

UNIVERSITE ASSANE SECK DE ZIGUINCHOR



UFR : SCIENCES ET TECHNOLOGIES

DEPARTEMENT : CHIMIE



Mémoire de master

Spécialité : Synthèse Organique et Produits Naturels

Sujet :

ISOLATION ET IDENTIFICATION DES METABOLITES SECONDAIRES DE *VERNONIA COLORATA*

PRESENTE PAR

LAMINE SANO

Soutenu publiquement le 1 juillet 2017 devant le jury composé de :

Président : Mr. Magatte CAMARA	Maître de conférences,	UASZ
Rapporteure : Mme. Anastasie MANGA	Assistante,	UASZ
Examineurs : Mr. Abdoulaye GASSAMA	Maître de conférences,	UASZ
Mr. Saïdou Nourou DIOP	Maître assistant,	UASZ
Directeur de mémoire Mr. MBAYE Diagne MBAYE	Maître assistant,	UASZ

Remerciement

Je remercie Dr Mbaye Diagne Mbaye enseignant chercheur à l'Université Assane SECK de Ziguinchor pour l'encadrement de ce mémoire ainsi que sa participation dans ma formation universitaire.

Je tiens à remercier le Professeur Magatte CAMARA d'avoir accepté de présider ce travail et d'avoir participé à ma formation.

Je remercie le Professeur Abdoulaye GASSAMA pour m'avoir initié dans la recherche scientifique et sa participation dans ma formation universitaire.

Mes remerciements au Dr Anastasie MANGA pour avoir accepté de rapporter ce travail. Je remercie aussi Dr Saïdou Nourou DIOP pour avoir accepté de juger ce mémoire.

Je remercie également le Dr Mohamed CHARAHABIL enseignant chercheur à l'université Assane Seck de Ziguinchor au Département d'Agroforesterie pour sa documentation de l'étude botanique.

Je remercie les Doctorants pour ma formation au laboratoire de chimie sur les techniques d'extraction et de purification des produits naturels de même que Madame Fatoumata MB. SOUMARE CAMARA pour sa disponibilité en cas de besoin de matériels ou de produits au sein du laboratoire.

Je tiens à remercier l'ensemble des enseignants chercheurs qui ont de près ou de loin participé à ma formation universitaire.

A l'endroit de mes camarades de promotion, je garderai pour toujours en souvenir ces moments de vie estudiantine. Je leur dis merci pour les années passées ensemble.

Je ne peux terminer sans remercier toute ma famille. Je remercie également ma famille tutrice à Ziguinchor mon grand frère Bouba SANE et ses deux épouses et leurs enfants.

Je remercie en fin tous mes amis en particulier Mr Abdourahamane Barry et tous ceux qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Listes des figures

Figure 1 : Photo de <i>Vernonia colarata</i>	3.
Figure 2 : Macération.....	7
Figure 3 : Plaque CCM.....	8
Figure 4 : Chromatographie sur colonne.....	9
Figure 5 : Spectre de masse.....	14
Figure 6 : Spectre de carbone	15
Figure 7 : Spectre de DEPT	16
Figure 8 : Spectre de HSQC	17
Figure 9 : Corrélation entre un carbone et un proton $^1J_{C-H}$	17
Figure 10 : Spectre de Proton	18
Figure 11 : Spectre de COSY	19
Figure 12 : Corrélation de proton sur la molécule	20
Figure 13 : Spectre de HMBC	20
Figure 14 : la molécule finale : 1,3 dihydroxypropan-2-yl docos-13-enoate.....	21

RESUME

L'étude de ce mémoire s'est portée sur la plante de *Vernonia colorata* utilisée pour le traitement de plusieurs maladies par la médecine traditionnelle d'où son nom « soigne tout : docteur ».

Ce travail a permis d'isoler et d'identifier des métabolites dans cette plante par des techniques de purification et de spectroscopie.

L'étude s'est portée sur les feuilles de *Vernonia colorata*, qui ont été cueillies au quartier Kandé de Ziguinchor. Des techniques d'extraction telles que la macération, la filtration et l'évaporation ont été réalisées permettant d'avoir un produit brut.

Après l'extraction, des techniques de séparations chromatographiques sur couche mince CCM et sur colonne ont été réalisées pour l'obtention des fractions **mbol1**, **mbol2**, **mbol3** et **mbol4** où des études spectroscopiques ont été effectuées sur ces extraits.

Cependant, l'analyse spectrale ne s'est portée que sur **mbol2** car les autres comportaient les impuretés. Les analyses spectroscopiques telles que la masse, la RMN du proton ^1H et du ^{13}C , le DEPT et la RMN en 2D à savoir le HSQC, le COSY et le HMBC ont permis de montrer la présence de *1,3-dihydroxypropan-2-yl docos-13-énoate* ($\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{O}_4$) dans le **mbol2**.

Mots clés : *Vernonia colorata*, médecine traditionnelle, « soigne tout », spectroscopie, macération, chromatographie.

Abréviations, unités et réactifs

Ac : acétate d'éthyle

CCM : chromatographie sur couche mince

COSY : corrélation spectroscopie moléculaire

cm : centimètre

Cyclo : cyclohexane

DEPT : distorsion enhancement by polarization transfer

g : gramme

HCl : acide chlorhydrique

HMBC : heteronuclear multiple bond corrélation

HSQC : heteronuclear single quantum corrélation.

H₂SO₄ : acide sulfurique

Hu : humidité

L : litre

m : mètre

Mhu : masse des feuilles humide

mL : millilitre

mm : millimètre

Ms : masse des feuilles sèches

RMN : résonance magnétique nucléaire

UV : ultraviolet

Sommaire

INTRODUCTION	7
I. ETUDE BOTANIQUE	9
I – 1) Répartition géographique.....	9
I – 2) Noms vernaculaires	9
I – 3) Description botanique	9
I – 4) Utilisations en médecine traditionnelle.....	10
I – 5) Etudes antérieures	11
II. MATERIERES ET METHODES	12
II – 1) Macération.....	12
II – 2) Chromatographie.....	13
III. RESULTATS ANALYSES ET DISCUSSIONS	19
III-1) Résultats	19
III- 2) Analyses et discussions	19
III-2-a) Spectre de masse.....	13
III-2-b) RMN du ¹³ C.....	14
III-2-c) Spectre de DEPT.....	16
III-2-d) Spectre de HSQC.....	17
III-2-e) RMN ¹ H.....	18
III-2-f) Spectre de COSY.....	19
III-2-g) Spectre de HMBC.....	20
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	28
<u>Références</u>	29
<u>ANNEXE</u>	30

INTRODUCTION

Dans les pays en voie de développement en particulier les pays Africains, la médecine traditionnelle est la source de soins abordables et accessibles pour les personnes aux revenus faibles. Le *Vernonia colorata*, une plante de la sous-région est largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour ses propriétés thérapeutiques. Ces propriétés sont engendrées par certaines familles de molécules qui se trouvent dans les extraits de cette plante¹.

Pour comprendre et contribuer à la valorisation de la médecine et la pharmacopée traditionnelle au Sénégal, nous avons décidé de faire des études sur des molécules présentes dans les extraits des feuilles de cette plante. Pour ce faire nous avons effectué d'abord des extractions des feuilles de la plante avec des solvants de polarités croissantes, ensuite nous avons séparé les molécules présentes dans les extraits et enfin nous avons caractérisé les molécules présentes dans ces extraits.

L'objectif de notre travail est d'isoler et d'identifier les métabolites dans cette plante par des techniques de séparation et d'analyse spectroscopique.

Notre travail s'articulera sur trois grandes parties.

Dans la première partie, nous ferons une étude botanique de la plante de *Vernonia colorata*.

La seconde partie développera les matériels et méthodes utilisées.

Enfin nous conclurons en retraçant l'essentiel de nos résultats, analyses et discussions

I. ETUDE BOTANIQUE

Vernonia colorata est un arbuste de taille moyenne qui appartient à la famille des Asteraceae².



Feuilles et tiges



Fleurs de Vernonia colorata

Figure 1: photo de *Vernonia colorata*

I – 1) Répartition géographique

Cette espèce de Vernonia est surtout rencontrée en Afrique, dans les pays comme le Sénégal, la Gambie, la Guinée Biseau, la Guinée, la Sierra Leone, le Nigeria, le Mali, la Cote d'ivoire, le Benin, etc. Au Sénégal, elle pousse dans les sols frais de la Basse Casamance mais également près de la zone des Niayes aux alentours de la région de Dakar.

Aujourd'hui cette plante est domestiquée presque dans tous les foyers Sénégalais pour ses propriétés thérapeutiques²

I – 2) Noms vernaculaires²

Le *Vernonia colorata* a différente appellation selon les ethnies.

On l'appelle chez les Bambaras : Kosafiné, chez les peuls : Kosufana, chez les Wolofs : Zidor, chez les Mandingues : Bataraburure, chez les Sérère : Mam et Butahat chez les Diolas.

I – 3) Description botanique

Le *Vernonia colorata* est un arbuste de 3 à 4 m de haut. Il possède de nombreuses branches dressées dans tous les sens. Ses tiges ont des bois très tendre et de couleur blanche dont les moelles développées et les rameaux couverts d'un pubescent beige lorsqu'ils sont jeunes. Les feuilles ont une forme ovale pouvant atteindre 15 cm de long et 10 cm de large. Elles sont alternées tout le long des branches. Les feuilles et les rameaux sont recouvertes de poils fins

(elles sont pubescentes). Leurs pétioles sont visibles et pouvant atteindre 20 mm de long. Ils sont également pubescents².

Les fleurs sont blanchâtres et les akènes sont longs de 3 mm surmontés de soies simples sous forme de barbelés

I – 4) Utilisations en médecine traditionnelle

Au Sénégal l'utilisation de cette plante diffère selon les milieux, les ethnies,

Par exemple les Sérères les soumettent aux malades, sujets aux syncopes ou aux crises épileptiformes aux inhalations du décocté bouillant de feuilles et d'inflorescences, ce même décocté sert également en friction corporelles pour les éruptions cutanées de toutes origines et toutes natures³.

Chez les Peuls, le *Vernonia colorata* est utilisé dans le traitement de la bilharziose, la stérilité et la frigidité. La préparation est à base d'écorce de tige et de tronc ou de racine, avec presque toujours des épis de maïs de variété rouge. Pour le traitement des douleurs dentaires, des bains de bouche sont effectués avec l'eau d'ébullition des feuilles³.

L'écorce est aussi employée; elle est écrasée puis mélangée avec une espèce de poivre appelée "Sa" chez les Abbés, puis cette pâte est placée dans la dent atteinte de carie. Elle calme la douleur et permet un dégonflement de la joue en cas d'abcès. Cet acte est répété plusieurs fois jusqu'à l'arrêt de l'inflammation. Le *Vernonia colorata* est utilisé pour guérir l'ictère. L'amertume prononcée de cette drogue le fait passer pour fébrifuge, anti gastralgique, diurétique, purgatif, vomitif. Elle est aussi utilisée dans le traitement des hépatites. Le décocté des feuilles de *Vernonia colorata* est utilisé par les tradipraticiens togolais dans le traitement du diabète².

La décoction est également utilisée après l'accouchement. Les femmes boivent la décoction de feuilles qui est censée affecter le lait et agir comme aide préventive contre les vers qui risqueraient d'être transmis à l'enfant. Les femmes se frottent sur la poitrine pour faciliter le sevrage. La décoction des feuilles est également utilisée pour traiter le paludisme. Le jus des feuilles sert au traitement des affections gastro-intestinales et de la blennorragie.

La plante est utilisée à plusieurs niveaux de la médecine traditionnelle africaine, d'où son nom de « *soigne tout* ».

I – 5) Etudes antérieures

Les études scientifiques menées sur cette espèce ont permis de prouver la présence des sesquiterpènes (les principes amers) dans les extraits de *Vernonia Colorata*. Sous la dénomination de *Vernonia Sénégalensis* on signale dans les racines de l'espèce de l'Ouest africaine la présence d'un alcaloïde ; sous la dénomination de *Vernonia colorata*, des réactions positives ont été trouvées lors de la recherche des alcaloïdes et des saponosides. D'autres études menées par Parlet et Rowson sur l'espèce de Nigeria, prouvent la présence dans les extraits des glucosides à action cardiaque⁴.

Les acides aminés ont été aussi identifiés dans les feuilles de *Vernonia colorata*, dont :

- deux (2) sous formes libres : leucine et isoleucine
- onze (11) sous formes liés : acide aspartique, thréonine, proline, acide glutamiques, glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phénylalanine⁵.

La partie aérienne (fleurs) contient des huiles essentielles⁵.

Les graines de *Vernonia colorata* contiennent des huiles (3,1%) dont 45% d'insaponifiable ; les compositions des glycérides en acides gras sont respectivement 12% d'acide oléique, 15% d'acide linoléique et 28% d'acide gras oxydes³.

Toubiana a extrait en 1969 deux composés cristallisés l'hydroxyvernolide $C_{19}H_{22}O_8$ et le vernolide $C_{19}H_{22}O_7$ ⁶

Des études cliniques ont montré que la toxicité de *vernonia Colorata* pour la souris est 100% mortelle pour une dose de 10g/kg. Par contre pour une dose peu élevée par voie intraveineuse de la toxicité du principe amer sur des chiens, on observe la baisse de la tension.

La toxicité a des effets suivant le poids. La souris étant très petite elle meurt immédiatement. Le chien étant plus gros que la souris il ne meurt pas mais on observe une baisse progressive de la tension : le principe amer se montre hypotenseur. Le test mené sur des extraits de feuilles, de racines et de tiges a permis de prouver que cette plante possède des principes actifs capables d'augmenter le rythme cardiaque des crapauds².

Des travaux antérieurs ont montré que l'extrait acétonique de feuilles de *vernonia colorata* entraîne un effet hypoglycémiant chez des rats normo glycémiques et anti-hypoglycémiant sur un test de tolérance au glucose et chez des rats diabétiques de type 2⁷.

II. MATERIELES ET METHODES

Différentes expériences menées au laboratoire nous ont permis d'obtenir des produits qui ont été analysés. Ces produits ont été obtenus après récolte des feuilles qui sont ensuite lavées et séchées à l'abri de la lumière puis broyées et réduites en poudre. Les méthodes utilisées en laboratoire furent la macération, la chromatographie sur couche mince et la chromatographie sur colonne.

II – 1) Macération

Pour effectuer la macération, nous avons commencé d'abord à faire un échantillonnage des feuilles de *Vernonia colorata* qui ont été récoltées dans le quartier Kandé. Les feuilles sont détachées de leurs tiges puis pesées pour avoir les masses des feuilles humides.

Par la suite, les feuilles sont séchées à l'intérieur du laboratoire sous les placards à l'abri de toute lumière et humidité. Le séchage du *Vernonia colorata* a duré 28 jours.

A la fin du séchage les échantillons sont récupérés puis pesés pour avoir la masse des feuilles sèches. Les données obtenues sont :

Vernonia colorata Mhu= 334,28 g

Vernonia colorata Ms = 161,17 g

Ainsi avec la formule suivante nous avons déterminé le taux d'humidité dans les échantillons.

$$Hu = \frac{Mhu - Ms}{Mhu} \times 100$$

Le résultat est le suivant :

Le taux d'humidité du *Vernonia colorata* est 51 %. L'humidité étant supérieure à 50% ce qui veut dire que les feuilles étaient suffisamment sèches pour être bien pilée et avoir une bonne conservation de la poudre. Cependant pour obtenir les poudres qui sont utilisées dans l'extraction, le matériel ci-dessous est utilisé.

Le broyage a été fait à l'aide d'un mortier et d'un pilon après les avoir bien lavés et séchés. Le tamis a permis d'avoir des poudres avec des grains plus fins (de bonne qualité) puis stockées dans des flacons.

En effet, 100 g de ce produit sont mis dans un ballon de 3000 ml avec 500 ml de méthanol pendant 24h pour être macérer. Le mélange est filtré et le filtrat récupéré est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le produit obtenu après évaporation est séché sous la hotte.

Le même protocole est repris avec l'éther de pétrole.



Figure 2 : macération

II – 2) Chromatographie

C'est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à séparer vis-à-vis des deux phases, l'une stationnaire ou fixe et l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, le principe est basé sur la différence d'affinité d'un composé entre une phase mobile et une phase stationnaire sous l'influence de deux effets antagonistes : effet d'entraînement exercé par la phase mobile et l'effet de rétention exercé par la phase stationnaire

- **Phase stationnaire** : phase fixe soit sur la surface intérieure d'une colonne soit sur une surface plane (plaque CCM).
- **Phase mobile** : phase qui se déplace à travers la phase stationnaire en entraînant les composés. La phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire mais uniquement avec les composés.

Il existe de nombreux types de chromatographie que nous pouvons classer selon la nature de la phase mobile, selon les interactions développées par la phase stationnaire ou selon le support de la phase stationnaire⁸.

➤ Chromatographie sur couche mince (CCM)

Après extraction, toutes les fractions obtenues sont soumises à un test de séparation par CCM. Le principe est de partir d'un solvant moins polaire à un solvant plus polaire. Nous avons réalisé

une chromatographie sur couche mince (CCM) qui nous a permis de voir quelles proportions d'éluant utiliser pour la chromatographie sur colonne en jouant sur le rapport Pentane/Acétate d'éthyle. Tout au long de la chromatographie sur colonne, nous n'avons utilisé que ces deux solvants comme éluant.

L'éluant est préparé dans une éprouvette de 10 ml. Il est rempli jusqu'à 9,7 ; 9,5 et 9 ml avec du Pentane et l'Acétate d'éthyle complète. Ce mélange est aussitôt déversé dans un bécher puis fermé. Après préparation de l'éluant une plaque de CCM de dimensions 3 et 6 cm est délimitée. Un trait est tracé à 1 cm de chaque extrémité inférieure et supérieure et sur un des traits trois croix distants d'environ de 0,7 cm sont marqués avec des références (figure 2).

En utilisant des micropipettes quelques microlitres de chaque extrait sont déposés sur sa croix de référence. Comme nous avons travaillé sur deux extraits, une plaque est utilisée pour chaque extraction.

La plaque CCM est introduite judicieusement dans le bécher contenant l'éluant. Elle y est déposée de sorte que les croix se trouvent au fond du bécher et que les spots ne soient pas mouillés juste au moment du dépôt. Juste après le dépôt, le bécher est refermé et c'est le début de la séparation. Cette élution est arrêtée lorsque le solvant arrive au deuxième trait (en haut) et la plaque est retirée du bécher. Elle est ensuite séchée à l'air libre en encerclant toutes les taches visibles (figure 3).

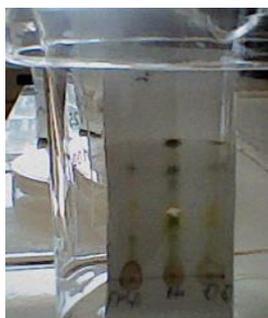


Figure 3 : plaque CCM

Pour visualiser les différentes taches, nous avons commencé par placer la plaque sous une lampe UV à 254 nm. La plaque apparaît en vert fluorescent et les produits qui absorbent les UV apparaissent sous forme de taches sombres. Cette méthode de détection est très utilisée en priorité car elle n'endommage pas la plaque. Comme la lampe UV ne révèle pas toutes les molécules, la plaque par la suite est pulvérisée avec le H_2SO_4 dans une hotte. Cependant, il

existe de nombreux autres révélateurs. La plaque est chauffée avec un sèche-cheveux et les nouvelles taches colorées qui apparaissent sont encerclées.

Après avoir trouvé les bons rapports d'éluant, Pentane/Acétate d'éthyle 9,7/0,3, 9,5/0,5 et en fin 9/1, nous nous sommes lancés à la chromatographie sur colonne qui consiste à séparer les différents produits de nos extraits.

➤ **Chromatographie sur colonne**

La chromatographie sur colonne est une méthode importante pour la séparation d'un produit contenant des impuretés difficiles à enlever par distillation ou cristallisation.

Cette technique sert également à séparer des produits organiques d'un mélange. Nous avons utilisé le gel de silice.

1000 ml d'éluant du mélange Pentane/Acétate d'éthyle dans la portion 9,7/0,3 en volume ont été préalablement préparé.

- Dans un bécher de 250 mL, 31g de silice ont été introduits avec 100 mL de l'éluant déjà préparé. L'ensemble est homogénéisé puis versé dans la colonne de chromatographie. Du sable de quartz a été ajouté par la suite au contact de la silice pour la protection de notre matière en évitant une désorganisation de la silice qui va constituer la phase stationnaire.

- Nous avons ici le même le même principe comme la CCM, les composés les plus retenus sont les composés polaires. La phase mobile est en général un mélange de deux solvants : l'un polaire, l'autre apolaire ou moins polaire.



Figure 3 : Chromatographie sur colonne

Durant la séparation, et après avoir récupéré les produits apolaires, nous pourrions augmenter progressivement la polarité de l'éluant afin de récupérer les produits les plus polaires. Nous devons donc préparer les éluant avec des proportions de pourcentage utilisés dans la CCM. Après préparation de l'éluant nous passons à la préparation de la colonne

- La colonne est remplie au deux tiers par le moins polaire des solvants et l'adsorbant en poudre y est successivement ajouté en portion à l'aide d'un entonnoir. Pendant l'addition, nous tapons continuellement sur les parois pour obtenir un tassement maximal. Quand la première portion forme une couche d'environ 2 cm, le robinet de la colonne est ouvert pour faire couler lentement le solvant.

- La préparation du produit brut s'est faite comme suit : 1 g d'extrait méthanolique a été solubilisé dans le méthanol et une petite quantité de silice y est ajouté puis mélangé jusqu'à avoir une texture homogène. Le mélange est évaporé pour avoir un produit sec. Le produit brut est ensuite déposé sur la surface du sable de la colonne. Pour l'alimentation de la colonne en éluant, nous devons faire attention à ne pas perturber la surface du solvant dans la colonne au cours des ajouts. La colonne est remplie de l'éluant jusqu'au niveau du rodage. Le robinet de la colonne permet de collectionner des fractions dans des tubes à essai numérotés de 1 à n. Les différents rapports Pentane/Acétate d'éthyle 9,7/0,3, 9,5/0,5 et 9/1 ont été progressivement utilisés selon la polarité adéquate.

- L'analyse des fractions recueillies s'est réalisée comme suit

- Une CCM est réalisée sur les différents tubes à essai ainsi recueillis permettant de rassembler les fractions qui ont les mêmes caractérisations en CCM (contenant le même isomère). Nous avons réalisé par la suite une CCM récapitulative en déposant chacune des fractions regroupées ainsi que le brut initial. Cela nous a permis de connaître que seul le rapport 9,5/0,5 qui donne un produit, les autres donnent des mélanges.
- Après évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, la masse de chacun des isomères est ensuite déterminée. Une analyse de la plaque récapitulative basée sur le produit, la masse du produit, la pureté, nous a conduites à exploiter les différents échantillons **mboL1, mboL2, mboL3, et mboL4.**

Des études phytochimiques prévus dans ce travail n'ont pas pu être réalisées à cause de manque de solvants pendant cette période dans le laboratoire.

Néanmoins nous pouvons décrire les principes de cette méthode.

Le test phytochimique permet de révéler si un extrait contient ou pas un alcaloïde, un stérol, des polyterpènes, un polyphénol, les tannins, les substances quinoniques. Pour cela nous allons décrire le principe de test de chaque composé.

➤ Test pour alcaloïdes⁹

Environ 0,5 g de chaque extrait est agité avec 5 ml d'acide chlorhydrique aqueux sur un bain de vapeur : 1 ml du filtrat est traité avec quelques gouttes du réactif de Mayer et une deuxième portion de 1 ml est traitée de manière similaire avec du réactif de Dragendorff. La présence de précipité obtenu avec un de ces réactifs est considérée comme indicateur préliminaire de la présence d'alcaloïde (Harborne, 1973 ; Trease et Evans, 1989)¹⁰. Certains laboratoires utilisent aussi le réactif de Wagner, ou une solution d'acide picrique et /ou une solution d'acide tannique en plus des réactifs mentionnés plus haut (Persinos et Quimby, 1967)¹¹.

Un test de confirmation destiné à éliminer les composés non alcaloïde pouvant donner des réactions faussement positives est effectué comme suit avec tous les extraits qui donnent un résultat positif dans les tests d'alcaloïdes préliminaires

Une forme modifiée de la méthode sur couche mince par Farnsworth et Euler (1962)¹² est utilisée. Un gramme de l'extrait est traité avec une solution d'hydrate de calcium à 40% jusqu'à ce que l'extrait devienne alcalin (mesuré par papier pH), et avec 10 ml de chloroforme. L'extrait au chloroforme est alors appliqué sur des couches minces. Quatre systèmes de solvants différents (avec des polarités très différentes) sont utilisés pour faire migrer chaque extrait. La présence d'alcaloïdes dans le chromatogramme est détectée en faisant gicler sur la couche mince du réactif de Dragendorff fraîchement préparé. Une réaction positive sur le chromatogramme (indiquée par une tache orange ou une tache plus foncée contre un fond jaune pâle) confirme que l'extrait contient un alcaloïde.

➤ Test de stérols et polyterpènes

Les stérols et les polyterpènes dont le principe est de dissoudre à chaud dans 1 ml d'anhydride acétique 5 ml d'extraction sec, y ajouter 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition à l'interface d'un anneau pourpre et violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive.

➤ Test de polyphénols

Les polyphénols dont le principe est d'ajouter dans 2 ml de solution une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. L'apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée indique que le test est positif.

➤ Test de tannins

Les tannins dont le principe est d'ajouter dans 5 ml de chaque extrait évaporé à sec, 15 ml du réactif de STIASNY (formol 30%, HCl concentré : 1/0,5). Le mélange est maintenu au bain-marie à 80°C pendant 30 min. L'observation d'un précipité en gros flocons (ou flocons) caractérise les tanins.

➤ Test de substances quinoniques

Les substances quinoniques libres ou combinées dont le principe est de triturer dans 5 ml de HCl au 1/5, 2 ml de chacun des extraits évaporés à sec et portés au bain-marie pendant 30 min. L'ajout de 20 ml de chloroforme, puis de l'ammoniac dilué 2 fois (0,5 ml) donne une coloration rouge ou violet si le test est positif.

➤ Test des saponines

Les saponines dont le principe est d'introduire 10 ml de chacun des extraits aqueux dans un tube à essai. Si une hauteur de mousse persistante supérieure à 1 cm apparaît après agitation pendant 15 secondes, puis laissé au repos cela indique que le test est positif.

III. RESULTATS ANALYSES ET DISCUSSIONS

1) Résultats

L'analyse de nos échantillons révèle que seul l'échantillon *mbOL2* est exploitable. Les autres sont constitués de mélange de plusieurs entités chimiques, ce qui peut rendre les spectres inexploitable. D'après les spectres de proton, de masse et de carbone *mbOL1*, *mbOL3* et *mbOL4* sont inexploitable à cause de leurs impuretés (voir annexe). Par conséquent, le résultat présenté se limite à l'identification de la molécule de l'échantillon *mbOL2*.

L'exploitation de *mbOL2* nous permet d'identifier deux produits majoritaires comme étant l'acide gras (acide érucique : $C_{22}H_{42}O_2$) et le glycérol ($C_3H_8O_3$) qui donnent le *1,3-dihydroxypropan-2-yl docos-13-enoate*, déterminés grâce la spectroscopie de masse associée à la spectroscopie de RMN.

2. Analyses et discussions

a) Spectre de masse

L'analyse du spectre de masse (figure 5) nous a permis d'identifier deux fragments de la molécule à savoir l'acide érucique et le glycérol. Ces deux fragments présentent ensemble 25 atomes de carbones qui sont identifiés dans le spectre RMN du carbone ^{13}C (figure 6).

Nous avons trois fragments caractéristiques sur le spectre de masse à savoir.

- Le pic 100,9362 qui correspond à la masse moléculaire du glycérol lié à un carbone
- Le pic 338,3224 qui est la masse moléculaire de l'acide érucique
- Le pic 412,4043 correspond au pic moléculaire des deux fragments de la molécule

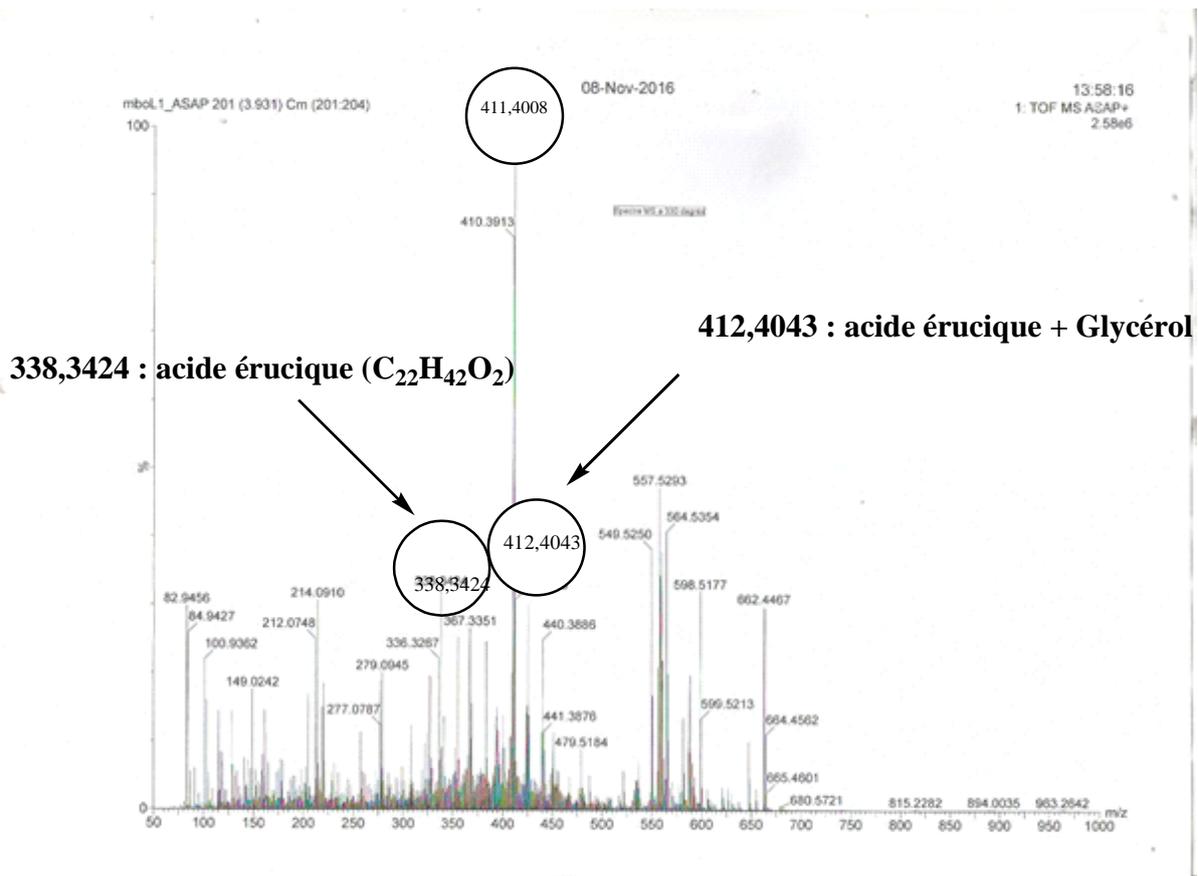


Figure 5 : Spectre de masse

Grâce à ces différents fragments, nous pouvons avoir une idée sur la masse molaire de la molécule à identifier. La structure de la molécule sera définie par l'interprétation de tous les spectres 1D et 2D dont nous disposons.

b) RMN du ^{13}C

Ce travail commence par la numérotation des résonances des δ du ^{13}C (figure 6) par ordre décroissant. Cela nous a permis de donner un identifiant unique à chaque carbone. Cette numérotation est reportée dans tous les spectres 1D : les spectres du proton ^1H (figure: 10), DEPT (figure 7) et les spectres 2D : les spectres COSY (figure 11), HSQC (figure 8) et HMBC (figure 13).

D'après le spectre de masse, nous avons 25 atomes de carbones parmi lesquels nous pouvons distinguer les carbones caractéristiques suivants :

- Un carbone de carbonyle à 173,3 ppm attribué à C_1
- Les deux carbones éthyléniques C_2 et C_3 à 130 ppm
- Un carbone lié à un oxygène vers 63,0 ppm qui correspond à C_4

- Deux carbones liés à un oxygène vers 61,0 ppm correspondant à C₅ et C₆
- Un massif de carbone entre 34-22 ppm attribuables aux CH₂ et CH
- Un carbone primaire vers 13 ppm correspondant à C₂₅

Tous ces déplacements sont pris en fonction du déplacement chimique des carbones.

Nous avons du problème à attribuer un numéro à des carbones qui se situe entre 34 et 22 ppm à cause de leurs non éclatement.

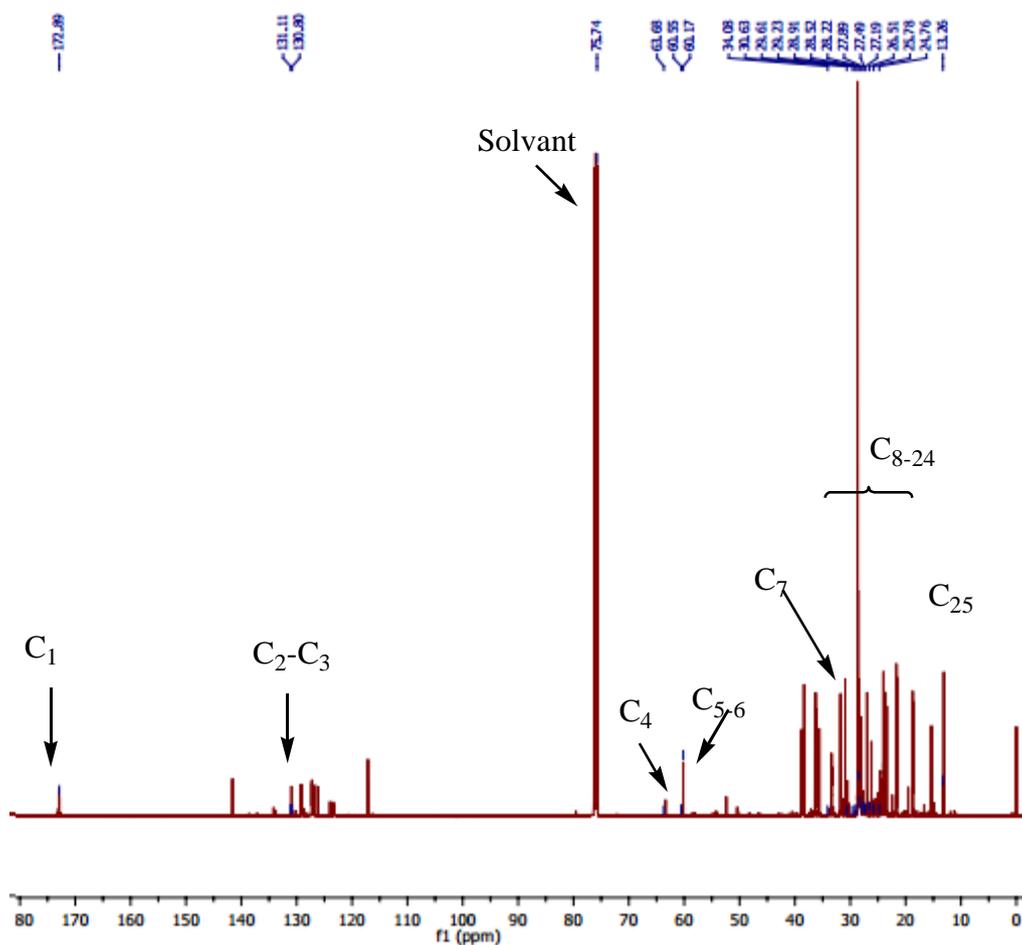


Figure 6 : Spectre de carbones

En effet nous constatons des pics de carbones qui ne sont pas pris en compte, cela montre que nous avons un mélange de produits. Les pics caractéristiques ont été identifiés grâce à la masse et le spectre de proton.

c) Spectre de DEPT

L'analyse du spectre de DEPT permet de différencier les carbones selon leur hydrogénation.

Le DEPT est un spectre dans lequel les Carbones non hydrogénés (carbone quaternaire) sont absents, les CH_2 inchangés et les CH et CH_3 inversés par rapport au spectre de carbone. Seul peut rester un doute sur ces deux derniers mais d'autre séquence de DEPT peuvent régler cette difficulté. La détermination de tous les carbones de DEPT pose problème puis que nous avons un mélange de produits.

De ce fait, nous constatons l'absence de carbone vers 173,3 ppm et la présence des pics de carbones à 63,0 ppm et 61,0 ppm correspondant à des CH ou CH_3 . On note la présence de plusieurs pics qui ne font pas partie de la molécule. Avec le spectre de masse nous aurons 20 CH_2 , 3 CH , 1 CH_3 et un carbone quaternaire.

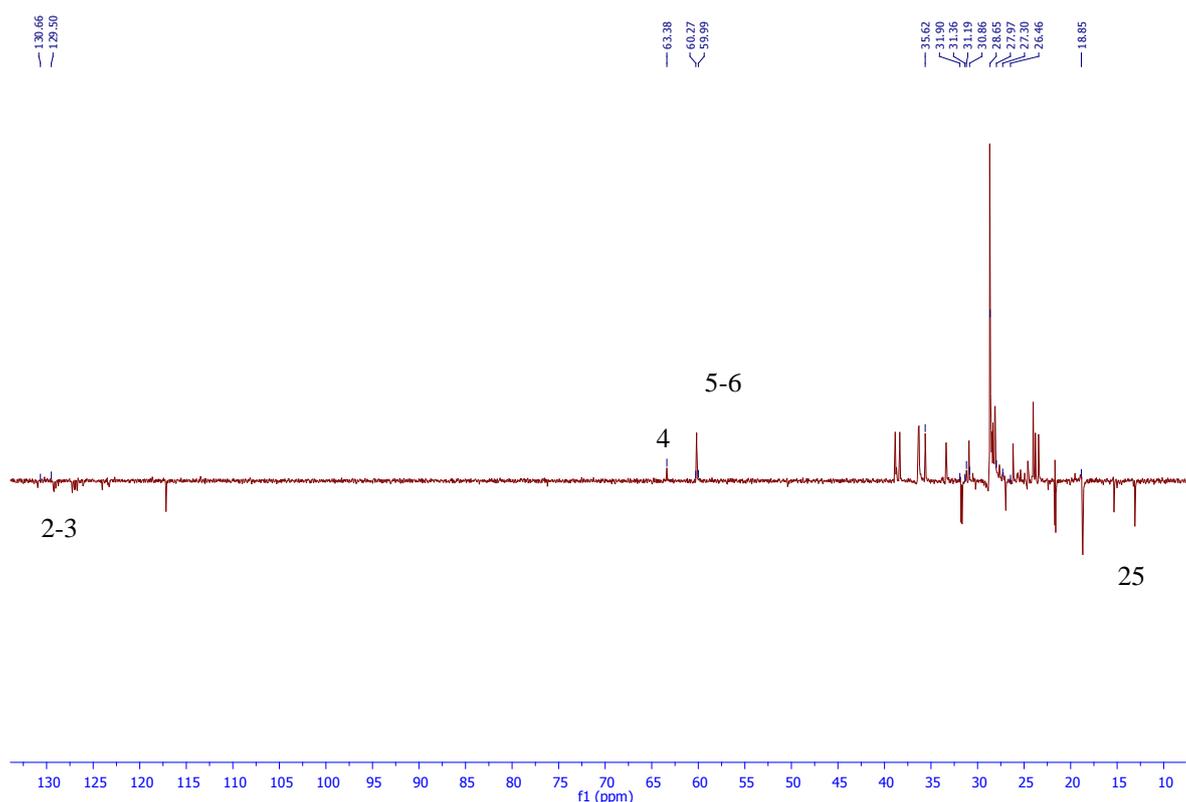


Figure 7 : Spectre de DEPT

d) Spectre HSQC

Grace à l'analyse des corrélations hétéro-nucléaires directe $^1J_{H-C}$ observées sur le spectre HSQC nous pouvons identifier un carbone quaternaire, un méthyle et deux méthylènes.

Cette analyse nous permet également d'identifier le degré de substitution de la double liaison déduite par le fait que deux protons éthyléniques sont portés par le même carbone ce qui forme la présence d'une double liaison.

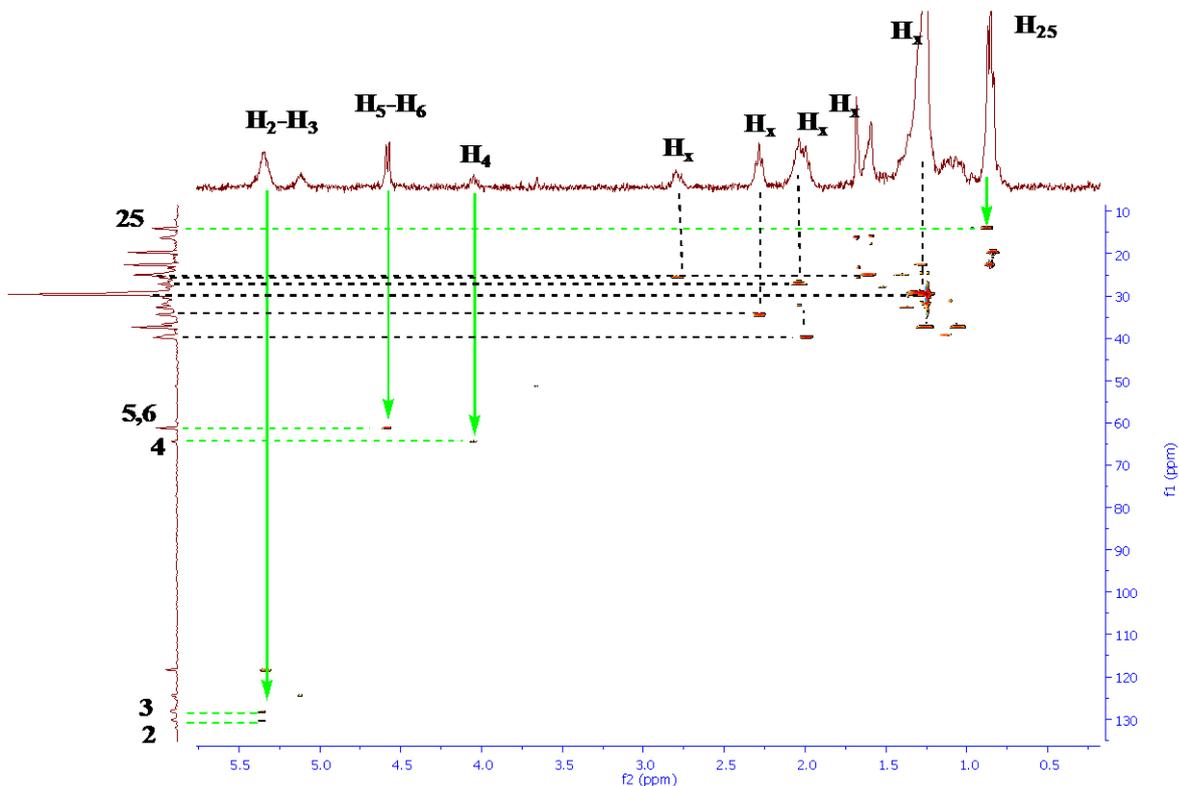


Figure 8 : Spectre de HSQC

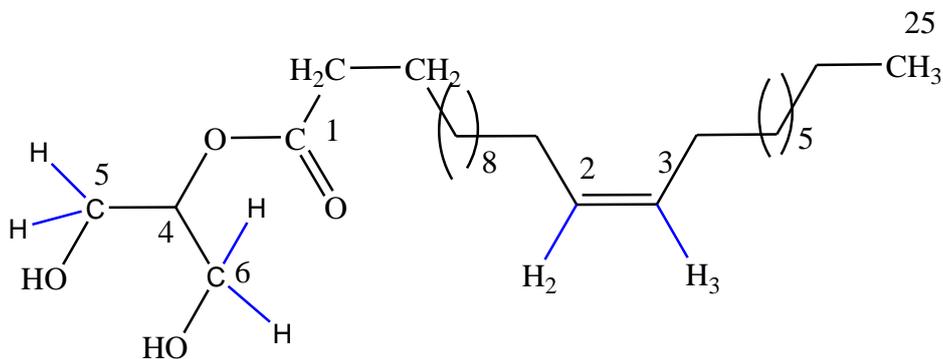


Figure 9 : Corrélation entre un carbone et un proton $^1J_{C-H}$

e) RMN 1H

A partir du spectre de RMN du proton nous pouvons distinguer :

- Deux protons éthyléniques sous forme de multiplet résonnant à 5,32 ppm et 5,35 ppm
H₂ et H₃
- Un doublet entre 4,99 ppm et 4,58 ppm correspondant à un proton
- Un triplet entre 4,07 ppm et 4,04 ppm correspondant à un proton
- Un singulet à 3,66 ppm correspondant au proton d'OH
- Les protons H_x de la chaîne carbonée sortent sous forme de multiplet entre 1,30 et 2,75 ppm. Un des pics apparaît sous forme d'un massif regroupant plusieurs protons H_x.
- Un multiplet entre 0,87 ppm et 0,84 ppm correspondant à 3H du CH₃

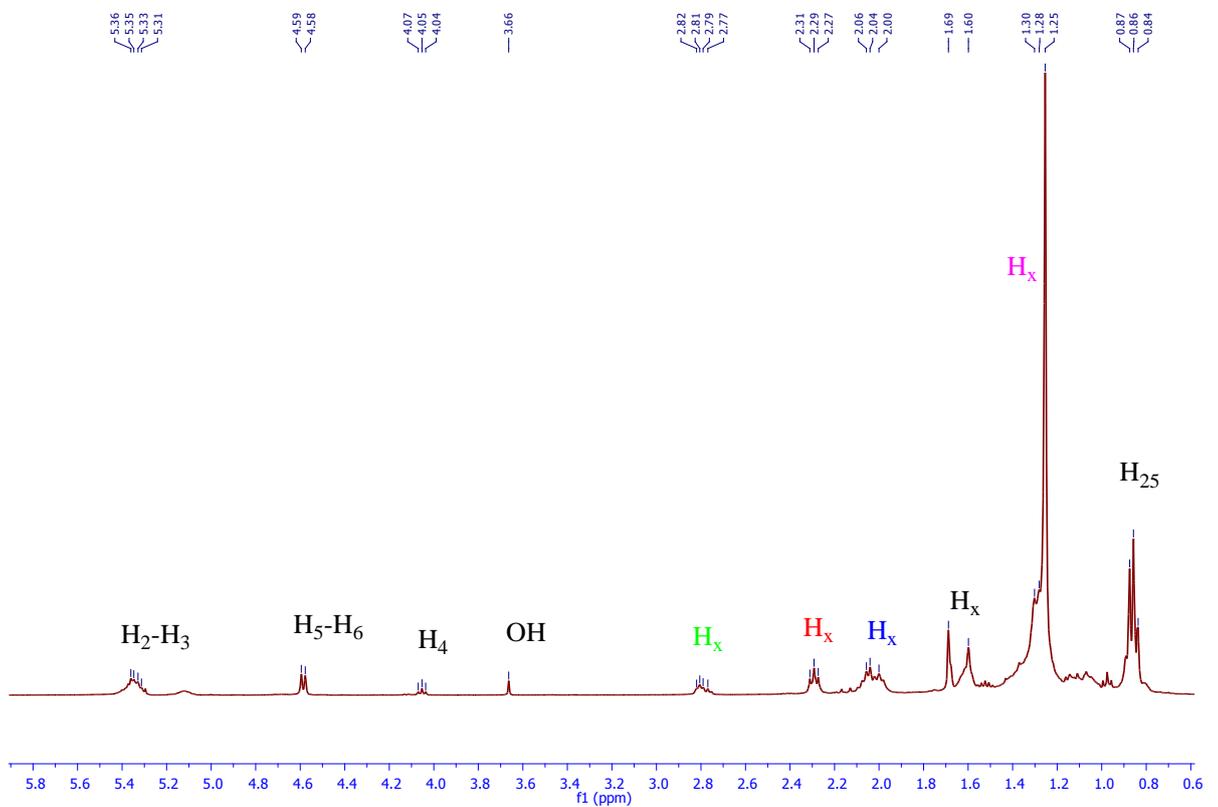


Figure 10 : Spectre de proton

f) Spectre de COSY

En examinant le spectre de COSY nous pouvons identifier les différentes corrélations entre les protons géminés et vicinaux.

- Les deux protons allyliques H₂-H₃ corrélient avec les protons H_x le plus déblindé.
- Le proton résonnant à 2,30 ppm corréle avec le proton H_x δH 1,63 ppm.
- Le proton résonnant à 0,85 ppm corréle avec celui situé à 1,30 ppm, lui-même corréle avec deux protons géminés à δH 1,63 ppm et δH 2 ppm.

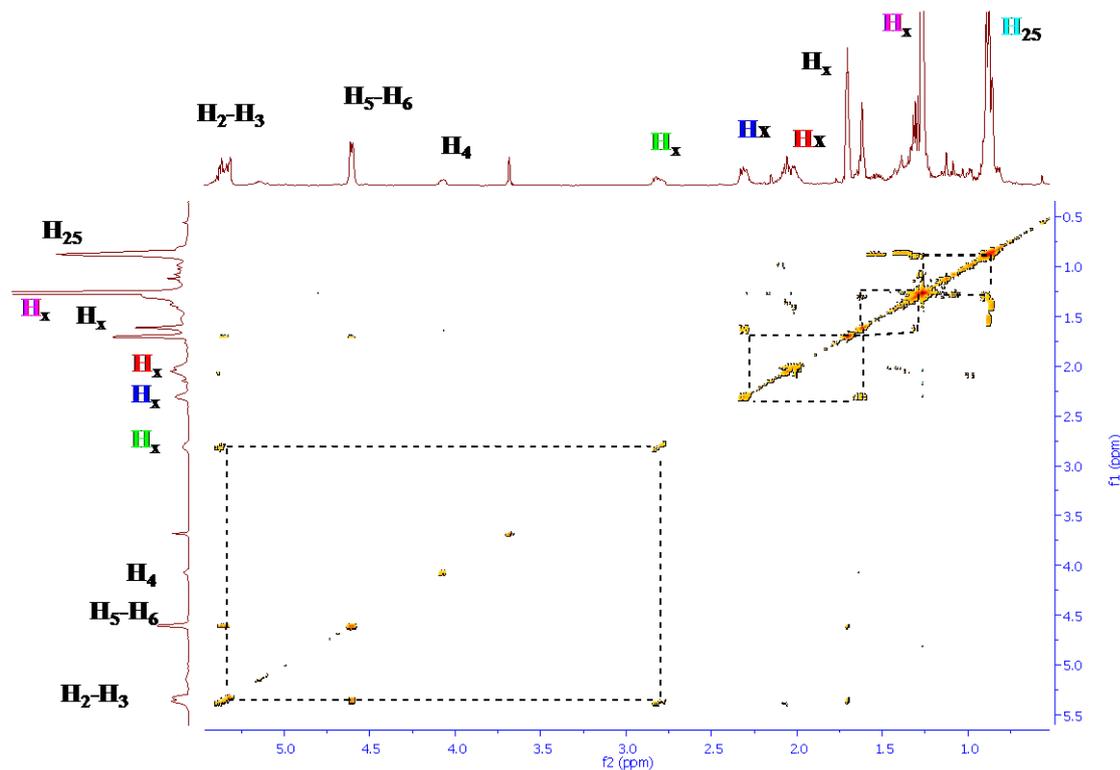


Figure 11 : Spectre de COSY

Le tableau suivant montre les couplages scalaires entre les protons.

	H ₂ -H ₃	H ₄	H ₅ -H ₆	H _x	H ₂₅				
H ₂ -H ₃					✓				
H ₄									
H ₅ -H ₆									
H _x						✓			
H _x	✓								
H _x				✓					
H _x							✓	✓	✓
H ₂₅								✓	

Suite à toutes ces informations nous pouvons proposer la molécule suivante qui correspondrait au mieux à ces spectres. Il s'agit du *1,3-dihydroxypropan-2-yl docos-13-enoate*

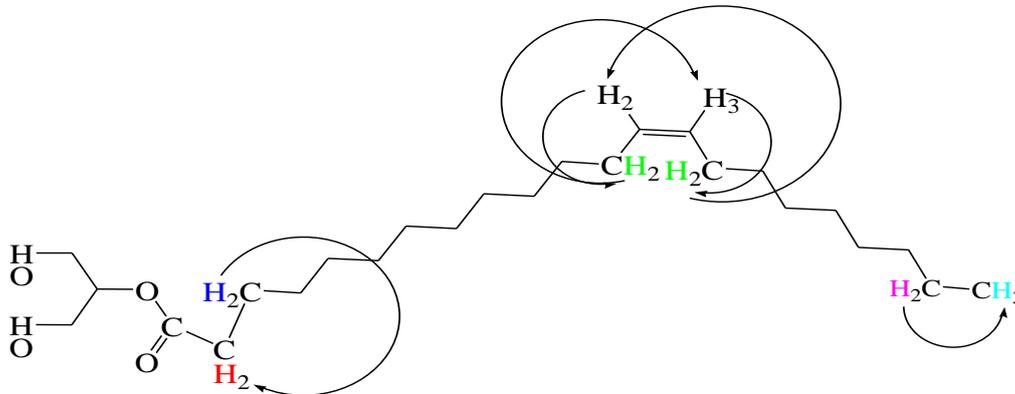


Figure 12: Corrélation de proton sur la molécule

g) Spectre HMBC

Le spectre de HMBC montre les corrélations à longues distance entre les carbones et les hydrogènes.

Les protons du méthyle H_{25} corrélient avec un carbone dans la bande non éclaté.

Le carbone C_1 corrélient avec les protons H_x vers 2,2 ppm.

Les carbones C_2 et C_3 corrélient avec les protons H_x qui résonnent vers 2 ppm et 1,7 ppm.

Le proton H_2 - H_3 présente trois corrélations aux niveaux des carbones non éclaté.

Le proton H_x qui résonne vers 1,5 ppm corréle avec les carbones non éclaté, le proton H_x vers 1,6 ppm quant à lui corréle avec les carbones C_2 , C_3 et ceux de la bande non éclaté.

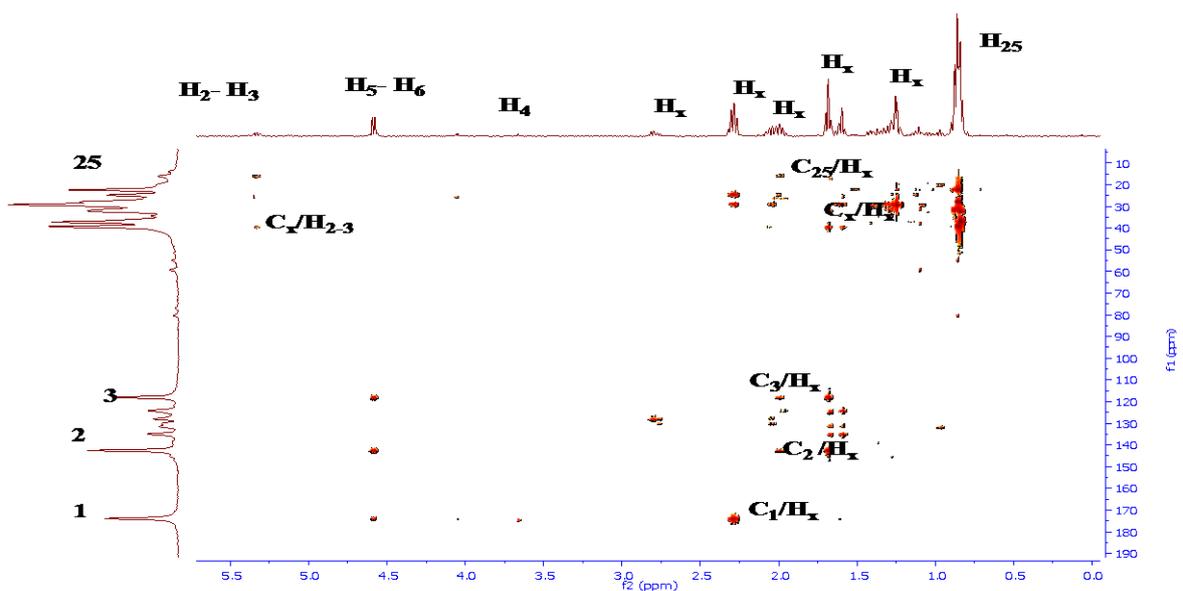


Figure 13 : Spectre de HMBC

Le tableau suivant montre la corrélation hétéro nucléaire entre le carbone et le proton.

	H ₂ -H ₃	H _x	H _x	H _x	H _x
C ₁		✓			
C ₂			✓		
C ₃				✓	
C ₂₅					✓

L'analyse de tous ces spectres nous permet de donner une structure finale de la molécule isolée dans l'échantillon *mb0L2* qui renferme aussi des impuretés (Schéma 3).

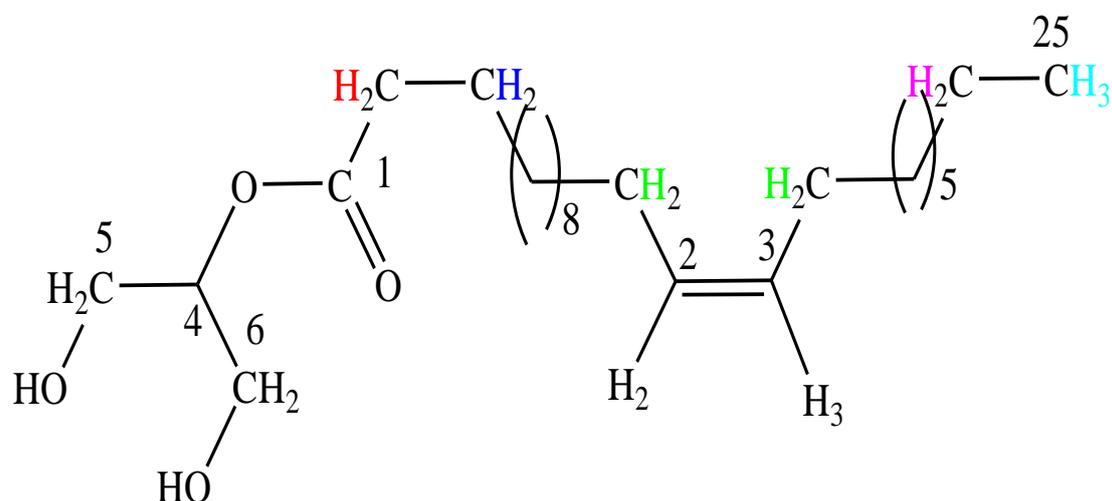


Figure 14 : la molécule finale 1,3 dihydroxypropan-2-yl docos-13-enoate

CONCLUSION

Notre objectif au cours du stage était d'identifier des molécules se trouvant dans les feuilles de *Vernonia colorata*.

Cependant la seule molécule que nous avons pu isoler et identifié dans l'extrait méthanol est le *1,3-dihydroxypropan-2-yl docos-13-enoate*, grâce à la chromatographie sur colonne, la spectroscopie de masse et les spectroscopies 1D et 2D.

L'isolation de cette molécule est faite à la suite d'une macération des feuilles de *Vernonia colorata* puis d'une chromatographie sur couche mince et sur colonne avec des solvants comme le méthanol, éther de pétrole et le pentane /Acétate d'éthyle. La molécule est ensuite caractérisée par les méthodes de spectroscopies masse, proton, carbone et DEPT (1D) et COSY, HSQC et HMBC (2D).

Ce travail nous a permis de connaître les différentes techniques d'extraction au laboratoire. Au cours de ce stage nous avons eu un problème de solvant qui nous a obligés de distiller les solvants déjà utilisés. Ce stage nous a aussi permis également de connaître les risques au laboratoire.

En somme l'étude phytochimique nous a permis de nous familiariser avec les méthodes chromatographiques, d'avoir un aperçu de comment extraire un principe actif dans une substance organique.

Néanmoins le travail est loin d'être terminé. Nous envisageons de faire des tests bactériens et même faire des analyses avec les autres extraits.

Références

- ¹ NGOKO M. L. Contribution à l'étude du Ndole : *Vernonia colorata* (Willd) Drake composées
Thèse Pharm., Dakar, **1989**, n°50
- ² Ndeye Awa MBODJ. *Etude de l'activité antidiabétique des extraits acétoniques, méthanoliques et hexanique de vernonia colorata chez les rats*. Thèse de Doctorat : Pharmacie.
Lieu de soutenance : Université Cheick Anta Diop **2003**, 57.
- ³ Kerharo J. et Adam 1974 J. Pharmacopée Sénégalaise traditionnelle : *plantes médicinales et toxiques vigot et frères*, **1974**, 1011, 231
- ⁴ Parlet et Rawson
- ⁵ GASQUET M., BAMBBA D., et al. Action amoebicide et anthelminthique du Vernolide et de l'hydroxyvermolide isolés des feuilles de *Vernonia colorata* (Willd) Drake *European journal of medicinal chemistry*, **1985**, 20, 111
- ⁶Toubiana. R. ; Structure de l'hydroxyvermolide, nouvel ester sesquiterpènes isolé du *Vernonia colorata* DRAKE (composée) ; *compte rendu hebdomadaire séance académique science* **1969**, 268 ; 82-85.
- ⁷ Sy GY., Nongonierma RB., Cissé A., Dièye AM., Wélé A., Gadiaga NF., Faye B. ; *Mécanismes d'action des extraits acétonique et hexanique de feuilles de Vernonia colorata Willd. (Drake) (COMPOSEAE) sur la régulation de la glycémie*. Dakar Médical, **2006**, 51, 42
- ⁸ Cours de Dr Abdoulaye GASSAMA (Licence 3 de chimie) Université Assane SECK de Ziguinchor.
- ⁹ Abayomi Sofowora *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*, *Karthala édition*, **2010**, 384.
- ¹⁰ Harborne. J. B ; *phytochemical methods : A guide to modern techniques of plant analysis ; chapman and Hall ; 1973*.
- ¹¹ Persinos. G. L. and M. W. Quimby ; Nigerian plants III phytochemical screening for alkaloides, saponnins and tannins ; *journal of pharmacy and pharmacology* ; **1967** ; 143 ; 25.
- ¹² Farnsworth. N.R, K. L. Euler ; *A comparison of certain alcaloid sreening procedures ; 1962*

ANNEXE

I) Revue bibliographique

L'application en grande partie des huiles essentielles et flavonoïdes dans le domaine pharmaceutique est un domaine en plein développement. La plante *Vernonia Colorata* fait partie des plus consommées dans la pharmacologie Sénégalaise. Cela conduit souvent à beaucoup de recherches afin de mieux connaître leurs effets sur les sujets mais aussi de trouver des techniques de séparation des molécules pour mieux les étudier. Dans cette synthèse bibliographique nous définirons les huiles essentielles et les flavonoïdes.

I-1) Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances volatiles et odorantes sécrétées par des parties spécifiques de certains végétaux : les fleurs, les fruits, les feuilles, les racines, les graines et même les écorces. Une huile essentielle est constituée de composés aromatiques liquides et terpéniques qui peuvent être regroupés en cinq classes : les alcools, les esters, les aldéhydes, les cétones, les lactones et oxydes. Les composés terpéniques sont constitués majoritairement dans les huiles par les mono terpènes et des sesquiterpènes qui donnent tous des hydrocarbures et des composés oxygénés. Les composés oxygénés sont responsables des odeurs des huiles essentielles.

Ces figures montrent quelques molécules terpéniques que nous pouvons trouver dans les huiles essentielles

I-2) Monoterpènes

➤ Hydrocarbures

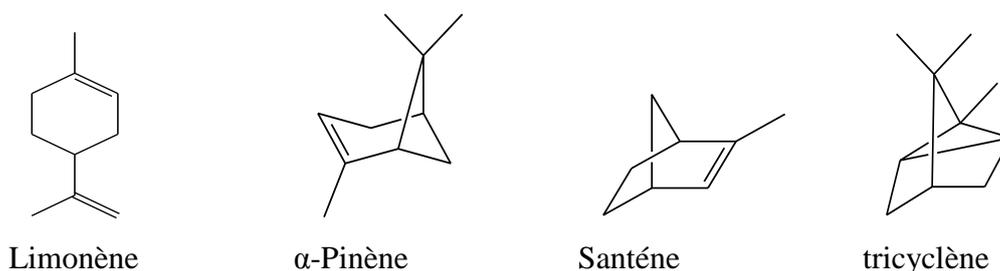
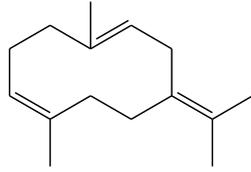


Figure 15 : les principaux hydrocarbures

I-3) Sesquiterpènes

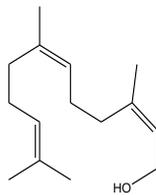
➤ **Hydrocarbures**



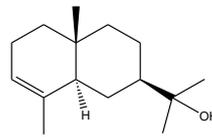
Germacrène B

Figure 16 : hydrocarbures sesquiterpéniques

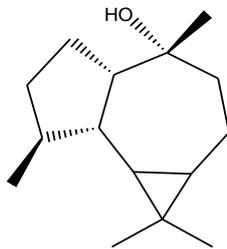
➤ **Alcools**



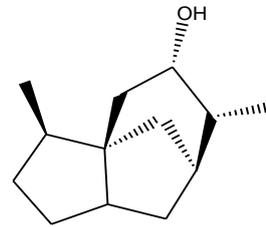
cis-Farnésol



α -Eudesmol



Lédol



5-néo-Cédranol

Figure 17 : les alcools sesquiterpéniques

II) ETUDE BOTANIQUE

II-1) Etude Systématique

Synonyme : *Eupatorium colorata* (Willd), *Vernonia Senegalensis* (Less)

Règne : végétal

Ordre : Astéales

Sous règne : Eucaryotes

Famille : Astéaceae

Embranchement : Spermatophytes

Sous famille : Asteroideae

Sous embranchement : Angiosperme

Genre : *Vernonia*

Classe : Dicotylédone

Espèce : *Vernonia colorata*

Sous classe : Asteridae

II-2) Caractères botaniques

Port : Arbrisseau de 3 à 4 m de hauteur, à fut ramifié près de la base, à bois très tendre, blanc avec de nombreuses branches dressées, évasées, à moelle développée et rameaux à pubescence rouille

Feuilles : Pétiolées, entières, ondulées, à limbe étroit vers la base souvent dissymétrique, l'un des côtés du limbe descendant plus bas que l'autre ; 7 à 9 nervures latérales.

Fleurs : En panicule terminale corymbifère de 5 à 12 cm de largeur. Capitules larges de 7 à 8 mm, ayant à la base des bractées écailles ovales ; fleurs blanches toutes tubulaires.

Fruits : Akènes glabres, longs de 3 mm ayant une dizaine de côtes fines couvertes de petites glandes blanchâtres.

II-3) Habitat et répartition géographique

Espèce répandu dans toute l'Afrique tropicale, en particulier dans les savanes pré forestières, les galeries forestières et les forêts secondaires. On le trouve au Sénégal, en Guinée, au Mali, en Gambie, en Sierra Léone, au Libéria, en Côte d'Ivoire, au Ghana, au Togo, au Bénin, au Nigeria, au Niger, au Cameroun, au Congo, en Angola, en Afrique orientale.

II-4) Etudes ethnobotaniques

La plante est utilisée à plusieurs niveaux de la médecine traditionnelle africaine, d'où son nom de « soigne tout ».

Les feuilles servent à faire de frictions contre les douleurs, les démangeaisons, les mycoses et les maladies de la peau d'origine parasitaire.

Les feuilles très amères, sont employées en décoction comme fébrifuge. La décoction est administrée par petites doses le long de la journée, l'amertume étant atténuée par du miel ou du sucre. La décoction des feuilles est également employée en lotion chaudes et en frictions corporelles en cas de fièvre.

La décoction est également utilisée après l'accouchement. Les femmes boivent la décoction de feuilles qui est censée affecter le lait et agir comme aide préventive contre les vers qui risqueraient d'être transmis à l'enfant. Les femmes se frottent sur la poitrine pour faciliter le sevrage. La décoction des feuilles est également utilisée pour traiter le paludisme. Le jus des feuilles sert au traitement des affections gastro-intestinales et de la blennorragie.

Hormis l'aspect thérapeutique, les feuilles sont utilisées dans l'alimentation. Elles sont utilisées pour préparer des sauces dans certains pays comme le Cameroun, le Nigeria, le Benin et le Togo. L'amertume diminuant avec la cuisson, les jeunes feuilles sont employées comme potagères : elles seraient antiscorbutiques, digestives et toniques.

Pour toutes les entéralgies, on fait prendre une macération de feuilles ou de racines qui a duré 24 heures. Cette préparation est très amère.

L'écorce de la tige et des racines est très amère et plus ou moins astringente : on l'emploie contre la fièvre et la diarrhée. Les écorces des tiges, du tronc et des racines sont employés en préparation, souvent avec des épis de maïs (variété rouge), dans le cas de la bilharziose, d'impuissance masculine et de stérilité féminine.

Contre la blennorragie, on donne la décoction de la racine, avec celle du *Rauwolfia vomitoria*, à plusieurs reprises pendant la journée.

Dans certaines régions, on brûle les rameaux pour en tirer du sel. Les rameaux sont aussi employés comme cure-dents-brosses, mais aussi mâchés comme stomacique tonique et excitant.

La plante est très employée comme purgatif en boisson et en lavement. On prépare un lavement avec des feuilles macérées et filtrées auxquelles on ajoute du poivre et des épices.

II-5) Etudes chimiques et toxicité

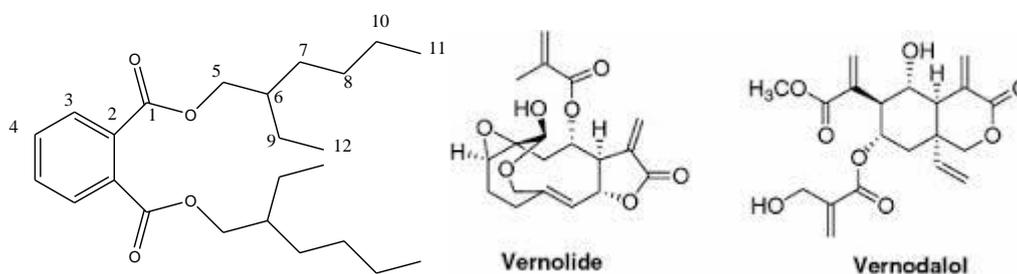
Githen, sous la dénomination de **Vernonia Senegalensis** signale dans les racines de l'espèce ouest-africaine la présence d'un alcaloïde et Haerdi, sous la dénomination exacte de *vernonia colorata*, fait état de réactions positives obtenues lors de la recherche d'alcaloïdes (par le réactif de Mayer et celui de Dragendorff) et de saponosides avec l'espèce du Tanganyika.

Il a constaté que la plante ne renfermait pas d'alcaloïdes mais des principes amers. L'un d'eux a été séparé à l'état brut par préparation au moyen d'éther de pétrole d'un extrait acétate d'éthyle de tiges feuillées.

Des expérimentations réalisées au laboratoire de pharmacognosie et biologie végétale de l'UCAD ont montré la présence de saponisides, d'hétérosides cardiotoniques, ainsi que de tanins catéchiques.

III-) Etudes antérieures

Les molécules trouvées dans les extraits de *Vernonia colorata*



Bis (2-ethylhexyl) phthalate

Figure 18 : les molécules extraites de *Vernonia colorata*

III) Les Spectres

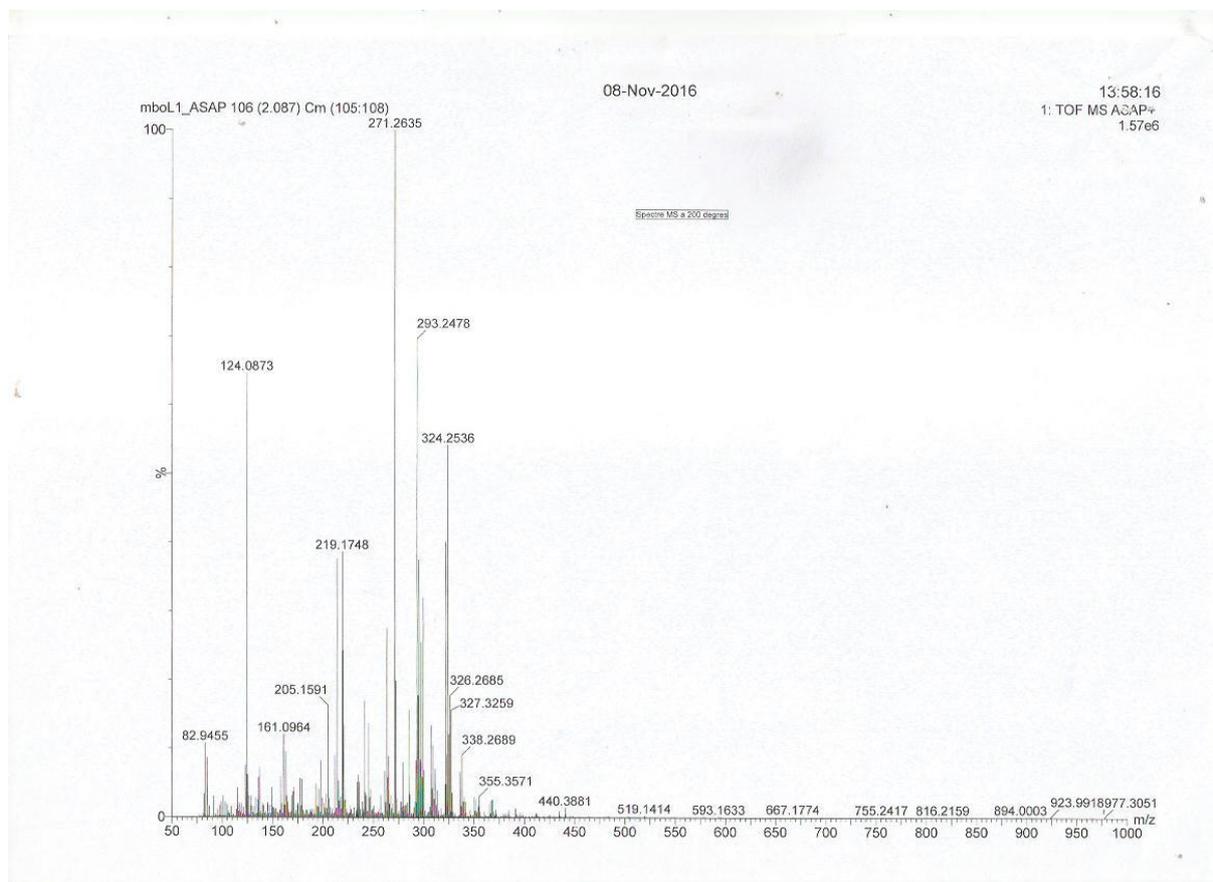


Figure 19 : Spectre de masse mboL1

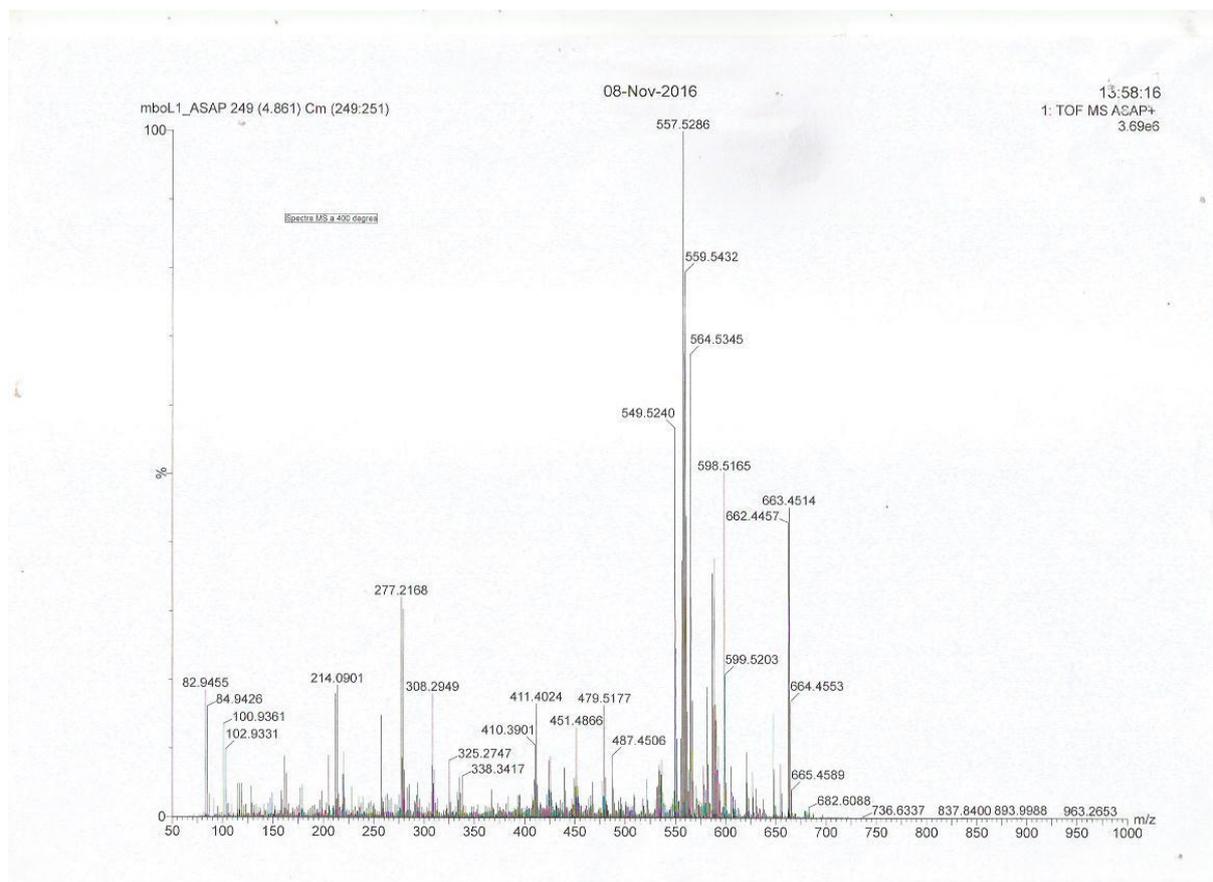


Figure 20 : Spectre de masse mboL1

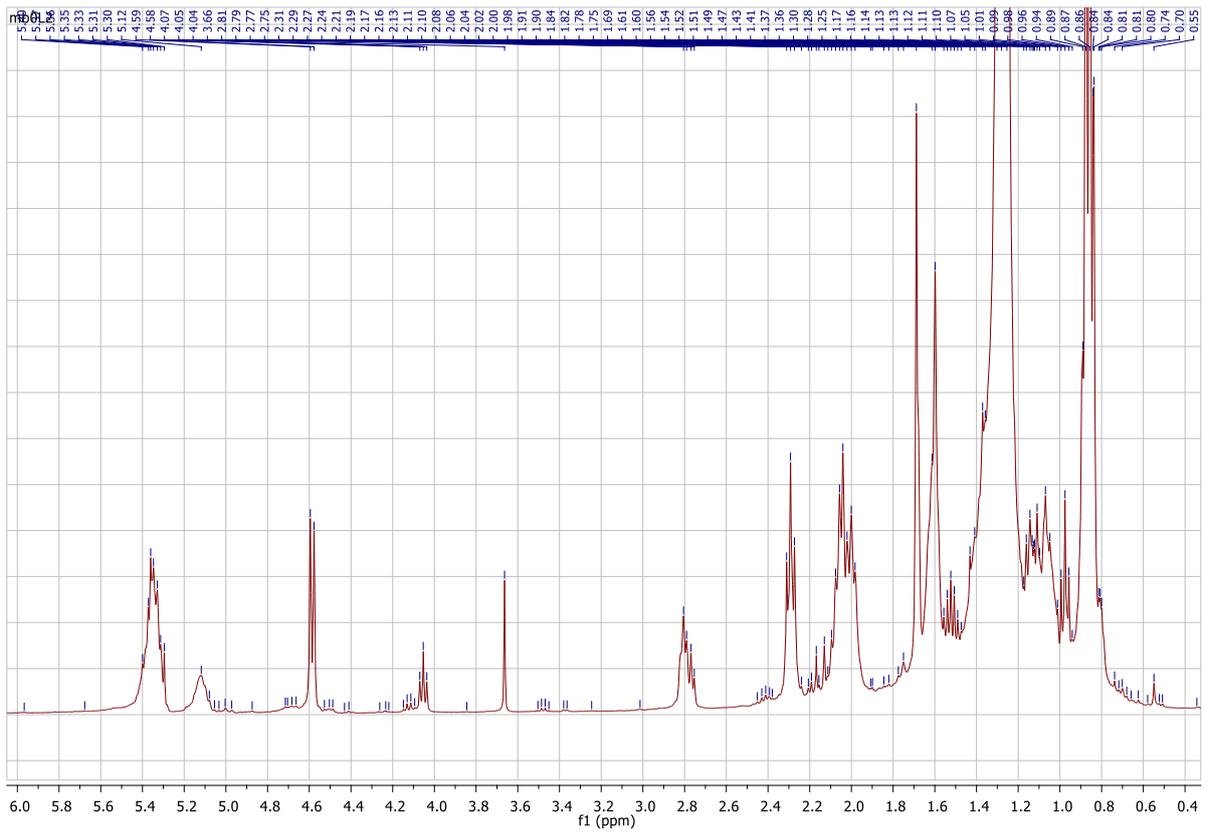


Figure 21 : Zoom spectre de proton mbol2

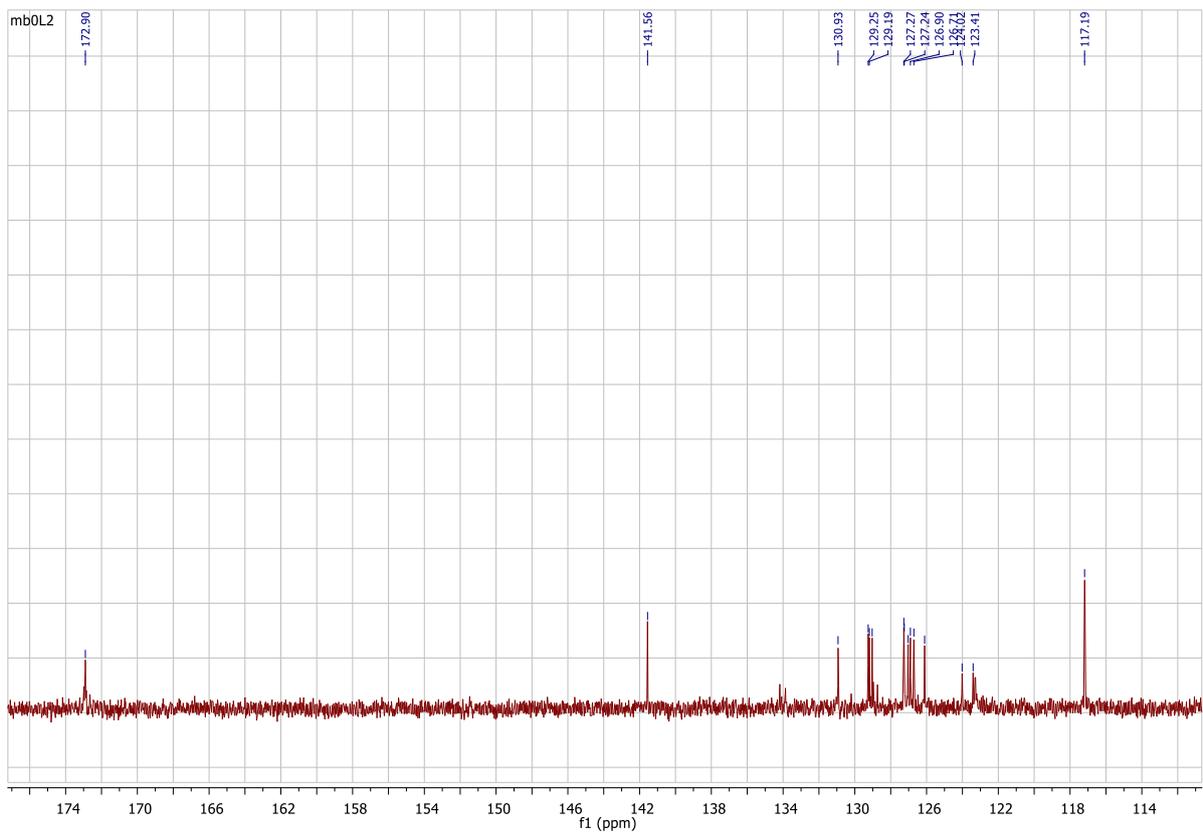


Figure 22 : Zoom spectre de carbone mboL2

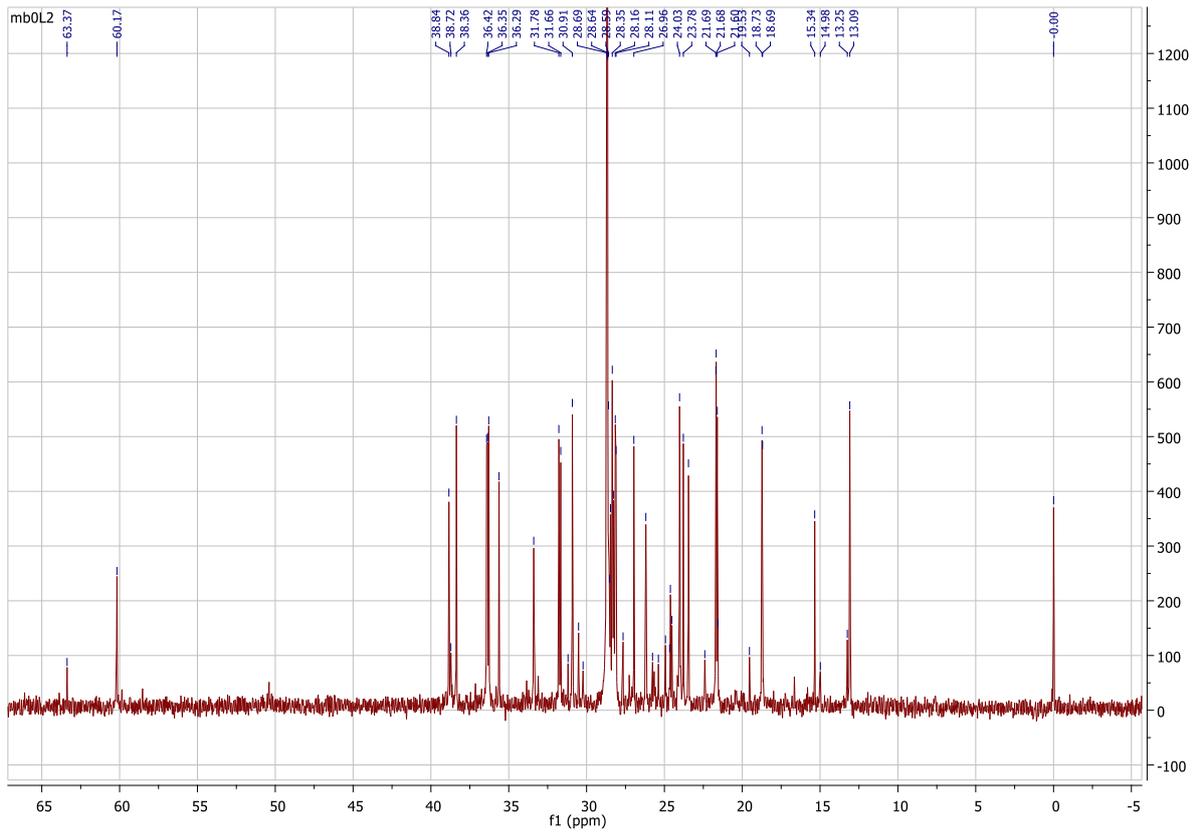


Figure 23 : Zoom spectre de carbone mboL2

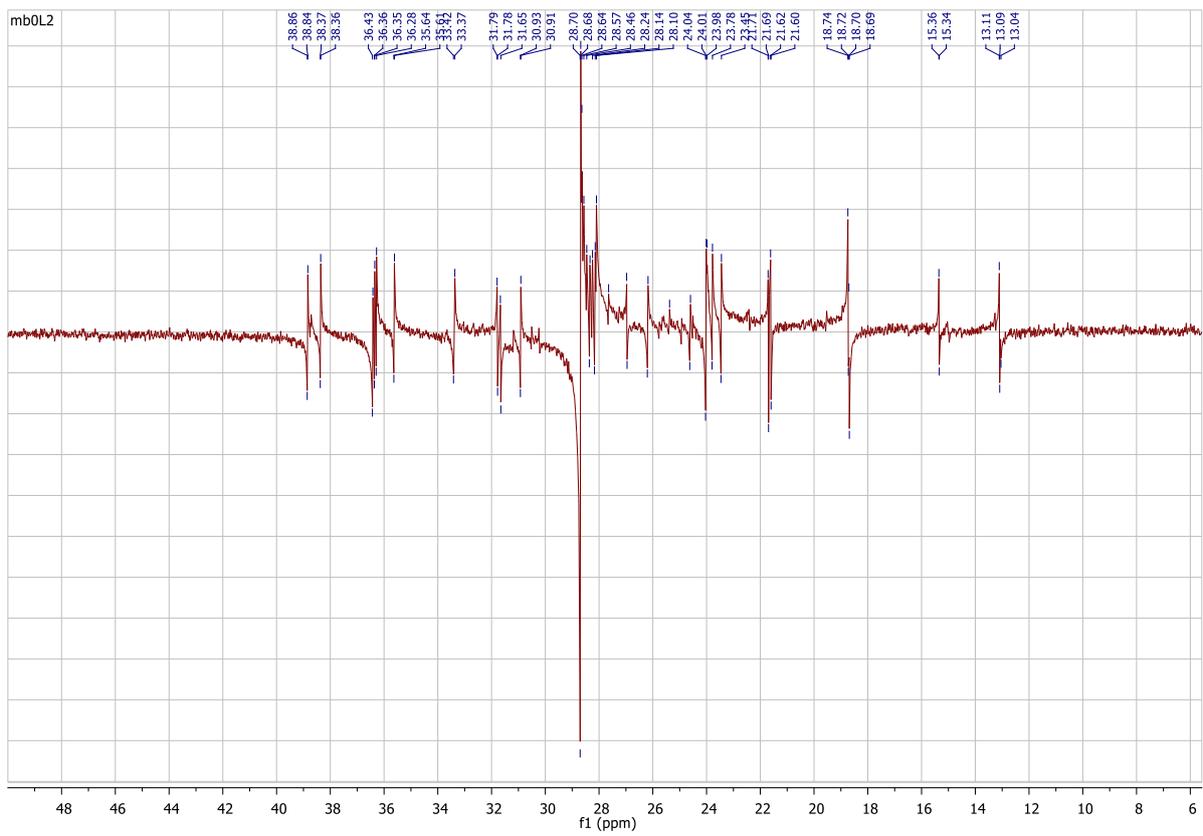


Figure 24 : Zoom spectre de DEPT mb0L2

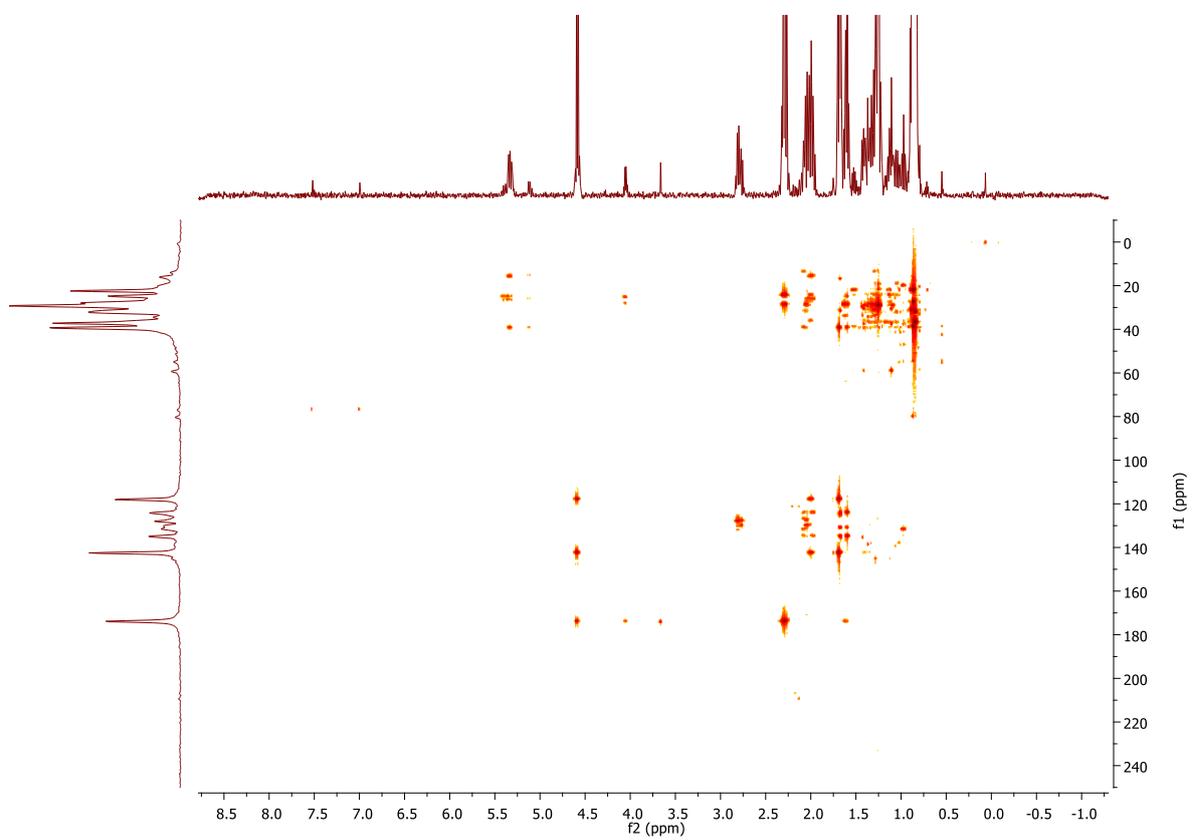


Figure 25 : Spectre de HMBC mboL2

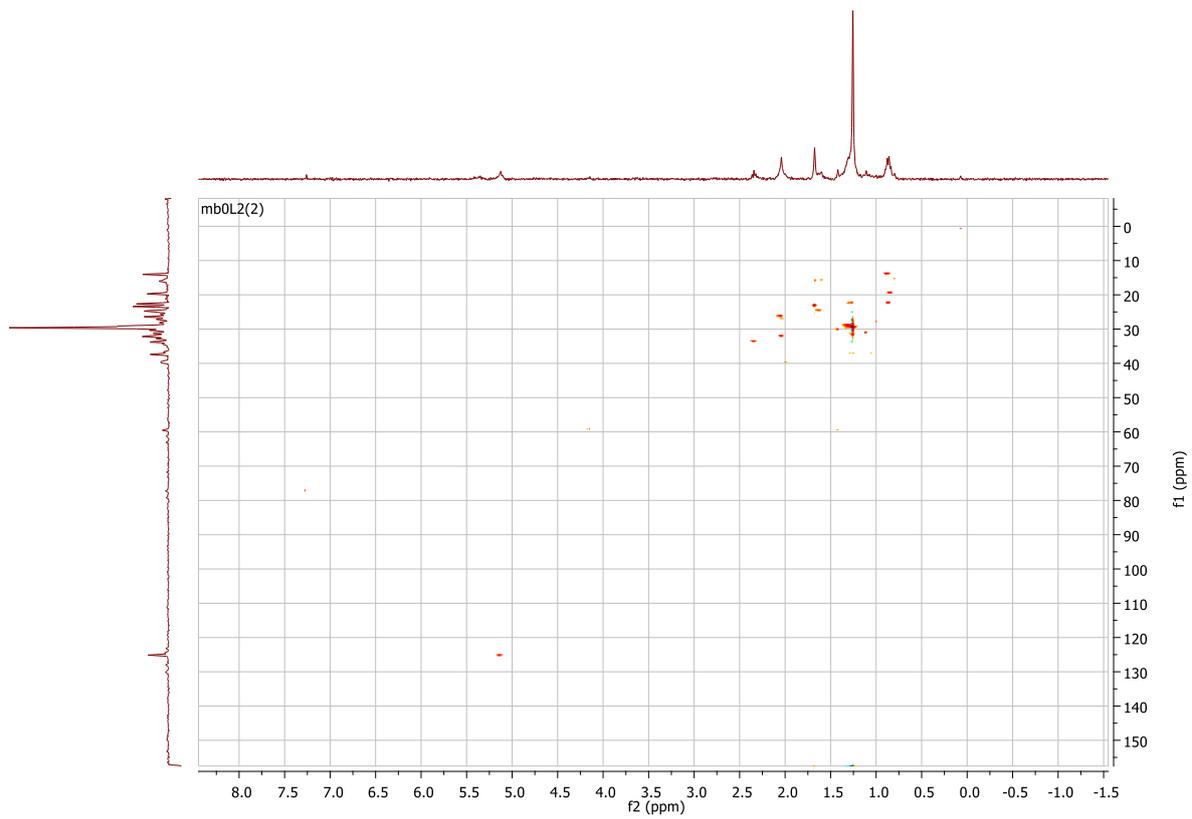


Figure 26 : Spectre de HSQC de mb0L2

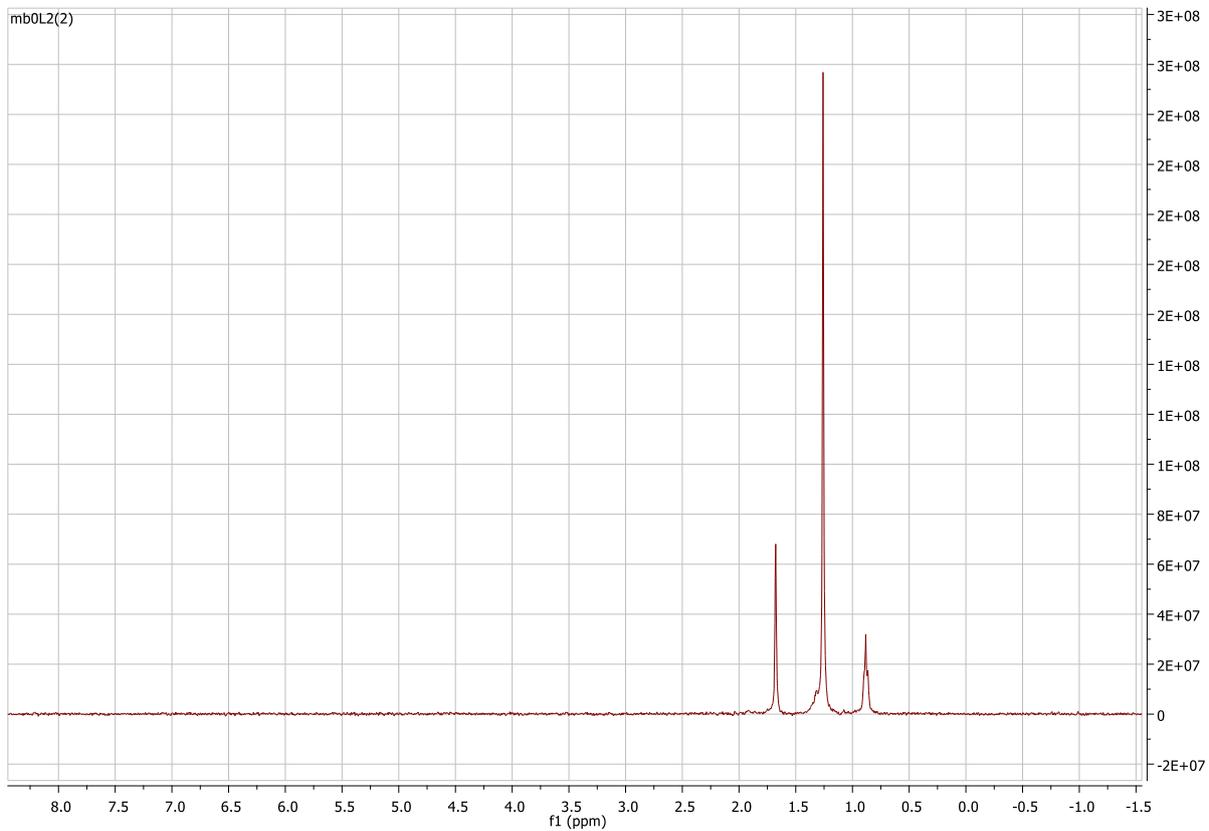


Figure 27 : Spectre de proton mbol2

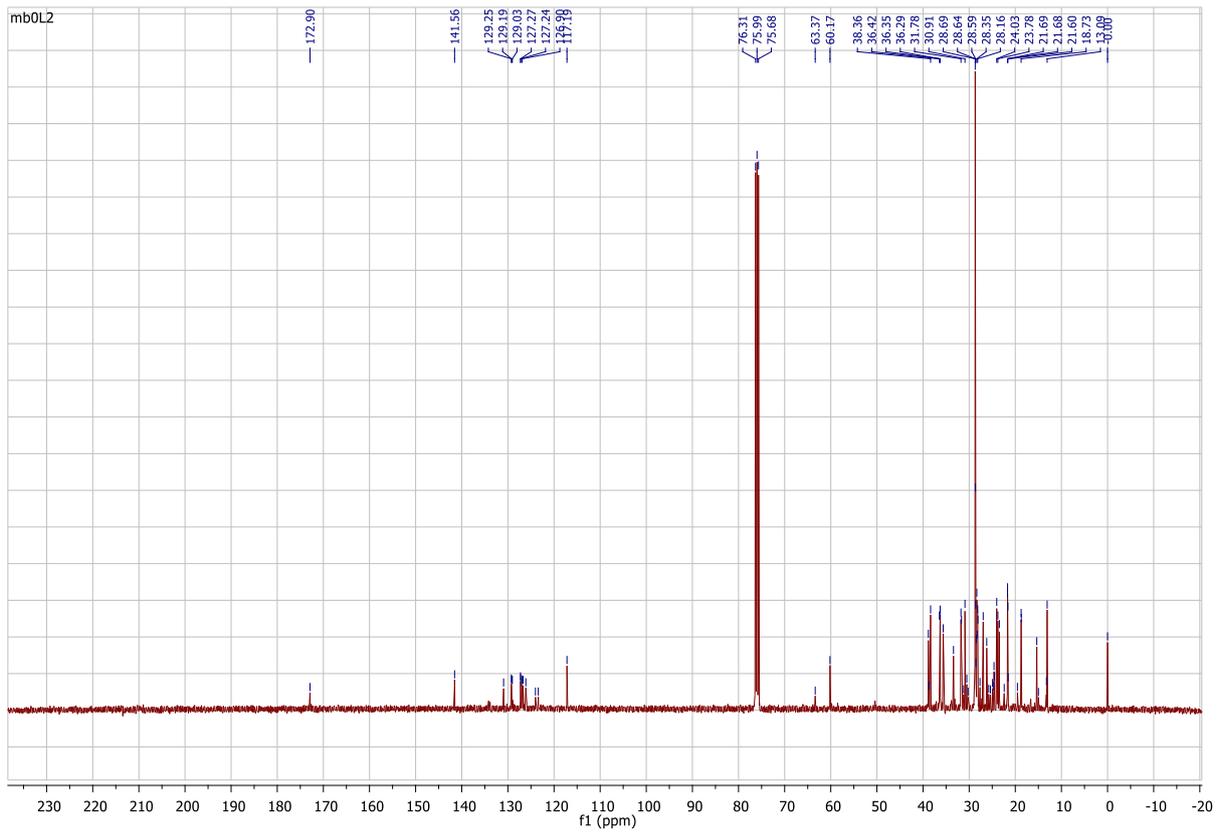


Figure 28 : Spectre de carbone mboL2

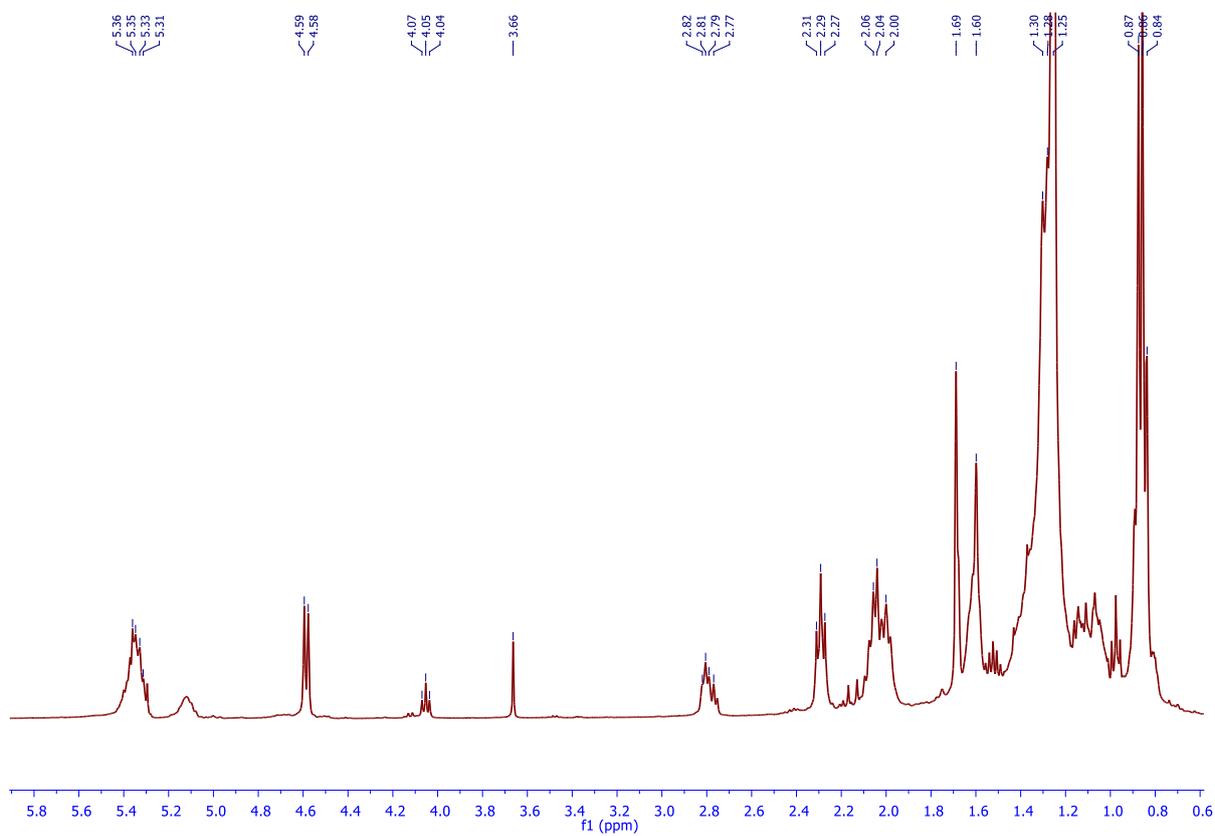


Figure 29 : Spectre de protons mboL2

A

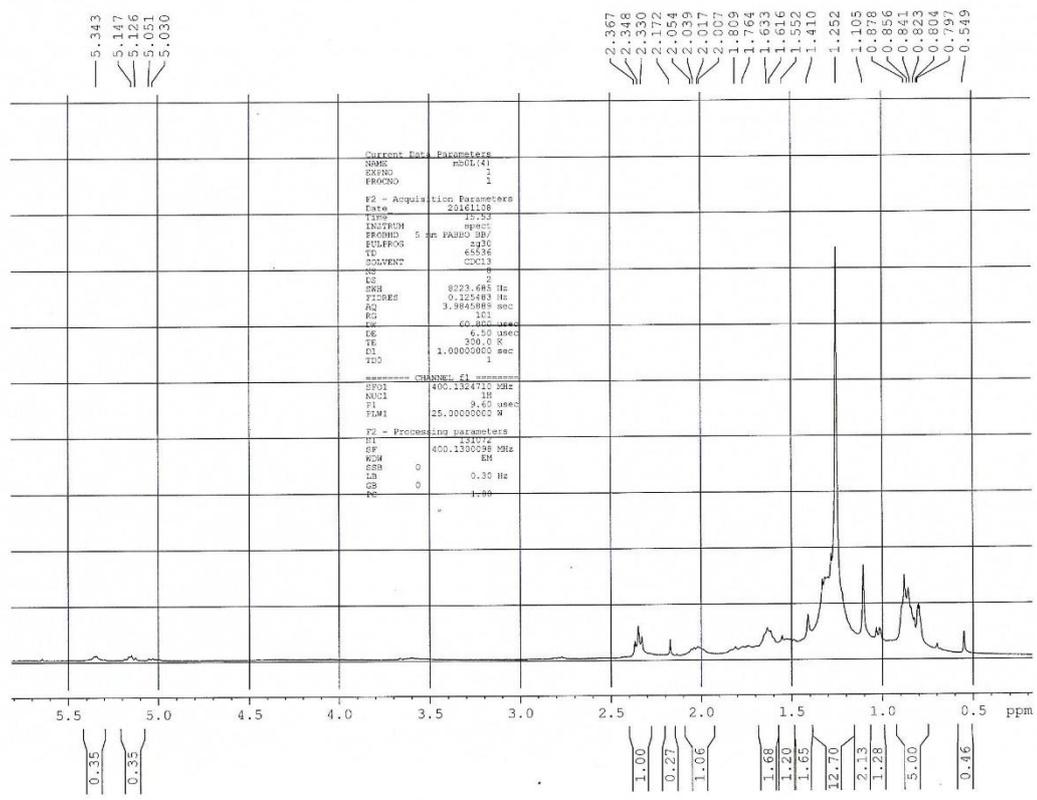


Figure 30 : Spectre de proton mboL4

U

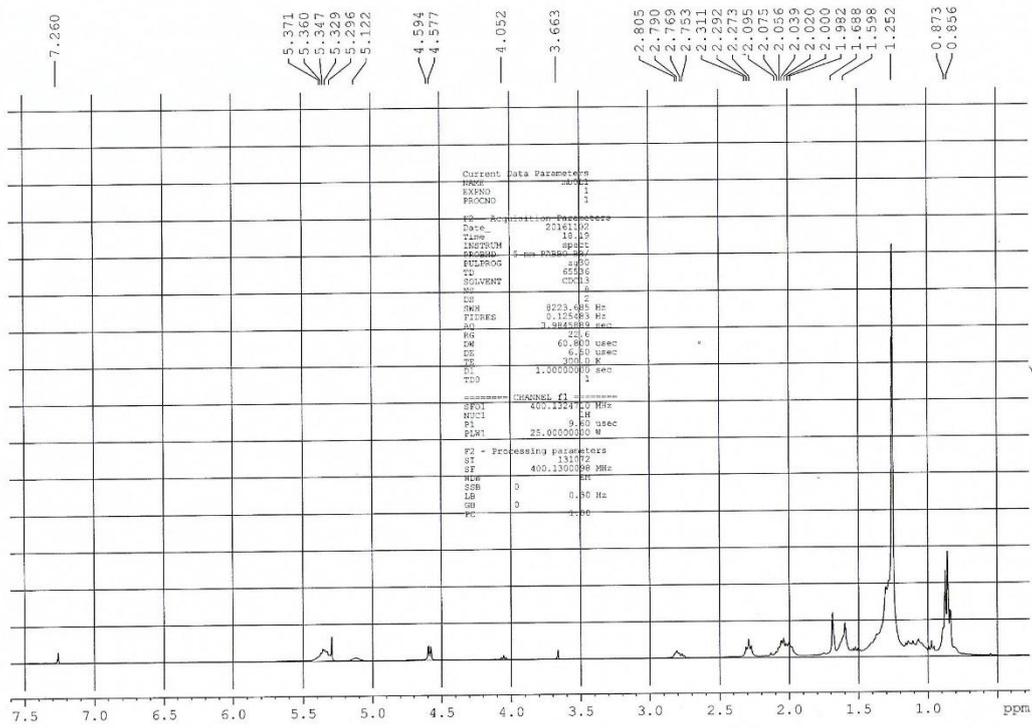


Figure 31 : Spectre de proton mboL3

C

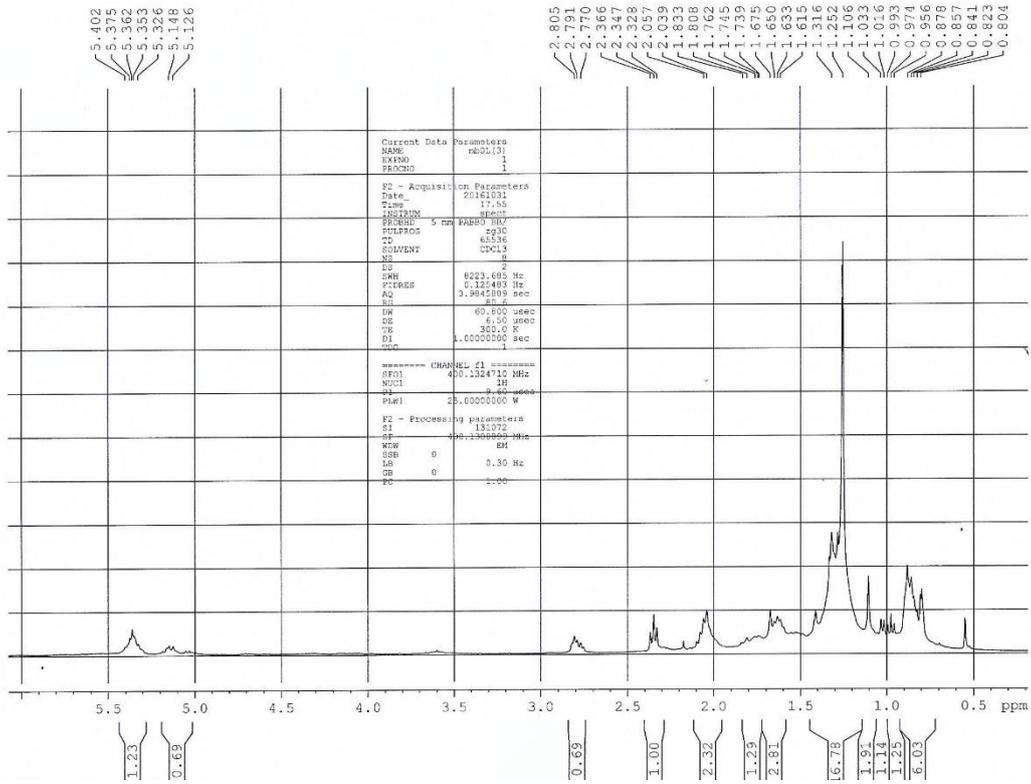


Figure 32 : Spectre de proton mboL1