

2005-01

Extraction qualitative et purification des stéroïdes et des terpènes des feuilles de *Cassia alata* de la zone Kinindo en mairie de Bujumbura

Havyarimana, Juvénal

UB, FS : Chimie

<https://repository.ub.edu.bi/handle/123456789/2255>

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

UNIVERSITE DU BURUNDI
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

**EXTRACTION QUALITATIVE ET PURIFICATION DES
STEROIDES ET DES TERPENES DES FEUILLES DE
Cassia alata DE LA ZONE KININDO EN MAIRIE DE
BUJUMBURA.**

Par

Juvénal HAVYARIMANA

SOUS LA DIRECTION DE :

Professeur Léonard HARI

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

Bujumbura, Janvier 2005

DEDICACE

A ma regrettée Mère;

A mon Père;

A ma sœur et frères;

A mes oncles et tantes;

A mes cousins et cousines;

A mes neveux et nièces ;

A vous tous qui avez contribué à la réalisation de ce travail;

A vous tous qui me sont chers;

Je dédie ce mémoire.

REMERCIEMENTS

Au terme du présent travail, grand est notre désir d'exprimer notre profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à sa réalisation.

Nos sentiments de gratitude sont d'abord adressés à l'endroit du Dr Léonard HARI professeur à la Faculté des Sciences, promoteur et directeur de ce travail, qui malgré ses multiples occupations nous a dirigé avec sagesse et rigueur. Ses conseils; ses suggestions et sa clairvoyance nous ont été d'une importance capitale. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nos remerciements vont aussi à l'endroit de tous les éducateurs de l'école primaire jusqu'à l'université qui nous ont fait ce que nous sommes. Aux professeurs de la Faculté des Sciences particulièrement ceux du Département de chimie qui ont consacré leurs efforts à notre formation, pour l'ouverture d'esprit et d'humanité, que ce travail soit pour eux une satisfaction.

Nous ne pouvons pas oublier de remercier tout le personnel de laboratoire du Département de chimie pour les services qu'il nous a rendu au cours de ce travail.

Il nous serait ingrat, voire décevant de terminer sans exprimer notre grande reconnaissance à nos parents pour nous avoir montré le chemin de l'école et pour leur patience sans égale.

Nos remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes qui nous ont prêté main forte aussi bien matériellement que moralement.

Nous songeons plus particulièrement à BARUTWANAYO Moussa, à BAVUGA Léandre, au feu NURWAKAGARI Abraham et à la famille HARIMENSHI Hilaire. Nous disons merci pour vos actes à notre égard. Que tous les compagnons de classe et tous les amis qui ont agrémenté notre séjour à l'université soient rassurés : je vous serai toujours reconnaissant.

RESUME

Ce travail intitulé « **Extraction qualitative et purification des stéroïdes et des terpènes des feuilles de *Cassia alata*** » entre dans le cadre d'une contribution aux recherches sur les plantes médicinales.

Il est subdivisé en quatre chapitres à savoir l'introduction générale, la partie théorique, la partie expérimentale et enfin la conclusion générale et quelques recommandations.

Dans le chapitre introductif, nous évoquons la part des plantes dans la médecine traditionnelle en particulier. Nous avons aussi justifié les raisons du choix du sujet et de la plante.

Le deuxième chapitre est constitué par la description botanique de la plante *Cassia alata*, son intérêt en phytothérapie et sa répartition géographique. Quelques généralités sur les stéroïdes et sur les terpènes font également partie de ce deuxième chapitre.

La partie expérimentale constitue le troisième chapitre : le screening phytochimique nous a révélé la présence de trois principes actifs à savoir les tannins, les stéroïdes et les terpènes et enfin les flavonoïdes sous forme de traces.

Après confirmation de la présence des stéroïdes et des terpènes par la réaction de Liebermann-Burchard, l'extraction des stéroïdes a été faite à l'éther. Les analyses chromatographiques nous ont conduit à l'isolation de deux produits donnant un test positif à la réaction de Liebermann-Burchard. Ces deux produits isolés sont apolaires.

Le chapitre quatre est constitué par une conclusion générale et quelques recommandations.

LISTE DES SIGLES ET DES ABREVIATIONS

C.A.M.E.S.	: Conseil Africain et Malgache pour l'Enseignement Supérieur
R _f	: « Retarding factor » une traduction adaptée pourrait être « rapport frontal »
H ₂ SO ₄	: Acide sulfurique
H ₃ PO ₄	: Acide phosphorique
KOH	: Hydroxyde de potassium
°C	: Degré Celsius
g	: gramme
ml	: millilitre
N	: Normalité
D	: Dragendorff
W	: Wagner
M	: Mayer
V/V	: volume sur volume
U.V	: Ultra-Violet

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
RESUME.....	iii
SIGLES ET ABREVIATIONS.....	iv
TABLE DES MATIERES.....	v
CHAPITRE I: INTRODUCTION GENERALE.....	1
I. 1. Contexte du sujet.....	1
I.2. Intérêt du choix de la plante et du sujet.....	2
CHAPITRE II: PARTIE THEORIQUE.....	3
II.1. Généralités sur la plante “ <i>Cassia alata</i> ”	3
II.1.1. Systématique.....	3
II.1.2. Description botanique de la plante.....	3
II.1.3. Intérêt de la plante en phytothérapie.....	3
II.1.4. Photo de <i>Cassia alata</i>	4
II.1.5. Répartition géographique.....	5
II.1.6. Utilisations.....	5
II.2. Généralités sur les stéroïdes et sur les terpènes.....	5
II.2.1. Les stéroïdes	5
II.2.1.1. Définition.....	5
II.2.1.2. Propriétés des stérols.....	6
II.2.1.2.a. Propriétés physiques.....	6
II.2.1.2.b. Propriétés chimiques.....	6
II.2.1.2.c. Propriétés pharmacologiques.....	6
II.2.1.3. Importance des stéroïdes.....	7
II.2.1.4. Différents types des stéroïdes.....	8
II.2.2. Les terpènes	12
II.2.2.1. Définition.....	12
II.2.2.2. Classification.....	12
1° Les hémiterpènes.....	12
2° Les monoterpènes.....	13
3° Les sesquiterpènes.....	13
4° Les diterpènes.....	13
5° Les triterpènes.....	14

6° Les trériterpènes.....	15
7° Les polyterpènes.....	15
II.2.2.3. Les propriétés des terpènes.....	16
II.2.2.3.1. Propriétés physiques.....	16
II.2.2.3.2. Propriétés physiologiques.....	16
CHAPITRE III: PARTIE EXPERIMENTALE.....	17
III.1. Préparation préliminaire du matériel végétal.....	17
III.2. Screening phytochimique.....	19
III.2.1. Définition.....	19
III.2.2. Détection des stéroïdes et des terpènes.....	19
III.2. Détection des autres principes actifs.....	19
III.3. Extraction des stéroïdes et des terpènes.....	21
III.3.a. Saponification.....	21
III.3.b. Méthode de saponification et extraction des stéroïdes et des terpènes.....	22
III.4. Analyses chromatographiques.....	22
III.4.1. Introduction.....	22
III.4.2. Chromatographie sur couche mince (C.C.M).....	23
1° Définition.....	23
2° Principe de la technique.....	23
3° Choix du système éluant.....	23
4° Dépôt de l'échantillon et développement.....	24
5° Révélation.....	26
III.4.3. Chromatographie sur colonne (C.C).....	26
1° Description de la colonne.....	26
2° Remplissage de la colonne.....	27
3° Introduction de l'échantillon et le développement.....	27
III.4.4. Analyse des fractions recueillies.....	28
III.4.5. Test de pureté.....	28
III.4.5.1. Chromatographie sur couche mince.....	28
III.4.5.2. Essai de cristallisation.....	30
III.4.5.3. Test de solubilité.....	30

CHAPITRE IV: CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS.....	31
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	33
ANNEXE 1.....	36
ANNEXE 2.....	38
ANNEXE 3.....	39

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE

I.1. Contexte du sujet

L'homme de tous les temps a eu et aura toujours un souhait : celui d'avoir un lendemain meilleur.

Il court, il court sans jamais s'arrêter à la recherche de ce dernier. Dans cette lutte, sans merci, qui constitue l'essence même de la vie, il tourne les yeux vers la nature, la seule susceptible de le soulager. En effet, dans la multitude des exemples où l'homme recourt incessamment à la nature salvatrice, les plantes médicinales occupent une place de choix. Les plantes nous donnent à manger, nous habillent, nous fournissent du matériel de construction. Nos besoins s'étendant peu à peu, nous cherchons chez les plantes des médicaments, des parfums et teintures, des épices etc.

Les plantes demeurent encore irremplaçables pour la matière première à partir desquelles s'élaborent les composés de synthèse. A ces derniers, la médecine moderne préfère souvent l'emploi des drogues extraites des végétaux, parce que ceux-ci sont abondants et peu coûteux.

Au Burundi, comme partout ailleurs dans les pays du tiers-monde, la médecine traditionnelle à base des plantes a joué et joue encore un rôle capital dans la thérapeutique. Cette thérapeutique longtemps méconnue, incomprise, souvent dénigrée, voire combattue par quelques esprits mal avisés, répond au désir du mieux être de l'individu (RWANGABO, 1993).

Elle s'est souvent avérée efficace dans le traitement de plusieurs maladies notamment les maladies infantiles, les vers intestinaux,...

Aussi, est-il fréquent de voir de nos jours, les malades indépendamment de leur niveau social, se faire soigner à la fois par le médecin conventionnel et par le guérisseur traditionnel.

Actuellement, l'intérêt pour la médecine traditionnelle s'accroît constamment. On constate un retour assez net des populations rurales vers les soins de santé traditionnels.

La majorité des africains n'ont pas encore accès aux produits pharmaceutiques modernes, soit à cause de l'éloignement des centres de santé, soit en raison de leur pouvoir d'achat faible.

Depuis quelques années donc, les recherches sur les plantes médicinales s'intensifient partout dans le monde. Ce vif regain d'intérêt s'explique par diverses raisons :

- Les plantes médicinales synthétisent un grand nombre de composés chimiques (alcaloïdes, hétérosides, etc) aux propriétés physiologiques et thérapeutiques les plus variées (GAHUNGU et NTAMAVUKIRO, 1993)
- Les besoins croissants de la thérapeutique en hormones stéroïdiques ont déterminé dans le monde entier, des recherches phytochimiques pour trouver les matières premières les plus indispensables pour les hémisynthèses de ces importants médicaments (BIVUZIMANA, 1999).

I.2. Intérêt du choix de la plante et du sujet

La plante « *Cassia alata* » appartient à la pharmacopée des pays Sud-américains. Le choix de cette plante dans l'étude des plantes médicinales n'est pas le fait du hasard mais plutôt, il est prémédité.

Ses usages en thérapeutique démontrent l'intérêt que revêt la valorisation de cette plante.

En effet, cette plante contient plusieurs principes actifs très utilisés en pharmacologie et en thérapeutique dans le traitement de plusieurs maladies. Néanmoins, mon travail consistera à l'extraction des stéroïdes et des terpènes puisque ces substances extraites du strophantus et de la digitale ont déjà fait leur preuve dans le traitement de certaines maladies du cœur. Par ailleurs, la cortisone et ses dérivés sont utilisés dans les maladies allergiques et rhumatismales.

De plus, les terpènes sont utilisés comme antiseptiques, vermifuges, anti-inflammatoires, abortifs et stupéfiants.

CHAPITRE II : PARTIE THEORIQUE

II.1. Généralités sur la plante « *Cassia alata* »

II.1.1. Systématique

Règne	: Végétal
Embranchement	: Spermatophytes
Sous-embranchement	: Angiospermes
Classe	: Dicotylédones
(Sous-classe)	: Archichlamydées
Ordre	: Rosale
(Sous-ordre)	: Leguminosae
Famille	: Caesalpiniceae
Genre	: <i>Cassia</i>
Espèce	: <i>Cassia alata</i>

II.1.2. Description botanique de la plante

Cassia alata est une plante arbustive haute de 1 à 3m, à feuilles paripennées alternes, vivant dans les jachères herbeuses ou buissonnantes. La tige est très ramifiée et les entre-nœuds sont très courts. Les feuilles sont composées et atteignent au plus 1m de longueur. Elles ont plus de 15 paires de folioles ovales.

Les fleurs sont très nombreuses et très agglomérées. Elles ont une couleur jaune d'or. Les pétales sont pleins de nervures brunâtres très ramifiées. Les fruits sont des gousses étagères plates avec des ailes longitudinales partant des deux faces. Elles atteignent une longueur de 25cm et renferment chacune au plus 40 graines unisériées.

II.1.3. Intérêt de la plante en phytothérapie

Cassia alata Linn est une plante dont les feuilles sont universellement utilisées dans le traitement des maladies de la peau : les mycoses.

Certains travaux ont mis en évidence chez le rat, l'activité bactéricide, hypoglycémiant, anti-inflammatoire, analgésique et antihypertensive de cette plante ; d'autres lui reconnaissent son action contre les morsures de serpent ainsi que ses propriétés anti-helminthiques, purgatives et anti-herpétiques. (KEITA et al., 1993).

Les analyses chimiques ont mis en évidence l'acide chrysophanique dans les divers organes responsables de l'action antimycosique et antidermatosique (C.A.M.E.S, 1976).

Broyées et macérées, les feuilles de *Cassia alata* sont utilisées contre la teigne et les plaies syphilitiques.

Une forte décoction des feuilles est donnée durant l'accouchement pour hâter la délivrance.

Les essais pharmacologiques ont montré des propriétés antibiotiques vis-à-vis de certains bacilles et du staphylocoque doré, ce qui justifie son utilisation dans les affections externes de la peau (C.A.M.E.S,1976).

En Afrique, les feuilles sont parfois utilisées contre la grippe, ou bien alliées à des écorces de racines pilées, elles servent à lutter contre la migraine.

A Madagascar, elle sert contre l'hypertension. On utilise les feuilles comme remède contre les affections de la peau comme par exemple le bouton de chaleur fréquent sous nos climats.

([http : // www.barbadine.com /pages/cassia % 20 alata % lien htm](http://www.barbadine.com/pages/cassia%20alata%20lien.htm) et [http : // perso .wanadoo.fr / natou /w-cassia. htm](http://perso.wanadoo.fr/natou/w-cassia.htm))

II.1.4.Figure no 1 : Photo de *Cassia alata*



Cassia alata est une plante largement utilisée en médecine traditionnelle africaine. Cette plante est de la famille des Caesalpiniceae. Le nom vernaculaire de cette plante n'est pas donné en KIRUNDI car elle serait nouvellement introduite

En Français, elle s'appelle : « Dartrier » tandis qu'en Kishwahili c'est « Bilombo ».

II.1.5. Répartition géographique

Cassia alata, originaire d'Amérique du Sud, se rencontre également en Afrique occidentale, centrale et orientale.

Cassia alata est une plante nouvellement introduite au Burundi et qui est cultivée dans la ville de Bujumbura surtout pour la beauté de son feuillage. Elle peut également pousser dans d'autres coins du pays.

II.1.6. Utilisations

C'est un remède universel dans les pays pauvres, pour soigner des dermatoses diverses : l'eczéma surinfectée, ulcères tropicaux, herpès circiné (mycose cutanée), parasitoses cutanées surinfectées.

On applique sur les lésions :

- le jus des feuilles hachées et pressées avec ou sans jus de citron,
- une pâte préparée en mélangeant de la poudre de feuilles séchées et de l'eau ou de la graisse, de l'huile ou de vaseline.

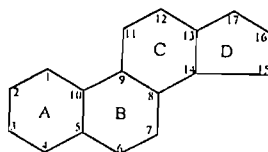
Les praticiens traditionnels recommandent de bien frotter les lésions mycosiques avec cette pâte (<http://www.phytomania.com/cassia.htm>).

II.2. Généralités sur les stéroïdes et sur les terpènes

II.2.1. Les stéroïdes

II.2.1.1. Définition

Le terme « Stéroïde » est généralement appliqué aux composés ayant un noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène et portant différents substituants et groupements fonctionnels (CHAPEVILLE et CLAUSER, 1974 ; ROBERTS et CASERIO, 1968).



Noyau stéroïdique (cyclopentanoperhydrophénanthrène)

Ceux qui portent un groupement-OH en C₃, deux groupes méthyles en C₁₀ et C₁₃ et une chaîne latérale en C₁₇, forment le groupe des stérols (MORVAN, 1973).

Les stérols tant libres qu'estérifiés surtout par les acides gras supérieurs, sont largement répandus dans la nature et peuvent être isolés par extraction de la fraction insaponifiable des graisses neutres. Tous les stérols ont une répartition très générale, seules les bactéries en sont pratiquement dépourvues.

D'après l'origine biologique, on distingue : les zoostérols ou stérols animaux et les phytostérols ou stérols végétaux (AUDIGIE ET ZONZAIN, 1991).

Ces derniers se présentent soit à l'état libre, soit estérifiés par les acides gras (stérides) ; soit combinés à des sucres sous forme d'hétérosides (DEYSSON, 1982).

II.2.1.2. Propriétés des stérols

a. Propriétés physiques

Les stérols sont des solides cristallisés. Ils sont insolubles dans l'eau, peu solubles dans l'alcool à froid ; solubles dans l'alcool à chaud ; ils se dissolvent dans le benzène, le chloroforme, l'éther, l'éther diéthylique et la pyridine. Ils sont doués de pouvoir rotatoire et sont en général lévogyres.

b. Propriétés chimiques

Les stérols donnent facilement des esters avec les acides gras. Ils donnent également avec les acides benzoïque et acétique des esters qui peuvent servir à l'identification des stérols concernés. En effet, les esters purs d'acides benzoïque, acétique.... ont des points de fusion caractéristiques des stérols ; si on isole un ester d'un de ces acides, la détermination de son point de fusion renseigne sur le stérol présent.

c. Propriétés pharmacologiques

Les stéroïdes sont très utilisés en pharmacologie et en thérapeutique dans le traitement de certaines maladies : par exemple les principes actifs du strophanthus et de la digitale s'emploient dans certaines maladies du cœur ; la cortisone et ses dérivés dans les maladies allergiques et rhumatismales (MORVAN, 1973).

Sous l'action des radiations ultraviolettes, l'ergostérol se transforme en calciférol ou vitamine D₂ antirachitique. L'insuffisance de cette vitamine dans le régime alimentaire des enfants cause le rachitisme, maladie caractérisée par une déficience en phosphate de calcium dans les os.

Le stigmastérol est une matière première pour la synthèse d'hormones, l'hémisynthèse d'hormones sexuelles et corticosurréaliennes.

On emploie aussi des stéroïdes contraceptifs en thérapeutique, certains dans le traitement des troubles hormonaux, d'autres utilisés contre la stérilité et dans la contraception où ils trouvent une large application (BRUNETON, 1993). Le sitostérol des céréales est utilisé comme préventif contre l'artériosclérose. Les sels d'acides biliaires interviennent dans la digestion et l'absorption des graisses en permettant leur émulsionnement (AUDIGIE et ZONZAIN, 1991).

Les glycosides cardiotoniques exercent leur activité sur le cœur défaillant à plusieurs niveaux : ils agissent sur la contractilité, sur la conductibilité et sur l'automatisme.

- Sur la contractilité

Les glycosides cardiotoniques exercent une action inotrope positive, l'inotropie étant la propriété que possède le cœur de se contracter en développant une force.

- Sur la conductibilité

Les glycosides cardiotoniques ralentissent la conduction au niveau du nœud auriculo-ventriculaire. Il y a aussi allongement de la période réfractaire à ce niveau.

- Sur l'automatisme

En abaissant la fréquence sinusale, les cardiotoniques peuvent abaisser de 20 à 40% la fréquence cardiaque. Aux posologies supérieures, les hétérosides cardiotoniques augmentent l'automatisme des foyers ectopiques, cette propriété est responsable des troubles du rythme observés en cas de surdose (BRUNETON, 1987).

II.2.1.3. Importance des stéroïdes

L'intérêt thérapeutique et industriel des stéroïdes est considérable et leur donne une importance économique non négligeable.

Aucun produit synthétique n'a pu encore se substituer aux hétérosides cardiotoniques. Dans diverses industries, les saponosides ont d'importants débouchés comme agents moussants et émulsionnants.

Notons que les sapogénines spirostaniques du sitostérol ou du stigmastérol sont des matières premières aisément valorisables par des procédés biotechnologiques. Certaines substances interviennent dans des synthèses d'hormones, d'autres demeurent indispensables pour la couverture des besoins de l'industrie pharmaceutique en médicaments stéroïdiques (Contraceptifs, anabolisants, anti-inflammatoires).

Ce sont des substances douées des potentialités thérapeutiques dans les domaines les plus divers : insecticides, molluscicides, analgésiques (BRUNETON, 1993).

Ce sont des substances douées des potentialités thérapeutiques dans les domaines les plus divers : insecticides, molluscicides, analgésiques (BRUNETON, 1993).

En effet, les plantes à saponosides sont utilisées pour leurs propriétés expectorantes, dépuratives, diurétiques et veinotropes dans les industries pharmaceutiques. Les propriétés détergentes des plantes à saponosides ont été exploitées très précocement par l'homme sur tous les Continents.

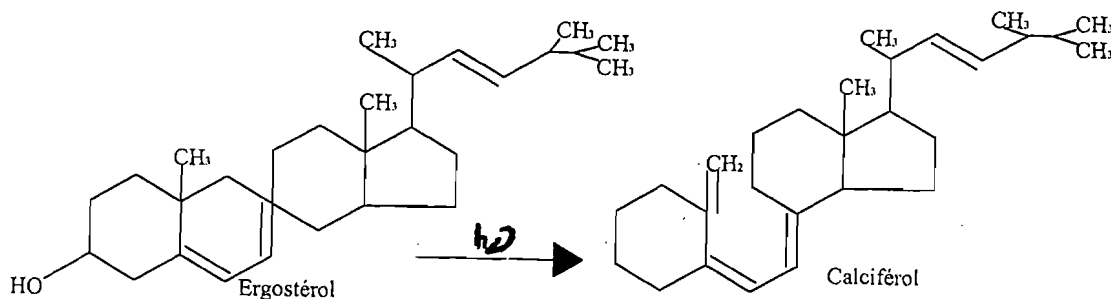
II.2.1.4. Différents types de stéroïdes

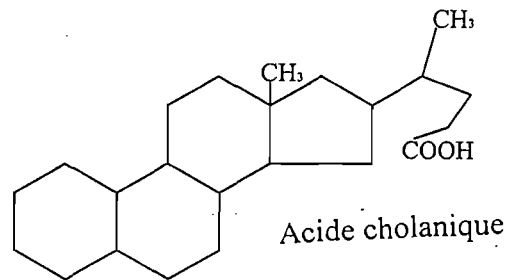
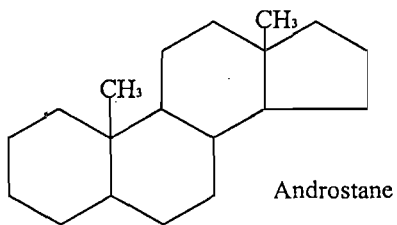
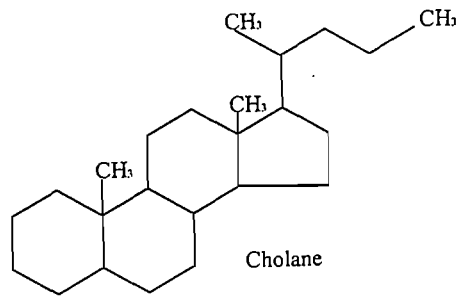
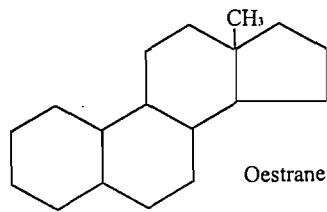
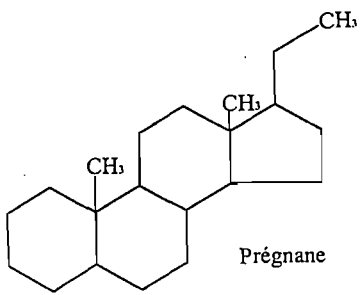
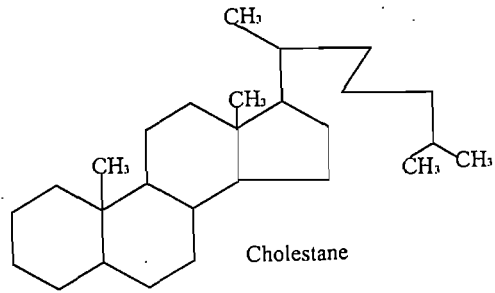
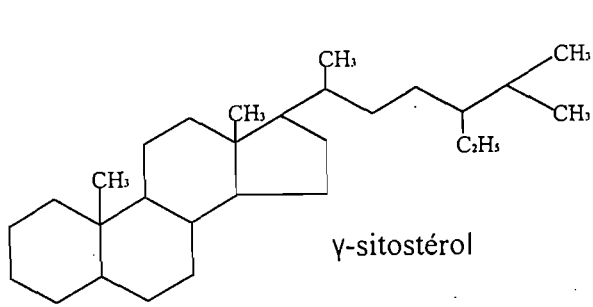
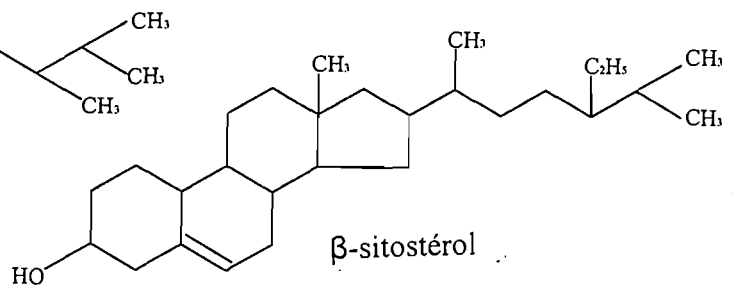
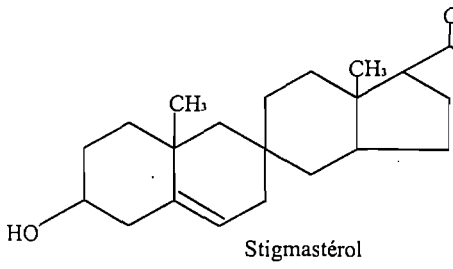
Très répandus dans le règne végétal, les stérols végétaux (phytostérols) sont présents à l'état libre, à l'état d'esters d'acides gras (stérides) ; ou combinés à des sucres sous forme d'hétérosides sans oublier les alcaloïdes stéroïdiques. Le plus étudié est l'ergostérol découvert par Tanret dans l'ergot du seigle, retrouvé ensuite dans la levure (QUILLIERMOND et MANGENOT, 1960). Par action de l'irradiation de la lumière ultraviolette, il donne le calciférol ou vitamine D₂.

D'autres stéroïdes plus répandus chez les végétaux supérieurs sont le stigmasterol, le β - sitostérol et γ -sitostérol.

On a identifié également chez les végétaux des dérivés de prégnone et de l'oestrane dont la constitution s'apparente à certaines hormones stéroïdiques animales ; par contre, on ne connaît pas de dérivés de l'acide cholanique ni de l'androstane qui existe chez l'animal (DEYSSON, 1982).

Formules chimiques des composés ci-haut cités.





On trouve également des stérols chez les animaux (les zoostérols) comme le cholestérol, chez les algues, les levures et les champignons ; Soit à l'état libre, soit à l'état d'esters. D'une façon générale, les stéroïdes peuvent être classés en quatre grandes catégories.

1° Les stérols libres

Ce sont des substances caractérisées par l'existence d'une fonction alcool en C₃, de deux groupes méthyles en C₁₀ et C₁₃, éventuellement de deux doubles liaisons et la présence d'une longue chaîne carbonée aliphatique sur le C₁₇ plus ou moins insaturé et ramifié.

2° Les stérides

Les stérols libres donnent des stérides par estérification de la fonction alcool par les acides gras (QUILLIERMOND et MANGENOT, 1960). Les stéroïdes sous forme d'esters n'ont pas une grande importance en pharmacologie. Ils sont parfois rattachés aux lipides. En général, la quantité de stérides dans un tissu donné est faible par rapport aux stérols libres, le sang fait exception à cette règle (WEIL, 1983).

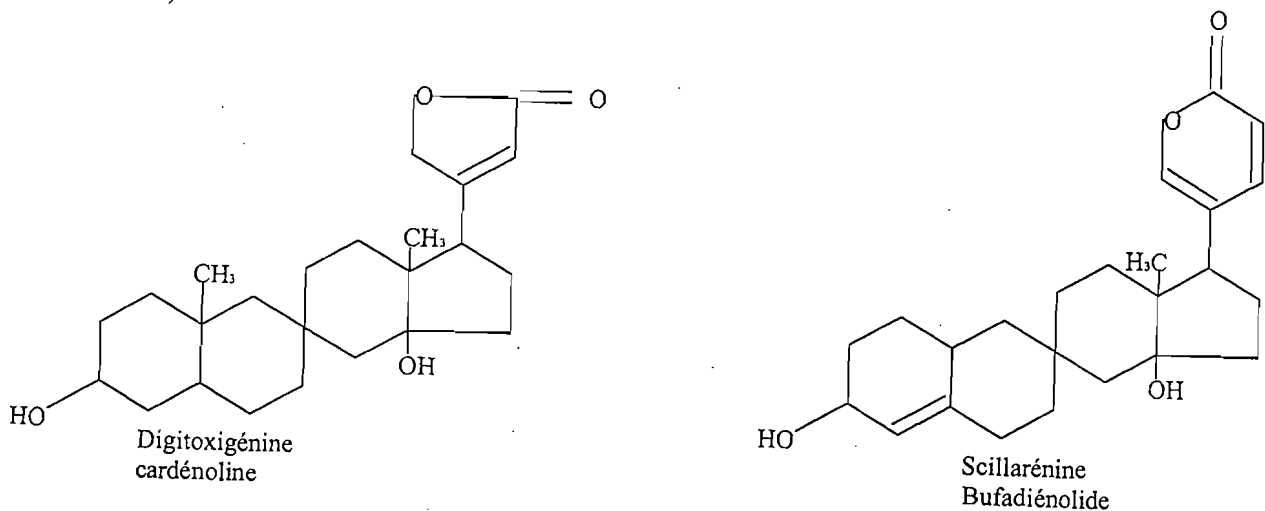
3° Les génines stéroïdiques

Chez les végétaux, certains stéroïdes existent sous forme d'hétérosides, donc liés en position C₃ à un ou plusieurs oses en chaîne (glucoses généralement) et constituent ainsi des génines ou aglycones. Parmi ces dernières, deux grands groupes sont plus importants comme faisant partie de la molécule de principes actifs : il s'agit des génines d'hétérosides cardiotoniques et des sapogénines.

a) Les génines d'hétérosides cardiotoniques

Toutes les génines ont en commun le squelette tétracyclique habituel des stéroïdes. Ces composés possèdent toujours des hydroxyles en position C_3 et C_{14} et un cycle lactonique non saturé, pentagonal ou hexagonal fixé en position C_{17} .

La taille du cycle lactonique permet de distinguer deux groupes de génines : Les cardénoïdes (non dû à la fonction lactonique « olide » et l'activité sur le cœur, qui sont des buténolides en C_{23} , et des bufadiénolides en C_{24} (KLYNE, 1966).

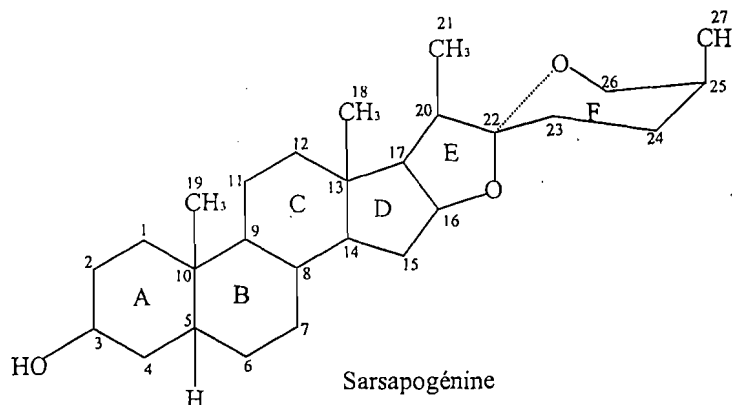


b) Les sapogénines stéroïdiques

Les saponosides à génines stéroïdiques sont les plus nombreux. Toutes les génines chez les saponosides stéroïdiques possèdent un squelette à 27 atomes de carbones pourvus d'une chaîne latérale spirocétalique. Les saponosides sont caractérisés par leur pouvoir moussant en solution aqueuse, leur toxicité pour les animaux à sang froid, leur propriété hémolytique (BRUNETON, 1987 ; KLYNE, 1966).

Dans ce groupe, la chaîne latérale très complexe est toujours fixée en C_{17} comme chez les génines cardiotoniques.

Cette chaîne latérale comprend deux anneaux hétérocycliques, l'un pentagonal, l'autre hexagonal (exemple de cette structure : sarsapogénine) (KLYNE, 1966).



Ces substances sont utilisées comme matières premières pour la synthèse des hormones sexuelles et corticosurréaliennes.

4^o. Les alcaloïdes stéroïdiques

Ils sont représentés par un grand nombre de composés synthétisés par les plantes. Ils dérivent de la molécule de stéroïdes en général par l'introduction de nouvelles fonctions (acide, alcool, amine,.....).

II.2.2. Les terpènes

II.2.2.1. Définition

Les terpènes sont des composés insaturés dont font partie les essences naturelles et les résines. Les terpènes sont généralement dits « carbures terpéniques » avec comme formule générale $(C_5H_8)_n$. Ils peuvent être aliphatiques, monocycliques, bicycliques ou polycycliques.

A ces carbures correspondent des alcools, des aldéhydes, des acides, des cétones, des oxydes. Les terpènes peuvent être considérés comme constitués par des unités en C_5 dérivées de la structure de l'isoprène C_5H_8 .

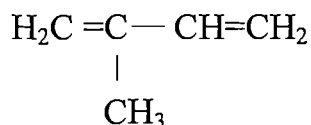
II.2.2.2. Classification

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représentés. Bien que de structures très diverses, ils ont un caractère commun : ils peuvent être virtuellement déconnectés en unités isopréniques.

De ce fait, les hydrocarbures terpéniques peuvent être classés en hémiterpènes C_5H_8 , monoterpènes $C_{10}H_{16}$, sesquiterpènes $C_{15}H_{24}$, di-, tri- et tétraterpènes $(C_{10}H_{16})_n$ avec $n=2,3,4$ et polyterpènes $(C_5H_8)_n$ (WINNACKER et KUCHLER, 1968).

1^o Hémiterpènes

Ils ne comportent qu'une seule unité isoprène (méthyl-2 butadiène-1,3) en C_5 .



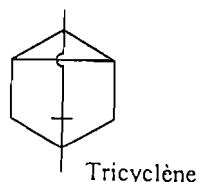
Cette molécule se polymérise pour donner le caoutchouc.

Biologiquement, on peut le considérer comme le maillon originaire des terpènes, des carotènes et des polyterpènes ou polyisoprènes.

2° Les monoterpènes $C_{10}H_{16}$

Les monoterpènes peuvent être classés en acycliques, monocycliques et bicycliques.

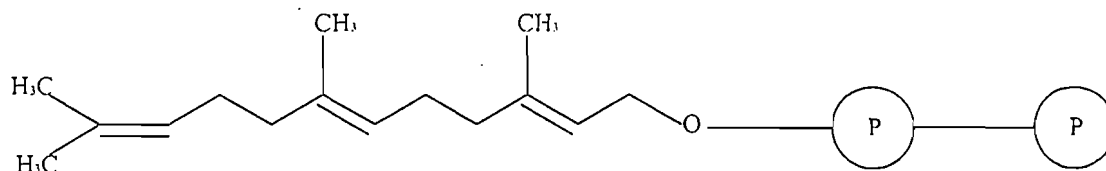
Il existe même un monoterpène tricyclique précisément appelé « tricyclène »



Dans chaque série, on rencontre les produits oxygénés tels qu'alcools, aldéhydes cétones, oxydes, esters. Ils constituent les composants principaux d'un très grand nombre d'huiles essentielles tirées de fleurs, feuilles ou fruits (TEISSEIRE, 1991).

3° Les sesquiterpènes $C_{15}H_{24}$

Dans ces composés, le nombre de cyclisations et de modifications s'accroît comparativement aux monoterpènes ; raison pour laquelle il en existe plus d'un millier issu d'environ une centaine de squelettes. Elles peuvent être déduites et dérivées du pyrophosphate de farnesyl de formule chimique suivante :

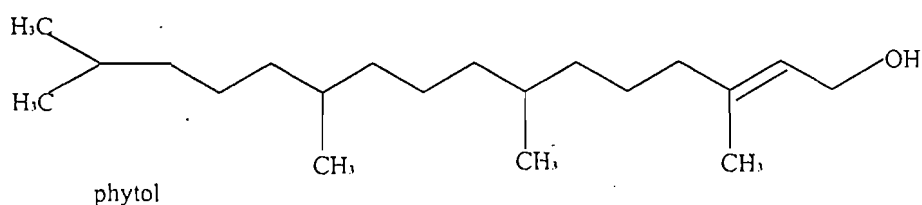


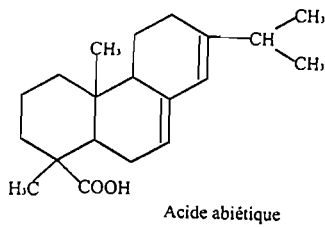
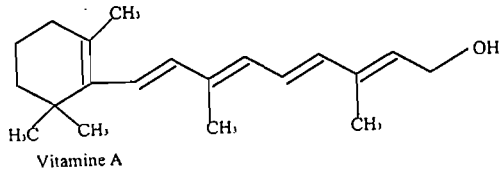
Beaucoup de sesquiterpènes sont des constituants des fractions lourdes des huiles essentielles.

4° Les diterpènes $C_{20}H_{32}$

Les diterpènes forment un vaste ensemble de composés en C_{20} issu du métabolisme du géranylgeranylpyrophosphate (G.G.P.P)

Ils comprennent des dérivés acycliques comme le phytol, des dérivés monocycliques comme la vitamine A, des dérivés bicycliques et, surtout les acides résiniques. L'acide résinique le plus important et le plus répandu, est l'acide abiétique.





5° Les triterpènes $C_{30}H_{48}$

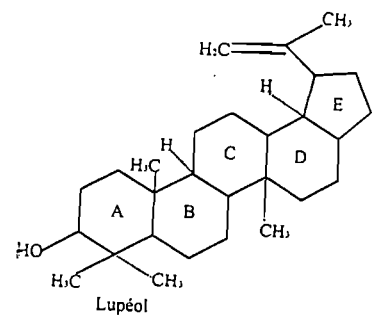
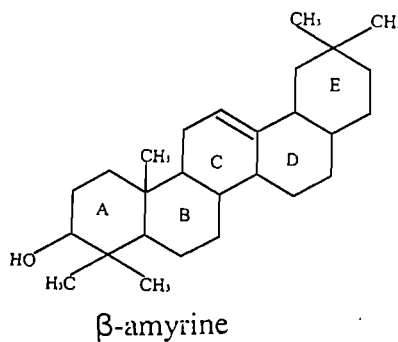
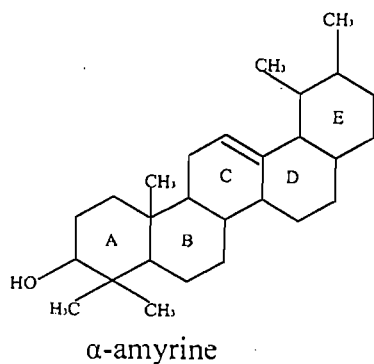
Ce sont des composés en C_{30} issu de la cyclisation du squalène et ayant une structure toujours polycyclique, habituellement tétra ou pentacyclique.

Presque toujours hydroxylés en C_3 , ils présentent contrairement aux autres terpènes, une assez forte unité structurale.

Les triterpènes sont largement répandus dans la nature et surtout dans le règne végétal.

On les trouve à l'état libre (squalène), estérifié ou sous forme hétérosidique (saponosides) (DEYSSON, 1982).

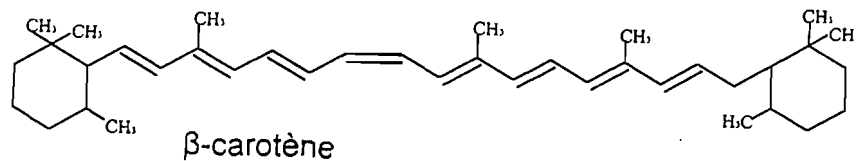
Très fréquents chez les plantes, les triterpènes pentacycliques les plus importants sont généralement divisés en trois groupes, en fonction de leur squelette carboné : le groupe d' α -amyrine, de β -amyrine et celui du lupéol.



6° Les tétraterpènes $C_{40}H_{64}$

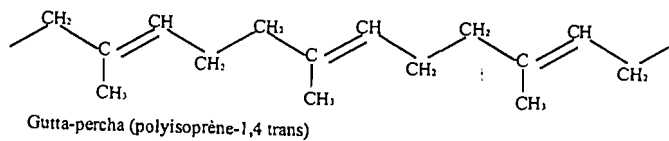
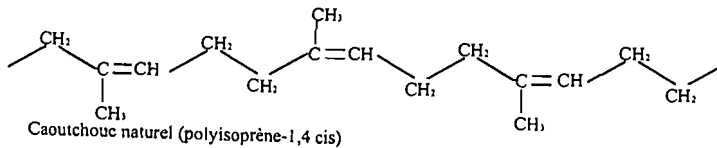
Ce sont des composés en C_{40} formés par l'enchaînement de huit unités isopréniques. Les tétraterpènes les mieux connus sont les carotènes, hydrocarbures colorés et importants du point de vue biochimique ; ils sont très répandus dans les légumes et les graisses animales.

Ces substances contiennent une longue chaîne à doubles liaisons conjuguées responsable de leur couleur. Ce groupe est constitué par les caroténoïdes, les carotènes.

7° Les polyterpènes $(C_5H_8)_n$

Les composés polyterpéniques se rencontrent à l'état naturel sous forme de solide dans le latex.

Ex : Le caoutchouc de masse moléculaire 150.000 environ, la gutta dont la masse moléculaire est de l'ordre de 100.000. Ce sont des macromolécules résultant de la combinaison de plusieurs milliers d'unités isopréniques.



II.2.2.3. Propriétés des terpènes

II.2.2.3.1. Propriétés physiques

Les terpènes peuvent être des liquides aux bas points d'ébullition (essences végétales).

Les terpénoïdes sont solubles dans les alcools de titres élevés, dans les solvants organiques usuels, liposolubles et peu solubles dans l'eau.

Ils sont volatils, odorants et entraînés à la vapeur d'eau.

Ils ont un indice de réfraction élevé et, le plus souvent, sont doués de pouvoir rotatoire.

II.2.2.3.2. Propriétés physiologiques

Les terpènes possèdent diverses activités physiologiques : certains irritent la peau et les muqueuses alors que d'autres sont employés comme rubéfiants.

Les terpènes sont révulsifs, cicatrisants et anti-inflammatoires.

On y trouve aussi des antiseptiques, des vermifuges, des abortifs et des stupéfiants.

CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE

III.1. Préparation préliminaire du matériel végétal

Les extractions et toute manipulation sont faites sur une poudre. Pour l'obtenir, il faut procéder à la récolte, au séchage et au broyage des parties de la plante récoltée.

Les feuilles, parties utilisées dans notre travail, ont été récoltées au mois de février 2004 dans la zone Kinindo en mairie de Bujumbura.

Aussitôt récoltées, les feuilles de *Cassia alata* ont été séchées sur la paille et à l'air libre dans le laboratoire du CRUPHMET (Centre de Recherche Universitaire en Pharmacopée et Médecine Traditionnelle). Ces feuilles étaient de temps en temps retournées et le séchage a duré trois semaines. Elles sont ensuite pilées et réduites en poudre fine à l'aide d'un pilon dans un mortier en bois bien lavé et sec.

La poudre ainsi obtenue, après tamisage, a été conservée dans un flacon bien fermé. C'est sur cette même poudre qu'a porté la suite de la partie expérimentale.

III.2. Le screening phytochimique

III.2.1. Définition

Le screening phytochimique a pour but l'analyse qualitative d'un certain groupe de substances responsables de l'activité physiologique dans l'organisme.

Les substances qui possèdent les propriétés thérapeutiques les plus actives et qui sont faciles à détecter avec un minimum de moyens sont : les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tannins, les saponosides, les stéroïdes, les terpènes, les anthraquinones et les leucoanthocyanes.

III.2.2. Détection des stéroïdes et des terpènes

On les détecte à l'aide de la réaction de Liebermann-Burchard. Cette réaction implique successivement des oxydations par l'anhydride acétique et des déshydratations par l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) ; ce qui aboutit à la formation d'une série de doubles liaisons conjuguées assez importantes pour donner une coloration.

Un gramme de poudre sèche est alors mis à macérer dans 20ml d'éther pendant 24 heures en agitant de temps en temps. Après filtration, quelques gouttes de la solution étherée sont évaporées sur un verre de montre. Le résidu est ensuite dissous dans quelques gouttes d'anhydride acétique. En ajoutant deux gouttes d'acide sulfurique concentré, on obtient une coloration bleue ou verte caractéristique des stéroïdes et des terpènes.

III.2.3. Détection des autres principes actifs

Le screening phytochimique ne peut pas se limiter à la seule détection des stéroïdes et des terpènes. Nous avons également détecté d'autres principes actifs à savoir : les alcaloïdes, les flavonoïdes, les leucoanthocyanes, les saponosides, les tannins ainsi que les anthraquinones. Les modes opératoires sont consignés dans l'annexe 1.

Les résultats du screening phytochimique sont présentés dans le tableau n° 1.

Tableau n° 1 : Résultat du screening phytochimique des feuilles de *Cassia alata*

Principes actifs	Résultats du test	
1. Stéroïdes et terpènes	++	
2. Alcaloïdes	Réactif	
	Dragendorff	-
	Wagner	-
	Mayer	-
3. Flavonoïdes	+	
4. Leucoanthocyanes	-	
5. Saponosides	-	
6. Tannins	+++	
7. Quinones	-	

Barème utilisé

- : Absence du principe actif
- + : Présence du principe actif en faible quantité
- ++ : Présence du principe actif en quantité moyenne
- +++ : Présence du principe actif en très grande quantité

Quelques observations sur les résultats du screening phytochimique

Le tableau n°1 nous montre que les feuilles de *Cassia alata* contiennent une quantité consistante de tannins et une quantité moyenne de stéroïdes et de terpènes. D'autres principes actifs présents sont les flavonoïdes sous forme de traces. Par contre, nous constatons une absence totale des alcaloïdes, des quinones, des saponosides et des leucoanthocyanes.

Les études antérieures dont les résultats ont été collectés par le bulletin semestriel du Centre National de Médecine Traditionnelle du Mali stipulent ce qui suit :

« ...Les analyses préliminaires ont mis en évidence la présence de flavonoïdes, de coumarines, de tannins catéchiques et de dérivés anthracéniques dans les feuilles sèches et dans le jus des feuilles fraîches. L'indice de mousse (saponosides) est de 166,6 dans les feuilles sèches et de 250 dans le jus des feuilles fraîches. Les tannins galliques et les alcaloïdes n'ont été trouvés ni dans les feuilles sèches ni dans le jus des feuilles fraîches... ».

Nos résultats ne concordent pas avec ceux trouvés au Mali car nous n'avons pas trouvé ni de saponosides ni de quinones. Cela serait peut être dû à la période de récolte, à l'âge de la plante, à la saison.

III.3. Extraction des stéroïdes et des terpènes

Les résultats du screening phytochimique nous ont renseigné sur la composition chimique de la plante que nous étudions, *Cassia alata*.

L'étude approfondie de la plante portera donc sur sa composition en stéroïdes et terpènes car, les feuilles ont prouvé une quantité non négligeable de stéroïdes et de terpènes.

Cependant, nous rappelons que les feuilles contenaient également une quantité consistante de tannins. Nous nous sommes proposé d'extraire les stéroïdes et les terpènes des feuilles de *Cassia alata*.

Dans notre travail, nous avons utilisé l'extraction au soxhlet parce qu'il présente certains avantages: le solvant condensé s'accumule dans un réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute.

Mode opératoire

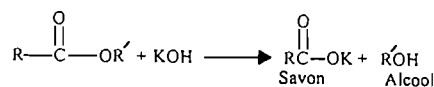
A l'aide d'un appareil à extraction continue (extracteur au soxhlet), 30g de poudre sont mis dans une cartouche et placés dans l'appareil de soxhlet. L'extraction est effectuée avec l'éther.

Après extraction, l'extrait en résultant est évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. Celui-ci permet d'obtenir le résidu et de récupérer le solvant utilisé (éther) qu'on pourra réutiliser dans une autre opération. Le résidu est ensuite saponifié par une solution alcoolique de KOH 0,5N.

a. Saponification

La saponification d'un ester carboxylique est l'hydrolyse par une base, suivie de la formation d'un sel d'acide gras ou savon (partie saponifiable) et d'un alcool (partie insaponifiable).

La réaction est la suivante :



Pour notre cas, les stéroïdes constituent la partie insaponifiable. Cette saponification est faite à ébullition de la solution alcoolique.

On récupère le résidu de l'évaporation à sec de l'extrait étheré à l'aide d'une solution alcoolique du KOH 0,5N ; la quantité de la solution dépend de celle de la poudre (10ml pour 15g de poudre). Après, on fait un chauffage à reflux pendant une à deux heures (température du bain 78°C).

b. Extraction des stéroïdes et des terpènes

L'éthanol est ensuite évaporé dans un évaporateur rotatif et le résidu est de nouveau dissous dans l'eau distillée chaude (10 à 15ml pour 15g de poudre) ; la solution devient visqueuse et opalescente.

Les stéroïdes et les terpènes sont alors extraits de cette solution avec de l'éther par agitation mécanique dans une ampoule à décanter. L'extraction est répétée trois fois et chaque extrait étheré est récupéré par décantation. Les trois extraits étherés ainsi obtenus sont réunis et concentrés dans un évaporateur rotatif. C'est cet extrait concentré obtenu qu'on a utilisé dans les analyses chromatographiques.

Avant de passer aux analyses chromatographiques, l'extrait obtenu a subi encore une fois un test pour se rassurer de la présence des stéroïdes et des terpènes : il s'agit de la réaction de Liebermann-Burchard.

Lorsqu'on traite une solution chloroformique de stérol par un mélange d'anhydride acétique et de quelques gouttes de H₂SO₄ concentré, il y a apparition d'une coloration violette qui vire au bleu, puis au vert. L'apparition successive de ces colorations nous a confirmé que nous venions d'extraire les stéroïdes et les terpènes.

III.4. Analyse chromatographique

III.4.1. Introduction

Le terme général de chromatographie (du grec « *chrôma* » : couleur et « *graphein* » : écrire) englobe toute une série de techniques reliées par un principe commun : la migration différentielle des substances à séparer à travers une phase solide poreuse (phase fixe), sous l'impulsion d'un fluide vecteur (phase mobile) (BOUNIAS, 1983).

III.4.2. Chromatographie sur couche mince (C.C.M)

1° Définition

La chromatographie sur couche mince (C.C.M) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et celle du solvant (CHAVANNE et al., 1991).

2° Principe de la technique

Un volume déterminé d'extrait à analyser est déposé sur une plaque chromatographique dont la partie basse est ensuite immergée dans un solvant éluant. Celui-ci monte par capillarité le long de la plaque et entraîne les composants de l'extrait à des vitesses différentes (BOUNIAS, 1983).

3° Choix du système éluant

La mobilité chromatographique des composés biochimiques résulte du degré de corrélation entre leur polarité et celle du mélange éluant (BOUNIAS, 1983).

Comme nous avions un mélange dont les constituants n'étaient pas connus, nous avons essayé les systèmes éluants proposés par RANDERATH et d'autres chercheurs pour la chromatographie des stéroïdes sur couche mince. Ce sont ces systèmes qui nous ont guidés dans le choix du meilleur éluant.

Systèmes essayés

- | | |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1. Cyclohexane-acétate d'éthyl | (8 : 2 V/V) |
| 2. Toluène-éthanol | (9 : 1 V/V) |
| 3. n-Hexane-éthanol | (9 : 1 V/V) |
| 4. Cyclohexane-acétate d'éthyl | (9 : 1 V/V) |
| 5. n-Hexane-acétate d'éthyl | (9 : 1 V/V) |
| 6. Chloroforme-acétone | (7 : 3 V/V) |
| 7. Toluène-méthanol | (8,5 : 1,5 V/V) |
| 8. Toluène-éther de pétrole-méthanol | (5 : 4 : 1 V/V) |
| 9. Toluène-éther diéthylique-méthanol | (5 : 4 : 1 V/V) |

Parmi tous ces systèmes, le système de solvant qui fractionnait mieux notre échantillon était : **Toluène-éther diéthylique-méthanol (5 : 4 : 1 V/V)**

4° Dépôt de l'échantillon et développement

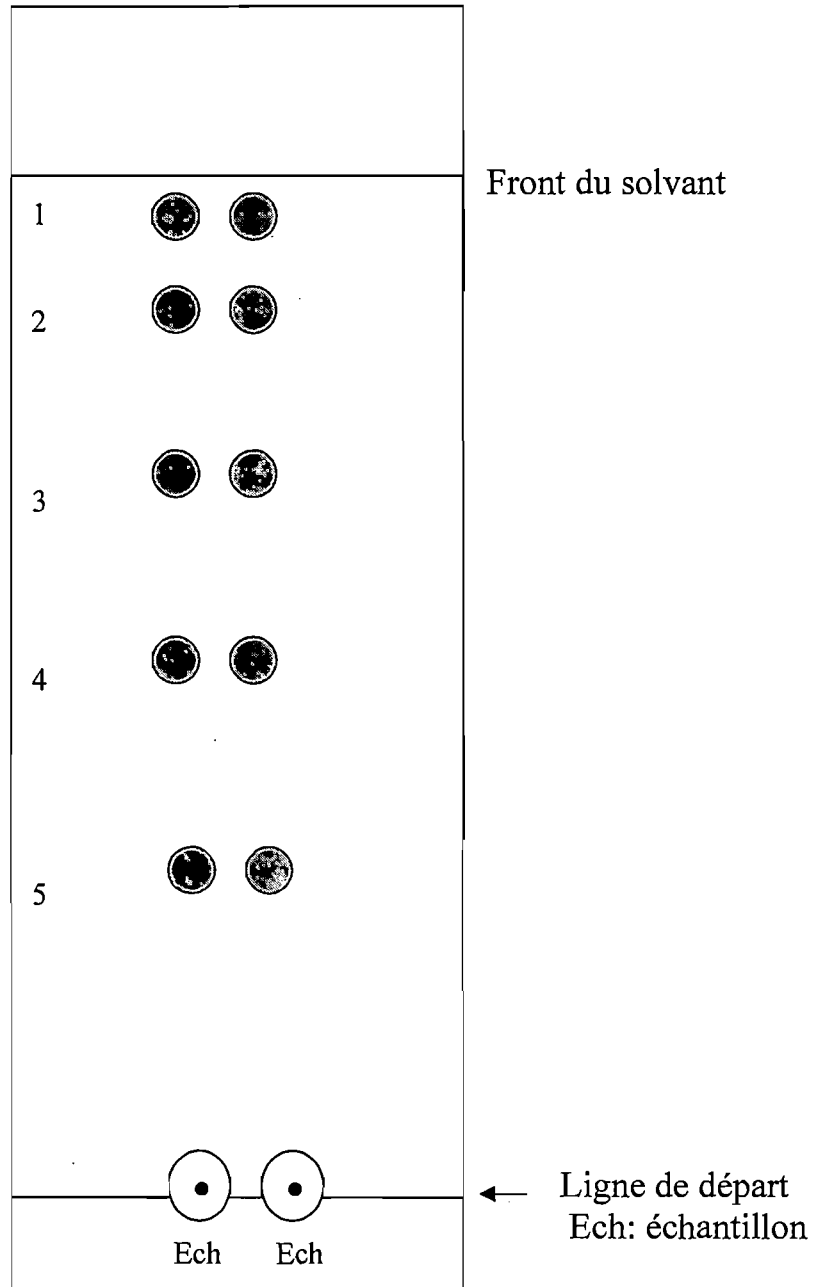
La chromatographie sur couche mince s'effectue de manière descendante, radiale ou ascendante. Pour le présent travail, il a été exploité le procédé de la chromatographie ascendante.

Le système de solvants est introduit au fond de la cuve chromatographique au moins deux heures avant l'introduction de la plaque en vue de la saturation de l'atmosphère interne en vapeurs de solvants. Après activation de la plaque dans une étuve à 110°C pendant 30 minutes, l'échantillon est déposé, à l'aide d'une micropipette, sur une ligne tracée à 2cm du bord inférieur de la plaque.

Après évaporation complète du solvant contenant la substance à analyser, nous avons placé la plaque dans la cuve de développement dans laquelle nous avons introduit le système de solvant. Lorsque le système de solvant aura parcouru une distance de 15cm à partir de la ligne de départ, la plaque est retirée de la cuve puis séchée à l'air libre.

La figure suivante nous montre le chromatogramme de l'extrait brut dans le système : **Toluène-éther diéthylique-méthanol (5 : 4 : 1 V/V)**

**Figure n°3 : Chromatogramme de l'extrait brut dans le système :
Toluène-éther diéthylique-méthanol (5 : 4 : 1 V/V)**



L'analyse du chromatogramme obtenu à la lumière du jour nous a révélé cinq taches.

Le tableau suivant nous montre les résultats du chromatogramme de l'extrait brut dans le système: Toluène-éther diéthylique-méthanol (5 : 4 : 1V/V).

Tableau n° 2 : Valeurs de R_f et couleurs des spots du chromatogramme de l'extrait brut dans le système : Toluène-éther diéthylique-méthanol (5 : 4 : 1 V/V)

Numéro du spot	Couleur de la tache	Distance parcourue par la substance (cm)	Front (cm)	R_f
1	Orange	14,3	15	0,95
2	Jaune foncé	12	15	0,80
3	Jaune clair	8,5	15	0,53
4	Jaune verdâtre	6,4	15	0,42
5	Jaune clair	4	15	0,26

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

5° Révélation

Dans notre travail, nous avons fait recours au réactif à l'acide phosphorique pour rechercher le noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène des stéroïdes.

Sur le chromatogramme précédent, la révélation au réactif à l'acide phosphorique nous a montré que les taches dont les $R_f = 0,95$ et $0,42$ viraient respectivement de l'orange et du jaune verdâtre au bleu.

Ceci nous a conduit à confirmer que l'extrait brut contient les stéroïdes et les terpènes. Par après, nous avons soumis notre échantillon à la chromatographie sur colonne.

III.4.3. La chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne permet comme toute chromatographie la séparation d'un mélange en ses différents constituants. Pour cette technique, la phase stationnaire est contenue dans une colonne cylindrique en verre (CHAVANNE et al., 1991).

1° Description de la colonne

La colonne chromatographique est en général un tube cylindrique vertical en verre dont la longueur peut varier de quelques centimètres à un mètre et parfois plus.

Le diamètre moyen est voisin du quinzième de la hauteur et la partie inférieure est obturée par une plaque en verre fritté ou par un tampon de laine de verre.

Dans notre travail, nous avons utilisé une burette graduée de 100ml, de 65cm de hauteur et 2cm de diamètre.

2° Remplissage de la colonne

L'opération la plus délicate en chromatographie sur colonne est son remplissage qui doit être le plus homogène et totalement exempt de toute bulle d'air, les surfaces inférieure et supérieure de l'adsorbant doivent être parfaitement horizontales.

La colonne préalablement préparée est disposée verticalement au moyen d'un statif. On procède alors à son remplissage.

Le remplissage se fait soit :

- par voie sèche
- par voie humide.

Dans le présent travail, nous avons utilisé le remplissage par voie humide. Nous avons d'abord introduit dans une burette un tampon d'ouate suivi d'une petite couche de sable de mer. Ensuite, nous avons préparé dans un bécher un mélange homogénéisé de l'adsorbant (silicagel) et du système éluant (**Toluène-éther diéthylique-méthanol (5 : 4 : 1 V/V)**).

Ce mélange doit former une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement.

La bouillie ainsi obtenue est versée dans une colonne à l'aide d'un entonnoir. Pendant l'addition, on frappe continuellement sur les parois de la colonne pour favoriser le tassement maximum. On ouvre alors le robinet pour que le solvant coule lentement et on poursuit l'addition de la bouillie homogénéisée par portions successives, tout en frappant les parois de la colonne. Pendant l'opération, on doit veiller à ce que le niveau du solvant soit toujours supérieur à celui de l'adsorbant (CHAVANNE et al., 1991).

Quand l'adsorbant (silicagel) est bien tassé, on introduit une autre petite couche de sable de mer en maintenant une certaine quantité de liquide au-dessus de sa surface.

3° Introduction de l'échantillon et le développement

Nous avons laissé d'abord couler le système éluant jusqu'à dépasser la couche supérieure de sable. Nous avons introduit alors une petite quantité de l'échantillon à analyser dans la colonne. Quand l'échantillon a pénétré à travers le sable et atteint le silicagel, nous avons versé le système éluant par petites portions et à quelques reprises.

Ensuite, à l'aide d'un entonnoir, l'éluant a été continuellement versé et maintenu de préférence au même niveau, ceci pour garder une pression constante et avoir une bonne migration mais aussi pour éviter la fragmentation du silicagel. Le débit du robinet étant constant, nous avons alors recueilli 23 fractions avec le système : **Toluène-éther diéthylique-méthanol (5 : 4 : 1 V/V)**

III.4.4. Analyse des fractions recueillies

L'analyse des fractions recueillies a été vérifiée à l'aide de deux tests. Premièrement, nous avons eu recours à la réaction de Liebermann-Burchard. Lorsqu'on traite une solution chloroformique de stérol par un mélange d'anhydride acétique et de deux à trois gouttes de H_2SO_4 concentré, après agitation, il apparaît une coloration violacée fugace virant au bleu puis au vert.

Des 23 fractions recueillies ; 1,2,3,4,15,16,17,18 et 19 répondaient au test positif à la réaction de Liebermann-Burchard. Nous les avons ensuite chromatographié sur couche mince.

En effet, les fractions 1,2,3,4 et les fractions 15,16,17,18 et 19 ont été respectivement mélangées car présentant un même R_f . Ainsi les fractions 1,2,3,4 ont formé le produit p_1 ; les fractions 15, 16, 17, 18,19 ont constitué le produit p_2 .

Deuxièmement, la réaction dont nous nous sommes fortement servi est la révélation des spots à l'aide du réactif à l'acide phosphorique. La révélation au réactif à l'acide phosphorique nous a montré des taches de couleur bleue pour les produits p_1 et p_2 isolés. Ceci nous a amené à conclure que les deux produits p_1 et p_2 pourraient être des stéroïdes ou des triterpènes.

Le tableau suivant nous montre les résultats de coloration des plaques par l'acide phosphorique (H_3PO_4) des produits obtenus par chromatographie sur colonne.

Tableau n°3 : Résultats de coloration des plaques par l'acide phosphorique (H_3PO_4) des produits obtenus par chromatographie sur colonne.

produit	R_f	Coloration avant la réaction de Liebermann-Burchard	Coloration après la réaction de Liebermann-Burchard	Coloration après addition de H_3PO_4
P_1	0,94	Orange	Verte	Bleue
P_2	0,41	Jaune	bleue	bleue

III.4.5. Test de pureté

1. Chromatographie sur couche mince

En chromatographie sur couche mince, un produit est qualifié de produit pur lorsqu'on ne peut pas trouver un solvant ou un système de solvant pouvant le séparer en deux ou plusieurs taches.

Les systèmes essayés sont les suivants :

1. Toluène-éther diéthylique- méthanol (5 :4 :1 V/V)
2. Toluène-éther diéthylique- méthanol (4 :5 :1 V/V)
3. Toluène-éther de pétrole-méthanol (5 :4 :1 V/V)
4. Cyclohexane-acétate d'éthyl (9 :1 V/V)
5. Toluène-éthanol (9 :1 V/V)
6. Toluène-méthanol (8,5 :1,5 V/V)

Le tableau qui suit nous montre les résultats de la chromatographie sur couche mince.

Tableau n° 4 : Résultats de la chromatographie sur couche mince

Systèmes	Produit	Nombre de taches	R _f	Coloration à la lumière du jour	Coloration à l'U.V
1. Toluène-éther diéthylique-méthanol (5 :4 :1 V/V)	P ₁	1	0,94	Orange	Rouge
	P ₂	1	0,41	Jaune	Jaune-orange
2. Toluène-éther diéthylique-méthanol (4 :5 :1 V/V)	P ₁	1	0,95	Orange	Rouge
	P ₂	1	0,42	Jaune	Jaune-orange
3. Toluène-éther de pétrole-méthanol (5 :4 :1 V/V)	P ₁	1	0,94	Orange	Rouge
	P ₂	1	0,40	Jaune	Jaune-orange
4. Cyclohexane-acétate d'éthyl (9 :1 V/V)	P ₁	1	0,93	Orange	Rouge
	P ₂	1	0,38	Jaune	Jaune-orange
5. Toluène-éthanol (9 :1 V/V)	P ₁	1	0,94	Orange	Rouge
	P ₂	1	0,40	Jaune	Jaune-orange
6. Toluène-méthanol (8,5 :1,5 V/V)	P ₁	1	0,95	Orange	Rouge
	P ₂	1	0,41	Jaune	Jaune-orange

Interprétation des résultats du test de pureté par chromatographie sur couche mince

Parmi les six systèmes essayés, aucun d'eux n'a pu scinder nos deux produits en deux ou plusieurs taches. Le fait d'obtenir une seule tache pour tous les systèmes utilisés nous amène à conclure que les deux substances isolées sont probablement pures.

2. Essai de cristallisation

Cette opération exige d'abord le choix du solvant dans lequel elle pourra s'effectuer. Celui-ci doit répondre à certains critères :

- le manque de réaction chimique entre le solvant et la substance à purifier ;
- la solubilité du produit qui doit être élevée dans le solvant chaud et faible dans le solvant froid ;
- la solubilité des impuretés organiques dans le solvant froid; ce qui fait qu'elles restent dans le solvant au moment de la cristallisation ;
- la température d'ébullition du solvant devrait être inférieure au point de fusion du solide (CHAVANNE et al. ,1991).

Pour notre cas, nous avons essayé de former des esters qui pourraient servir à l'identification des stéroïls concernés en utilisant l'acide acétique, mais nous n'avons pas pu avoir des cristaux.

Laissant cet acide, nous avons essayé avec les mauvais solvants des stéroïdes notamment le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyl, le cyclohexane, l'acétone ...mais l'acétone semblait le mieux indiqué par rapport aux autres. Mais, nous avons obtenu une masse huileuse orange pour le produit P₁ et jaune pour le produit P₂, que nous n'avons pas pu séparer du solvant-mère par décantation du fait qu'il ne se déposait pas au fond du flacon.

3. Test de solubilité

Le test de solubilité nous a révélé que les produits P₁ et P₂ sont solubles dans les solvants apolaires (toluène, éther diéthylique, éther de pétrole, chloroforme), faiblement solubles dans les solvants de polarité moyenne (acétate d'éthyl, acétone à chaud, éthanol, méthanol) et pratiquement insolubles dans l'eau.

De ce qui précède, nous pensons que les deux produits isolés sont apolaires. Ceci nous amène à croire que les deux substances isolées pourraient être des stéroïdes et des terpènes étant donné la réaction positive au réactif de Liebermann-Burchard.

CHAPITRE IV. CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS

Notre objectif était d'extraire, d'isoler et de purifier des stéroïdes et des terpènes des feuilles de *Cassia alata*.

Nous avons d'abord procédé à leur détection grâce à la réaction de Liebermann-Burchard qui fait apparaître une coloration verte, ce qui est en accord avec les considérations théoriques.

Le screening phytochimique du tableau n°1 nous a révélé en plus de ceux-ci, la présence de tannins en quantité consistante et des flavonoïdes sous forme de traces. Les alcaloïdes, les quinones (anthraquinones), les saponosides et les leucoanthocyanes n'ont pas été trouvés.

L'extraction des stéroïdes et des terpènes a été faite au moyen de l'appareil de soxhlet avec de l'éther. L'extrait obtenu, concentré dans un évaporateur rotatif a été soumis aux analyses chromatographiques. Grâce à ces dernières, nous avons pu isoler deux produits P₁ et P₂.

Ces produits ont répondu positivement à la réaction de Liebermann-Burchard. La réaction à l'acide phosphorique nous a révélé une coloration bleue pour tous les deux produits isolés. Ceci nous amène à croire que les produits P₁ et P₂ pourraient être des stéroïdes et des terpènes. La rechromatographie sur couche mince des deux produits isolés P₁ et P₂ dans d'autres systèmes que celui utilisé sur la colonne a prouvé que les deux produits pourraient être purs, étant donné qu'aucun des systèmes essayés n'est parvenu à les scinder.

En essayant de former des esters qui pourraient servir à l'identification des stérols concernés en utilisant l'acide acétique, nous n'avons pas pu avoir des cristaux. Laissant cet acide, nous avons tenté avec les mauvais solvants des stéroïdes notamment le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyl, le cyclohexane, l'acétone...mais l'acétone semblait le mieux indiqué par rapport aux autres. Mais, nous avons obtenu une masse huileuse orange pour le produit P₁ et jaune pour le produit P₂.

Le test de solubilité nous a révélé que nos deux produits isolés sont solubles dans les solvants apolaires, peu polaires et pratiquement insolubles dans les solvants polaires.

Notre travail n'a pas été épuisé faute de produits chimiques requis. Pour cela, nous recommandons à nos successeurs de déterminer la teneur de nos deux produits isolés et d'élucider leurs structures moléculaires.

Ceci ne pourra être fait que si les autorités de l'Université du Burundi sur demande des membres du Département de chimie équipent celui-ci en matériel et produits chimiques adéquats.

Le screening phytochimique de *Cassia alata* ayant révélé la présence des stéroïdes et des terpènes, des tannins et des flavonoïdes dans les feuilles; des études ultérieures sur les autres parties de la plante méritent d'être faites. Nous recommandons une étude exhaustive de sa composition en stéroïdes et terpènes en fonction de l'altitude et des saisons de récolte. Aux Botanistes, nous recommandons d'essayer d'inventer le nom vernaculaire en Kirundi de *Cassia alata*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ARNAUD P., 1986: Cours de chimie organique, 16^e édition, Paris, Dunod.
2. AUDIGIE C. et ZONSZAIN F., 1991: Biochimie structurale, Paris, Nouvelle édition, Doin éditeur.
3. BIVUZIMANA P., 1999: Etude phytochimique des feuilles du *Chenopodium opulifolium* (UMUGOMBE) des enceintes de la Faculté des Sciences à l'Université du Burundi : cas des Saponosides, Mémoire, U.B, Bujumbura.
4. BOUNIAS M., 1983 : Analyse biochimique quantitative par Nanochromatographie en couche mince, Paris, Masson.
5. BRUNETON J., 1987: Elément de phytochimie et de pharmacognosie, 1^{ère} édition, Paris, Lavoisier.
6. BRUNETON J., 1993: Pharmacognosie- phytochimie: plantes médicinales, 2^e édition, Paris, Lavoisier.
7. Conseil Africain et Malgache pour l'Enseignement Supérieur, 1976: Médecine traditionnelle et pharmacopée, 2^e colloque, Niamey.
8. CHAPEVILLE F. et CLAUSER H., 1974: Biochimie, Paris, Hermann.
9. CHAVANNE M., JULLIEN A., BEAUDOING J. et FLAMANDE , 1991: Chimie organique expérimentale, 2^{ème} édition, Quebec.
10. COURTOIS J.E. et PERLES R., 1972 : Précis de chimie biologique, Tome II, 2^{ème} édition, Paris VI^e, Masson et Cie, Editeurs.
11. DEYSSON G., 1982 : Physiologie et biologie des plantes vasculaires, 6^{ème} édition, Paris.

12. GAHUNGU J. et NTAMAVUKIRO A., 1993: Contribution à l'étude des possibilités de valorisation des plantes médicinales par extraction des alcaloïdes : cas du *Datura stramonium par tatula*, Mémoire, U.B, Bujumbura.
13. GAHUNGU M., 2003: Screening phytochimique, isolation, essai de caractérisation et d'identification des tannins des feuilles de *Cassia alata* du campus Mutanga de l'Université du Burundi, Mémoire, U.B, Bujumbura.
14. KEITA A., DIARRA N. et DIALLON D., 1993: Santé pour tous, bulletin semestriel du centre national de médecine traditionnelle du Mali, Bamako.
15. KLYNE W., 1966: La Chimie des stéroïdes, Paris, Gauthier-Villards.
16. MORVAN R.G., 1973: Encyclopédie des sciences technologiques, Paris.
17. NDAYIMIRIJE C., 1993: Extraction et essai d'isolation des terpénoïdes et des stéroïdes à partir des feuilles d'*Hibiscus diversifolius*, Mémoire, U.B Bujumbura.
18. NDIHOKUBWAYO G., 1995 : Contribution à la recherche des principes actifs des feuilles d'*Hibiscus diversifolius* : cas des stéroïdes, Mémoire, U.B, Bujumbura.
19. PARIS M. et MOYSE H., 1969 : Abrégé de matière médicale (matières Premières d'origine médicale), 6^e édition, Paris.
20. PARIS R.R. et MOYSE H., 1971 : Précis de matière médicale (Pharmacognosie spéciale), tome III, Paris, Masson et Cie.
21. QUILLIERMOND A. et MANGENOT G., 1960: Précis de biologie végétale, 2^{ème} édition, Paris, Masson et Cie.

22. RANDERATH K., 1971 : Chromatographie sur couche mince, Paris, Gauthier-Villard.
23. ROBERTS J.D. et CASERIO C., 1968 : Chimie organique moderne, Paris, Interreduction.
24. RWANGABO P.C., 1993: La Médecine traditionnelle au Rwanda, édition KARTHALA, Paris.
25. SOFOWORA A., 1996 : Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, édition KARTHALA, Paris.
26. TEISSEIRE P.J., 1991: Chimie des substances odorantes, Paris, Lavoisier.
27. VERNIN G., 1970: La chromatographie en couche mince, techniques et applications en chimie organique, Paris, Dunod.
28. WEIL J.H., 1983: Biochimie générale, 2^{ème} édition, Paris, Masson.
29. WINNACKER K. et KUCHER L., 1966-1968: Traité de chimie appliquée : Chimie organique, Tome XVI, Paris, Eyrolles.

Annexe 1 : MODES OPERATOIRES UTILISES POUR LA DETECTION DES PRINCIPES ACTIFS

1. Détection des alcaloïdes

On fait une macération chlorhydrique de la poudre de la partie à analyser (1g dans 10 ml de HCl 5%). On filtre et on ajoute quelques gouttes des réactifs de Mayer, Dragendorff et de Wagner sur le filtrat. L'apparition d'un précipité indique la présence d'alcaloïdes.

Test de confirmation

Ce test consiste à alcaliniser le filtrat de la macération précédente avec NH_4OH et extraire avec le Chloroforme. Le résidu est ensuite dissout dans du HCl à 5% et on confirme les alcaloïdes tertiaires par les réactifs cités précédemment.

Une acidification de la phase alcaline (obtenue après extraction au chloroforme) à pH_5 permet de confirmer les alcaloïdes quaternaires par les mêmes réactifs.

2. Recherche des quinones : réaction de Bornträger

On humecte 2g de poudre avec une solution de HCl 10%. On laisse ensuite macérer pendant 24h dans 5ml d'un mélange CHCl_3 et d'éther (4 :1 V/V). On filtre et on traite 1 ml du filtrat avec 1ml de NaOH 10%

Une coloration rouge ou violette signale la présence des quinones.

3. Recherche des saponosides

On les caractérise en mesurant la hauteur de la mousse persistante 20 minutes après une agitation pendant 10 secondes de 10 ml de l'infusé à 5% de l'eau dans un tube à essai.

4. Recherche des flavonoïdes : Méthode de Willstätter

A 5g de la poudre sèche, on ajoute 50ml d'eau bouillante. On laisse infuser pendant quelques minutes et on filtre. A 3ml du filtrat, on ajoute 3ml du mélange HCl, CH_3OH , 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 flavonones.

5. Recherche des stéroïdes et des terpènes

Méthode de Lieberman-Burchard : un gramme de poudre sèche est mis à macérer dans 20ml d'éther pendant 24 heures en agitant de temps en temps. Après filtration, quelques gouttes de la solution étherée sont évaporées sur une plaque. Le résidu est ensuite dissout dans 2 gouttes d'anhydride acétique. L'addition de 2 ou 3 gouttes d'acide sulfurique concentré produit en présence des stéroïdes-terpènes une coloration bleue ou verte.

6. Recherche de 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.

Annexe 2 : MODES OPERATOIRES DE PREPARATION DE QUELQUES REACTIFS

1. Réactif de Mayer

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

2. Réactif de Dragendorff

-Solution A : 0,85g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ + 40ml d'eau + 10ml de CH_3COOH .

-Solution B : 8g de KI + 20ml d'eau.

Mélanger les deux.

3. Réactif de Wagner

2g d' I_2 et 6g de KI sont dissous dans 10 ml d'eau.

Annexe 3 : PREPARATION DES REACTIFS DE REVELATION DES STEROIDES

1. Réactif à l'acide phosphorique

On dilue un volume de H_3PO_4 ($d=1,70$) avec un volume d'eau. On en pulvérise sur les plaques jusqu'à ce qu'elles deviennent transparentes, puis on les chauffe 10 à 20 minutes à $120^\circ C$.

Les stéroïdes non-saturés sont reconnaissables à la lumière ordinaire sous forme de taches bleues ; Si après le traitement à l'acide phosphorique, on chauffe la plaque pendant 10 minutes et que, pendant qu'elle est encore chaude, on pulvérise sur elle une solution fraîchement préparée de 1,5g d'acide phosphomolybdique dans 100ml d'éthanol, en chauffant de 2 à 5 minutes les couleurs se renforcent.

2. Réactif à l'anisaldéhyde sulfurique

Mélanger 0.5ml d'anisaldéhydes avec 10ml d'acide acétique glacial.

Ajouter à ce mélange 85ml de méthanol et 5ml d'acide sulfurique concentré. Cet ordre doit être impérativement suivi.

Pulvériser la plaque. Après chauffage pendant 5-6 minutes à $110^\circ C$, on voit apparaître des taches bleues, rouges ou pourpres.

3. Réactif de Morine

On pulvérise une solution de morine 0,005-0,01% dans le méthanol, on chauffe quelques instants pour sécher et l'on examine immédiatement la plaque sous UV (environ $365 \mu_m$). La plupart des stéroïdes apparaissent sous forme de taches jaune-clair sur fond sombre. Quand la solution de morine est trop concentrée, la fluorescence des taches des stéroïdes est masquée par celle du fond. La réaction est assez sensible.

4. Réactif au trichlorure d'antimoine

Préparer 20% de solution de trichlorure d'antimoine dans le chloroforme ou éthanol.

Pulvériser la plaque après chauffage à $110^\circ C$ pendant 5-6 minutes et voir si des taches rouges apparaissent.

5. Réactif à l'acide sulfurique concentré ou acide sulfurique concentré méthanol (1 :1 V/V).

On pulvérise sur les plaques sèches, que l'on chauffe pendant 15 minutes à $110^\circ C$. Les stéroïdes donnent des couleurs en partie caractéristique en lumière et dans l'UV.

6. TTC (Chlorure 2,3,5-triphényl trétrazolium)

On mélange 2 volumes égaux d'une solution de T.T.C à 4% dans le méthanol. On chauffe le chromatogramme encore humide à 80 °C jusqu'à ce qu'il apparaisse des taches rouges.

7. Vanilline-H₃PO₄

Solution de vanilline à 1% dans l'acide phosphorique à 50%, après pulvérisation, chauffage de 10 à 20 minutes à 120 °C.

8. Acide perchlorique

On pulvérise de l'acide perchlorique à 2% puis on chauffe pendant 10 minutes à 120 °C.

9. Pentachlorure d'antimoine

La plaque révélée est chauffée plus ou moins longtemps à 120 °C.