles par la vapeur d'eau. Très peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent leur odeur. Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, la plupart des solvants organiques, les huiles fixes.

TABLEAU N°1: QUELQUES CONSTANTES PHYSIQUES DE CERTAINES ESSENCES.

Nom de l'essence	Température d'ébullition(°c)	Densité	Indice de réfraction
Myrcène	167	0.8013	1.4706
Linalol	198 - 200	0.8700	1.4623
Géraniol	107	0.8830	1.4766
Citral (a)	229	0.8898	1.4895
Citral (b)	120	0.8880	1.4900
Citronellal	207.8	0.8573	1.4467
citronellol	244.4	0.8590	1.4572
- Ionore	140	0.9445	1.5210
Carvone	231	0.9608	1.4999

1.2.3. COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES.

Les huiles essentielles sont des mélanges (9) dont les principaux constituants sont: des terpènes aliphatiques mono- et bicycliques et parfois des sesquiterpènes; leurs dérivés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones).

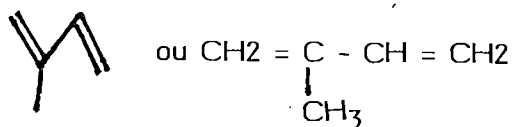
On rencontre aussi des huiles essentielles des composés acycliques: acides organiques à faible poids moléculaire (formique, acétique valérique), alcools, aldéhydes, cétones (methyl-nonylcétone); et surtout des dérivés aromatiques: aldéhydes (cumique, cinnamique), phénols et leurs éthers (thymol, eugénol, anéthole).

On trouve enfin des coumarines (ombelliférone).

On classe généralement les essences suivant leurs constituants principaux (12). Ceux-ci peuvent être des terpènes (limonène), des alcools (géraniol), des aldéhydes (citral), des cétones (carvone, thymol).

1.2.3.1. LES TERPENES.

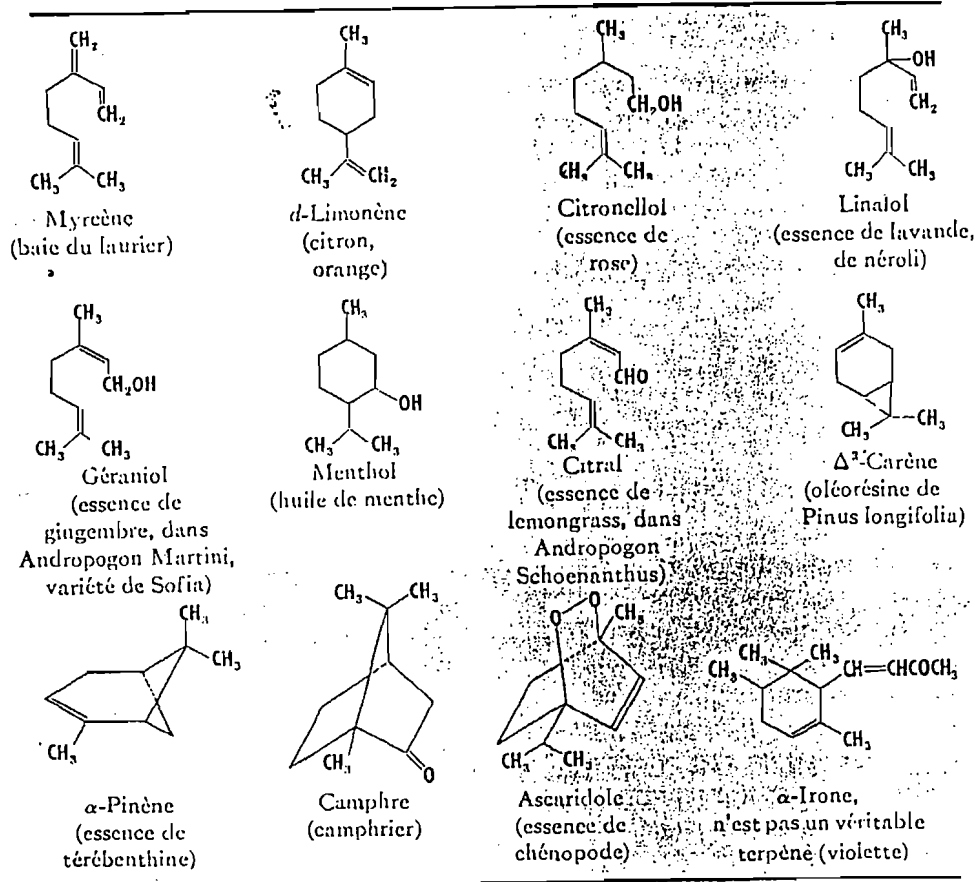
Le nom de terpène a été initialement réservé aux hydrocarbures d'origine végétale (12), (14) dont la formule brute, $C_{10}H_{16}$, et le squelette carboné indiquait qu'ils pouvaient être considérés comme des dimères de l'isoprène C_5H_8 :



Certains de ces hydrocarbures étaient extraits de l'essence de térébenthine, d'où le nom de terpène.

L'appellation s'est ensuite étendue aux dérivés obtenus par hydratation, réduction, oxydation ou même dégradation.

TABLEAU N°2: EXEMPLES REPRESENTATIFS DE TERPENES NATURELS.



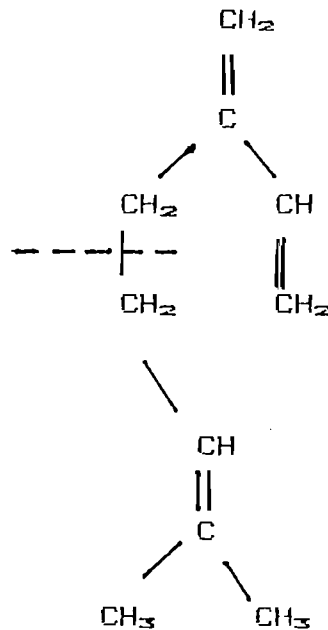
CLASSIFICATION DES TERPENES.

Selon le nombre d'unité d'isoprènes (C_5H_8) que contient leur squelette, les terpènes sont classés en différentes catégories :

- Les monoterpènes (deux maillons isopréniques) : $C_{10}H_{16}$. Ils ont en général un squelette en C_{10} qui peut être linéaire, acyclique, monocyclique (voir Annexe 2).

Exemple :

Le myrcène ($C_{10}H_{16}$) que l'on trouve dans les essences de laurier et de verveine et dont le squelette est aisément divisible en unités isoprènes (14).



Dans tous les cas, le squelette correspond à l'enchaînement tête à queue des deux maillons isopréniques.

- Les sesquiterpènes : $C_{15}H_{24}$ (formule brute).

Ils contiennent trois maillons isopréniques, enchaînés tête à queue. Leur squelette en C_{15} se présente sous plusieurs formes (voir Annexe 2).

- Les diterpènes à formule brute ($C_{20}H_{32}$).

Ils contiennent quatre maillons isopréniques enchaînés tête à queue. Leur squelette peut être linéaire ou cyclique. Les produits de dimérisation tête à tête des diterpènes sont les tétraterpènes.

- Les triterpènes à formule brute : $C_{30}H_{40}$ résultent de l'enchaînement tête à tête de deux chaînes diterpéniques. Leur squelette peut être linéaire ou cyclique.

- Les tétraterpènes résultent de l'enchaînement tête à tête de deux chaînes diterpéniques.

LA BIOSYNTHESE DES TERPENES.

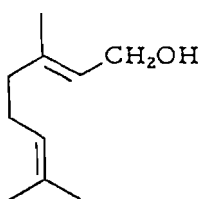
Bien que les terpènes se présentent structuralement comme des polymères de l'isoprène (C_5H_8), celui-ci n'est cependant pas leur véritable précurseur dans la synthèse qu'en effectue la nature. L'isoprène donne par polymérisation de Ziggler le caoutchouc. Le précurseur du caoutchouc naturel est le pyrophosphate d'isopentényle (PPI), lui-même produit de 3 unités d'acétyl CoA (voir Annexe 3).

1.2.3.2. DERIVES OXYGENES DES TERPENES.

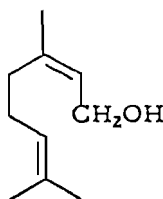
Au sens strict, les terpènes sont des hydrocarbures, mais de nombreux dérivés fonctionnels de structure apparentée (alcools, aldéhydes, cétones, acides, ...) sont également considérés comme des composés terpéniques.

Bon nombre de dérivés oxygénés des monoterpènes et des sesquiterpènes ont une odeur intense, et, sous la forme d'huiles essentielles, ont une importance économique comme matières premières dans la parfumerie (12) (14), ou comme additif dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie pharmaceutique.

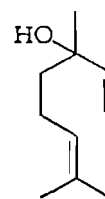
Exemple :



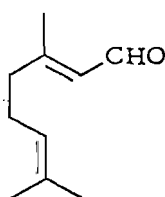
géraniol



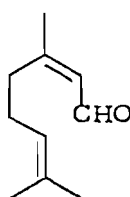
nérol



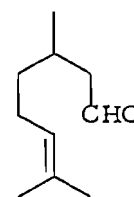
linalol



géraniol
(citral b)



néral
(citral a)



citronellal

On trouve ces alcools dans les essences de rose et de certaines autres fleurs. Ils possèdent des odeurs de géranium ou de rose et ils sont largement en parfumerie. Les aldéhydes, dont l'odeur plus forte rappelle surtout celle du citron, sont les

constituants, majeurs ou mineurs, d'un grand nombre d'huiles essentielles : citronnelle, citron, etc. (14)

Les mono et les sesquiterpènes (oxygénés ou pas) sont volatils, et comme noté plus haut, ont une odeur. Ce sont les substances qui sont responsables pour l'odeur (le parfum) des fleurs, des épices, des herbes (à quelques exceptions près), et qui sont extraites en vue de leur application.

1.3. BREF APERCU SUR L'EUPHORBIA HIRTA.

1.3.1. DESCRIPTION BOTANIQUE.

L'Euphorbia Hirta est une plante herbacée, à latex blanc abondant, érigée ou prostrée, et pouvant atteindre 40 cm de haut, pubescente. Les tiges (voir figure n° 1), en particulier les parties jeunes, portent de poils raides jaunâtres et sur les parties vieilles se trouvent des tâches pourpre-rougeâtres. Les feuilles opposées et dissymétriques à la base sont arrondies (voir figure n° 2) d'un côté et cunées de l'autre. Elles sont aigües au sommet et atteignent 5 cm de long et 2 cm de large. Elles ont un vert foncé et velues sur les deux faces, avec des bords finement dentés. Les inflorescences sont des glomérules compacts auxiliaires et terminaux, avec de petites fleurs jaunâtres (le cyathium caractéristique des (EUPHORBIA). Les fruits sont de très petites capsules jaunes trilobulaires et poilues, chaque loge contenant une seule graine.

1.3.2. HABITAT ET DISTRIBUTION BOTANIQUE.

L'EUPHORBIA HIRTA appelé en Kirundi AKAZIBANDA ou AKAZIRARUGUMA est une plante rudérale. Elle pousse dans les lieux divers, en particulier le long des routes, sur les terrains vagues et dans les anciennes cultures. Elle est pantropicale. Elle se retrouve dans bon nombre de pays : Côte d'Ivoire, Bénin, Burkina Faso, Comores, Congo, Zaïre, Dominique, Mali, Maurice, Nigéria, Sénégal, Seychelles, Tanzanie et Togo (4).

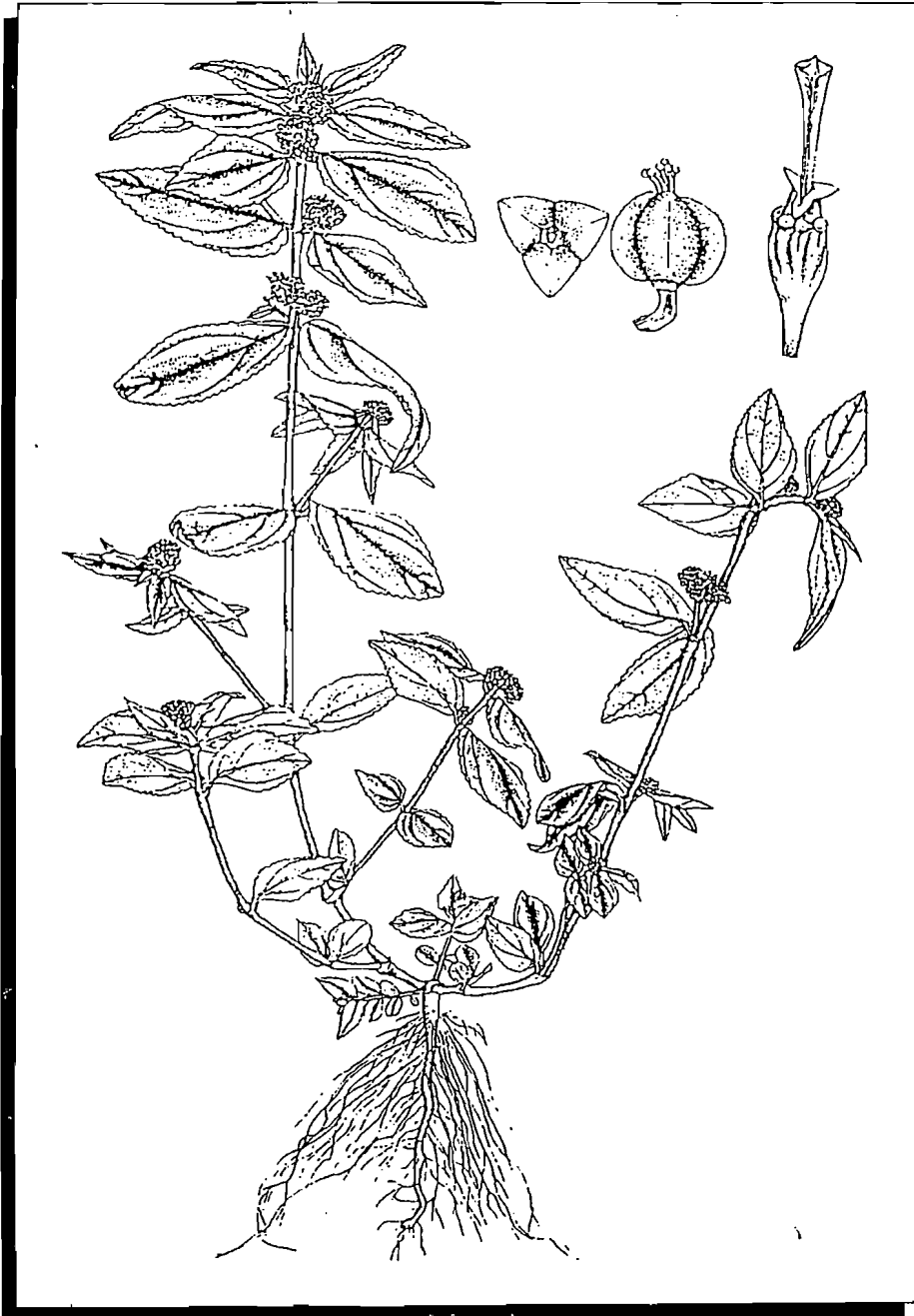


Figure n° 1 : Euphorbia hirta (4)

(plante fraîche)

Figure n° 2 : *Euphorbia hirta*.



1.3.3. QUELQUES USAGES MEDICAUX TRADITIONNELS.

L'Euphorbia Hirta est utilisée pour traiter un certain nombre de maladies dont le résumé est donné dans le tableau ci-dessous :

Maladies traitées	Partie utilisée	Préparation	Mode d'emploi et posologie	Source
Diarrhée	Plante entière fraîche	Décoction d'une poignée de plantes entières fraîches dans 1l d'eau environ.	Boire 150 cc (1verre) de décocté par jour (adulte)	Comores, Congo, Mali, Sénégal, (17).
Dysenterie	Plante entière fraîche	Décoction aqueuse de 10g environ de plantes entières fraîches dans un demi-litre d'eau.	Boire le décocté au 1/5 ^{ème} , 3 fois par jour, jusqu'à disparition des signes cliniques	Côte d'Ivoire(1), Sénégal.
		Faire bouillir dans un récipient couvert, un sachet unidose de 10g environ dans un demi-litre d'eau.	Boire le décocté, 3fois par jour, jusqu'à disparition des signes cliniques.	Connu au Centre National de Médecine Traditionnelle du Mali sous le nom de "Dysenteral n°1".
Parasitoses intestinales	Tiges feuillées fraîches	-	Mâcher la partie aérienne de la plante fraîche avec de la noix de palme. Avaler le suc	Centrafrique
Ulcères gastriques	Plante entière fraîche ou sèche	Faire bouillir 3 ou 4 bottes de plantes fraîches ou sèches dans 2l d'eau.	Boire environ 150cc de décocté: matin, midi et soir. Durée de traitement: 3 semaines.	Bénin

Tableau n°3 (suite).

Maladies traitées	Partie utilisée	Préparation	Mode d'emploi et posologie	source
Blennorragie	Plante entière fraîche.	Décoction aqueuse de la plante entière fraîche.	Boire le décocté à volonté.	Sénégal
Urétrite	Plante entière fraîche	Décoction aqueuse de la plante entière fraîche (1 poignée de plantes pour 1 litre d'eau)	Boire le décocté à volonté.	Comores
Diarrhée du nourrisson	Plante entière fraîche	Triturer une poignée de plantes entières fraîches dans un demi-litre d'eau. Laisser macérer jusqu'à ce que le lait prenne une teinte verte (3 heures environ)	Donner au nourrisson une cuillerée à café, 3 fois par jour.	Sénégal
	Plante entière fraîche ou sèche	Décoction aqueuse de la plante entière fraîche ou sèche	le décocté est utilisé en lavement de l'enfant 1 fois les deux jours	Information donnée par les guérisseurs de Jabe.
Céphalées	plante entière sèche.	Calciner une plante entière sèche. Réduire les cendres en poudre fine.	Scarifier la région bregmatique en 7 points et y appliquer la poudre	Bénin
Effet antiseptique	-	-	le latex en usage externe, est indiqué comme antiseptique.	Sénégal, informations données par les guérisseurs de Jabe.

Suite du Tableau n° 3

Maladies traitées	Partie utilisée	Préparation	Mode d'emploi et posologie	Source
Retard à la marche de l'enfant	Feuille fraîche	Triturer les feuilles de la plante dans la paume de la main. Delayer la pulpe obtenue dans un demi-litre d'eau.	La solution est employée en lavement, 1 fois par jour.	Côte d'Ivoire

Cette plante est utilisée aussi par les femmes dans la gynécologie et dans l'obstétrique (1).

II. RESULTATS EXPERIMENTAUX

II.1. RECOLTE, SECHAGE, BROYAGE ET TAMISAGE.

La récolte de la plante étudiée, Euphorbia Hirta, a eu lieu le 8 Novembre 1990 et le 12 Avril 1991 à côté de la Faculté des Sciences, au Campus Mutanga de l'Université du Burundi.

Le séchage a eu lieu dans le séchoir Serre Combiné du CRUEA, à la Faculté des Sciences de l'Université du Burundi. Etant suffisamment secs, les échantillons ont été broyés dans un mortier en bois (bien lavé et sec) à l'aide d'un pilon de même nature.

La poudre obtenue après tamisage a servi aux analyses du screening phytochimique et à l'extraction.

Toutefois, pour l'extraction des huiles essentielles, les échantillons ont été séchés dans l'étuve à 40°C.

II. 2. SCREENING PHYTOCHIMIQUE.

Le screening phytochimique consiste en une analyse chimique qualitative (6) (15), à l'aide des tests standardisés, dont les plus importantes sont :

- les alcaloïdes,
- les flavonoïdes,
- les leucoanthocyanes,
- les quinones et hétérosides anthracéniques,
- les saponosides,
- les stérols et les terpènes,
- les tannins.

A ces classes précitées, peuvent s'ajouter le groupe des substances volatiles appelées également Huiles essentielles ou essences.

Les screening a porté sur quatre extraits : l'extrait aqueux de la plante fraîche, l'extrait éthéré, l'extrait alcoolique de la poudre et l'extrait aqueux de la poudre.

II. 2.1. ANALYSE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE LA PLANTE FRAICHE.

Après la décoction de la plante entière fraîche dans de l'eau distillée, la décocté est séparé du résidu par filtration et est concentré.

Etant donné que la détection des substances glycosidiques suppose une hydrolyse préalable, l'analyse des différents principes actifs se fait en deux étapes :

- l'extrait aqueux brut pour les substances non glycosidiques,
- l'extrait aqueux hydrolysé pour les substances glycosidiques.

II. 2.1.1. ANALYSE DE L'EXTRAIT AQUEUX BRUT.

Dans cette extrait, on peut identifier :

- les saponosides,
- les tannins,
- les sels d'alcaloïdes,
- les composés réducteurs,
- les glucides (ose et polyoses).

a. IDENTIFICATION DES SAPONOSIDES.

Leur détection est basée sur leur pouvoir moussant. La partie de la molécule formée par les sucres est soluble dans l'eau, alors que le noyau stéroïdique ou triterpénique ne l'est pas. C'est ce facteur qui est à l'origine de la formation de la mousse. (18)

MODE OPERATOIRE.

2 ml de la solution diluée à l'eau (1:1) sont introduits dans un tube à essais sec de 1.6 cm de diamètre. On agite pendant 15 minutes et on repose le tube durant 15 minutes. On mesure alors la hauteur de la mousse persistante.

(19)

b. DETECTION DES TANNINS.

Deux réactifs sont souvent utilisés:

- le trichlorure de fer FeCl_3 (1%)
- la gélatine salée.

Le FeCl_3 réagit sur les tannins en donnant un précipité coloré en bleu-noir (tannins galliques) ou en brun-vert (tannins catéchiques).

Le test à la gélatine salée forme un précipité blanc. Les protéines qui composent la gélatine salée forment un complexe avec les tannins.

MODE OPERATOIRE.

1 ml de l'extrait aqueux est dilué avec de l'eau (1-2 ml) et on ajoute 2 ou 3 gouttes de FeCl_3 (1%). En cas de présence de tannins, on observe un précipité coloré en brun-vert ou en bleu-noir.

c. DETECTION DES SELS D'ALCALOIDES

Pour détecter les alcaloïdes, on emploie trois réactifs classiques: les réactifs de Mayer, de Dragendorff et de Wagner. Tous ces réactifs se basent sur le caractère basique de l'azote hétérocyclique de l'alcaloïde qui doit avoir un poids moléculaire assez important pour former un sel, un complexe ou un composé d'addition insoluble avec le réactif.

MODE OPERATOIRE.

15 ml de l'extrait aqueux sont alcalinisés avec une solution aqueuse de NH_3 à 10% jusqu'au $\text{PH} = 8 - 9$.

La solution obtenue est ensuite extraite avec un solvant apolaire (éther, chloroforme...). La solution étherée ou chloroformique est évaporée à sec dans une capsule.

Le résidu est dissout dans une solution aqueuse de HCl à 2% (à peu près 1.5 ml de HCl).

La solution acide dans laquelle les alcaloïdes se trouvent sous forme de sels est divisée en trois portions dans les 3 tubes à essais: une portion sert de référence, aux deux autres, on ajoute 2 à 3 gouttes du réactif de Mayer ou de Wagner. On observe un précipité opalescent ou blanc-jaunâtre avec le réactif de Mayer...(19)

d. IDENTIFICATION DES COMPOSES REDUCTEURS.

1 ml de l'extrait aqueux est dilué avec de l'eau (1 ml). On ajoute 0.5 - 1 ml du réactif de Fehling et on chauffe. La formation d'un précipité rouge-brique constitue un test positif. (19) , (20)

II.2.1.2.ANALYSE DE L'EXTRAIT AQUEUX HYDROLYSE.

L'hydrolyse a pour but de libérer les substances glycosidiques des sucres auxquels ils sont liés, quitte à les identifier après par les réactions ordinaires caractéristiques des substances aglycones.

A. PREPARATION DE L'EXTRAIT AQUEUX HYDROLYSE.

A 25 ml de l'extrait aqueux, on ajoute 15 ml de Hcl 10%; puis on chauffe à reflux durant 30 minutes.

Pendant l'hydrolyse, la solution devient opalescente suite à la précipitation des aglycones.

Après avoir refroidi, la solution est extraite 3 fois avec 10-12 ml d'éther diéthylique dans une ampoule à décanter. Les extraits étherés sont rassemblés (30 - 36 ml) et déshydratés avec le sulfate de sodium (Na_2SO_4) anhydre.

B. ANALYSE DE L'EXTRAIT ETHERE.

Dans cet extrait, on peut identifier les anthracénosides, les flavonosides, les stéroïdes glycosidiques et les triterpènes.

a. LES QUINONES.

On utilise la réaction de Bornträger qui consiste à mettre en contact le produit avec une base forte. Une coloration rouge, rose ou violacée indique la présence des quinones. Cette coloration est généralement attribuée à la formation en milieu basique d'un anion phénolate, toujours coloré en rouge.

MODE OPERATOIRE.

L'extrait étheré de 4 ml est concentré à 2 ml. On ajoute 2 ml de NH_4OH 25% et on agite. Une coloration rouge, rose violacée de la solution alcaline indique la présence des quinones.

b. DETECTION DES FLAVONOSIDES.

L'identification des flavonoïdes est basée sur la réaction de Willstätter qui est une réduction du groupement acétonique par le Mg, en milieu acide, suivi d'une déshydratation.

Le test est positif quand il apparaît une coloration rouge pour les flavonols, orange pour les flavones ou rose pour les flavonones.

MODE OPERATOIRE.

L'extrait étheré (5 ml) est évaporé à sec. Le résidu est dissous dans 2 ml de méthanol 50% en chauffant.

On ajoute quelques tournures de magnésium et 5 à 6 gouttes d'acide chlorhydrique concentré. La solution devient rouge pour les flavonols, orange pour les flavonones.

c. LES STEROLS ET LES TRITERPENES.

On utilise souvent la réaction de Liebermann-Burchard.

C'est une suite de réactions d'oxydation et de déshydratation faisant apparaître dans le molécule de stéroïde ou de terpénoïde un groupe chromophore important en milieu acide fort (H_2SO_4 concentré) et en présence d'anhydride acétique et de CHCl_3 .

MODE OPERATOIRE.

L'extrait étheré (10 ml) est évaporé à sec. Le résidu est dissout successivement dans l'anhydride acétique (0.5 ml) et du chloroforme (0.5 ml). Le mélange obtenu est transféré dans un tube à essais sec et à l'aide d'une pipette, on ajoute de l'acide sulfurique concentré (1 - 2 ml) en présence de stérols et des triterpènes, on observe successivement différentes colorations: rouge-violette ou rose, puis la coloration bleue qui passe définitivement au vert.

C. ANALYSE DE LA SOLUTION AQUEUSE ACIDE.

Dans cette solution, on identifie les anthocyanines. Si la solution acide est rouge et ne change ni au violet à un pH neutre, ni au vert ou au bleu à un pH basique, les anthocyanines sont présentes dans la solution.

II.2.2. ANALYSE DE L'EXTRAIT ETHERE DE LA POUDRE.

La drogue (sous forme de poudre) est extraite avec de l'éther. L'extrait étheré contient les constituants lipophiles qu'on pourra alors les identifier.

Les principaux composés sont:

- les stérols et terpènes
- les caroténoïdes
- les sels alcaloïdiques
- les flavones aglycones
- les quinones
- les huiles volatiles

L'identification de ces substances se fait comme c'est décrit pour l'analyse de l'extrait aqueux.

II.2.3. ANALYSE DE L'EXTRAIT ALCOOLIQUE DE LA POUDRE.

Après extraction avec de l'éther, le résidu est séché, puis est extrait 3 fois avec du méthanol. Les trois extraits sont combinés et concentrés.

Dans cet extrait, la détection des principes actifs se fait en deux étapes:

- dans l'extrait alcoolique brut
- dans l'extrait alcoolique hydrolysé

II.2.3.1. ANALYSE DE L'EXTRAIT ALCOOLIQUE BRUT.

Cet extrait peut servir à l'identification des principes actifs suivants:

- les tannins
- les sels alcaloïdiques
- les alcaloïdes quaternaires, N-oxides

a. IDENTIFICATION DES TANNINS.

Elle se fait à l'aide de FeCl_3 (1%) ou de la gélatine salée.

b. IDENTIFICATION DES SELS ALCALOÏDIQUES.

L'extrait alcoolique (20 ml) est transféré dans une capsule et est évaporé dans un bain-marie (en ébullition). Le résidu contient les alcaloïdes sous forme de sels de quelques acides organiques. Il est dissous dans l'acide chlorhydrique (HCl) 10% (5-10 ml). Les alcaloïdes deviennent alors des sels de l'acide minéral. La solution aqueuse est alcalinisée à l'aide de NH_4OH 10% jusqu'au pH= 8-9. les alcaloïdes sont extraits avec un solvant apolaire (éther, chloroforme,...). La solution étherique ou chloroformique est évaporée à sec dans une capsule. Le résidu est dissous dans HCl 2% (1.5 ml). La solution acide est alors utilisée pour les tests avec les réactifs appropriés aux alcaloïdes.

c. LES ALCALOÏDES QUATERNAIRES ET N-OXIDES.

A 15 ml de l'extrait aqueux (concentré), on ajoute 8 ml de HCl et on agite (avec une baguette en verre) en chauffant.

Après refroidissement, on ajoute 0.5 g de NaCl et on agite. On filtre, le papier filtre est lavé avec 3 ml de HCl 10%. 1 ml de l'extrait aqueux acide est utilisé pour l'identification avec des réactifs de Mayer, de Wagner ou de Dagendorff. La formation de précipité indique la présence probable des alcaloïdes.

CONFIRMATION DE LA PRESENCE DES ALCALOIDES

L'extrait acide est alcalinisé avec NH_4OH 10% jusqu'au pH=8-9. On fait ensuite une extraction au chloroforme ou éther. Après la séparation des phases alcaline et chloroformique (ou éthérée), on procède à l'évaporation à sec du chloroforme. le résidu est dissous dans une solution aqueuse de HCl 10%. On fait les tests avec les réactifs précédents.

IDENTIFICATION DES ALCALOIDES QUATERNAIRES ET DES N-OXIDES.

La solution alcaline est acidifiée avec du HCl 10% jusqu'au pH=3, ensuite on filtre. Les tests sont effectués avec les réactifs cités précédemment.

II.3.2. ANALYSE DE L'EXTRAIT ALCOOLIQUE HYDROLYSE.

L'hydrolyse de l'extrait alcoolique suit le même procédé que pour l'extrait aqueux. On obtient une phase éthérée et une phase aqueuse acide.

L'extrait éthéré obtenu après hydrolyse sert à identifier les quinones, flavonoides, stéroïdes et terpènes tandis que la solution aqueuse acide sert à l'identification des anthocyanes.

II.2.4. ANALYSE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE LA POUDRE.

La poudre extraite avec de l'éther, puis avec le méthanol, est enfin extraite avec de l'eau. L'extrait aqueux est ensuite concentré.

L'identification des principes actifs se fait de la même façon que pour l'extrait aqueux de la plante fraîche.

Le tableau suivant résume l'ensemble des résultats obtenus.

Tableau n° 4. Résultats de screening phytochimique.

SUBSTANCES A DETECTER	TEST STANDARDISE UTILISE	RESULTAT DU TEST			
		Extrait aqueux de la plante fraîche	Extrait étheré de la poudre	Extrait alcoolique	Extrait aqueux (de la poudre)
Alcaloïdes	Mayer	(+)	-	(+)	(+)
Anthocyanes	Variation de couleur de la solution en fonction du pH	++	-	+	+
Flavonosides	Willstätter	(+)	-	-	(+)
Quinones	Bornträger	+	-	(+)	(+)
Stérols et Terpènes	Liebermann-Burchard	++	++	+	-
Saponosides	Pouvoir moussant	(+) h=0.1-0.2 Cm	-	-	(+)
Tannins	Gélatine salée	++	-	++	++
	FeCl ₃ (1%)	++	-	++	++
Composés réducteurs	Fehling	++	-	++	+
Acides aminés	Réaction avec la ninhydrine	-	+	-	-

BAREME UTILISE:

(+) : Coloration faible ou très peu de précipité ou solution trouble.

+: Coloration franche, précipité faible.

++: Coloration intense, précipité abondant.

- : Test négatif

II.3. ESSAI D'EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES.

II.3.1. DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION DES SUBSTANCES VOLATILES.

L'extraction des huiles essentielles peut se faire par diverses méthodes: distillation, expression, solvants volatils et enfleurage.

1^o) LA DISTILLATION.

Dans la distillation on distingue:

- a) la distillation directe ou entraînement à la vapeur d'eau.
- b) la distillation indirecte = hydrodistillation = distillation à l'eau.

Les plantes sont placées dans un alambic. On fait passer à travers les végétaux un courant de vapeur d'eau ou bien on fait bouillir directement l'eau dans laquelle ont été mises les plantes entières ou broyées lorsqu'il s'agit d'organes durs (écorces, racines).

Les composés volatils ne se dissolvent que partiellement dans l'eau et peuvent être séparés par décantation du distillat après refroidissement.

On se sert le plus souvent pour recueillir les essences d'un récipient florentin à tubulure latérale: les essences moins denses que l'eau sont séparées à la partie supérieure, les autres à la partie inférieure.

Au cours de l'opération, l'eau saturée d'essences est "cohobée" c'est-à-dire renvoyée dans l'alambic.

On peut saturer le distillat avec un sel neutre et l'épuiser par un solvant très volatil (éther, pentane), qui est ensuite évaporé sous-vide.

Cette méthode est très générale; cependant, elle ne peut être utilisée que lorsque les constituants de l'essence sont altérables par la chaleur.

D'autre part, l'extraction par hydrodistillation présente des difficultés: formation d'artéfacts. (voir annexe 4).

2^o) EXTRACTION PAR EXPRESSION.

Pour certaines essences comme celles des fruits de citrus (orange, citron), on a avantage à opérer par "expression" à froid du zente frais. Celle-ci peut se faire à la main (procédés à la cuillère, à l'écuëlle), ou après sacrifices mécaniques.

3° EXTRACTION DIRECTE DES PLANTES PAR DES SOLVANTS VOLATILS SUIVIE D'UNE DISTILLATION.

Cette méthode est très utilisée en parfumerie où l'on prépare des "concrètes" et des essences dites "absolues" (solubles dans l'alcool à froid).

4° L'ENFLEURAGE.

Pour les organes fragiles, on peut pratiquer l'enfleurage, c'est-à-dire le contact avec un corps gras (axonge) qui se sature d'essence. Le corps gras est épuisé par l'alcool absolu qui est ensuite évaporé sous vide.

Les essences extraites d'une même plante par ces différentes méthodes n'ont pas exactement la même composition. Les pharmacopées n'admettent que les premiers procédés. Les essences ainsi obtenues sont purifiées par distillation fractionnée, ce qui permet de se débarrasser des constituants malodorants (amines, furfural) ou irritants (aldéhydes: essence de Niaouli).

II.3.2. EXTRACTION PAR ENTRAINEMENT A LA VAPEUR.

250 g de la plante fraîche sont soumis à l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau.

Le distillat (eau + substances volatiles) est extrait avec un solvant de densité plus grande que l'eau avec un point d'ébullition: 40°C, densité = 1.335) qui est ensuite évaporé sous vide.

Les mêmes opérations ont été effectuées sur 250 g de la plante sèche (poudre). Nous avons obtenu 12 ml pour la plante fraîche et 7 ml pour la poudre.

Le tableau n°5 donne quelques caractéristiques des substances volatiles obtenues à partir de la plante fraîche.

Tableau n°5:

Couleur	Densité	Indice de réfraction(n)	Température d'ébullition
Jaune	1.3864	1.432	?

Le produit étant volatil, il nous a été difficile de déterminer sa t° d'ébullition par les moyens que nous disposons.

II.3.3. ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES.

Etant donné que les huiles essentielles sont composées de substances volatiles, elles sont analysées par chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.) sur des colonnes à haute résolution p.e. des colonnes capillaires (diamètre intérieur 0,5 - 0,2 mm; longueur 25-50m) FSOT ("fused silica open tubular" = colonnes tubulaires ouvertes, en silice mis en fusion).

Si la composition de l'huile n'est pas très compliquée, on essaie d'obtenir les S.M. des composants et de déterminer les structures par comparaison des S.M avec des S.M de référence. En même temps, on détermine les indices de Kovats qui sont presque des constantes physiques des substances volatiles.

Au cas où les substances ne sont complètement séparées, ou pas suffisamment séparées pour donner des S.M. des substances pures, il est indiqué de soumettre l'huile à une séparation alternative en employant une autre technique. Ainsi par exemple, on soumet l'huile à une chromatographie sur colonne de gel de silice, de Florisil (sel de magnésium du gel de silice) d'alumina (oxyde d'aluminium) en utilisant des solvants de polarité différente:

Avec l'hexane, on obtient la fraction apolaire (hydrocarbures) tandis que l'éther donne des substances de polarité moyenne (esters, certaines cétones, éthers). L'acétone donne des cétones et alcools.

Ces fractions sont ensuite concentrées, et analysées séparément.

Si on a une substance inconnue dans une concentration intéressante (25 à 50 mg), on essaie d'abord d'isoler le produit par chromatographie sur colonne ou sur couche mince. Si ces techniques ne donnent pas de bon résultat, on peut essayer de purifier la substance à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse préparative. (10)

• ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES FRACTIONS
VOLATILES OBTENUES •

Les analyses ont été effectuées dans le laboratoire de chimie organique de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gand (Belgique). Elles ont été menées sur un chromatographe HP 5980 muni d'une colonne capillaire en quartz de 30 m de long et 0,32 mm de diamètre avec comme phase stationnaire le poly-diméthylsiloxane 5 % (épaisseur de la couche : $0,2 \times 10^{-6}$ m) et d'un détecteur sélectif de masse HP 5970 A.

Le débit du gaz vecteur (He) était de 1 ml/min. et l'énergie de la source était de 70 eV.

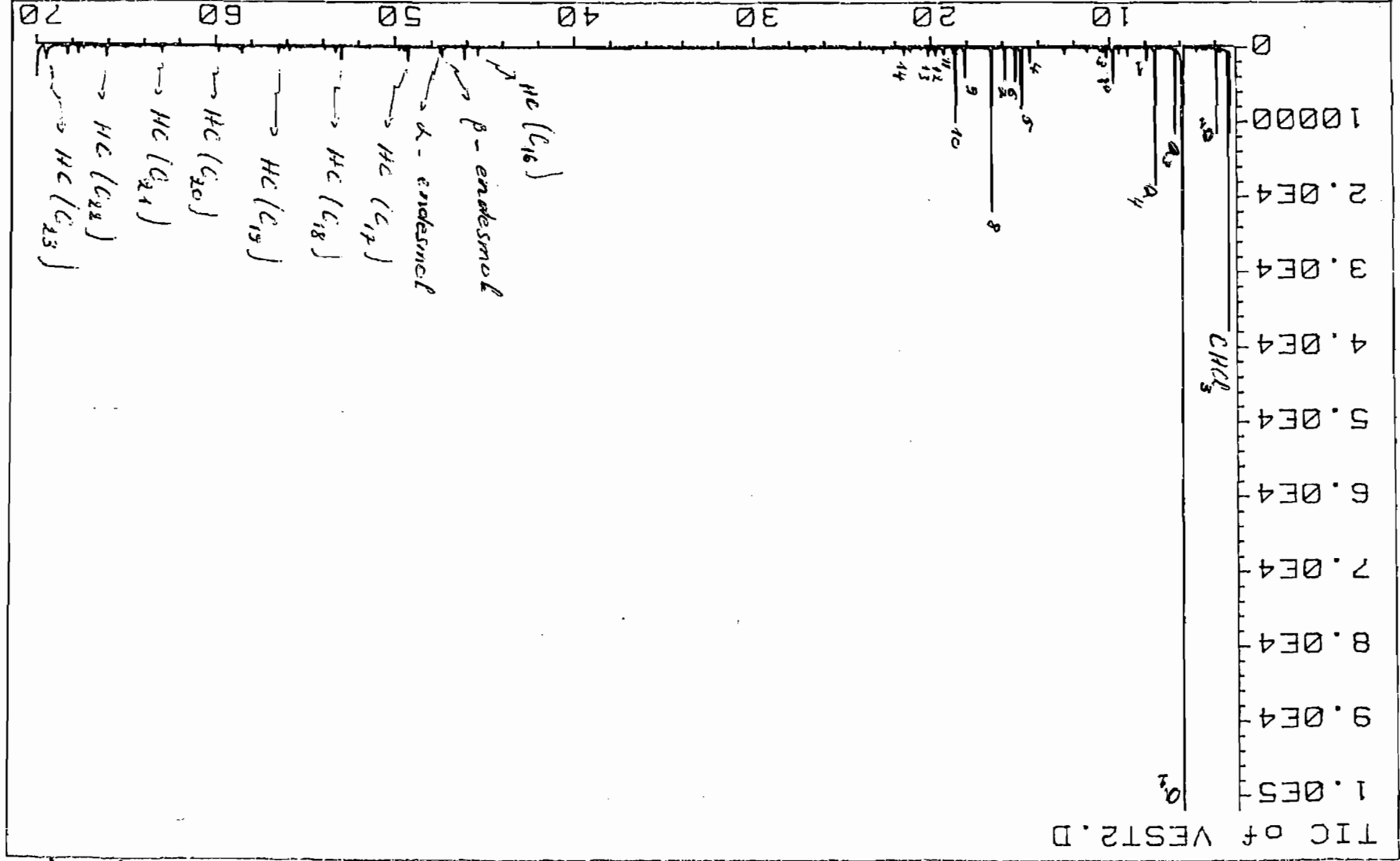
Le chromatogramme du produit de la plante fraîche (figure n° 3) relève les traces de nombreux hydrocarbures, des dérivés du benzène, le p et m xylène. Il n'y a presque pas d'huiles essentielles. Le 1,8 - cinéole, le p - cimène et α et β - endesmol sont identifiés mais leurs concentrations sont faibles.

La figure n° 4 reprend le chromatogramme de la fraction volatile de la plante sèche.


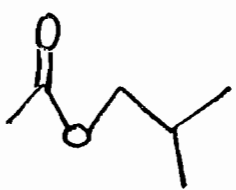
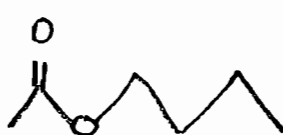

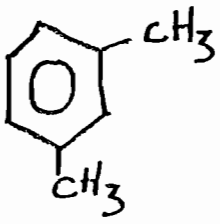
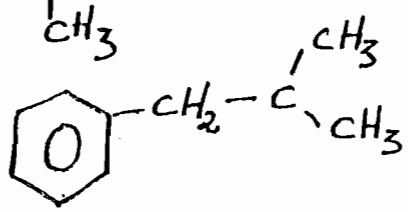
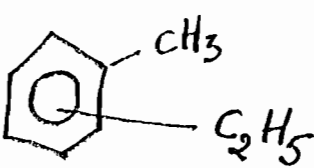
Dans cette fraction, il ne reste que très peu de substances. Nous avons pu identifier aussi le 1,8 - cinéole, et endesmol avec de faibles concentrations.

Compte tenu des analyses, l'Euphorbia hirta ne semble pas contenir d'huiles essentielles, mais faut-il peut être améliorer les conditions expérimentales.

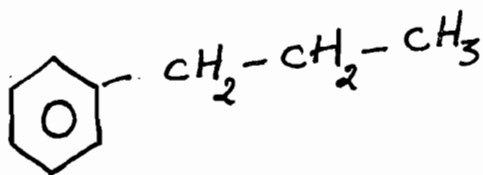
Figure n° 3 : Chromatogramme de la fraction volatile de *Euphorbia hirta* (plante fraîche)



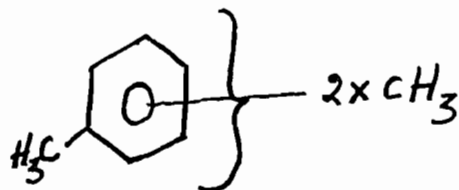
**b. COMPOSITION DE LA FRACTION VOLATILE DE
L'EUPHORBIA HIRTA (PLANTE FRAICHE)**

<u>PIC</u>	<u>COMPOSE</u>	<u>FORMULE</u>	<u>REMARQUES</u>
a ₁	Trichloroéthylène.	$Cl_2C = CHCl$	Contaminant du solvant
a ₂	Toluène		Contaminant du solvant
a ₃	Acétate d'isobutyle		
a ₄	Tétrachloroéthylène	$Cl_2C = CCl_2$	
1.	Acétate de butyle		
2.	p. Xylène		
3.	m. Xylène		
4.	Isopropylbenzène		
5. } 6. } 9. }	Ethyle-méthyle- benzène		La position du groupe - C ₂ H ₅ est indétermi- née.

7. Propylebenzène



8. } Trimethyle-
11. } benzène
12. }

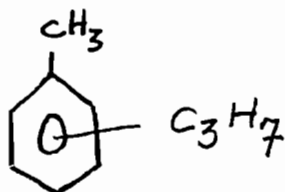


La position des deux groupes - CH₃ est indéterminée.

13. p. cymène

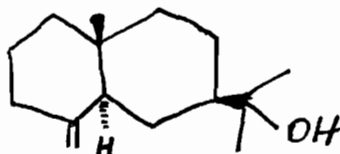


14. Méthylepropyle-
benzène

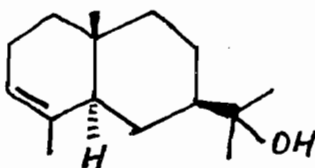


La position du groupe - C₃H₇ est indéterminée.

15. β- endesmol



16. α- endesmol



10. 1,8 - cineole



HC Hydrocarbure
(C₁₆, C₁₇, ...)

Le nombre de carbones a été déterminé.

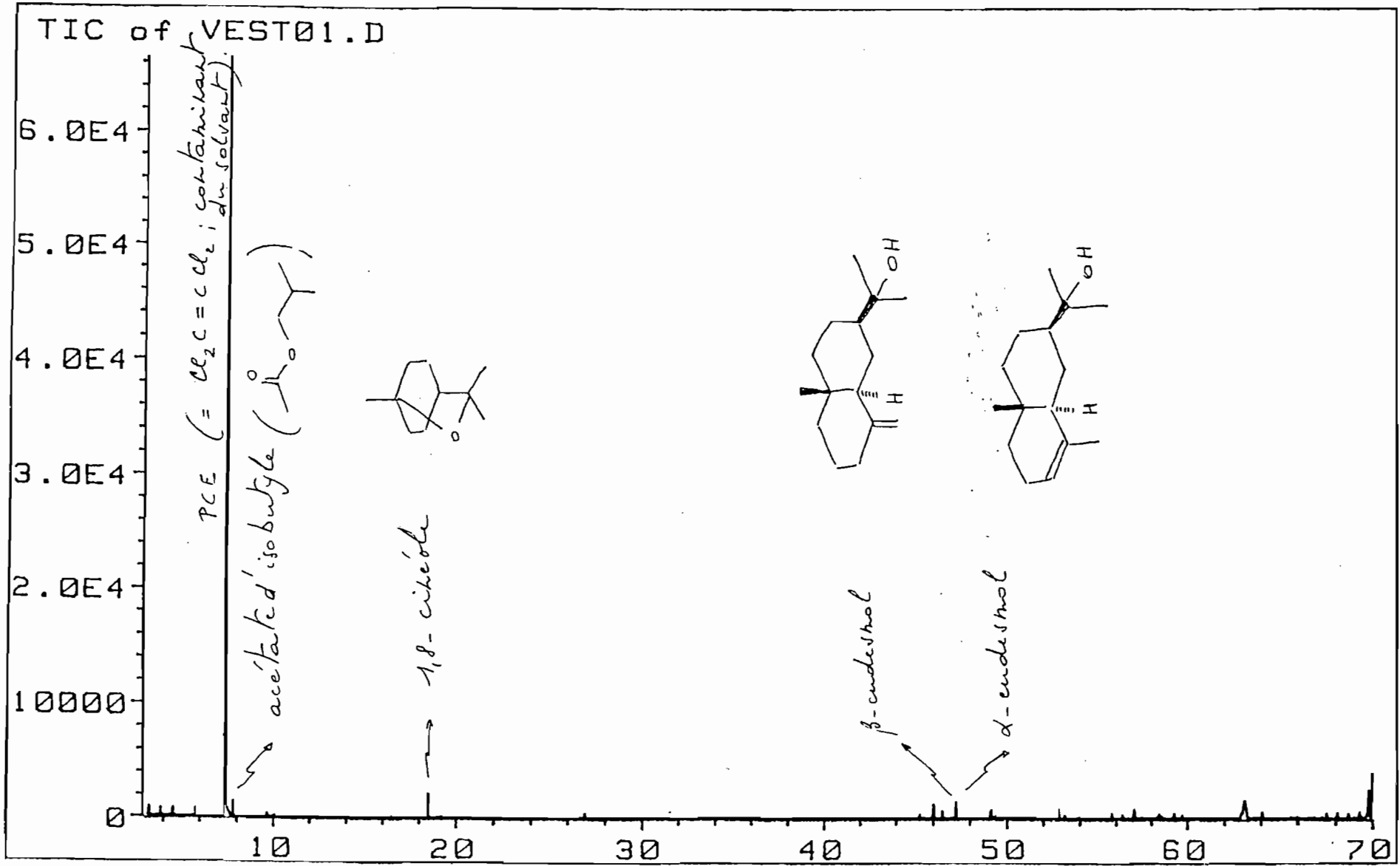


Figure n° 4 : Chromatogramme de la fraction volatile de l'*Euphorbia hirta* (plante sèche).

II.4. SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES CONSTITUANTS A PARTIR DE L'EXTRAIT ALCOOLIQUE BRUT.

II.4.I. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES (C.C.M.).

Il s'agit d'un procédé d'analyse dans lequel, sous l'impulsion d'un fluide vecteur (phase mobile ou éluant), les substances à séparer migrent à travers une phase solide poreuse, insoluble, minéral ou organique, réduit en une poudre plus ou moins fine. La phase solide est déposée sur une plaque, généralement en verre. (21), (22), (23), (24)

Lors de notre travail, la C.C.M. a été effectuée en utilisant des plaques de verre 5*10 cm recouvertes de Kieselgel 60 F₂₅₄ avec une épaisseur de la couche adsorbante de 0.25 mm, et une cuve parallélépipédique de marque Dasage-Heidelberg (RFA) de dimensions 22*21*22 cm.

A. CHOIX DU SYSTEME ELUANT.

Dans la recherche du meilleur système éluant, nous avons d'abord utilisé la méthode de la microtechnique circulaire (de Sthall) (23), (24)

A l'aide d'une micropipette, on dépose quelques gouttes d'une solution de substances à séparer sur la couche adsorbante en plusieurs points, à des intervalles de quelques centimètres. Après évaporation du solvant, on applique le système à examiner au centre de chaque point avec un capillaire fin (il est à noter que ce système éluant est composé à partir de mélanges homogènes des solvants apolaires, ou peu polaires avec des solvants polaires dans des proportions bien définies).

Chaque tache subit un développement radical. L'examen de la netteté de séparation des composants attribués sous forme de cercles concentriques, permet le choix du système convenable.

N'ayant pas de résultat satisfaisant, nous avons ensuite utilisé des séries éluotropes classées par ordre d'augmentation de la force d'éluotion. Le problème, n'étant pas toujours résolu, nous avons marché à tâtons.

Les principes suivant nous ont guidé:

- Si on a un mélange inconnu, on commence par les solvants les moins polaires comme l'hexane, le toluène, le benzène,...

- Si les constituants restent au voisinage du point de départ, on choisit un solvant beaucoup plus polaire tel que: acétone, EtOH, MeOH, eau,... ou bien on l'ajoute au solvant le moins polaire dans des proportions données afin d'augmenter la force d'éluion.

- Si les constituants se déplacent trop vite dans le système précédent, le mieux est d'utiliser les solvants les moins polaires de la série.

Les systèmes suivants ont été efficaces:

1^o) Acétate d'éthyle-Toluène-éther de pétrole: 1:1:1

2^o) Acétone_toluène: 1:1

3^o) Acétate d'ethyle-toluène-acétone: 1:2:1

B. DEPOT DE L'ECHANTILLON ET DEVELOPPEMENT.

A l'aide de micropipettes, les échantillons sont déposés en des points disposés sur une ligne horizontale à 1,5 cm du bord de la plaque. Ces échantillons sont distants de 1 cm l'un de l'autre. La plaque est ensuite séchée immédiatement afin d'éviter des phénomènes de diffusion, sous courant d'air chaud. (22), (24),(25) La plaque ainsi préparée est introduite dans la cuve au fond de laquelle se trouve l'éluant. La cuve est fermée soigneusement avec un couvercle préalablement enduit de graisse de silicone pour assurer l'étachéité.

L'éluant migre emportant avec lui, à des vitesses différentes, les composants du mélange à séparer. Une série de sports est obtenue sur la plaque. Celle-ci est retirée et séchée rapidement à l'air libre car les solvants sont souvent volatils. La plupart des substances éluées sont colorées et absorbent dans le visible; les autres visualisées à l'aide des radiations ultraviolettes (21).

On prend comme mesure de la vitesse de migration de chaque substance dans un système de solvants donné, le R_f défini par la formule :

$$R_f = \frac{\text{DISTANCE PARCOURUE PAR LA SUBSTANCE}}{\text{DISTANCE PARCOURUE PAR LE FRONT}} \quad (23)$$

Tableau n°6 :

R_f des substances détectées en chromatographie sur couche mince (à 28°C) avec le système : Acétate d'ethyle - toluène - acétone : 1 : 2 : 1

Numéro de substances et leur coloration	R _f
1. Verte	1
2. Jaune-verdatre	0.91
3. Jaune	0.87
4. Verte	0.21
5. Jaunâtre	0.17
6. Jaune-orangée	0.11
7. Verte	0.07

II.4.2. LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE (C.C.).

Après avoir trouvé le système éluant, il est nécessaire de passer à la chromatographie sur colonne. Cette méthode de séparation devrait nous permettre d'obtenir les différentes fractions.

Suite au manque de produits nécessaires au montage de cette technique (manque de Kieselgel S), cette méthode de séparation des substances n'a pas pu être réalisée. Et par conséquent, nous n'avons pas pu isoler les produits détectés par C.C.M.

III. DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSION

Le screening phytochimique de l'Euphorbia hirta a permis de mettre en évidence la présence des substances suivantes : les alcaloïdes, les flavonosides, les anthocyanes, les quinones, les saponosides, les tannins, les stérols et les terpènes ainsi que les composés réducteurs et les acides aminés.

Dans l'extrait éthéré, il y a très peu de substances.

L'extrait aqueux contient beaucoup de substances par rapport aux autres extraits :

- il y a beaucoup de tannins, de stérols et terpènes ainsi que des anthocyanes.
- les quinones sont aussi présentes dans des proportions non négligeables.
- les alcaloïdes, les flavonosides et les saponosides sont en quantité minime.

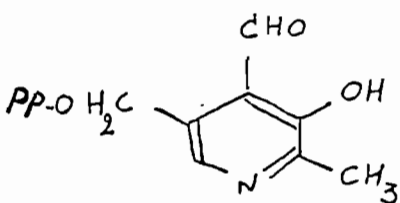
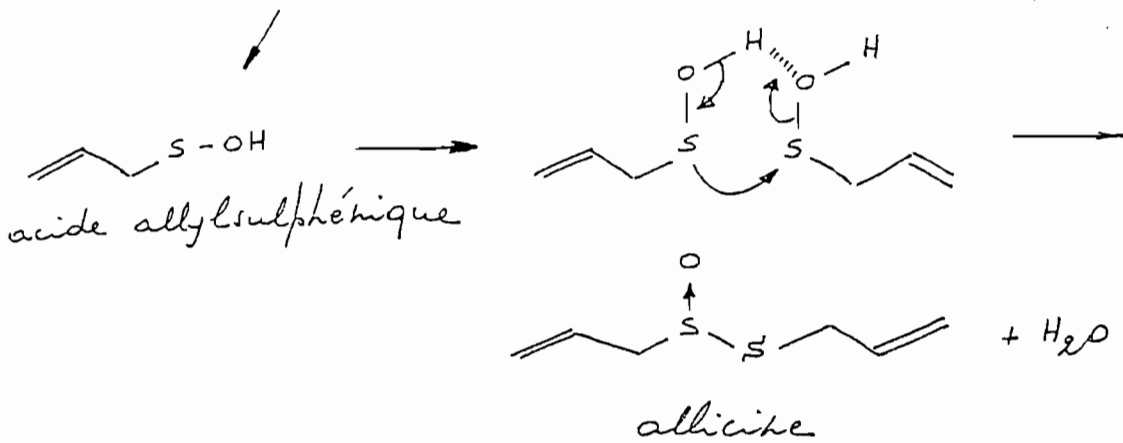
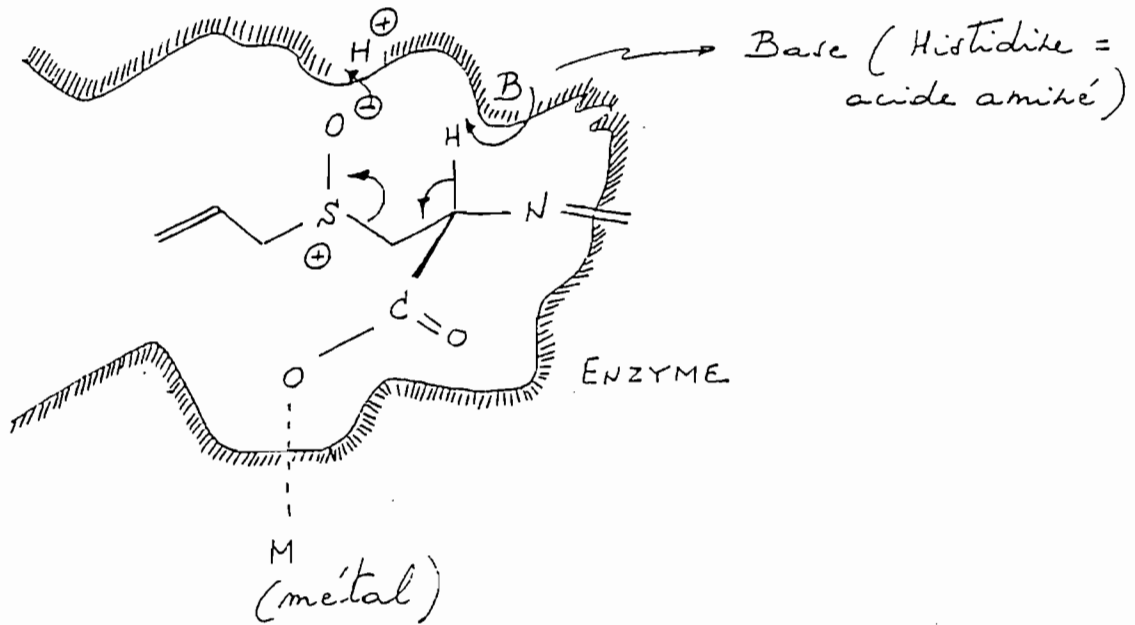
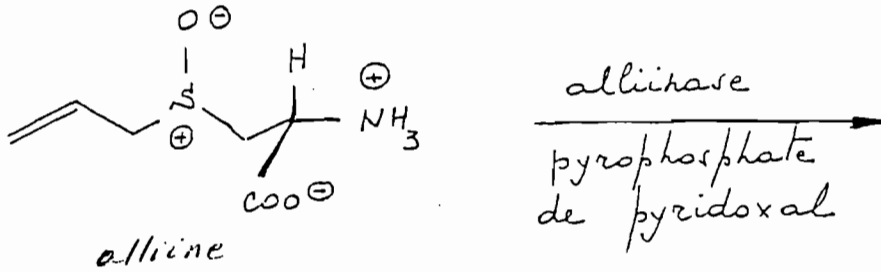
L'extraction des substances volatiles par entraînement à la vapeur nous a donné une substance de couleur jaune. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a indiqué qu'il n'y a pas d'huiles essentielles mais des hydrocarbures (dans la plante fraîche en particulier).

Nous avons essayé de faire une séparation des substances par chromatographie dans l'extrait alcoolique. La chromatographie sur couche mince a fait apparaître 7 taches avec le système Acétate d'ethyle - Toluène - Acétone : 1 : 2 : 1. L'isolation de ces produits par chromatographie sur colonne n'a pas été réalisée.

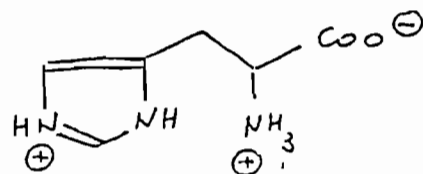
Nous invitons donc nos successeurs à pousser plus loin les études chimiques de cette plante, vu ses diverses utilisations ici et ailleurs, et sa richesse en substances actives.

IV. ANNEXES

Annexe 1: Décomposition de l'alliine en allicine sous l'influence de l'enzyme alliinase.



le pyrophosphate de pyridoxal

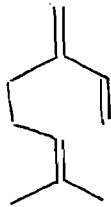


l'histidine (acide aminé)

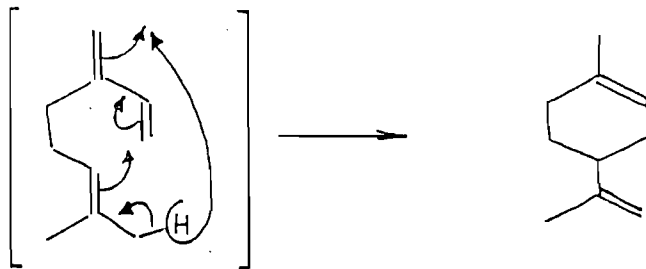
Annexe 2:

a) Les différentes formes de monoterpènes $C_{10}H_{16}$

a. acycliques p.e. le myrcène (très répandu p.e. les pins; odeur de la térébenthine)

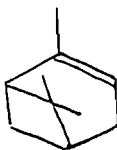


b. monocycliques p.e. le limonène (pelure d'orange, le citron); odeur d'orange.



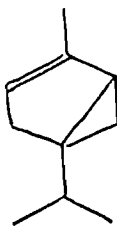
c. plusieurs formes bicycliques

p.e. α -pinène



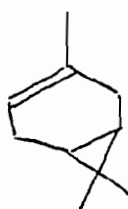
le pin
odeur résineuse

α -thujène



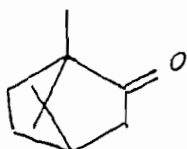
le pin (en de faibles concentrations)

car-3-ene



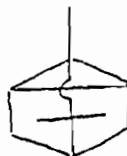
les pins du Portugal
odeur résineuse

le camphre



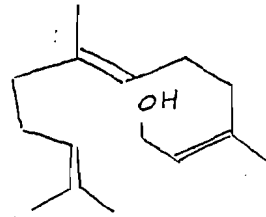
odeur intense

d. tricycliques
p.e. le tricyclène



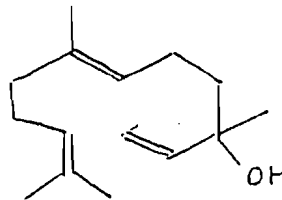
b) Les différentes formes des sesquiterpènes.

a. acyclique p.e. le farnésol



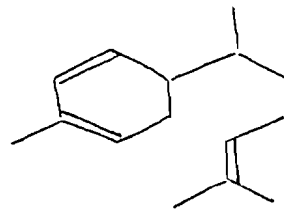
peu d'odeur

le nérolidol



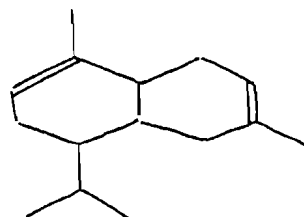
l'huile de néroli (employée en parfumerie)
(sent le renfermé)

b. monocyclique p.e. le zingibérène



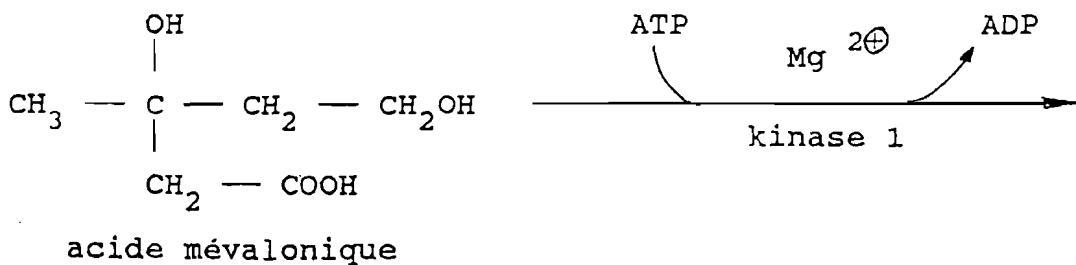
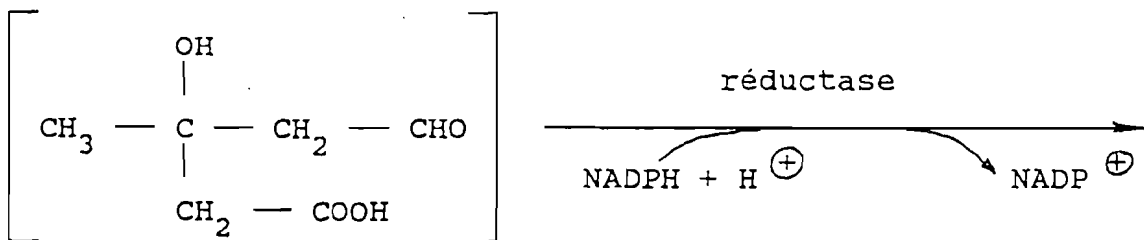
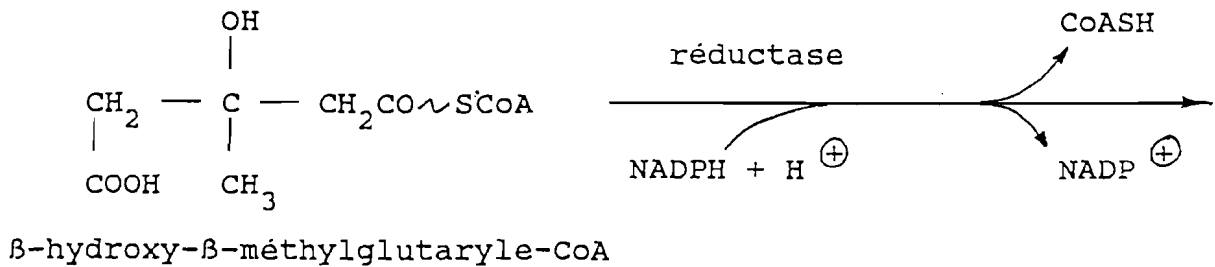
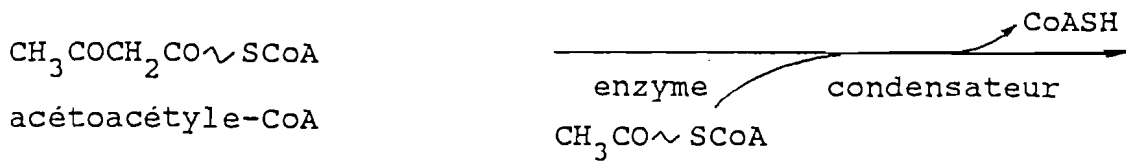
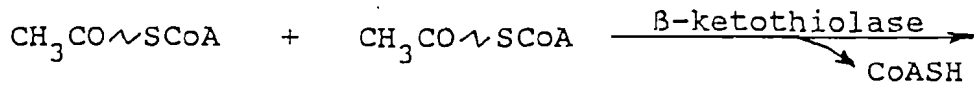
l'huile de gingembre
(peu d'odeur)

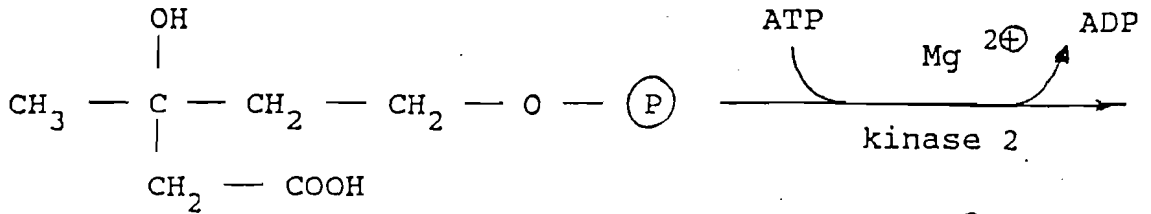
c. bicyclique p.e. du type naphthalène : α -cadinène



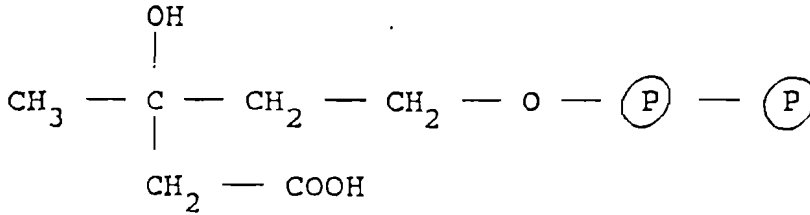
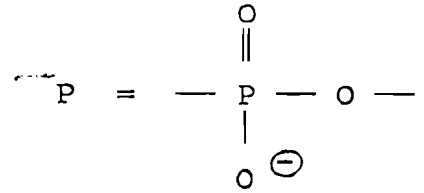
peu d'odeur

Annexe 3: Biosynthèse des terpènes à partir de l'acétylCoA.

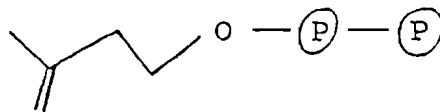
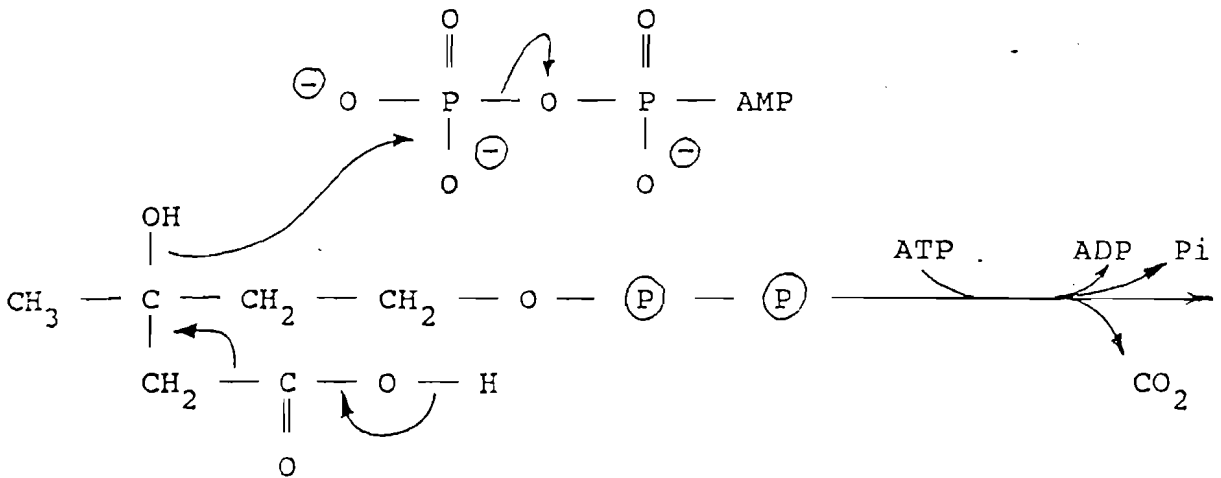




5-phosphate de mévalonyle



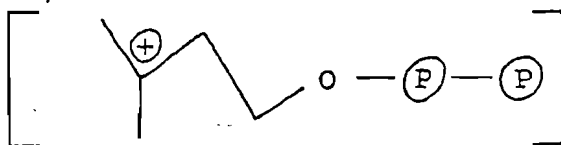
pyrophosphate de mévalonyle



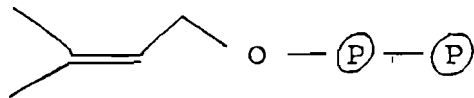
pyrophosphate d'isopentényle (IPP)

isomérase

(+ H⁺)

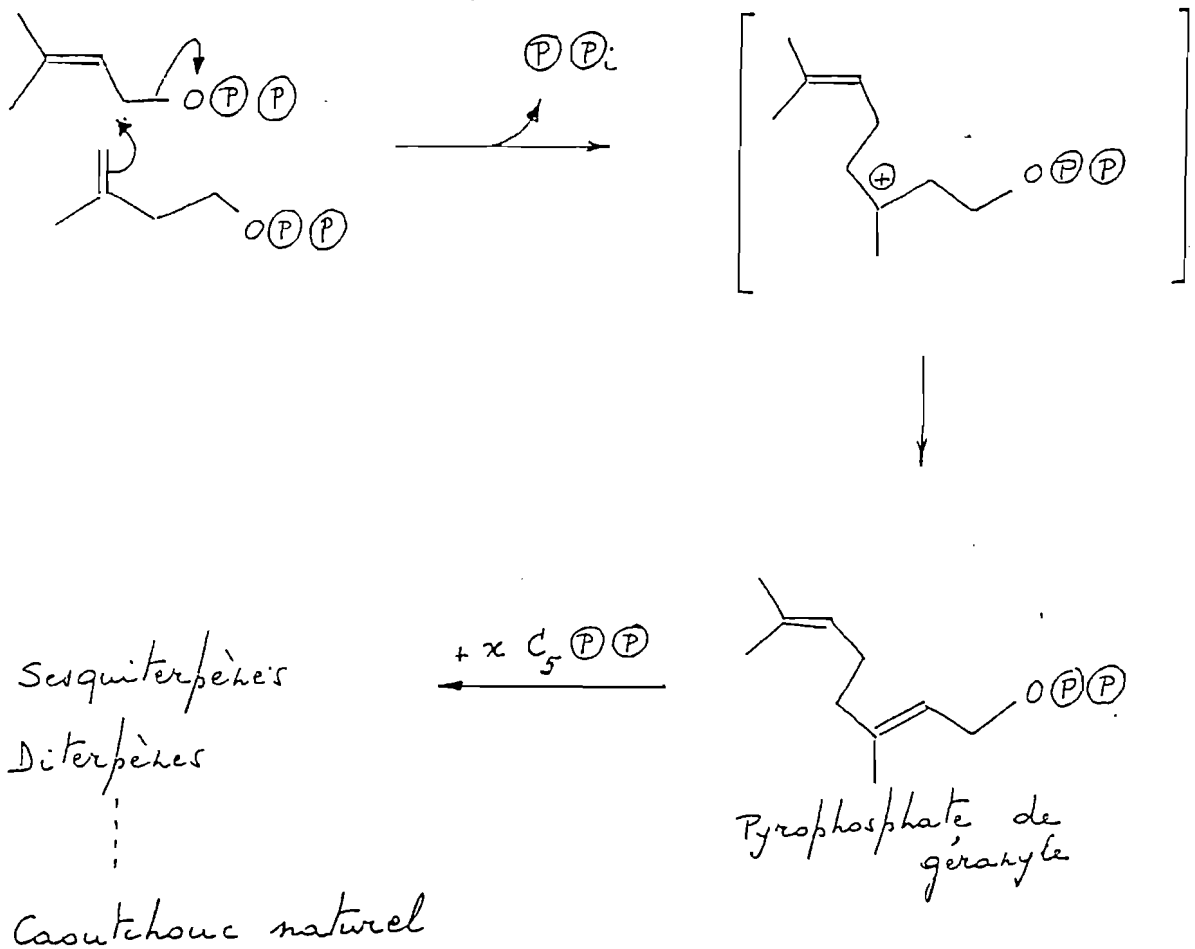


- H⁺



pyrophosphate de diméthylallyle
(DAPP)

En couplant les unités IPP + DAPP on obtient le pyrophosphate de géranyle. Celui-ci sert de produit de base pour la formation des autres terpènes. Par addition consécutive d'unités DAPP se forment les sesquiterpènes, les diterpènes, etc. jusqu'au caoutchouc naturel, qui est un polymère.



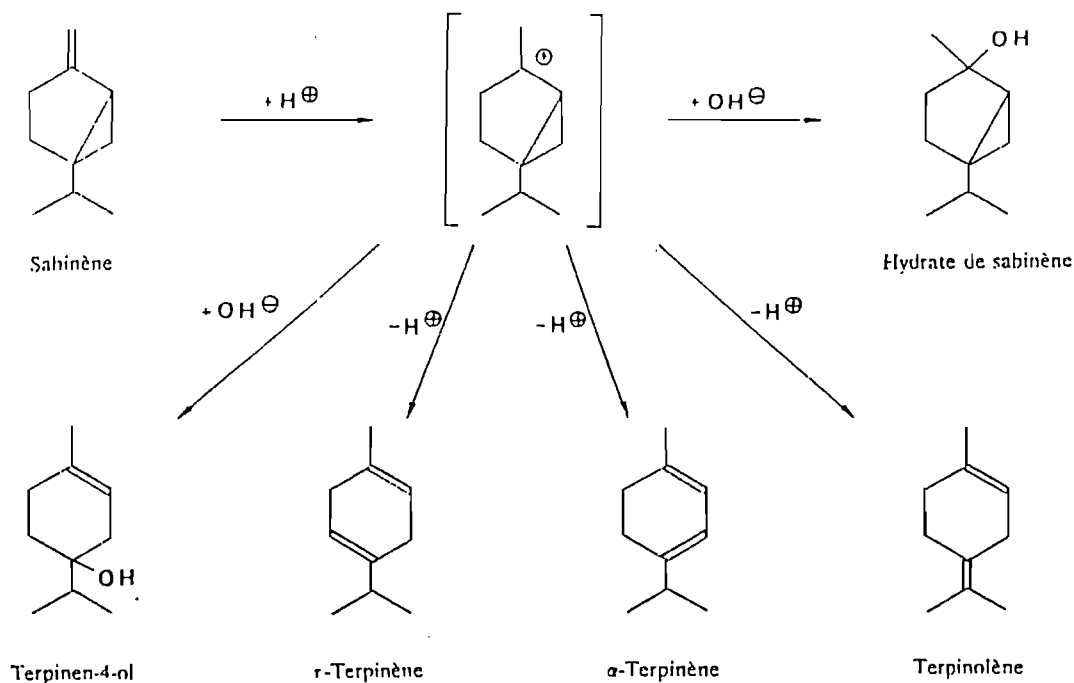
ANNEXE 4

EXEMPLE DE FORMATION D'ARTEFACTS PENDANT
L'HYDRODISTILLATION : CAS DU SABINENE.

Le pH d'un extrait aqueux d'une plante est généralement acide, c'est-à-dire d'un pH de l'ordre de 5 à 6.

Pendant la préparation de l'essence de Juniper Sabina (un conifère), qui est particulièrement riche en sabinène (30 % de l'huile essentielle), on observait que le contenu en sabinène de l'huile essentielle semblait diminuer avec la durée de la distillation. Cela semblait se produire en faveur d'une augmentation de plusieurs autres substances. Le même effet était constaté en diminuant le pH du milieu.

Ces transformations qui dépendent du pH peuvent être expliquées aisément, en commençant les réactions par l'addition d'un proton :



ANNEXE 5

LA CHROMOTOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE C.P.G.-

La C.P.G. est une des principales méthodes de l'analyse physico-chimique pour la séparation des mélanges complexes par une suite continue d'équilibres s'établissant entre une phase mobile gazeuse et une phase solide, placée à l'intérieur d'une colonne (25), (26).

La C.P.G. s'adresse aux molécules gazeuses et à tout composé susceptible d'être volatilisé (27).

La nécessité de maintenir les molécules à l'état gazeux implique donc que toute l'opération chromatographique se réalise à une température compatible avec cet état sans provoquer leur destruction.

Les composants à séparer se déplacent à des vitesses différentes dans une colonne chromatographique. Leur identification est basée sur la comparaison du volume de rétention et du temps de rétention de substance connue avec celle inconnue.

Parfois on ajoute une substance connue et on étudie le chromatogramme. L'augmentation du pic de chromatogramme confirme la présence du composant de mélange ; l'apparition d'un pic nouveau indique l'absence de cette substance.

Kovats a utilisé avec succès pour l'identification des substances un indice de rétention qui dépend de la structure du composé.

INDICE DE KOVATS (I_k).

L'indice de Kovats est un chiffre qui exprime le temps de rétention d'une substance lors d'une analyse par C.P.G. Il est indépendant des circonstances chromatographiques employées (température, débit du gaz vecteur, taux d'accroissement de la température dans une analyse à température programmée), et dépend uniquement de la phase stationnaire utilisée.

L'index est déterminé en comparant le temps de rétention d'une substance aux temps de rétention de produits de référence. En général, pour ces derniers, on utilise une série d'homologues d'hydrocarbures.

a. ANALYSE FAITE A TEMPERATURE CONSTANTE :

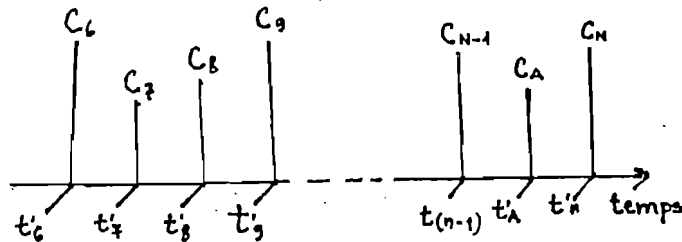
$$I_k = 100 (N-n) + 100 n \cdot \frac{\log t'_A - \log t'(N-n)}{\log t'(N) - \log t'(N-n)}$$

t'_A = temps de rétention corrigé de l'inconnu A

$t'(N-n)$ = temps de rétention corrigé de la paraffine $C_{(N-n)}$ qui se trouve devant l'inconnu A dans le chromatogramme.

n = un nombre entier.

L'_{I_k} de la paraffine en C_N est par définition 100 N.



b. ANALYSE FAITE A TEMPERATURE PROGRAMMEE.-

L'analyse est faite dans les conditions suivantes : au début de l'analyse, la température du four est relativement basse, et elle est augmentée progressivement et continuellement à un taux défini [p.e. à 3°/min]. Ceci résulte dans une analyse complète d'échantillons dont les composants ont des volatilités très divergentes : au début seule les substances très volatiles sont volatilisées (et donc introduites dans la colonne pour l'analyse), tandis que les substances peu volatiles ne bougent pas. En augmentant la température, les composants sont introduits dans la colonne en fonction de leur volatilité, et analysés. Ceci résulte dans l'analyse complète de l'échantillon après une seule injection.

$$I_k = 100 (N-n) + 100 n \cdot \frac{t'_A - t'(N-n)}{t'(N) - t'(N-n)}$$

$t'_A - t'(N-n)$ = la distance (en mm) entre le pic de l'inconnu A et celui de l'hydrocarbure précédent A.

$t'(N) - t'(N-n)$ = la distance (en mm) entre le pic de l'hydrocarbure suivant l'inconnu et celui de l'hydrocarbure précédent A.

Cette méthode, bien que strictement pas tout à fait correcte, est fondée sur l'observation que dans une analyse à température programmée, les distances entre trois hydrocarbures consécutifs sont presque constantes, et de ce fait que la localisation d'un inconnu peut être obtenu par interpolation.

Noter que la seconde partie de la formule calcule la place de l'inconnu relative aux deux hydrocarbures repères.

Bibliographie

- 01 L. AKE ASSI, J. ABEYE ; S. GUINKO, R. GIGUET et Y. BANGAVOU :
"Contribution à l'identification et au recensement des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle et la pharmacopée en Empire Centrafricaine".
Programme de Coopération Scientifique et Technique, 1978.
02. WOME BOKEMO :
"Recherches ethnopharmacognosiques sur les plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle à KISANGANI (Haut-Zaïre)".
Tome I. Thèse de Doctorat Université Libre de Bruxelles,
Année académique 1984 - 1985.
03. A. BOUQUET et M. DEBRAY,
"Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire" ;
Paris, 1974.
04. "Médecine traditionnelle et pharmacopée".
A.C.C.T. ; Bulletin de liaison n° 0 VOLO, 1986.
05. J. BRUNETON ;
"Eléments de phytochimie et de pharmacognosie";
Technique et Documentation.- Lavoisier, Paris, 1987.
06. BWAYOYA A.
Contribution à l'inventaire phytochimique des plantes médicinales du Burundi"
Mémoire de Licence
Université du Burundi, Bujumbura 1982.
07. M. Paris et M. Hurabielle
"Abregé de matière médicinale (Pharmacognosie)".
Tome 1 ; Masson, Paris 1981.
- 08 L. THURZOVA
"Les plantes - santé qui poussent autour de nous".
Bordas, 1981.
09. M. PARIS et M. MOYSE
"Matière médicale"
Tome I., 2e édition ; Masson, 1976
10. H. DE POOTER : "Notes de cours sur les substances naturelles (chimie, biochimie, physiologie)". Université du Burundi, Faculté des Sciences.
Bujumbura, Novembre 1991.
11. J. LEVISALLES et M. JOZEFOWICZ ; "Chimie organique 3". Flammarion Sciences, 1974.
12. D.J. CRAM et G.S. HAMMOND : "Chimie organique"
Chez Gauthier-Villars, Paris 1965.

13. P. ARNAUD ; "Cours de chimie organique" ; 11e édition, Gauthier - Villars, Paris, 1978.
14. J.D. Roberts et M.C. Caserio
"Chimie organique moderne", chez Ediscience, Paris, 1968.
15. NDABAHAGAMYE F. "Contribution à l'inventaire phytochimique des plantes médicinales du Burundi". Mémoire de Licence. Université du Burundi ; Bujumbura, 1986.
16. NZOHABONAYO C. "Contribution à l'inventaire ethnobotanique des plantes médicinales dans les communes : Buyenzi, Kabezi et Mutimbuzi". Mémoire de Licence. U.B., Bujumbura 1983.
17. RAMADHAN Moustapha ; "Contribution à l'étude phytochimique des plantes médicinales du Burundi". Mémoire de Licence. U.B., Bujumbura, 1986.
18. L. Van FUYVELDE ; "Etude chimique et pharmacologique d'une plante médicinale rwandaise, l'IBOZA RIPARIA". Centre universitaire de Recherche sur la pharmacopée et la médecine traditionnelle (CURPHAMETRA), 1983.
19. I. CIULEI : "Practical manuals on the industrial utilisation of medicinal and aromatic plants : I. Methodology for analysis of vegetable drugs". IPC Romania, Bucharest, 1982.
20. A. WILLEMART et R. CHAUX : "Les grandes fonctions de la chimie organique et leurs principales applications". 2^e éd. augmentée, Dunod, Paris, 1958.
21. J.M. BOBBIT ; A.E. SCHWARTING & R.J. GRITTER : "Introduction à la chromatographie" ; Gauthier - Villars, 1968.
22. M. BOUNIAS : "L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince ; choix des techniques utilisant les plaques préfabriquées sur couches minces". 2e édition ; Gauthier - Villars, Paris, 1971.
23. K. RANDEPATH
"Chromatographie sur couches minces". Gauthier - Villars, Paris 1971.
24. G. VERNIN ; "Chromatographie en couche mince. Techniques et applications en chimie organique. Dunod ; Paris, 1970.
25. G. MAHUZIER et M. HAMON
"Abrégé de chimie analytique". Tome II, 2e édition, Masson, Paris, 1990.
26. G. LAVOUE, P. CHEBROUX ; M. PROST et M. RIGAUD ;
"Les nouvelles dimensions de la chromatographie en phase gazeuse". Labo-France éditeur, 1982.
27. A.U. KIESELV & Ya. I. YASHIN ;
"La chromatographie gaz-solide" ; Masson et Cie, 1969.