

## I Généralités sur les polyphénols

Les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes sont les trois principaux groupes des métabolites secondaires des plantes. Ils sont connus pour avoir une large gamme des activités physiologiques reliée à la protection contre divers formes de stress environnemental.

Les composés phénoliques sont produits par la voie de phénylpropanoïde et renferment une large gamme de classes chimiques. y compris les acides phénoliques comme les acides benzoïques et hydroxycinnamiques, les flavonoïdes telles que des Flavonols et anthocyanines, stilbènes et lignanes (Manach et al., 2004). Considérant que le rôle structurale des lignines qui sont les polymères complexes formés à partir des acides hydroxycinnamiques simples, est clairement défini dans les plantes, les fonctions d'autres composés phénoliques ne sont pas évidentes (Grace, 2005; Gould et al., 2006). Essentiellement, la voie de phénylpropanoïde est induite en réponse aux contraintes environnementales telles que les rayonnements UV-B nocifs, sécheresse, refroidissant, l'ozone, métaux lourds, l'attaque des microbes pathogènes, blessures ou des insuffisances nutritives (Dixon et Paiva, 1995). Il est évident que les polyphénols peuvent agir comme des antioxydants sous certaines conditions physiologiques et de ce fait protègent les plantes contre le stress oxydatif

(André et al., 2008).

## II Définitions

### II.1 Les composés phénoliques

Le terme polyphénol a été introduit en 1980, en remplacement un terme ancien : tanin végétal « végétale tannin» (Quideau).

Selon Blanc-Chaper-Smith-Swain-Haslam (WBSSH) le terme « polyphénol » devrait être exclusivement attribués aux composés phénoliques Hydroso lubles ayant les masses moléculaires entre 500 à 3000-4000 Da, possédant 12 à 16 groupes d'hydroxyle phénoliques et cinq à sept anneaux aromatiques par masse 1000 moléculaire relative, donnant les réactions phénoliques habituelles telles que la formation des complexes « blue-black » intenses sur le traitement avec du fer des sels, et expression des propriétés spéciales telles que la capacité de précipiter des alcaloïdes et des protéines (Quideau).

## II.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été découverts par Albert Szent- Gyorgyi. Ils constituent un groupe de 6000 composés naturels (Erlund, 2004) qui sont regroupés selon leur structure phénylbenzopyrone. Ils constituent des pigments responsables de la coloration des plantes et sont connus pour leurs activités antioxydantes. Les flavonoïdes se révèlent efficaces pour réduire la perméabilité des vaisseaux sanguins et sont notamment utilisés pour traiter les crises hémorroïdaires et les troubles de la fragilité capillaire (Erlund, 2004).

## III Extraction caractérisation et dosage des composés phénoliques

Les méthodes de séparation, de dosage et d'identification des composés phénoliques fait des progrès spectaculaires au cours de trente dernières années, grâce en particulier à l'utilisation quasi systématique de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et des détecteurs à barrette de diodes permettant l'analyse des spectres d'absorption en Ultraviolet et le couplage de la CLHP avec les techniques physicochimiques modernes (Macheix et al., 2005).

### III.1 Extraction:

La présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour extraire à partir du matériel végétal. Les caractériser chimiquement et les doser, la plupart des phénols simples présents dans la vacuole peuvent aisément être extraits avec des mélanges Méthanol/Eau (80/20. V/V). Il est recommandé de travailler à une température de 0 à 4 °c et d'assurer une protection en ajoutant un agent réducteur comme le métabisulfite de Sodium au milieu d'extraction. Après élimination de l'alcool par évaporation sous vide, il est ensuite nécessaire d'éliminer les pigments chlorophylliens et caroténoïdes (extraction à l'éther de pétrole). Puis en extrayant les composés phénoliques avec un solvant de polarité intermédiaire comme l'acétate d'éthyle. La plupart des phénols se retrouvent dans ce solvant, qu'il est éliminé sous vide à fin de transférer finalement dans le méthanol la fraction phénolique correctement purifiée, qui sera ensuite utilisée pour les analyses qualitatives et quantitatives (Macheix et al., 2005).

## **III.2 Facteurs influençant l'extraction**

### **III.2.1 Nature et état du solide et du soluté**

La nature et l'état physique du soluté ont une importance primordiale et déterminent le mécanisme de transfert de matière. Le soluté contenu dans ces corps est soit un solide, soit un liquide, stable ou non à la chaleur ou à l'atmosphère. Il est réparti ou moins régulièrement à des teneurs variable dans le solide.

Si le solide est dispersé uniformément dans le solide, les parties superficielles sont dissoutes en laissant derrière elles un solide poreux. Le solvant doit ensuite pénétrer cette couche extérieure avant d'atteindre le soluté situé en profondeur le chemin du solvant est rendu de plus en plus difficile, traduisant ainsi une diminution de la vitesse superficielle.

Lorsque la teneur en soluté est importante dans le solide, la structure poreuse peut être détruite par broyage. La dissolution ultérieure de soluté devient plus facile dans les matières végétales (Leybros et Frémeaux, 1990).

### **III.2.2 Nature du solvant**

D'une façon générale, les solvants utilisés doivent être dans la mesure du possible, thermiquement stables, peu chers, non corrosifs, non toxiques, inflammables. Ils doivent être, de plus sélectifs et facilement séparables des constituants entraînés (Cicile, 2002).

### **III.2.3 Température et pression**

La réduction de la pression de marche provoque un abaissement des températures d'ébullition et de condensation. Inversement, toute augmentation de pression amène une élévation de ces températures (Cicile, 2002).

L'élévation de la température permet l'accroissement de la solubilité et de la diffusivité du soluté et la diminution de la viscosité. Elle doit être limitée pour éviter les risques d'extraction des composés nuisibles et la dégradation thermique du soluté (Leybros et Frémeaux, 1990).

## **III.3 Dosage des polyphénols totaux**

L'estimation de la teneur en phénols totaux peut être obtenue par différentes méthodes. En particulier par l'utilisation d'un mélange de phosphomolybdate et de phosphotungstate commercialisée sous la dénomination de réactif de Folin-Ciocalteu (Harbone, 1989). Le caractère réducteur des

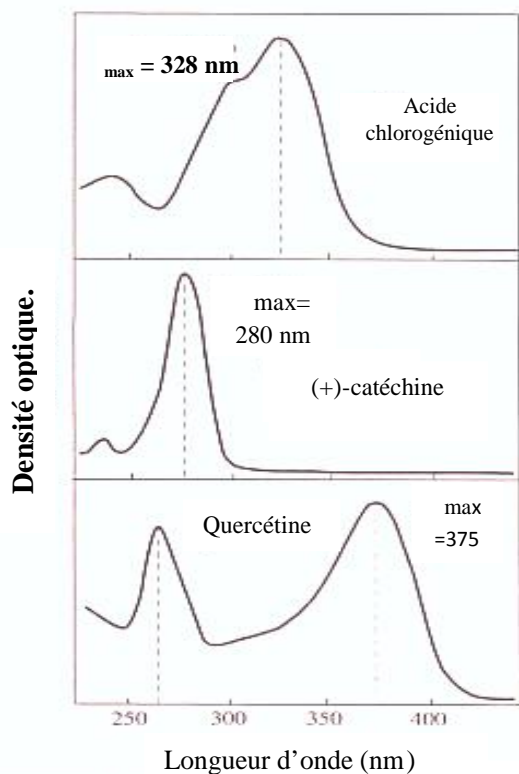
composés phénoliques et leur complexation possible avec les métaux lourds conduisent à la formation de complexes colorés bleus que l'on peut doser par colorimétrie vers 720 nm.

Cette méthode est très sensible mais peu spécifique car beaucoup d'autres composés réducteurs peuvent interférer, comme l'acide ascorbique. Il est donc recommandé de ne l'utiliser, que sur des extraits purifiés et de réaliser des témoins négatifs.

On peut avoir alors une bonne approximation de la teneur de l'extrait en phénols que l'on exprime par rapport à un composé de référence (par exemple en équivalents d'acide gallique ou d'acide chlorogénique). La valeur obtenue n'est pas très satisfaisante car elle est très globale et ne donne aucune indication sur les différents composés présents dans l'échantillon, car chacun d'entre eux peut réagir de manière différente dans la réaction colorée (Macheix et al., 2005).

#### III.4 Caractérisation et dosage des composés phénoliques par leur spectre d'absorption en UV-visible :

Tous les composés phénoliques absorbent en UV et certains d'entre eux (anthocyanes, flavonols, chalcones, aurones,...) absorbent également dans le visible et participent à la coloration des organes végétaux (Figure 1).



**Fig.1** : Spectre d'absorption de l'acide chlorogénique, de la (+)-catéchine et de la quercétine en lumière ultraviolette (Macheix et al.,2009).

Le spectre d'absorption résulte de la présence combinée du (ou des) cycle(s) benzénique (s), des fonctions hydroxyles portées par ce (s) cycle (s) et des différentes doubles liaisons présentes dans la molécule.

D'innombrables travaux ont été consacrés à la détermination du spectre d'absorption des composés phénoliques et à son utilisation pour les caractériser et les doser, dans la mesure où ils ont été préalablement séparés par chromatographie. Le dosage des composés phénoliques utilise fréquemment leur spectre d'absorption en choisissant pour chacun d'eux la longueur d'onde d'absorption maximale. C'est sur ce principe que fonctionnent la plupart des détecteurs qui équipent les appareils de chromatographie (CLHP et CL). La concentration du composé phénolique en solution est déduite en utilisant la classique loi de Beer-Lambert (Macheix et al.2005).

Les variations du spectre d'absorption sont en fonction des modifications chimiques, les caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, teneur en métaux, interférences avec d'autres composés) (Harbone, 1989; Markham, 1998).

### III.5 Séparation des polyphénols par méthodes chromatographiques

Avant l'introduction de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), les séparations chromatographiques sur papier, sur couche mince ou sur colonne avaient été largement développées pour l'analyse des composés phénoliques, ainsi que les séparations par électrophorèse sur papier (Harbone, 1989 ; Van Sumere et Harbone, 1989). Ces techniques gardent encore un certain intérêt pour réaliser une première approche qualitative concernant un matériel végétal inconnu, la combinaison de trois paramètres permet en effet de multiples séparations.

- D'abord la nature des supports chromatographiques (cellulose du papier ou des couches minces, silice, polyamide.....) ensuite celle des solvants d'élution (pH, large gamme de polarité depuis l'eau très polaire jusqu'au benzène fortement apolaire).
- Les propriétés chimiques des composés phénoliques eux-mêmes qui permettent leurs révélations caractéristiques sur les chromatogrammes. En effet, parmi les multiples propriétés des composés phénoliques, certaines ont des applications directes en chromatographie (Ribéreau-Gayon, 1980 ; Geiger, 1985 ; Treutter, 1989; Dai, 1995).

D'une part celles du (ou des) groupement (s) phénolique (s) porté (s) par le cycle benzénique qui a un caractère d'acide très faible conduisent à des phénolates, absorption fluorescence en lumière Ultra-violet permettant un repérage aisé sur les chromatogrammes, oxydation aisée et complexation avec des métaux ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ), permettant également une bonne révélation (réactif de Neu,  $\text{AlCl}_3$ ,

Nitrate d'argent...). Le réactif de Benedikt permet quant à lui de mettre en évidence les O – diphénoles (composés présentant deux fonctions phénols adjacentes).

D'autre part celles liées au cycle benzénique, souvent associées à des réactions colorées permettant de visualiser les composés phénoliques: réaction de nitrosation en présence de nitrite de sodium, formation de sels de diazonium, réaction de condensation avec les aldéhydes, dans ce dernier cas, la vanilline en milieu chlorhydrique réagit avec le noyau A de certains flavanes pour donner des dérivés de couleur rouge utilisé pour la révélation ou le dosage de ces composés. Il en est de même du 4-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA) qui donne une couleur bleue intense avec les flavnols simples et bleu vert avec les formes polymérisées (Treutter, 1989).

### **III.6 Séparations par CLHP et par Electrophorèse capillaire et les couplages CLPH /UV et CLHP/SM**

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est la technique la plus performante et la plus utilisée pour la séparation et le dosage des composés phénoliques comme en témoignant les excellentes séparations déjà obtenues, Il ya plus de vingt ans (Wulf et Nagel, 1978; Moller et Herrmann, 1982). Elle ne demande qu'une faible quantité d'échantillon végétal et permet de combiner en une seule opération rapide et reproductible les analyses quantitatives et qualitatives d'un extrait phénolique complexe, ce qui a permis l'étude de matériels végétaux très variés (Harborne, 1989; Macheix et al., 1990; Markham et Bloor, 1998; Pietta, 1998; Pietta et al., 2003).

Les séparations sont basées sur les polarités respectives des phases stationnaires utilisées du solvant d'élution et des composés phénoliques concernés. Deux approches analytiques sont possibles: d'une part la chromatographie de composés phénoliques non polaires sur une phase stationnaire de silice avec élution par un solvant apolaire, d'autre part, la fixation de ces composés sur une phase dite inversée suivie de leur élution par un mélange de solvants (Sakakibara et al., 2003).

A côté de la CLHP, une autre technique de séparation très performante, des composés phénolique est l'électrophorèse capillaire (EC) développée depuis une dizaine d'années pour ce type de molécules (Tomas-Barberan, 1995) et dont la sensibilité est environ 10 fois supérieure à celle de CLHP (Markham et Bloor, 1998).

En plus de la qualité des séparations obtenues, un des intérêts majeurs de la séparation des polyphénols par CLHP ou EC concerne l'automatisation possible des analyses (Pietta, 1998) qui peuvent être couplées en série d'une part avec la détection et le dosage de chacun des composés en UV et d'autre part avec la spectrométrie de masse qui donne des informations sur leur structure chimique (Duroux et al., 1998; Pietta, 1998; Pietta et al., 2003; Shwinny et Markham, 2003).

### **III.7 Détermination de la structure des composés phénoliques par les méthodes physico – chimiques modernes**

La spectrométrie de masse permet d'apporter la preuve de l'identité des composés phénoliques préalablement séparés par CLHP ou EC en apportant, grâce à la fragmentation de la molécule, des informations sur sa masse moléculaire et sur les principaux groupements chimiques présents ont permis d'analyser les aglycones des flavonoïdes. De nouvelles techniques d'ionisation douces développées depuis quelques années (Pietta, 1998; Kuhine, 2003). La combinaison de ces différentes approches ainsi permis de réaliser, pour de nombreuses plantes médicinales de véritables empreintes chimiques basées sur leurs teneurs en flavonoïdes (Pietta et al., 2003).

La technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil puissant pour la détermination de nouvelles structures phénoliques inconnues (Harborne, 1989; Markham et Bloor, 1998; Swinny et Markham, 2003). Les spectres RMN du proton (H) et du carbone (C) sont généralement obtenus dans des expérimentations séparées, le premier demandant quelques minutes à partir d'une faible quantité de composé préalablement purifié (0,3 mg), le second étant obtenu en plusieurs heures à partir de 1 mg en minimum, en donnant des informations sur l'environnement chimique immédiat de chaque proton H ou de chaque carbone d'une molécule. La RMN permet de préciser les liaisons existant entre ces atomes à l'intérieur d'une molécule (Markham et Bloor, 1998; Swinny et Markham, 2003).