

**THESE**

Présentée pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

École Doctorale : Science des Procédés

Specialité : Sciences des Agroressources

Par

**Abraham ENDRIAS**

**Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à  
*Hibiscus sabdariffa* L. et à *Artemisia annua***

Soutenue le 22 mai 2006 devant le jury composé de

M. BASSENE Emmanuel Professeur: Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Dakar	Rapporteurs
M. KARMOUS Tijani Maître de Conférence : Faculté des Sciences de Bizerte	
Mme FOURASTÉ Isabelle Professeur émérite : Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse	Président
M. TREILHOU Michel* Professeur: Université Jean-François Champollion Albi	Membre
M. MOULOUGUI Zéphirin Directeur de Recherche : INRA à l'INP-LCA-ENSIACET-Toulouse	
M. TALOU Thierry Ingénieur de Recherche : INP-LCA-ENSIACET- Toulouse	
M. BESSIERE Jean-Marie Professeur Honoraire : ENSC de Montpellier	Invité
Mme LAQUIEZE Brigitte Directrice de l'ENFA Toulouse	
M. PROVENDIER Damien Conseiller Scientifique NOMAD RSI Toulouse	

\*Directeur de thèse

**A mes Parents**

## Remerciements

Mes remerciements vont spécialement à **Mr. Kraemer** pour son aide lors du commencement et pendant cette thèse. Sans son appui, ce projet n'aurait pas eu lieu.

Je remercie chaleureusement à **Michel Treilhou** pour avoir accepté de diriger cette thèse et la confiance qu'il m'a témoignées au cours de dernières années de thèse.

Je remercie à **Mr. T. Talou**, d'avoir encadré le projet AUF et Particulièrement de m'avoir donné l'occasion de voyage au cambodge.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à **Mr. Z. Mouloungui** pour avoir encadré mon travail sur les huiles végétales, et pour m'avoir fait partager son expérience de la lipochime, et pour le financement une partie de ce travail, et aussi de son soutien et encouragement. J'ai tout particulièrement apprécié sa rigueur et son dynamisme.

J'adresse mes sincères remerciements à **Mr. E. Bassene** et **Mr T. Karmous** pour l'honneur qu'il m'a fait d'accepter d'être rapporteur de cette thèse.

J'exprime mon profond respect et ma reconnaissance à **Mme I. Fourasté**, qui a accepté de juger ce travail.

Je remercie **Mme B. Laquieze** de m'avoir fait l'honneur d'assister à ma soutenance.

Un grand merci à tout l'équipe du **Nomad RSI Toulouse**, et **Nomad Cambodge** pour son accueil chaleureux durant ces années, qui a su créer une ambiance très sympathique d'entraide.

Je tiens également à exprimer ma plus vive reconnaissance à **D. Provendier**, je le remercie pour son suivi permanent, ses conseils judicieux, ses grandes qualités humaines et le soutien qu'il m'a constamment apporté en me faisant profiter de ses compétences et de son enthousiasme.

La qualité des données présentées dans cette thèse sont le fruit d'un travail d'équipe sur le terrain (au Cambodge) avec la collaboration de nombreux acteurs .....**Nicola, Damien, Sarang, Calum, Net, Antoine** et **Sopha** merci à vous tous.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à **M. Cerny** pour son amitié et son soutien inconditionnel, Je te remercie pour ton aide précieuse.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à **J. Roche** pour ses conseils avisés notamment concernant les analyses statistiques et la rédaction scientifique.

Merci aussi à tous mes collègues thésards et amis du laboratoire. Pour sa convivialité et pour le bon accueil qu'ils m'ont réservé. J'en garde un très agréable souvenir :

**Florina, Yaocihuatl, Céline, Lucita, Aurélie, Delphine, Philippe Micone., Julien, Mathieu M., Phillippe E., Fabien, Laurent, Matthieu B., Oilivier, Azeddine, Virginie, Laure, Géraldine, Christine, Brigitte, Marjorie, Anne, Catherine, Michel L, Didier N., Jérôme, Antoine, Eric, Philippe M., Didier D., Sam, Samedy, Almu, Léon, Jesus, Colin, et Olaf.**

A tous les amis qui de près ou de loin ont rendu plus facile la réalisation de ce travail, :  
**Dorin, Brocher, Laurence Berdot, Eric Roskam, Kathleen Knabb, Ninfa Redman, Cati Blanche, Own Goods, and (The Gross family), Fredman, Maya, Sarah and Claribel.**  
A la famille **Bourges (Rabastens) Alain, Christine, Helen, Damien et Sylvan.**

Je remercie profondément de tout cœur à **Kira Sosnina** pour ton grande patience et soutien au moment les plus difficiles.

Une pensée sympathique à ma soeur **Jerry Thurston**, de m'avoir supporté et aidé.

## **INTRODUCTION GENERALE**

### **CHAPITRE I Etude Bibliographique**

**Les plantes aromatiques et médicinales, généralités**

### **CHAPITRE II *Hibiscus sabdariffa* L.**

**CHAPITRE IIA Rappel bibliographique**

**CHAPITRE IIB Matériel et méthodes**

**CHAPITRE IIC Résultats et discussion**

**C1. Les calices d'*Hibiscus sabdariffa*: extraction et caractérisation**

**C2. Les graines d'*Hibiscus sabdariffa*: extraction et caractérisation des huiles**

### **CHAPITRE III *Artemisia annua* L.**

**CHAPITRE IIIA Rappel bibliographique**

**CHAPITRE IIIB Contexte du projet de coopération scientifique inter-universitaire**

**CHAPITRE IIIC Matériels et méthodes**

**C1. Essai de mise en culture au Cambodge**

**C2. Essai de mise en culture au Sénégal**

**C3. Méthodes d'analyses**

**CHAPITRE IIID Résultats et discussion**

**D1. Cambodge**

**D2. Sénégal**

## **CONCLUSION GENERALE ET PERESPECTIVES**

## **ANNEXES**

## SOMMAIRE

<b>Introduction Générale.....</b>	<b>10</b>
<b>Chapitre I – Etude bibliographique</b>	
<b>I.1 Les plantes aromatiques et médicinales, généralités.....</b>	<b>14</b>
I.1.1 Identité botanique.....	14
I.1.2 Culture.....	14
I.1.3 Choix du site de culture.....	14
I.1.4 Environnement naturel et impact social.....	15
I.1.5 Climat.....	15
I.1.6 Sol.....	15
I.1.7 Période de récolte et techniques de cueillette.....	16
I.1.8 Séchage.....	16
I.1.9 Conservation.....	17
<b>I.2 Les huiles essentielles.....</b>	<b>17</b>
I.2.1 Localisation des huiles essentielles.....	18
I.2.2 Composition chimique.....	18
I.2.3 Propriétés physiques.....	21
I.2.4 Activités biologiques des huiles essentielles.....	21
I.2.5 Procédé classique d'extraction des huiles essentielles.....	22
I.2.6 Principe de l'entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles.....	22
<b>I.3 Extraction par un solvant organique volatil.....</b>	<b>23</b>
I.3.1 Pouvoir de solubilisation.....	24
I.3.2 Le pouvoir extractif.....	25
I.3.3 La capacité de pénétration.....	25
<b>I.4 Composition des huiles végétales.....</b>	<b>26</b>
I.4.1 Les acides gras.....	27
I.4.2 Les différents acides gras naturels.....	27
I.4.2.1. Acide gras saturés.....	28
I.4.2.2 Acide gras insaturés.....	28
I.4.2.3 Acide gras poly-insaturés.....	30

I.4.3	Les glycérides.....	30
I.4.4	Les phospholipides.....	31
I.4.5	Les cérides.....	32
I.4.6	Les stérols.....	32
I.4.7	Les Tocophérols.....	34
	Références bibliographiques.....	37

## Chapitre II-*Hibiscus sabdariffa* L

### Etude comparative et caractérisation chimique de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* perspectives de valorisation.

#### Chapitre IIA Rappel bibliographique-*Hibiscus sabdariffa*.....42

IIA.1	Autres dénominations.....	42
IIA.2	Description botanique.....	43
IIA.3	Présentation de la plante.....	43
IIA.4	Culture de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i> .....	44
IIA.5	Les Calices.....	44
IIA.6	Les Graines.....	45
IIA.7	Les Feuilles.....	46
IIA.8	Utilisations médicinales du <i>Hibiscus sabdariffa</i> .....	47
IIA.9	Les marchés des tisanes à partir des calices d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. ....	48
IIA.10	Conclusion.....	50

#### Chapitre IIB. Matériel et méthodes

IIB.1	Détermination de la teneur en matière sèche des calices et des graines d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> .....	52
IIB.2	Méthode d'extraction et analyses à partir des calices d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> ..	52
IIB.2.1	Procédé classique d'extraction : Hydrodistillation.....	52
IIB.2.2	Conditions opératoires d'hydrodistillation.....	53
IIB.2.3	Distillation –Extraction Simultanées (D.E.S), (Likens-Nickerson).....	53
IIB.2.4	Extraction par Soxhlet.....	55
IIB.2.5	Macération .....	56
IIB.2.6	E.M.A.U.S (Extraction, Macération Assistée par UltraSons).....	56
IIB.2.7	Conditions d'analyse de CPG/SM des calices d' <i>Hibiscus</i> .....	56

<b>IIB.3 Détermination de la composition des huiles d'<i>Hibiscus sabdariffa</i></b>	
IIB.3.1 Méthode d'extraction à partir des graines de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i> .....	57
IIB.3.1.1 Extraction à chaud au Soxhlet.....	57
IIB.3.1.2 Extraction à froid (par centrifugation).....	57
IIB.3.1.3 Accelerated solvent extractor (ASE 200 Dionex).....	58
<b>IIB.3.2 Caractérisation des propriétés physico-chimiques de la qualité des huiles d'<i>Hibiscus sabdariffa</i></b> .....	<b>59</b>
IIB.3.2.1 Indice de saponification .....	59
IIB.3.2.2 Indice d'acide.....	60
IIB.3.2.3 Indice d'iode.....	60
IIB.3.2.4 Mesure de la densité.....	61
<b>IIB.3.3 Détermination de la composition chimique des huiles d'<i>Hibiscus sabdariffa</i></b>	<b>61</b>
IIB.3.3.1 Analyse des acides .....	61
IIB.3.3.2 Dosage des esters méthyliques d'acides gras par CPG.....	62
IIB.3.3.3 Conditions d'analyse du profil d'acides gras.....	62
IIB.3.3.4 Détermination de la teneur en phytostérols.....	63
IIB.3.3.5 Analyses des stérols par CPG.....	63
IIB.3.3.6 Extraction de tocophérols.....	64
IIB.3.3.7 Dosage par étalonnage externe.....	64
IIB.3.3.8 Conditions chromatographiques des tocophérols (CLHP).....	64
<b>IIB.3.4 Détermination des cendres.....</b>	<b>65</b>
<b>IIB.3.5 Détermination de la teneur en protéines.....</b>	<b>65</b>

## Chapitre IIC Résultats et discussion

<b>IIC1 Analyse de huile essentielle extraite par l'hydrodistillation à partir du calice.....</b>	<b>68</b>
IIC1.1.1 Etudes préliminaires sur l'hydrodistillation.....	68
IIC1.1.2 Résultats et discussion sur l'hydrodistillation .....	69
IIC1.2 Comparaison de l'efficacité extractive des différentes techniques et solvants....	73
IIC1.2.1 Résultats d'analyses par CPG/SM.....	76
<b>IIC1.2.2 Conclusion.....</b>	<b>84</b>
<b>IIC2. Extraction et caractérisation des huiles des graines de l'hibiscus.....</b>	<b>86</b>
IIC2.1.1 . Propriétés physico-chimiques des huiles.....	86



IIC2.1.2 Composition en acide gras.....	87
IIC2.1.3 Composition en stérols .....	90
IIC2.1.4 Détermination des teneurs en tocophérols.....	91
IIC2.1.5 Conclusion.....	92
Références bibliographiques.....	94

### **Chapitre III *Artemisia annua***

#### **Etude agronomique et phytochimique pour le développement d'un traitement viable accessible et efficace du paludisme au Cambodge et au Sénégal**

<b>IIIA.1 Rappel bibliographique.....</b>	<b>100</b>
IIIA.1.1 Le paludisme.....	100
IIIA.1.2 Le cycle parasitaire.....	101
IIIA.1.3 Morbidité et mortalité.....	102
IIIA.1.4 Répartition géographique.....	103
<b>IIIA.2 <i>Artemisia annua</i>, plante anti-paludique.....</b>	<b>104</b>
IIIA.2.1 Historique.....	105
IIIA.2.2 Description botanique.....	105
IIIA.2.3 Noms vernaculaires.....	106
IIIA.2.4 Origine phytogéographique.....	106
IIIA.2.5 Utilisation des armoises.....	107
<b>IIIA.3 L'Artémisinine.....</b>	<b>107</b>
IIIA.3.1 Structure, chimie et synthèse.....	107
IIIA.3.2 Artémisinine mode d'action et les dérivés d'artémisinine.....	108
IIIA.3.3 Toxicité .....	110
IIIA.3.4 Résistance.....	111
<b>IIIA.4 Méthodes de production.....</b>	<b>111</b>
IIIA.4.1 Approche synthétique.....	112
IIIA.4.2 Approche biotechnologique.....	112
<b>IIIA.5. Les différents stades de croissance et le cycle biologique.....</b>	<b>112</b>
IIIA.5.1 La phénologie.....	112
IIIA.5.2 L'initiation de la floraison.....	113

IIIA.5.3 La densité.....	113
IIIA.5.4 Nutrition, fertilité et sol.....	113
IIIA.5.5 Irrigation.....	114
IIIA.5.6 La récolte et séchage.....	114
<b>IIIA.6 Variations de la concentration en artémisinine.....</b>	<b>115</b>
IIIA. 6.1 Selon les parties de la plante.....	115
IIIA. 6.2 Les différentes lignées.....	115
Références bibliographiques.....	116
<b>Chapitre IIIB.1. Contexte du projet de coopération scientifique inter-universitaire</b>	
IIIB.1. Partenaires et thématiques de recherche.....	121
<b>IIIB.2 Essai de mise en culture d'<i>artemisia annua</i> par Nomad au Cambodge et au Sénégal en 2002.....</b>	<b>122</b>
<b>IIIB.3 Le programme Nomad au Mondolkiri- Cambodge .....</b>	<b>123</b>
IIIB.3.1 La situation du paludisme au Mondolkiri.....	123
IIIB.3.2 Caractéristiques géographiques et climatiques du Cambodge.....	124
IIIB. 3.3 La zone d'étude : la province de Mondolkiri .....	125
<b>Chapitre IIIC Matériels et méthodes</b>	
<b>IIIC1. Essais de mise en culture au Cambodge</b>	
IIIC1.1.1 Les graines d' <i>Artemisia annua</i> .....	128
IIIC1.1.2 Sites de mise en culture .....	128
IIIC1.1.2.1 Localisation.....	128
IIIC1.1.2.2 Le climat .....	129
IIIC1.1.2.3. Dispositif expérimental.....	130
IIIC1.1.2.4 L'analyse de sol (Cambodge).....	130
IIIC1.1.2.5 Résultats et discussion.....	131
<b>IIIC.2. Essai de mise en culture au Sénégal</b>	
IIIC2. 2.1 Historique du projet.....	137
IIIC2. 2.2 L'objectif général du projet.....	137
IIIC2.2.3 La résistance aux antipaludiques au Sénégal .....	138
IIIC2.2.4 Localisation de la mise en culture .....	138

IIIC2.2.5 Semis et élevage des plantules.....	138
<b>IIIC3. Méthodes d'analyses</b>	
IIIC.3.1 Echantillonnage du matériel végétal.....	141
IIIC.3.2 Choix de la méthode d'analyse de l' <i>Artemisia annua</i> .....	142
<b>IIIC.3.3 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)-Densitomètre....</b>	<b>143</b>
IIIC.3.3.1 Extraction de <i>Artemisia annua</i> .....	143
IIIC.3.3.2 Solution standard.....	143
IIIC.3.3.4 Dosage de l'artémisinine par CCM et densitométrie.....	145
<b>IIIC.4 Analyses statistiques.....</b>	<b>146</b>
<b>IIIC.5 Analyses des sols (Cambodge).....</b>	<b>146</b>
IIIC.5.1 Prélèvement et analyses de sols.....	146
IIIC.5.2 Granulométrie.....	146
IIIC.5.3 pH et conductivité électrique .....	146
IIIC.5.4 La matière organique.....	147
IIIC.5.5 L'azote total par la méthode Kjeldahl.....	147
IIIC.5.6 La capacité d'échange cationique .....	147
IIIC.5.7 Dosage des micro-éléments : Fer, Cuivre, Zinc et Manganèse.....	148
<b>IIIC.6 Méthodes de distillation-extraction .....</b>	<b>148</b>
IIIC.6.1 L'hydrodistillation.....	148
IIIC.6.2 Conditions d'analyse de CPG/SM.....	148
IIIC.6.3 Méthode des indices de rétention – Identification des alcanes.....	149

## Chapitre IIID. Résultats et discussion sur artemisia

<b>IIID1.1 Cultivée au Cambodge.....</b>	<b>151</b>
IIID1.1 Résultats .....	151
IIID.1.1.1 Effets des modalités de culture sur la production d'artémisinine extraite des fleurs.....	151
IIID.1.1.2 Effets des modalités de culture sur la production d'artémisinine extraite des feuilles.....	152
IIID1.1.3 Discussion .....	160

IID1.2 Composés volatiles <i>d'Artemesia annua</i> extraits <i>par hydrodistillation</i> .....	161
IID1.3 Conclusions .....	163
<b>IID2. Cultivée au Sénégal .....</b>	<b>164</b>
IID2.1.1. Date de récolte et nombre de jours entre la transplantation et la récolte.....	165
IID2.2.1 Conclusion.....	167
Références bibliographiques.....	168
<b>Conclusions générales et perspectives.....</b>	<b>171</b>

## Liste des abréviations

ASE: Accelerated Solvent Extractor

A.U.F: Agence Universitaire de la Francophonie

C.N.M: Centre national de Malariologie

CPG: Chromatographie en Phase Gazeuse

H.N.I: Health Net International

FAO : Food and Agricultural Organization of the United Nations.

FAME: Fatty Acid Methyl Ester

M.D.M.: Médecins du Monde

*miir* : champ cultivé en langage Phnong (Cambodge)

O.M.S: Organisation Mondiale de la Santé

O.N.G : Organisation Non Gouvernementale

P.H.D: Provincial Health Department

RITAM: Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods

RSI: Recherche et Soutien International

TBME: Terbutylméthylether

TMSH: Triméthylsulfonium hydroxyde

## Introduction générale

Produites dans de nombreux pays du monde sous des formes très variées, les plantes aromatiques et médicinales sont une source intarissable de molécules intéressant le monde industriel. Les molécules issues de ces plantes sont souvent assimilées à des principes actifs possédant des propriétés spécifiques qui leur confèrent un caractère unique. Issues de la biodiversité, ces plantes particulièrement recherchées sont adaptées à des pays dont l'environnement et le climat facilitent leur culture. L'exploitation des molécules d'intérêt n'est par conséquent possible que dans les pays où la population entretient et cultive ces plantes depuis des décennies.

*Hibiscus sabdariffa* L., une espèce végétale appartenant à la famille des Malvaceae, pousse à l'état sauvage au Vietnam et donne lieu à des applications très variées dans le domaine industriel, notamment celui des arômes, des colorants alimentaires et de la génération des nouvelles boissons. Il est un candidat, par ses graines, à être une nouvelle source d'huile végétale. *Hibiscus sabdariffa* L. n'est pas une plante spécifique du Vietnam. On le trouve également en Afrique et en Amérique. On sait que la composition chimique des huiles essentielles est parfois différente selon l'origine et la biodiversité de la plante (nature du sol, climat et pratiques culturelles) et selon les méthodes d'extraction. Comme les fleurs rouges d'hibiscus sont communément utilisées en Asie, en Afrique ou sur le continent américain comme nourriture, colorant ou boisson, il nous a semblé intéressant de faire une étude comparative des fractions aromatiques contenues dans les calices et des huiles végétales contenues dans les graines d'hibiscus du Vietnam (Asie), du Sénégal (Afrique) et du Mexique (Amérique).

L'objectif de cette étude est de déterminer les caractéristiques et la composition chimique des fractions volatils et des « concrètes » extraites des calices, ainsi que des huiles végétales extraites des graines d'*Hibiscus sabdariffa* en vue de leur valorisation à des fins industrielles.

Une seconde plante a fait également l'objet de mon travail de thèse : c'est *Artemisia annua* L. utilisée comme antipaludique dans bon nombre de pays en voie de développement.

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) (2000), le paludisme est la plus importante infection parasitaire au monde, entraînant la mort de plus d'un million de personnes et en infectant 500 millions par an. Malgré les efforts pour contrôler l'infection, la morbidité et la mortalité n'ont pratiquement pas changé durant les 50 dernières années. La quinine et ses dérivés ont été la principale source de traitement de la maladie pendant des siècles. Cependant, aujourd'hui, face à l'augmentation de la résistance du parasite à ces médicaments à base de quinine dans toutes les zones impaludées, une nouvelle molécule est utilisée, l'artémisinine. L'artémisinine est extraite de la plante *Artemisia annua* L. pour la fabrication du médicament : la synthèse par voie chimique n'est pas encore possible. C'est donc la culture d'*Artemisia annua* qui semble être la seule voie de production d'artémisinine.

Une autre approche consiste en une utilisation directe de la plante sous forme d'infusion de feuilles. C'est la méthode traditionnelle qui est utilisée dans la pharmacopée chinoise depuis plus de 2000 ans. Depuis 1997, l'organisation non gouvernementale (ONG) Toulousaine, «Nomad» recherche et soutien international (RSI), a mis en place des projets de recherche opérationnelle orientés sur cette maladie dans une zone fortement impaludée du Cambodge, le Mondolkiri, où coexiste médecine traditionnelle et moderne et dont l'accès à des soins efficaces est souvent difficile. Dans son objectif de recherche de solution permettant d'améliorer la santé globale, tout en tenant compte le contexte local, «Nomad» a intégré la culture d'*Artemisia annua* dans ses programmes. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une coopération internationale entre «Nomad» et trois universités: le laboratoire de Chimie Agro-industrielle de Toulouse, (INPT, France), la faculté de pharmacie de Dakar, (Sénégal) et l'université d'agriculture de Phnom Penh, (Cambodge). Il a été financé par l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) qui permettra à des étudiants et chercheurs des 3 universités partenaires de se rencontrer et d'enrichir leurs connaissances.

L'objectif global du projet est de contribuer à la lutte contre le paludisme au travers de recherches coordonnées sur les potentialités de production et d'utilisation de la plante *Artemisia annua*. Ce type de recherche s'inscrit dans un objectif de développement international car sa finalité est de permettre l'accès à des modalités de soins géographiquement et financièrement accessibles pour les populations rurales du Cambodge et du Sénégal.

Le projet consiste, d'une part, à établir les conditions de production les plus favorables dans deux régions du Cambodge et du Sénégal dans lesquelles le paludisme est largement

prévalent et connaît une résistance aux traitements classiques et, d'autre part, à initier des recherches concernant l'extraction des composés actifs de la plante.

Le premier chapitre de ce mémoire propose une mise au point bibliographique des différents aspects abordés dans cette étude, des généralités sur les cultures des plantes aromatiques et médicinales, des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles et de la composition des huiles végétales.

Le deuxième chapitre est consacré à une étude comparative de trois variétés d'*Hibiscus sabdariffa* d'origines géographiques différentes. Après un bref rappel bibliographique et une présentation des matériels et méthodes nous avons, dans un premier temps, comparé les rendements et les performances des méthodes conventionnelles d'extraction telles que l'hydrodistillation, la D.E.S (Distillation Extraction Simultanées) Likens-Nickerson, l'E.M.A.U.S (Extraction, Macération Assistée par Ultrasons), et l'extraction par Soxhlet, ainsi que l'influence de la nature du solvant (eau, hexane, cyclohexane et dichlorométhane). Dans une deuxième partie, une étude comparative des extraits des graines des trois variétés de l'hibiscus incluant une caractérisation physico-chimique et la détermination de la composition en acide gras des huiles a été également menée. Puis, des dosages qualitatifs et quantitatifs des principaux composés de la fraction insaponifiable de ces huiles ont été réalisés. Enfin, à l'aide des résultats obtenus, nous tenterons de proposer des voies de valorisation potentielles des extraits des calices et des graines.

Le troisième chapitre propose une première partie bibliographique mettant en lumière les dernières découvertes autour du paludisme. Concernant, les traitements ainsi que résistances et les espoirs apportés par *Artemisia annua*. Une deuxième partie est consacrée à une présentation des matériels et méthodes et à une description du projet agronomique de mise en culture d'*artemisia*. Enfin, une troisième partie présente les principaux résultats de l'effet des différentes conduites agronomiques (techniques de plantation, site de culture, variation des dates de récolte, et le stade phénologique ...) sur la production du principe actif artémisinine en termes de pourcentage et rendements dans le cadre d'expérimentation au Cambodge et au Sénégal. Ces résultats sont discutés en rapport avec le lieu et les caractéristiques du lieu de culture.



**CHAPITRE I**  
**Etude bibliographique**

## **I.1 Les Plantes Aromatiques et Médicinales. Généralités**

### **I.1.1 Identité botanique.**

L'identité botanique, c'est-à-dire le nom scientifique (genre, espèce, sous-espèce/variété, auteur et famille) de chaque plante médicinale cultivée, doit être déterminée ou définie et enregistrée. Le nom local et le nom commun français, s'ils existent, seront également enregistrés. Toute autre information pertinente, comme le mode de culture, l'écotype, le chimiotype ou le phénotype, peut également être notée selon le cas.

En ce qui concerne les cultivars disponibles dans le commerce, le nom du cultivar et celui du fournisseur doivent être indiqués. Dans le cas d'espèces primitives récoltées, multipliées, disséminées et cultivées dans une région déterminée, on notera la lignée avec son nom local, la source des graines, plantes d'origine ou autres matériels de multiplication<sup>[1]</sup>.

### **I.1.2 Culture**

La culture des plantes médicinales requiert des soins attentifs et une gestion adéquate. Les conditions et la durée de culture dépendent de la qualité des matières végétales recherchées. S'il n'existe pas de données scientifiques publiées ou documentées sur la culture des plantes médicinales, on suivra, là où c'est possible, les méthodes de culture traditionnelles. Les principes de bonne gestion agricole, y compris par la rotation appropriée des cultures en fonction de leurs exigences environnementales, devront être appliqués, et les labours seront adaptés au développement des plantes et aux autres besoins de la culture<sup>[2]</sup>.

### **I.1.3 Choix du site de culture**

La matière végétale dérivée de la même espèce peut présenter des différences importantes de qualité d'un site de culture à un autre, du fait de l'influence du sol, du climat et d'autres paramètres. Ces différences peuvent porter sur l'aspect physique des plantes ou sur leurs constituants dont la biosynthèse peut être affectée par des conditions environnementales extrinsèques, notamment par des variables écologiques et géographiques, et doivent être prises en compte. Les risques de contamination du fait de la pollution des sols, de l'air ou de l'eau, ou par des produits chimiques dangereux, doivent être évités. L'impact de l'utilisation passée des sols sur le lieu de culture choisi, notamment les plantations précédentes et les applications éventuelles de produits phytosanitaires, doit être évalué<sup>[2-3]</sup>

#### **I.1.4 Environnement naturel et impact social.**

La culture des plantes médicinales peut affecter l'équilibre écologique et, en particulier, la diversité génétique de la flore et de la faune des habitats environnants. La qualité et le développement des plantes médicinales peuvent, à leur tour, être affectés par les autres plantes, les autres êtres vivants et les activités humaines. L'introduction d'espèces non indigènes de plantes médicinales, sous forme de cultures, peut avoir un impact défavorable sur l'équilibre biologique et écologique de la région. Là où cela est réalisable, l'impact écologique des activités de culture devra être surveillé dans le temps <sup>[1-3]</sup>.

#### **I.1.5 Climat**

Les conditions climatiques, par exemple la période de la journée, les précipitations et la température extérieure, ont une influence sensible sur les qualités physiques, chimiques et biologiques des plantes médicinales. La durée d'ensoleillement, la hauteur moyenne des précipitations, la température moyenne et l'amplitude thermique entre le jour et la nuit influencent également l'activité physiologique et biochimique des plantes. Il est important de déterminer au préalable tous ces facteurs <sup>[4]</sup>.

#### **I.1.6 Sol**

Le sol doit contenir des quantités appropriées d'éléments nutritifs, de matières organiques et d'autres éléments de façon à assurer à la plante un développement et une qualité optimale. Les conditions pédologiques optimales - type de sol, de drainage, rétention de l'humidité, fertilité, pH - seront dictées par l'espèce de plantes médicinales ou aromatiques choisies et /ou par la partie de la plante que l'on souhaite récolter. Il est souvent indispensable d'utiliser des engrais pour obtenir des rendements élevés. Il est toutefois nécessaire de s'assurer, grâce à la recherche agronomique, que les types adéquats d'engrais sont correctement utilisés ainsi que les quantités. Dans la pratique, on utilise des engrais organiques et naturels. Mais, quels que soient les engrais utilisés, ils doivent être appliqués avec parcimonie et en fonction des besoins de la plante médicinale cultivée et de la capacité du sol. L'application devra être réalisée de façon à éviter au maximum le lessivage <sup>[6-8]</sup>.

### **I.1.7 La période de récolte et les techniques de cueillette**

Les propriétés des plantes dépendent essentiellement de la région de production, de la période de récolte et des techniques de cueillette. La connaissance du calendrier des récoltes et des techniques de cueillette et de conservation doit toujours être considérée afin de garantir la qualité des produits. Les différentes parties d'une plante (racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits et graines) ont des modalités de croissance bien déterminées et chacune d'entre elles renferment, à des moments précis et en proportions variables, les différents éléments qui conditionnent leur qualité et leur efficacité.

La cueillette doit toujours tenir compte des variations climatiques et saisonnières. Ainsi, elle ne doit jamais se faire par temps de pluie afin d'éviter les risques de moisissure. Pour déterminer les propriétés d'une plante, il est donc nécessaire de prendre en considération, non seulement la partie utilisée mais aussi sa morphologie, sa couleur, sa nature, sa saveur et ne pas s'arrêter sur un seul critère <sup>[7-9]</sup>.

### **I.1.8 Le séchage**

De la qualité du séchage va dépendre la conservation de la plante. La cueillette terminée, la plante est débarrassée de tout détritrus indésirable, puis ses différentes parties sont traitées de manière spécifique. Selon les catégories de plantes, les techniques de séchage peuvent varier: séchage au soleil, séchage à l'ombre, séchage artificiel. Le séchage au soleil est la méthode la plus simple et la plus économique. Il concerne surtout les racines, les tiges ou les graines. Les feuilles vertes séchées au soleil jaunissent, les pétales de fleurs perdent leurs couleurs vives, ce qui peut altérer les propriétés médicinales de ces produits. Les plantes aromatiques, pour ne pas perdre leur parfum, ne doivent pas rester trop longtemps au soleil. Les séchages artificiels doivent s'effectuer dans un endroit sec, à l'abri du soleil. Ils conviennent particulièrement aux plantes aromatiques. Les séchages artificiels s'obtiennent à l'étuve ou dans une chambre de séchage chauffée. Les fruits, qui contiennent beaucoup de jus, ou les racines, riches en sucs, doivent être séchés rapidement à une température moyenne de 25-30° C <sup>[7-9]</sup>.

### **I.1.9 La conservation**

Au cours d'un stockage prolongé, les méthodes et les conditions de conservation doivent permettre d'éviter toute modification de la nature des plantes (vermine, moisissures, micro-organismes) afin de préserver l'intégrité de leurs propriétés actives. La qualité des plantes aromatiques ou médicinales en dépend. C'est une étape importante dans la garantie des propriétés des plantes étudiées ou utilisées.

Le développement des moisissures et des micro-organismes est favorisé par l'humidité pouvant provenir de la plante elle-même, d'une mauvaise aération du lieu de conservation ou de l'humidité du sol. Ces facteurs qui peuvent accélérer les processus de fermentation ou d'oxydation de certains constituants végétaux. La conservation dans un endroit frais évite, par exemple, la dissémination des spores et la multiplication des parasites. Aussi, est-il souvent nécessaire, dans un premier temps, de soumettre les produits récoltés au séchage par le soleil, tout en sachant qu'un séchage trop prolongé au soleil modifie non seulement la couleur mais aussi la nature de ceux-ci <sup>[10]</sup>.

La conservation à l'abri de la lumière, dans des récipients en porcelaine, en faïence ou en verre teinté, peut être nécessaire pour les plantes qui subissent des transformations chimiques sous l'influence des ultraviolets. La conservation en milieu étanche peut être utile pour les plantes qui s'oxydent rapidement ou qui contiennent des produits volatils<sup>[10,11]</sup>.

## **I.2 Les huiles essentielles**

Les parfums qu'exhalent certaines plantes sont dus à des molécules volatiles que l'on désigne globalement par le terme "essence". L'huile essentielle correspond à l'extrait obtenu par entraînement à la vapeur d'eau de l'organe végétal où a lieu le stockage de l'essence. Ces composés volatils ont la propriété d'être solubles dans l'huile et les graisses et ont, de ce fait, reçu le nom d'huile essentielle. Le terme "huile" souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances.

### **I.2.1 Localisation des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal avec des familles à haute teneur en matières odorantes comme les *conifères*, les *rutacées*, les *myrtacées*, les *ombellifères*, les *lamiacées*, les *géraniacées* etc.

Les essences peuvent être localisées dans des cellules sécrétrices isolées (cas des lauracées et magnoliacées), mais on les trouve le plus souvent dans des organes sécréteurs spécialement différenciés et variables suivant les familles botaniques. On peut citer, par exemple, les poils sécréteurs des *lamiacées*, les poches sécrétrices des rutacées et les canaux sécréteurs des conifères. L'appareil sécréteur peut être externe, comme dans bon nombre de *lamiacées*, ou bien interne, comme c'est le cas pour les différents *eucalyptus (myrtacées)* [13, 14].

## I.2.2 Composition chimique

L'huile essentielle est un mélange complexe de molécules odorantes. C'est un liquide homogène, bien que constitué d'un assemblage hétérogène sur le plan chimique par la diversité des structures présentes. Nous présenterons, au cours de ce paragraphe, les principales familles de molécules odorantes.

Les **composés terpéniques**, quelle que soit leur provenance, sont issus de métabolites secondaires de l'acide mévalonique. Leur structure est généralement formée par un nombre entier d'unités (n), de méthyl-2-butadiène. Selon le nombre d'unités, nous pouvons réaliser la classification suivante : Un grand nombre de composés naturels de la famille des terpènes viennent des polymérisations et des remaniements d'un même précurseur l'isoprène, carbure diénique à 5 atomes de carbone :

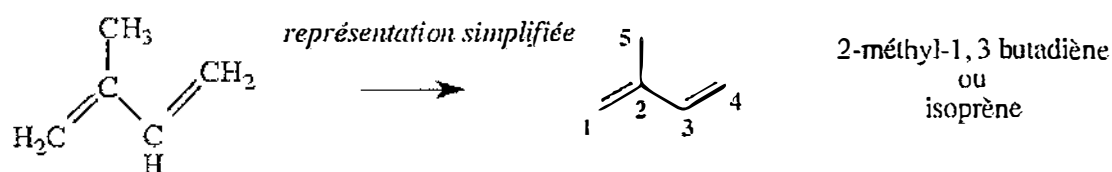


Figure1: Molécule d'isoprène

- **Pour n=2** : Les *monoterpènes*, ce sont des hydrocarbures aromatiques, en (C<sub>10</sub>). Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales, surtout alcool et aldéhyde, comme: l'ocimène (basilic), le myrcène (laurier) et le géraniol. Ces derniers sont des monoterpènes acycliques, alors que le limonène et le pinène sont des monoterpènes cycliques.

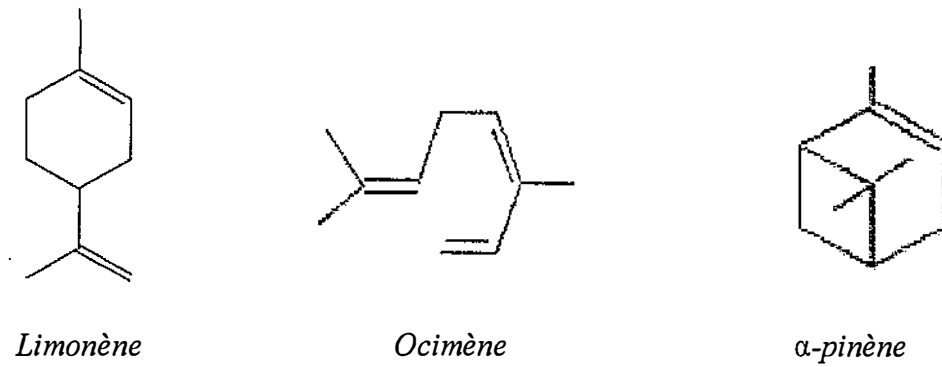


Figure 2: Exemple des composants monoterpéniques

• Pour  $n=3$  : *Les sesquiterpéniques*. Ce sont des hydrocarbures aromatiques en ( $C_{15}$ ), comme les pinène, phellandréne, camphène, caryophyllène, humulène etc....

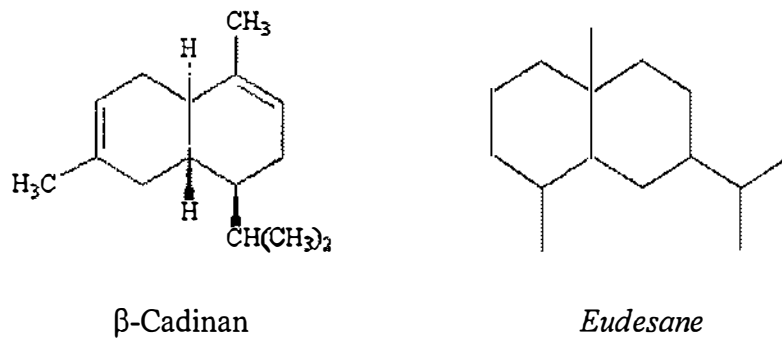


Figure.3: Exemple des composants sesquiterpéniques

• Pour  $n=4$ : *Les diterpènes*. Ce sont des dérivés d'hydrocarbures aromatiques en ( $C_{20}$ ). Ces composées, à point d'ébullition élevé, se rencontrent surtout dans les résines.

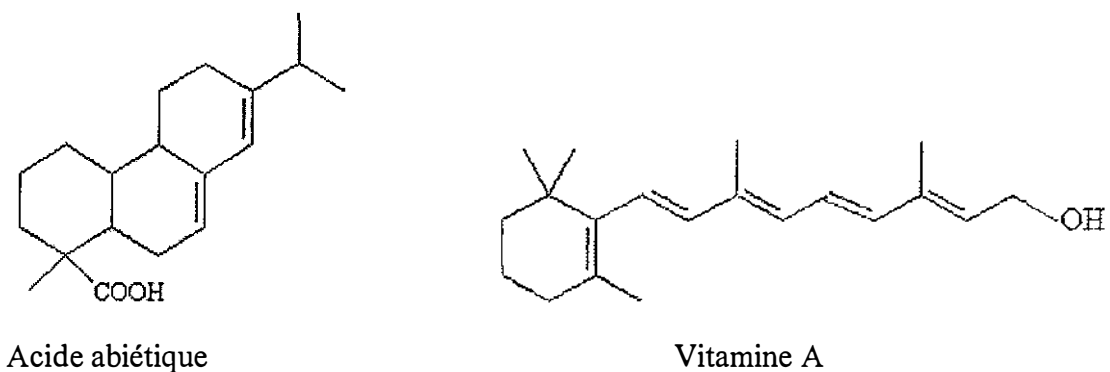
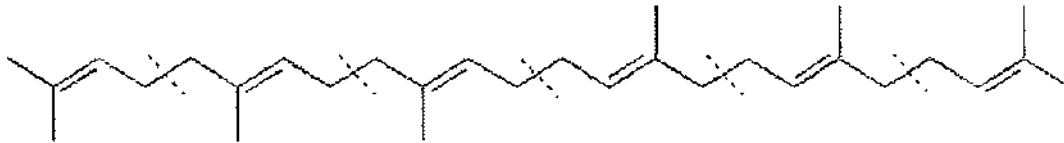


Figure 4: Exemple des composants terpéniques

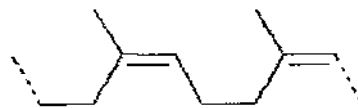
- **Pour  $n=5$ : les sesterpènes.** Ce sont des dérivés d'hydrocarbures, ( $C_{25}$ )
- **Pour  $n=6$ : Les Triterpènes.** Ce sont des dérivés d'hydrocarbures aromatiques en ( $C_{30}$ ).



Squalène

Figure 5 : Exemple des composants triterpéniques

- **Pour  $n=8$ : Les polyterpènes.** Le caoutchouc naturel dont les précurseurs sont des stéroïdes, très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifié, ou sous forme hétérosidique.



Caoutchouc naturel

Figure 6 : Exemple du caoutchouc naturel

La formule brute des hydrocarbures terpéniques est donc  $(C_5H_8)_n$ , famille de composés se retrouvant beaucoup dans les huiles essentielles. Aussi, comme nous le verrons par la suite, un grand nombre de composés oxygénés (alcools, cétones, acides, aldéhydes, éthers, esters) <sup>[13, 14]</sup> entrent dans la composition des huiles essentielles.

### I.2.3 Propriétés physiques

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent un certain nombre de propriétés physiques communes. Elles sont généralement sous forme liquides à température ambiante et leur grande volatilité les oppose aux "huiles fixes" (lipides). Lorsqu'elles viennent d'être préparées, leurs teintes est généralement comprise dans une gamme allant de l'incolore, à jaune pâle. Il existe toutefois quelques exceptions, comme



l'huile essentielle de camomille romaine (*Anthemis nobilis*) qui possède une coloration bleu clair due à la présence du chamazulène.

Leur densité est le plus souvent inférieure à l'unité. Seules 3 huiles essentielles officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau : il s'agit des huiles essentielles de cannelle, de girofle et de saffras. Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées de pouvoir rotatoire puisque constituées, pour l'essentiel, de molécules asymétriques. Peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent cependant leurs odeurs (eaux distillées aromatiques). Elles sont solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont très facilement altérables et sensibles à l'oxydation, mais ne rancissent pas. Le caractère odorant des huiles essentielles est lié à la volatilité des molécules qui les composent ce qui permet de les obtenir par entraînement à la vapeur d'eau<sup>[14]</sup>.

#### **1.2.4 Activités biologiques des huiles essentielles**

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés thérapeutiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine fongiques, contre les dermatophytes<sup>[15]</sup>, celles d'origine bactériennes, par exemple contre les bactéries endocanalaies<sup>[15,16]</sup> et au niveau de la microflore vaginale<sup>[17]</sup>. Elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre. Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique.

La dose de thymol applicable sur la peau et les muqueuses est de 0,5 %. Ingéré à des doses de 2 g ou plus, il est responsable de gastralgies et de nausées<sup>[19]</sup>. Dans les domaines phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs peuvent également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathologiques<sup>[20]</sup>, et les microorganismes envahissant des denrées alimentaires<sup>[21]</sup>.

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae*: *thym*, *origan*, *lavande*, *menthe*, *romarin*, *sauge*, etc. L'essence d'origan d'Espagne est souvent citée comme étant parmi les huiles les plus actives<sup>[22]</sup>. Son composé majoritaire, le carvacrol, possède également une forte activité antimicrobienne<sup>[23]</sup>.

### I.2.5 Procédé classique d'extraction des huiles essentielles.

En général les composants extraits à partir de matière végétale sont initialement dissous ou en émulsion, dans la sève de cellules, bien que quelques huiles essentielles puissent exister renfermés dans des poches à huile, sur des poils sécréteurs, etc. Il est nécessaire d'extraire ou d'isoler de la masse de la matière cellulaire inerte le complexe d'odeur/saveur avec le minimum de transformations chimiques. Ceci peut être réalisé par plusieurs techniques selon la matière végétale initiale.

D'une façon générale, la distillation est un procédé de séparation basé sur la différence de composition entre un liquide et la vapeur engendrée. La technique implique la condensation de la vapeur et la récupération des fractions liquides résultantes. On parle de distillation simple ou fractionnée lorsqu'il s'agit de liquides miscibles. On peut également procéder à la distillation de liquides non miscibles. C'est le cas de l'hydrodistillation des huiles essentielles <sup>[24]</sup>.

### I.2.6 Principe de l'entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles.

Le procédé, correspondant à une distillation hétérogène, met en jeu l'application de deux lois physiques.

- *La loi de Dalton* : La pression du mélange des vapeurs est égale à la somme des tensions de vapeur des constituants.

$$P_T = T_H + T_E$$

H et E désignent respectivement l'huile essentielle et l'eau

$P_T$  = Pression totale

T = Tension de vapeur

• *La loi de Raoult* : Le rapport des quantités des entités distillées simultanément est fonction de la tension et des densités des vapeurs (donc des masses moléculaires) à la température de distillation choisie.

$$\frac{Mole_H}{Mole_E} = \frac{T_H}{T_E}$$

T= Tension de vapeur

La relation de ces deux lois donne respectivement la pression totale et la composition des vapeurs en fonction des pressions partielles, d'où le calcul du taux de corps entraîné ou rapport d'entraînement :

$$R = \frac{T_H}{T_E} \times \frac{M_H}{M_E} = \frac{P_H}{P_E}$$

M = masse molaire

P = poids

R = rapport d'entraînement

La température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacune des constituants est égale à la pression d'évaporation. Elle est donc inférieure à chacune des températures d'ébullition des substances pures. Ainsi, le mélange eau/huile essentielle distillée possède une température inférieure à 100 °C à pression atmosphérique (généralement proche de 100 °C, en raison de la faible tension des constituants odorants) alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées [24].

### I.3 Extraction par un solvant organique volatil

Cette technique est la plus pratiquée avec l'hydrodistillation. Elle consiste à épuiser la matière première de ses constituants odorants au moyen d'un solvant, puis à chasser celui-ci de l'extrait par évaporation sous vide. Il existe deux cas particuliers, les hydrolats (extraction par solvant en présence d'eau) et les alcoolats (extraction avec de l'éthanol dilué) pour lesquels on récupère les composés odorants conjointement avec le solvant lors de la distillation pratiquée pour éliminer l'eau présente dans les isolats. Le choix du solvant dépend de nombreux paramètres techniques et économiques, notamment :

- la sélectivité (pouvoir solvant),
- la température d'ébullition (stabilité thermique des constituants),
- la miscibilité dans l'eau,

- la facilité de recyclage,
- la sécurité de manipulation : les solvants choisis seront, dans la mesure du possible, non toxiques tant pour le manipulateur que pour le consommateur.

Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont surtout des hydrocarbures aliphatiques (hexane, éther de pétrole), des hydrocarbures aromatiques (toluène), des alcools ou des solvants carbonylés, et moins fréquemment des hydrocarbures halogénés (dichlorométhane). La méthode d'extraction mise en œuvre dépend aussi de la nature de la matière première végétale. On peut extraire soit à chaud, c'est-à-dire à température proche de la température d'ébullition du solvant, soit à température ambiante. On travaille, en général, dans un extracteur statique afin d'éviter la dégradation de la matrice végétale et la solubilisation concomitante de composés indésirables<sup>[27]</sup>.

Les solutions aromatiques obtenues, appelées miscella, sont évaporées sous vide, à température la plus basse possible afin d'éviter la dégradation des molécules odorantes. Le solvant organique extrait également des composés indésirables, en particulier des matières grasses (huile, cires, etc...). Celles-ci sont d'ailleurs responsables de la dénomination «concrète» qui traduit la tendance des produits à se solidifier à température ambiante. Un traitement secondaire est donc nécessaire pour séparer les fractions aromatique et grasse. Il consiste à entraîner, à l'éthanol, les composés aromatiques. Cette opération est pratiquée à basse température (environ -20°C). On obtient, après évaporation de l'éthanol, un produit appelé «absolue» qui comporte la majorité des composés volatils<sup>[12]</sup>.

### I.3.1 Pouvoir de solubilisation

Le pouvoir de solubilisation d'un solvant est relié à ses caractéristiques moléculaires, définissant notamment sa polarité et son hydrophilie, utilisées en tant qu'indicateurs de l'affinité chimique. Les caractéristiques de polarité et d'hydrophilie sont notamment révélées par :

- la présence de groupes fonctionnels dissociatifs,
- le potentiel de liaison hydrogène et la faculté de mise en commun d'électrons,
- l'affinité eau/solvant, soit la solubilité du solvant dans l'eau, soit la solubilité de l'eau dans le solvant.

Cette approche sur l'efficacité extractive des solvants se justifie d'autant plus qu'elle concerne des substrats végétaux dont la teneur en eau peut atteindre 80 % pour les matières fraîches. L'affinité eau/solvant conditionne la diffusion dans les tissus riches en eau interstitielle et dans les cellules où l'eau libre est abondante. En entraînant l'eau libre, le solvant modifie l'assemblage cellulaire et entraîne les métabolites solubles dans l'eau [27].

De plus, la solubilisation peut atteindre l'eau structurelle qui participe à l'intégralité des tissus. Cette action prime sur les facteurs intervenant sur le pouvoir extractif, notamment lié à la diffusion, en relation avec les propriétés physiques du solvant. Par sa qualité déstructurante, elle a comme incidence d'assurer la diffusion du solvant dans les tissus végétaux. Un exemple de cette interaction pour l'éthanol, qui a une grande affinité pour l'eau. Il déstabilise l'interaction hydrophobe responsable de la structure tertiaire des molécules protéiques ou lipoprotéines présentes dans les membranes cellulaires.

En ce qui concerne l'affinité vis-à-vis de l'eau, deux facteurs sont à prendre en compte : la solubilité du solvant dans l'eau et la solubilité de l'eau dans le solvant. Ces facteurs interviennent vraisemblablement sur la diffusion des produits à l'intérieur du contenu cellulaire, notamment la solubilité dans l'eau pour la circulation du solvant dans les milieux hydratés. La solubilité de l'eau et sa polarité sont plus particulièrement déterminants pour prévoir le pouvoir du solvant vis-à-vis des composés hydrophiles dans un milieu hydrophile.

### ***1.3.2 Le pouvoir extractif***

L'estimation de l'efficacité d'un solvant ne peut être réduite aux seules propriétés chimiques de polarité et d'affinité vis-à-vis de l'eau. Nous devons également tenir compte des propriétés physiques déterminant la capacité du solvant à pénétrer dans une matrice poreuse. Le pouvoir extractif est défini par la capacité du solvant à pénétrer et à diffuser dans la structure végétale de façon à rencontrer et entraîner les molécules cibles. Evidemment, ce dernier processus suggère la solubilisation des molécules. Il est clair que les notions de pouvoir solvant et extractif, ainsi que de sélectivité chimique, sont liées les unes aux autres par les caractéristiques chimiques et physiques des solvants [27]. Nous tenterons d'évaluer le pouvoir extractif selon deux composantes, eux-mêmes liées, aux deux paramètres indiqués ci-dessous:

- tension superficielle et viscosité
- capacité de pénétration

### I.3.3 La capacité de pénétration

La faible tension superficielle d'un liquide, dans lequel on immerge une matrice solide poreuse tel un substrat végétal, permet un bon mouillage des pores, surtout si ces pores sont de petites dimensions. La pénétration du liquide est plus efficace, notamment s'il s'agit d'une matière à organisation cellulaire. Si la viscosité du liquide est peu élevée, il bénéficiera d'un bon écoulement dans les spores et circulera naturellement dans les espaces intercellulaires <sup>[27]</sup>.

En ce qui concerne la tension superficielle des solvants utilisés généralement dans l'extraction, nous remarquons qu'elle est faible pour l'hexane le dichlorométhane et le Toluène (Tableau.1). Nous pouvons constater, dans le Tableau 1, que la valeur de la viscosité de l'hexane est la plus basse par rapport aux autres solvants qui sont très utilisés lors de l'extraction de composants issus de la matière végétale<sup>[28, 29]</sup>.

Nous pouvons aussi considérer l'effet du volume moléculaire des solvants sur leur absorption si nous estimons que le diamètre des pores des matrices végétales est faible. Dans l'hypothèse où cette caractéristique intervient effectivement en tant que facteur limitant à la pénétration des solvants, nous constatons que la molécule ayant les plus faibles viscosité et tension superficielle a un volume moléculaire plus élevé et inversement.

<b>Solvant</b>	<b><i>n</i>-Hexane</b>	<b>Cyclohexane</b>	<b>Toluène</b>	<b>Dichlorométhane</b>
Masse moléculaire	86,18	84,16	92,14	84,93
Densité	0,663	0,789	0,866	1,33
Solubilité (g/100ml) à 20°C dans l'eau	0,07	0,09	0,053	1,63
Tension Superficielle (dynes/cm <sup>2</sup> )	18,4/20°C	----	28,5/20°C	28,2/20°C
Viscosité (cp) (g·cm <sup>-1</sup> ·sec <sup>-1</sup> )	0,326/20°C	-----	0,580/20°C	0,425/20°C
Température d'ébullition (°C)	68,95	81	110.6	39-40

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques des solvants utilisés dans l'extraction des composants aromatiques et médicinaux

## I.4 Composition des huiles végétales

Les corps gras d'origine végétale sont essentiellement des glycérides (98 à 99 %). Une fraction quantitativement mineure, appelée fraction insaponifiable, est également présente dans ces corps gras. D'autres composés n'appartenant pas à ces deux catégories peuvent y être présents dans de faibles proportions : les céroïdes, les chlorophylles et les produits d'altération, issus de la dégradation des triglycérides durant le stockage.

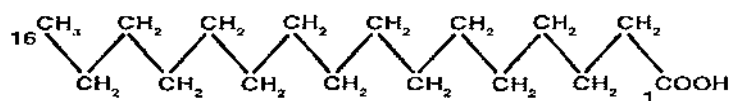
### I.4.1 Les acides gras<sup>[30,31]</sup>

Les acides gras sont des molécules peu abondantes sous forme libre dans les matières grasses fraîches. Ce sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe, saturés ou non saturés, selon qu'ils contiennent ou non des doubles liaisons. Ils sont notés  $C_n : m$  où  $n$  représente le nombre d'atomes de carbone et  $m$  est le nombre de doubles liaisons. Les acides gras sont donc différents entre eux non seulement par la longueur de la chaîne carbonée, mais aussi par le nombre, la position et la structure spatiale (cis, trans) des doubles liaisons. La longueur de la chaîne carbonée permet une classification des acides gras volatils avec 2, 3 ou 4 atomes de carbone ; les acides gras à chaîne courte qui possèdent entre 6 et 10 atomes de carbone ; les acides gras à chaîne moyenne, avec 12 à 14 atomes de carbone et les acides gras à chaîne longue avec plus de 15 atomes de carbone.

### I.4.2 Les différents acides gras naturels

#### I.4.2.1 Acides gras saturés

L'**acide palmitique** est un acide gras à chaîne longue, le principal produit de la synthèse des lipides dans les cellules animales. On le symbolise souvent par les nombres C16:0 pour indiquer qu'il a 16 atomes de carbone et aucune liaison éthylénique : c'est un acide gras saturé. Il est présent sous la forme d'un solide blanc, qui fond à 64°C. Son nom provient de l'huile de palme, mais il est abondant dans toutes les graisses et huiles animales et végétales. C'est un excellent aliment énergétique. Industriellement on utilise l'acide palmitique pour la fabrication des margarines et des savons durs.



Figures 7: L'acide palmitique (C16 : 0)





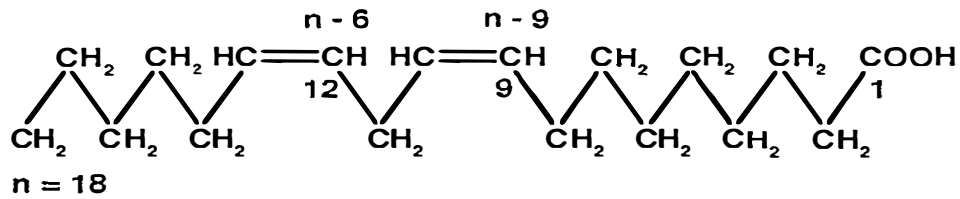
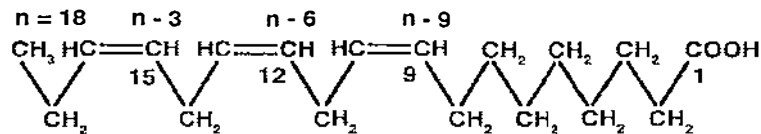


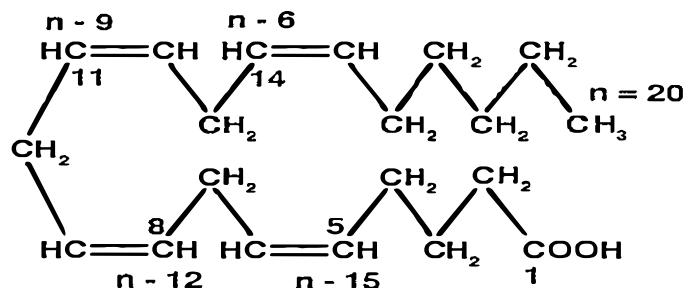
Figure 10: L'acide linoléique (C18 : 2 (n-6 n-9))

**L'acide linoléique**, est un acide gras à chaîne longue qu'on trouve dans les huiles végétales et dans les huiles des poissons. On le symbolise par les nombres 18:2. Il est un acide gras insaturé. Il est sous forme liquide (huile) à température ambiante et ne se solidifie qu'à  $-11^{\circ}\text{C}$ . En présence d'air, il s'oxyde rapidement (rancissement). L'acide linoléique ne peut pas être synthétisé dans l'organisme des animaux. Il est reçu exclusivement par voie alimentaire (huiles végétales).



Figures 11: L'acide linoléique (C18 : 3 (n-3 n-6 n-9))

**L'acide arachidonique**, est un acide gras à chaîne longue, présent dans certaines huiles végétales. On le symbolise par les nombres 20:4. Il est un acide gras polyinsaturé. L'acide arachidonique est fabriqué par l'organisme humaine à partir de l'acide linoléique. Il n'est donc pas un acide gras indispensable. Il est le précurseur direct des hormones eicosanoïdes.



Figures 12: L'acide arachidonique [(C20 : 4)(n-6 n-9 n-12 n-15)]

Les acides gras majoritaires de la plupart des espèces oléagineuses cultivées (à l'exception du coprah) possèdent 16 à 18 atomes de carbone. La composition relative en acides gras des huiles de différentes espèces oléoprotéagineuses est présentée dans le Tableau 2.

Acides gras		Colza	Tournesol	Olive	Arachide	Soja	Coton	Maïs	Palme	Palmiste	Coprah
Caproïdique C6:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,1	1,2
Caprylique C8:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	7,0
Caprique C10:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	6,1
Laurique C12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	trace	47,0	46,0
Myristique C14:0	-	<0,1	-	-	-	0,1	0,8	-	1,0	16,1	18,1
Palmitique C16:0	4,8	7,4	11,2	11,1	10,3	22,7	10,9	44,1	8,0	9,3	
Palmitoléique C16:1	0,5	0,2	1,1	0,1	0,2	0,8	trace	trace	-	-	
Stéarique C18:0	2,6	4,5	3,2	4,2	4,5	2,3	2,3	6,2	2,7	3,1	
Oléique C18:1	56,8	47,3	77,4	44,8	22,8	20,1	24,2	38,0	15,9	7,4	
Linoléique C18:2	22,1	39,8	7,0	32,0	52,0	51,5	58,6	10,1	2,8	2,0	
Linoléique C18:3	11,0	<0,5	<1	<0,5	9,6	<1	1,2	<0,5	-	-	
Arachidéique C20:0	<0,5	<0,5	trace	2,2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	-	-	
Béhénique C22:0	<0,5	<1	-	2,7	<0,5	<0,2	<0,5	-	-	-	
Erucique C22:1	<1	-	-	<1	-	-	<0,5	-	-	-	
Lignocérique C24:0	trace	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	

Tableau 2: Composition ( %) en acides gras de différents produits d'origine végétale<sup>[30]</sup>.

### I.4.3 Les glycérides

Les glycérides sont des esters formés à partir d'acides gras (C<sub>2</sub> à C<sub>22</sub>) et de glycérol. Les graisses et les huiles ne sont pas des glycérides simples. Elles contiennent un certain nombre d'acides gras différents ou non, distribués plus ou moins au hasard parmi les différentes molécules de glycérides. Ce qui leur confère des propriétés physiques, une réactivité chimique et un comportement physiologique.

La fraction glycéridique des corps gras d'origine végétale renferme en majeure partie des triglycérides (les acides gras estérifiant le glycérol pouvant être de diverses natures : chaîne hydrocarbonée (R), plus ou moins longue, plus ou moins insaturée), des monoglycérides et des diglycérides, ainsi que des acides gras, y sont présents en faibles quantités<sup>[32]</sup>.

### I.4.4 Les phospholipides

Les phospholipides (phosphatides), présents dans les corps gras végétaux bruts (jusqu'à 2 % de certaines huiles) sont essentiellement des phosphoglycérides (c'est-à-dire des dérivés du phosphoryl-3 glycérol), des sphingolipides (dérivés de la phytosphingosine) et des phospholipides comportant, en outre, des motifs glucidiques (glycolipides)<sup>[32]</sup>. La partie glycérol-phosphate est hydrophile alors que les acides gras sont hydrophobes. On représente souvent les phospholipides par un groupement phosphate hydrophile, et deux chaînes hydrocarbonées.

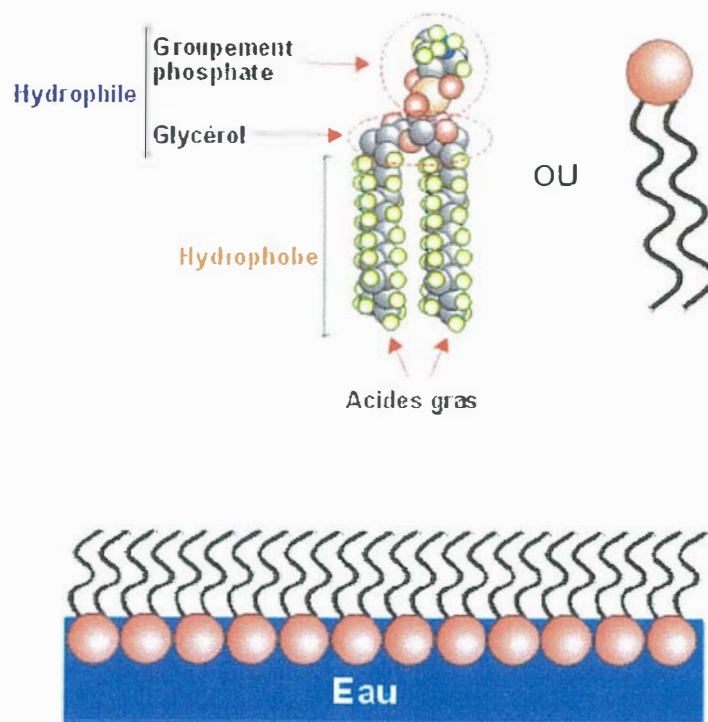


Figure 13: Comportement des phospholipides face à l'eau

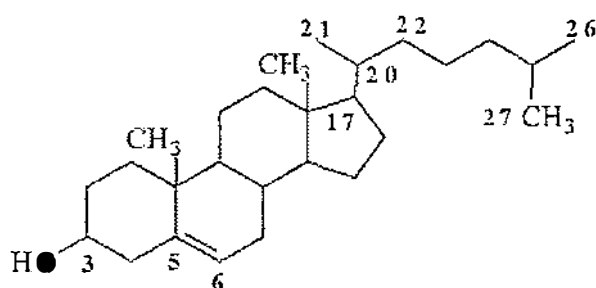
Placées dans de l'eau, les molécules de phospholipides ont tendance à former une couche monomoléculaire (une molécule d'épaisseur) où seules les portions hydrophiles sont en contact avec l'eau. Si les phospholipides sont «forcées» à se mélanger à l'eau, ils forment alors une double couche moléculaire: les acides gras hydrophobes se font face (ils ont plus d'affinité entre eux qu'avec les molécules d'eau) alors que les portions hydrophiles demeurent en contact avec l'eau.

### I.4.5 Les Cérides

Les cérides sont des esters d'acide gras et de mono (éventuellement di) alcools, de masse moléculaire suffisamment élevée pour que ces alcools soient insolubles dans l'eau. Aussi, parmi eux, on compte : les cires naturelles (esters d'acides gras et mono alcools aliphatiques), les stérides (esters de stérols, de méthyl-stérols ou d'alcools triterpéniques), les caroténocérides (esters d'acides gras et d'hydroxycaroténoïdes ou xanthophylles), etc.

### I.4.6 Les stérols

Les stérols de plantes, appelés aussi phytostérols, sont des alcools stéroïdiens, membres de la famille des triterpènes, comportant le plus souvent 25, 27 ou 29 atomes de carbone. Le noyau tétracyclique possède le plus souvent une double liaison fréquemment en position 5, mais que l'on peut rencontrer en position 7, beaucoup plus rarement en position 8(14) ou en position 19(11). Les groupes méthyle 18 et 19, la fonction alcool en 3 et la chaîne latérale en 17 sont en configuration  $\beta$ . La chaîne latérale qui peut être saturée ou comporter une ou deux doubles liaisons possède 8, 9 ou 10 atomes de carbone. Leur structure est dérivée de celle du cholestérol et ne diffère que par un groupement méthyle ou éthyle sur le carbone 24 (Figure 14). La plupart des phytostérols, comme le campestérol et le  $\beta$ -sitostérol, ont une liaison  $\Delta^5$  ainsi qu'un ou deux carbones additionnels substitués à la chaîne latérale au niveau du carbone 24<sup>[32, 33]</sup>.



Cholestérol (*cholest-5-ène-3 $\beta$ -ol*)

Les groupements  $\bullet$ H,  $\text{CH}_3$  et la chaîne aliphatique en 17 sont situés du même côté : ils sont tous en configuration  $\beta$

Figures 14: Structure chimique du cholestérol.

Les stérols représentent, en général, une part notable de l'insaponifiable, soit de 30 à 60 % de l'huile végétale. Le sitostérol et le campestérol apparaissent comme les plus efficaces. Certains auteurs suggèrent que la variation de leur concentration relative, pourrait être liée à l'adaptation des plantes à la variation de température<sup>[34]</sup>. Aussi, les stérols végétaux

seraient également impliqués dans de plus larges phénomènes d'anti-oxydation après l'extraction de huile<sup>[35,36]</sup>.

La majorité des huiles végétales contiennent de 1 g à 5 g de stérols par kilogramme d'huile, soit 100 mg à 500 mg pour 100 g d'huiles. La classe de stérols majoritairement représentée dans les huiles végétales correspond à celle des diméthylstérols. Leur proportion atteint 85 % pour la plupart des huiles végétales. Le Tableau 3 présente les gammes de variation de concentrations en stérols dans l'huile de différentes cultures. Le colza renferme le maximum de phytostérols totaux (5,13 à 9,79 g /kg). En seconde position, l'huile de tournesol possède des concentrations variant de 374 à 725 mg/100g d'huile ainsi que la plus forte teneur en  $\beta$ sitostérol<sup>[37,38]</sup>.

Huiles	Phytostérols totaux	$\beta$ -sitostérol	Campestérol	Stigmastérol	$\Delta^5$ avénastérol
Colza	5,13-9,79	2,84-3,58	1,56-2,48	0,02-0,04	0,13-0,19
Tournesol	3,74-7,25	4,65	0,69	0,75	0,28
Soja	2,29-4,59	1,29-4,59	0,62-0,76	0,45-0,76	-
Olive	1,44-1,50	1,18-1,21	0,05	0,01	0,17-0,18
Palme	0,71-1,17	0,72	0,23	0,04	0,02

Tableau 3: Composition en stérols majeurs des principales huiles végétales (g/kg)<sup>[37]</sup>.

En tant que valorisation non alimentaire, les phytostérols possèdent des propriétés de surfactant utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour solubiliser les hormones stéroïdes dans la formulation de certaines crèmes. De plus, ils présentent des effets curatifs sur la peau ainsi qu'une action anti-inflammatoire semblable à celle de la cortisone et des corticoïdes. En tant que bons émulsifiants, les stérols sont utilisés pour la formulation de produits cosmétiques variés. L'ajout de phytostérols dans les crèmes permet d'améliorer l'hydratation de la peau et sa tonicité<sup>[39]</sup>. Selon les préparations, ils servent d'émulsifiants principaux ou auxiliaires, modificateurs de consistance et d'apparence, d'agents contrôlant la viscosité ou d'émollients. Ils sont employés pour la formulation de shampoings, pour lesquels ils réduisent la charge électrostatique ; de lotions hydratantes, rouges à lèvres, crèmes de corps, solutions après rasage<sup>[39]</sup> (tableau 4).

<u>Phytostérols utilisés</u>	<u>Domaines d'utilisation</u>
90% $\beta$ -sitostérol + 10% campestérol	Emollient
45% $\beta$ -sitostérol + 25% campestrol + 20% stigmastérol	Cosmétiques
50% $\beta$ -sitostérol + 25% campestérol + 25% stigmastérol	Emulsifiant, dispersant, solubilisant
<u>Phytostanol : phytostérols saturés</u>	<u>Emulsifiant, dispersant</u>

Tableau 4 Valorisation non alimentaire des phytostérols<sup>[39]</sup>.

### I.4.7 Les Tocophérols

Les huiles et les corps gras, au contact de l'oxygène, sont susceptibles de dégradations oxydatives. Ce phénomène se déroule spontanément en 2 étapes : les chaînes grasses insaturées fixent l'oxygène de l'air en formant des peroxydes, puis ceux-ci instables, évoluent en formant des produits d'oxydation, de dégradation et de polymérisation. Ils sont alors indésirables aussi bien en raison de leurs effets physiologiques néfastes qu'à cause des modifications de saveur et d'odeur et des huiles qu'ils entraînent. Les antioxydants sont donc des molécules oxydables qui, en agissant comme donneurs d'hydrogène vis-à-vis d'un radical hydroperoxyde, interrompent la réaction en chaîne de formation des peroxydes<sup>[32]</sup>.

Les antioxydants sont pour la plupart synthétiques (hydroquinone, pyrogallol, acide gallique et gallate, etc.) et sont rajoutés aux huiles dans l'industrie alimentaire. Ils peuvent par contre être présents à l'état naturel dans les huiles végétales (vitamine E, polyphénols de l'olivier et du chêne, sésamol, flavonoïdes, certaines huiles essentielles, etc)<sup>[32]</sup>. Les huiles peuvent renfermer une quantité plus ou moins importante de vitamines liposolubles. Plus particulièrement, la vitamine E, présente dans tous les lipides naturels sous différentes formes moléculaires, est constituée de tocophérols et des tocotriénols. C'est l'anti-oxydant majeur des milieux lipidiques (huiles, membranes biologiques et lipoprotéines). Les tocophérols et les tocotriénols sont des composés aromatiques possédant un noyau chromanol (l'atome de carbone 6 porte un groupement hydroxyle) substitué par une chaîne à 3 unités isopenténiques condensées. Cette chaîne peut être saturée dans le cas des tocophérols et triinsaturée dans celui des tocotriénols; les autres substituants définissant les vitamères,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$ <sup>[32]</sup>.

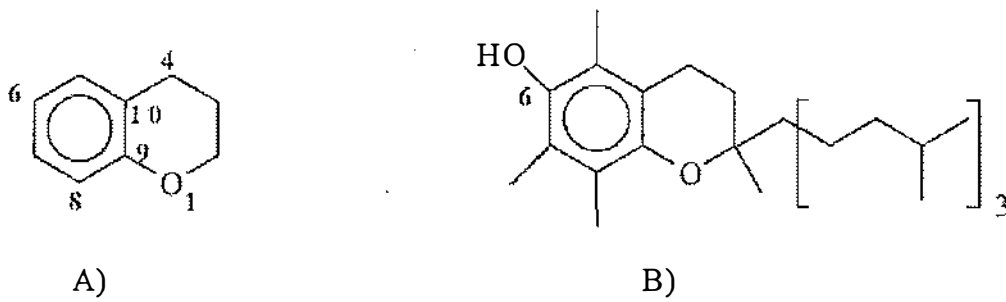


Figure.18: (A), noyau chromane (B)  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E)

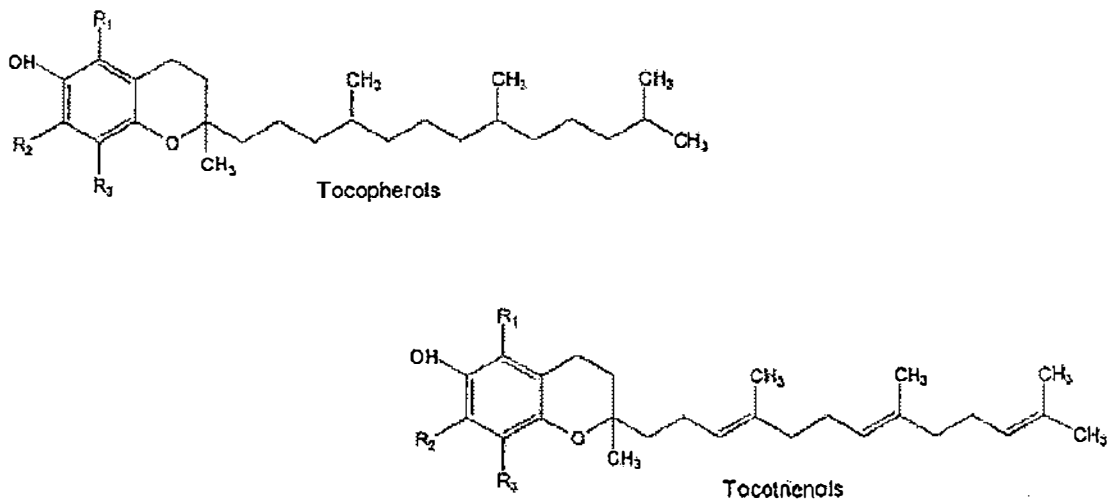


Figure.19: Structure moléculaire des tocophérols et tocotriénols

Le noyau 6-OH chromane existe sous 4 formes différenciées par la présence ou non de groupements méthyles en position 5 ou 7 du noyau (Tableau 5).

Forme	$R_1$ (position 5)	$R_2$ (position 7)
$\alpha$	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$	CH <sub>3</sub>	H
$\gamma$	H	CH <sub>3</sub>
$\delta$	H	H

Tableau 5: Les quatre formes des tocophérols selon la position des groupements méthyle sur le noyau 6-OH-chromane.

Les tocophérols présentent des propriétés anti-oxydantes responsables de la stabilité oxydative de l'huile<sup>[40]</sup>. *In vivo*, l'  $\alpha$ -tocophérol, appelé vitamine E, a pour fonction de protéger les structures sensibles à l'oxydation comme les lipides (essentiellement sous forme condensée dans les membranes et les lipoprotéines), les bases nucléotidiques de l'ADN et les protéines. L'activité anti-oxydante des tocophérols protège également les acides gras en éliminant les radicaux libres et les espèces oxygènes réactives<sup>[40]</sup>. La composition en tocophérols varie selon les espèces et, au sein d'une même espèce selon les génotypes. Le tableau 6 présente la composition en tocophérols et tocotriénols des principales huiles végétales.

<b>Huiles</b>	<b><math>\alpha</math>-TP</b>	<b><math>\beta</math>-TP</b>	<b><math>\gamma</math>-TP</b>	<b><math>\delta</math>-TP</b>	<b><math>\alpha</math>TT</b>	<b><math>\beta</math>TT</b>	<b><math>\gamma</math>TT</b>	<b><math>\delta</math>TT</b>
Colza	202	65	490	9	-	-	-	-
Tournesol	670	27	11	1	-	-	-	-
Palme	89	-	18	-	128	323	72	630
Soja	100	8	1021	421	-	-	-	-
Maïs	282	54	1034	54	49	8	161	6

Tableau 6: Teneurs en tocophérols (TP) et Tocotriénols (TT) ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) dans les principales huiles végétales<sup>[40]</sup>.



## Référence bibliographiques

- [1]. OMS, 2003. Directives sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte relatives aux plantes aromatique et médicinales. Organisation Mondiale de la Santé Genève, 2003.
- [2]. NIPPO, Y., 1992-2001. Culture des plantes médicinales et contrôle de la qualité. Tokyo, Ministère de la Santé, du travail et des affaires sociales, Japon.
- [3]. HOLLEY, J., CHERLA, K., 1998. The medicinal plants sector in India. The International development research center, South Asia regional office, Medicinal and Aromatic plants Programme in Asia, Delhi.
- [4]. TILMAN, D., REICH, P.B., KNOPS, J. WEDIN, D., MIELKE, T., LEHMAN, C. 2001. Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. *Science*, 294, 843-845.
- [5]. OMS, 2002. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. organisation mondiale de la santé, Genève. (Document WHO/EDM/TRM/2002.1).
- [6]. JONES, R.J.A., 1985. The soil survey's field capacity data set-an aid to assessing soil wetness. *Soil Surv. Land Eval.* 5 (1), 1-12.
- [7]. WHO, 2002. Quality control methods for medicinal plant materials. Organisation Mondiale de la Santé, Genève. WHO Monographs on selected medicinal plants, 2002. Vol. 2. Genève.
- [8]. STEVENS, M.H., CARSON, W.P., 1999. Plant density determines species richness along an experimental fertility gradient. *Ecology*, 80, 455-465.
- [9]. KLEIJN, D., VERBEEK, M., 2000. Factors affecting the species composition of arable field boundary vegetation. *J. Appl. Eco.*, 37, 256-266.
- [10]. DHAR, U., RAWAL, R.S., PRETI, J., 2000. Setting priorities for conservation of medicinal plants- a case study in the Indian Himalaya. *Bio. Conserv.* 95, 57-65.
- [11]. ARSSEN, L.W., 2000. On correlation and causations between productivity and species richness in vegetation : predication from habitat attributes. *Basic applied . Ecol.* 2, 105-114.
- [12]. ASSOCIATION FRANCAISE DE NORMALISATION, 1986. Recueil de normes Françaises Huiles essentielles, AFNOR, Paris.
- [13]. WILLEM, J.P., 2002. Les huiles essentielles : médecine d'avenir. Editions du Dauphin, Paris.

- [14]. ROUILIER, G., 1990. Les huiles essentielles pour votre santé. Editions Dangles, St. Jean-De-Braye, France.
- [15]. LOURENS, A.C.U., REDDY, D., BASER, K.H.C., VILJOEN, AM, & VAN VUÛREN, S.F., 2004. In vitro biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. J. Ethnophar. 95, 253-258.
- [16]. PELLECUR, J., ROUSSEL, C., ANDRAY, A., 1980. Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles. Riv. Ital. Essen., 23, 45-50.
- [17]. VIOLLON, C., CHAUMONT, J.P., 1994. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia., 128 (3), 151-153.
- [18]. CHAUMONT, J.P, LEGER, D., 1989. Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisins : relation structure-activité. Plants Med. Phyt., 23 (2), 124-126.
- [19]. SIVROPOULOU, J.P., PAPANIKOLAOU, E., KOKKINI, S., & LANARAS, T., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. Agric. Food Chem. J., 44, 1202-1205.
- [20]. ZAMBONELLI, A. D'AURELIO, A.Z., SEVERI, A., et al., 2004. Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *thymus vulgaris* L., J. Essen. Oil Res. 16, (1), 69-74.
- [21]. MANGENA, T., MUYIMA, N.Y.O., 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *artemisia afra*, *pteronia incana* and *rosmarinus officinalis*, on selected bacteria and yeast strains. Lett. Appli. Microbiol. 28 (4), 291-296.
- [22]. BOURRUEL, C., 1993. Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydants d'extraits de plante aromatiques sélectionnées. Thèse de l'INP Toulouse,
- [23]. CACCIONNI, D., GUIZZARDI, S., BIONDI, D., AGANTIO, R., & GUISEPPE, R., 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *penicillium digitatum* and *penicillium italicum*. Internat. J. Food Microb. 43 (12), 73-79.
- [24]. ROSE, A.E., 1965. Technique of organic chemistry: Distillation. John Wiley & Sans. New York Vol. IV p. 1-30.
- [25]. BERNARD, T., 1988. Le concept de raffinage végétale application a l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat de l'INP Toulouse. N° d'ordre : 145.
- [26]. LAWRENCE, B., 1986. A review of the world production of essential oils. (Newsletter of medicinal and aromatic plants). Herba Hungarica 2, p. 66-79.

- [27]. CU, J.Q., 1990. Extraction de compositions odorantes végétales par divers solvants organiques. Thèse, de doctorat de l' INP Toulouse, N° d'ordre 393.
- [28]. GERIN, M., 2002. Solvants industriels: Santé, Sécurité, Substitution. Collection médecine du travail. Ed. Masson, Paris.
- [29]. WINDHOLZ, M., BUDAVARI, S., 1983. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. The Merck Index. Merck & CO., Inc. New York, USA.
- [30]. CUVELIER, C., CABARAUX, J.A, DUFRASNE, I., HORNICK, J.L., ISTASSE, L., 2004. Acides gras: nomenclature et sources alimentaires. Ann. Méd. Vét., 148, 133-140.
- [31]. INTERNATIONAL UNION OF PURE APPLIED CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE. 1978. The nomenclature of lipides. J. Lipid Res., 19, 114-129.
- [32]. BÉREAU, D., 2001. Huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens. Thèse de doctorat de l'INP Toulouse. N° d'ordre : 1781.
- [33]. BETTACH, N., BANOUB, J., DELMAS, M., 1997. Etude comparative des graines de crucifères du genre lepidium, eruca, diplotaxis et sinapsis. II. caractérisation des stérols. OCL, 4 (2) : 152-155.
- [34]. PALTA, J.P., WHITAKER, B.D., et WEISS, L.S., 1993. Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of selenium species. Plant Physio. 103, 793-803.
- [35]. ABIDI, S.L., 2001. Chromatographie analysis of plant sterols in food and vegetable Oils. J. Chrom., 935, 173-201.
- [36]. MATTHAÛS, B., BRÜHL, L., 2001. Comparison of different methods of the determination of the oil content in oilseeds. J. Amer. Oil Chem. Soc., 78, 95-102.
- [37]. PIIRONEN, V., LINDSAY, D.G., MIETTINEN, T.A., TOIVO, J., et LAMPI, A.M., 2000. Review. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. J. Sci. Food Agri., 80, 939-966.
- [38]. LEGER, C.L., 2000. La vitamine E : état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardiovasculaire, biodisponibilité. OCL, 7 (3), 258-265.
- [39]. FOLMER, B.M., 2003. Sterol surfactant: from synthesis to applicationq, Advan. Colloid. Inter. Scie. 103, 99-119.
- [40]. DEMIR, C., CETIN, M., 1999. Determination of tocopherols, fatty acids and oxidative stability of pecan, walnut and sunflower oils. Deutsche Leb.Runds. 95, 278-282

## **CHAPITRE II**

**Etude comparative et caractérisation chimique de l'espèce  
*Hibiscus sabdariffa* L. Perspectives de valorisation**

## Chapitre IIA Rappel bibliographique-*Hibiscus sabdariffa* L

### IIA. 1. Autres Dénominations

Nom Scientifique:	<i>Hibiscus sabdariffa</i> (L.)
Famille:	MALVACEAE
Française:	Oseille de Guinée
Anglaise:	Roselle
Mexique:	la flor de Jamaïque.
Africaine:	Karkadé, Bissap.
Thaïlandaise :	Kra-chiap
Allemagne	Rosellahanf

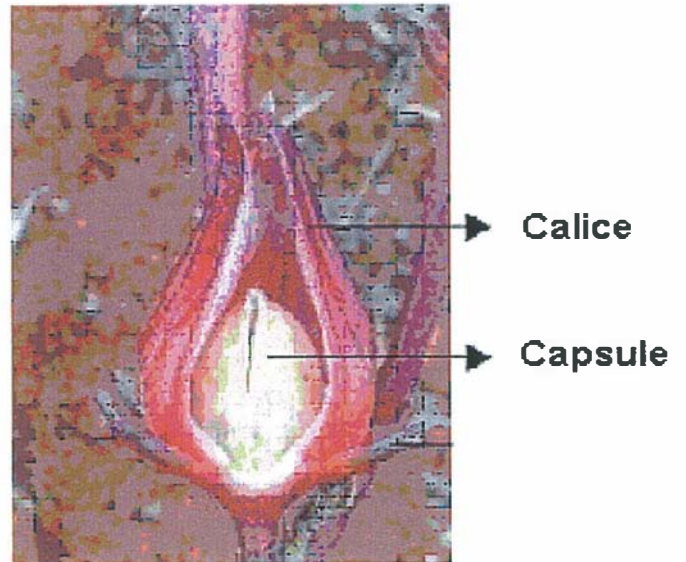


Figure 15 : Plant d' *Hibiscus sabdariffa*

## IIA. 2 Description Botanique

Introduction:	Une plante herbacée qui peut atteindre de 1 à 2 mètres de haut.
Feuilles:	Elles sont ovales, alternées, trilobées ou simples sur des tiges fleuries.
Fleurs:	Réparties le long de la tige; les fleurs ont de 7 à 10 cm de diamètre, roses à la périphérie, devenant jaunes à l'intérieur pour finir avec un cœur pourpre bordeaux.
Fruits:	Le fruit rond dans lequel il y a quelques graines est entouré par le calice persistant.
Récolte:	De juin à septembre pour les feuilles, vers octobre pour les calices, et fin octobre-début novembre pour les graines.

## IIA. 3 Présentation de la plante

*Hibiscus sabdariffa*, qui fait partie des familles Malvacées, était cultivée à l'origine en Afrique. Il a été largement distribué dans les zones tropicales et subtropicales, des Indes occidentales à l'Amérique centrale et en Asie, où l'espèce s'est adaptée. *Hibiscus sabdariffa* est présent en Thaïlande, au Vietnam, en Malaisie, en Chine, au Soudan et au Mexique. Il est aussi présent dans d'autres pays, tels que l'Égypte, le Sénégal, la Tanzanie, le Mali, le Tchad et la Jamaïque, qui en produisent en petite quantité.

*Hibiscus sabdariffa*, qui produit des calices contenant des colorants rouges comestibles, est utilisé comme nourriture, colorant et boisson. Certaines variétés de cette plante sont employées en tant que plantes ornementales. Les calices rouges gonflés, de type *sabdariffa*, sont également séchés, brassés et employés dans le traitement de jus, de gelées, de crèmes glacées et des saveurs. Une décoction des calices est employée pour faire des boissons froides et chaudes dans plusieurs pays tropicaux et subtropicaux<sup>[1]</sup>. Eût égard à ses potentialités (goût, couleur, acidité), *hibiscus sabdariffa* peut être mélangé à d'autres jus de fruit : orange, ananas, goyave, tamarin, anacarde. Acide mais sans alcool, d'une couleur rouge proche de celle du vin, le jus d'hibiscus est une boisson naturelle tonifiante. En Amérique tropicale et en Afrique subsaharienne, le *bissap* (Hibiscus) est servi en famille à tout moment.

A l'occasion de grandes cérémonies, il supplante merveilleusement certaines boissons occidentales comme le Coca-Cola.

En Afrique, les calices sont fréquemment préparés en pâte ou en sauce en guise de plat. Les nutritionnistes ont trouvé des calices d'*hibiscus sabdariffa* vendus sur les marchés d'Amérique centrale pour leur richesse en calcium, riboflavine et fer. Les calices, possédant plus de 3 % de pectine, ont été recommandés comme source de pectine pour l'industrie du préservatif<sup>[2]</sup>.

#### IIA. 4 La culture de *Hibiscus sabdariffa*

*Hibiscus* est relativement robuste et se développe bien dans la plupart des sols. L'*Hibiscus sabdariffa* aime les climats tropicaux humides. 5 à 8 kg de graines sont nécessaires pour ensemercer environ 1 hectare, en fonction de la densité choisie. Les graines ont besoin d'une température minimale de 10°C pour germer mais la température optimale pour le développement de la plante se situe entre 20 et 35°C, avec des précipitations mensuelles de 130 à 260 mm pendant les 3 à 4 premiers mois de croissance. Le pH optimum du sol, pour un bon développement, est de 5-6, et les meilleurs sols sont sablonneux ou de type terreux.

La floraison d'hibiscus est favorisée par des journées courtes (octobre février). Il lui faut 120 à 180 jours pour étaler ses calices d'un rouge vif. Les calices charnus rouges sont récoltés après que la fleur soit tombée mais avant que la cosse de la graine ne soit séchée et ouverte<sup>[3]</sup>.

#### IIA. 5 Les Calices

Les calices d'*hibiscus sabdariffa* constituent la partie la plus importante de la plante du point de vue économique. Ils contiennent des protéines, des vitamines, des polyphénols, des pectines, du carotène, des fibres, des minéraux, des anthocyanes. La présence de tous ces éléments explique l'utilisation de l'hibiscus dans divers domaines.

Le colorant extrait des calices séchés d'*hibiscus sabdariffa* contient différents anthocyanes dont les quantités sont relativement élevées : 1,5 g d'anthocyanes pour 100 g de calices séchés. Les principaux anthocyanes (fig. 16) sont : le delphinidine-3-sambubioside et le cyanidine-3-sambubioside<sup>[4]</sup>. La relation entre l'activité antioxydante et l'anthocyanine dans des pétales d'*hibiscus sabdariffa* a été étudiée à Taiwan. Le résultat démontre que le

taux d'anthocyanine est élevé dans les pétales d'hibiscus lesquelles sont donc, potentiellement, de bonnes sources d'antioxydants<sup>[5,6]</sup>.

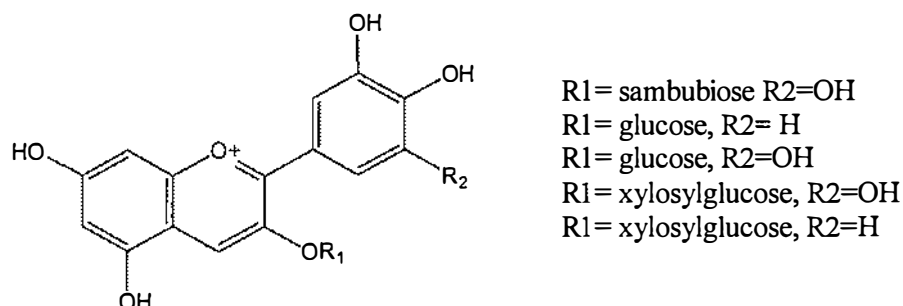


Figure 16 : Structure chimique des anthocyanes d'*hibiscus sabdariffa* L.

En Allemagne, les calices rouges sont de plus en plus utilisés comme colorants naturels dans la confiserie. L'extrait, sous forme de filtrat concentré ou de poudre séchée, est utilisé comme colorant dans l'industrie alimentaire ou pharmaceutique. Dans ces deux secteurs, où l'on cherche des colorants naturels aux dépens des produits de synthèse, les colorants d'hibiscus sont préférés à ceux de la betterave, d'un rouge trop foncé, ou à ceux du raisin, moins éclatant, ou encore à ceux de la cochenille qui sont trop chers<sup>[7,8]</sup>.

## IIA. 6 Les Graines

Le calice rouge persistant de l'hibiscus abrite le fruit rond dans lequel il y a un grand nombre de petites graines (fig. 17). Les graines sont ovoïdes, de teinte brune. A maturité, le fruit s'ouvre pour laisser apparaître les graines. Les graines d'*Hibiscus sabdariffa* sont principalement constituées de lipides, de protéines et d'acides aminés. La teneur de la graine en huile varie selon l'origine géographique, mais la valeur moyenne se situe entre 15 et 22 %. Elles contiennent donc des quantités considérables d'huile. Dans cette huile, les composés majoritaires sont l'acide linoléique, l'acide oléique, l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide arachidonique<sup>[9]</sup>.





Figure 17: Les graines de l'*hibiscus sabdariffa* L. du Vietnam. (Source: A.Endrias ).

Les graines d'hibiscus ont été proposées comme nouvelle source d'huile grâce à leurs qualités, lesquelles ressemblent à celles de l'huile de soja et de coton<sup>[9]</sup>. La teneur en protéine (20 %) pour les graines d'hibiscus est très proche de celles de l'okra (*Hibiscus esculentus*) et de l'huile de coton (*Gossypium sp*)<sup>[9,10]</sup>. Les acides aminés essentiels et majoritaires des graines sont les acides glutamique, aspartique, la leucine et l'arginine<sup>[9]</sup>.

## IIA. 7 Les Feuilles

Grâce à leurs qualités et à leur valeur nutritive, en Afrique occidentale, les feuilles d'hibiscus sont consommées comme des légumes en soupe ou en salade, mélangées avec d'autres légumes. La feuille d'*Hibiscus sabdariffa* contiennent une quantité non négligeable de protéines comparables au standard de l'OMS<sup>[11,12]</sup>. Le tableau 7, montre que les feuilles pourraient constituer, potentiellement, une bonne source de fer, calcium et magnésium, et notamment de zinc grâce à un taux exceptionnellement élevé de ce dernier<sup>[11]</sup>. Dans la région sub-saharienne de l'Afrique, durant les périodes où les cultures habituelles (maïs, sorgho, riz...) sont insuffisantes, à cause des conditions climatiques défavorables, les indigènes consomment des plantes poussant à l'état sauvage, telles que l'hibiscus ou d'autres plantes, en tant que substituts alimentaires<sup>[9]</sup>. Une étude menée au sud-est du Niger, (1993) a démontré que les feuilles sont régulièrement consommées durant la saison par 100 % des individus interrogés<sup>[11,14]</sup>.



Figure 18: Les calices d'*hibiscus sabdariffa* transformés en confitures et en sauces<sup>[15]</sup>

Acide amines	Feuille (mg/g) <sup>[11]</sup>	Calice (%) <sup>[17]</sup>	Graines (%) <sup>[16]</sup>	Minéraux	Feuille (µg/g) <sup>[11]</sup>	Acides gras	Graines (%) <sup>[11]</sup>
Aspartate	31,8	16,3	2,5	Ca	12,4	Myristique	0,34
Glutamate	26,6	7,2	5,21	Cr	<0,5	Palmitique	14,56
Serine	11,9	3,5	1,13	Cu	13,5	Stéarique	0,47
Glycine	11,7	3,8	5,21	Fe	1191	Elaidique	38,79
Histidine	6,4	1,5	0,78	K	19,7	Oléique	22,1
Arginine	17,5	3,6	2,33	Mg	7865	Linoléique	5,04
Thréonine	9,5	3,0	0,84	Mn	114	Linoléinique	3,46
Alanine	8,5	3,7	1,01	Mo	15,3	Arachidonique	8,61
Proline	13,3	5,6	0,81	Na	13	Béhénique	0,15
Tyrosine	8,5	2,2	0,38	Ni	8		
Valine	13,3	3,8	1,05	P	6640		
Méthionine	2,9	1	0,54	Se	<5,0		
Cystéine	3,4	1,3	0,43	Zn	7,9		
Isoleucine	10,1	3	0,81				
Leucine	17,4	5	1,58				
Phénylalanine	13,1	3,2	1,03				
Lysine	12,2	3,9	1,09				
Tryptophane	5,9	----	----				

Tableau 7: Composants nutritionnels des différents partie de la plant d'*Hibiscus sabdariffa*.

## IIA. 8 Utilisations médicinales de l'*Hibiscus sabdariffa*.

Traditionnellement, les médicaments, la décoction, l'infusion d'herbes, de feuilles d'olivier et d'ail, et spécialement le thé d'*Hibiscus sabdariffa*, sont utilisés en médication adjuvant pour contrôler l'hypertension<sup>[18]</sup>. En médecine traditionnelle chinoise, les calices rouges gonflés de type *sabdariffa* sont également séchés, brassés et employés sous forme d'infusion pour le traitement de l'hypertension. Une étude menée en Iran, a démontré que la consommation d'infusions de calices d'*Hibiscus sabdariffa* permettrait de contrôler l'hypertension chez des patients, hommes et femmes, atteints d'hypertension modérée<sup>[19,20]</sup>.

Au Sénégal, les calices en décoction sont utilisés comme diurétiques et antiseptiques urinaires<sup>[18]</sup>. Une étude publiée dans le *Journal of The Science of Food and Agriculture*, en septembre 2004, par des médecins chinois, ont déterminé l'activité de feuilles d'hibiscus sur le cholestérol de rats soumis à différents régimes. Selon les médecins chinois, l'extrait aqueux de fleurs d'*Hibiscus sabdariffa* neutraliserait l'oxydation du cholestérol LDL (le « mauvais » cholestérol) et réduirait le taux sanguin de cholestérol LDL chez des rats nourris avec une alimentation trop riche<sup>[21]</sup>.

L'extrait de feuilles d'hibiscus posséderait ainsi un fort pouvoir antioxydant qui permettrait la dégradation du cholestérol LDL. Sur des rats nourris avec un régime riche en fructose, cet extrait aqueux neutraliserait la production du cholestérol oxydé et réduirait le taux sanguin de triglycérides. D'autre part, la feuille d'hibiscus diminuerait aussi le taux sanguin de cholestérol LDL et le rapport cholestérol LDL sur cholestérol HDL chez des rats soumis à un régime<sup>[22-25]</sup>. Donc, les feuilles d'*Hibiscus sabdariffa* pourraient être utiles dans la prévention des maladies cardiovasculaires dans lesquelles le cholestérol joue un rôle important.

## IIA. 9 Les marchés des tisanes à partir des calices d'*Hibiscus sabdariffa* L.

Les premiers marchés d'importation pour les calices d'*Hibiscus sabdariffa* sont les Etats Unis et l'Allemagne. L'Angleterre n'est pas un importateur régulier du produit car la tisane en provenance de l'Allemagne satisfait une grande partie de la demande. Les principaux clients, pour les importateurs d'hibiscus, sont les fabricants de tisanes car le calice et la capsule séchés entre dans la fabrication de la plupart des tisanes en même temps que l'écorce d'ananas, d'orange et le jus de citron<sup>[26]</sup>.

L'Allemagne est plus gros importateur régulier d'*Hibiscus sabdariffa*. Les importations se sont chiffrées à près de 43.000 tonnes, soit 90 millions d'Euros en 1997 pour les plantes et les éléments de plantes d'*Hibiscus sabdariffa* pour la confection de tisanes, alicaments et parfums, soit une augmentation de 41 % en volume et 72 % en valeur par rapport aux niveaux de 1993. On estime que les produits importés, destinés exclusivement à la fabrication de tisanes, représentaient un quart des importations totales, soit environ 10.000 tonnes (20) millions d'Euros. Le Soudan domine le marché d'importation allemand. L'hibiscus soudanais est très prisé des utilisateurs mais, en raison de l'embargo de commerce imposé sur le Soudan par les Etats-Unis, les importateurs sont obligés de s'approvisionner en produit soudanais à travers l'Allemagne et à un prix élevé<sup>[26]</sup>.

Les Etats-Unis ont importé plus de 5.000 tonnes (22 millions d'Euros) de plantes et parties de plante pour l'utilisation dans les tisanes en 1998, soit une augmentation de 78 % en volume et 156 % en valeur par rapport aux niveaux de 1994. Les tisanes ont gagné en popularité au cours des cinq dernières années aux Etats-Unis. Même les principales chaînes de café ont commencé à vendre ce produit. Parmi les fournisseurs des Etats Unis, on compte la Thaïlande, le Mexique, l'Egypte et le plus important d'entre eux, la Chine<sup>[15]</sup>.

Les industries allemandes de tisanes pensent que l'hibiscus soudanais offre le mélange parfait quant à la couleur et au goût pour les bases de tisanes mais elles s'approvisionnent aussi en hibiscus chinois, thaïlandais, égyptien et mexicain, ces deux dernières en petites quantités cependant. L'hibiscus chinois donne un liquide violet foncé avec un arrière goût âpre. L'hibiscus soudanais produit un liquide de couleur orange-rouge, avec un goût légèrement moins âpre mais plus acide, convenant mieux comme base de tisane<sup>[26]</sup>.

L'hibiscus thaïlandais donne un liquide qui a une couleur intermédiaire entre celle du produit de Chine et du Soudan et qui est sucré. Le tableau 8 montre les caractéristiques et le prix pour les calices séchés d'*Hibiscus sabdariffa* en fonction de divers fournisseurs <sup>[26]</sup>.

<b>Fournisseur</b>	<b>Couleur du liquide</b>	<b>Goût liquide</b>	<b>Prix*</b>
Chine	Violet foncé	Apre	800-1.000
Soudan	Rouge-orange	Acide	1.500-1.700
Thaïlande	Rouge-violacé	Sucré	1.000-1.200
Mexique	Rouge-orange	Salé	600-700
Egypte	Rouge Bordeaux	Acide	1.200-1.500

Tableau 8: Caractéristiques et fourchettes de prix par tonne d'hibiscus séché <sup>[26]</sup>.

\* prix en euro/tonne d'hibiscus séché.

## **IIA. 10 Conclusion**

Le Vietnam et le Sénégal sont absents sur ce marché. *L'Hibiscus sabdariffa* L. est une plante très bien adaptée au deux pays: il pousse abondamment à l'état sauvage, même sur des sols pauvres. Pour peu qu'il soit mieux « domestiqué », la valorisation de l'*Hibiscus sabdariffa* est à envisager et pourrait apporter des plus-values aux agriculteurs des zones déshéritées.

Les feuilles d'hibiscus semblent représenter une excellente source de nutriments essentiels, et les graines pour l'utilisation d'huile végétale, savon, et d'agro-matériaux. Si ces différentes voies de valorisation se développent, de simples améliorations dans la technologie de production pourraient transformer une culture de substance négligée en une nouvelle source de prospérité pour les pays en développement.

## **CHAPITRE IIB**

**Matériels et méthodes : *Hibiscus sabdariffa* L.**

### **IIB.1 Détermination de la teneur en matière sèche des calices et des graines d'*Hibiscus sabdariffa***

Le teneur en matière sèche (NF V 03-903)<sup>[27]</sup> est déterminé sur des graines broyées et des calices séchés d'*Hibiscus sabdariffa*. Une masse [Me] de ces graines est introduite dans un creuset taré [T] puis mises à l'étuve à 103 °C jusqu'à ou poids constant [M<sub>SEC</sub>]. La teneur en matière sèche des graines est donnée par la relation :  $MS = 100 \times (M_E - M_{SEC}) / (M_E - T)$

### **IIB.2 Méthode d'extraction et analyses partir du calice de l'hibiscus**

L'étude comparative des extractions a été effectuée avec d'Hibiscus proviennent de trois pays : le Vietnam, le Sénégal et Le Mexique. Chaque manipulation a été préparée en trois exemplaires avec trois solvants: l'eau, l'hexane et le dichlorométhane. L'analyse qualitative a été réalisée par spectrométrie de masse couplée à un chromatographe en phase gazeuse (CPG/SM).

#### **IIB.2.1 Procédé classique d'extraction : Hydrodistillation**

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage communément appelé cohobage (Figure 19).

Le montage de type Clevenger<sup>[28,29]</sup> est composé de quatre parties principales :

1. le réacteur, un ballon dans lequel on introduit la matière et l'eau.
2. la colonne, un cylindre en verre placé au-dessus du réacteur qui recueille la phase vapeur,
3. Le réfrigérant dans lequel se condensent les vapeurs
4. le vase florentin où vont se séparer la phase organique (huile essentielle) et la phase aqueuse (eau florale).

Ce système peut être équipé d'un recyclage ou cohobage : un principe de siphon renvoie l'eau florale du vase florentin vers le réacteur. Un simple robinet au bas du vase permet de recueillir l'huile essentielle à la fin de la réaction. Le milieu réactionnel, constitué par la matière et l'eau, est porté à ébullition grâce à un chauffe-ballon. La température est limitée par la température d'ébullition de l'eau : 100 °C. La composition chimique des huiles



essentielles dépend largement de l'influence des conditions d'hydrodistillation sur l'essence contenue dans la plante.

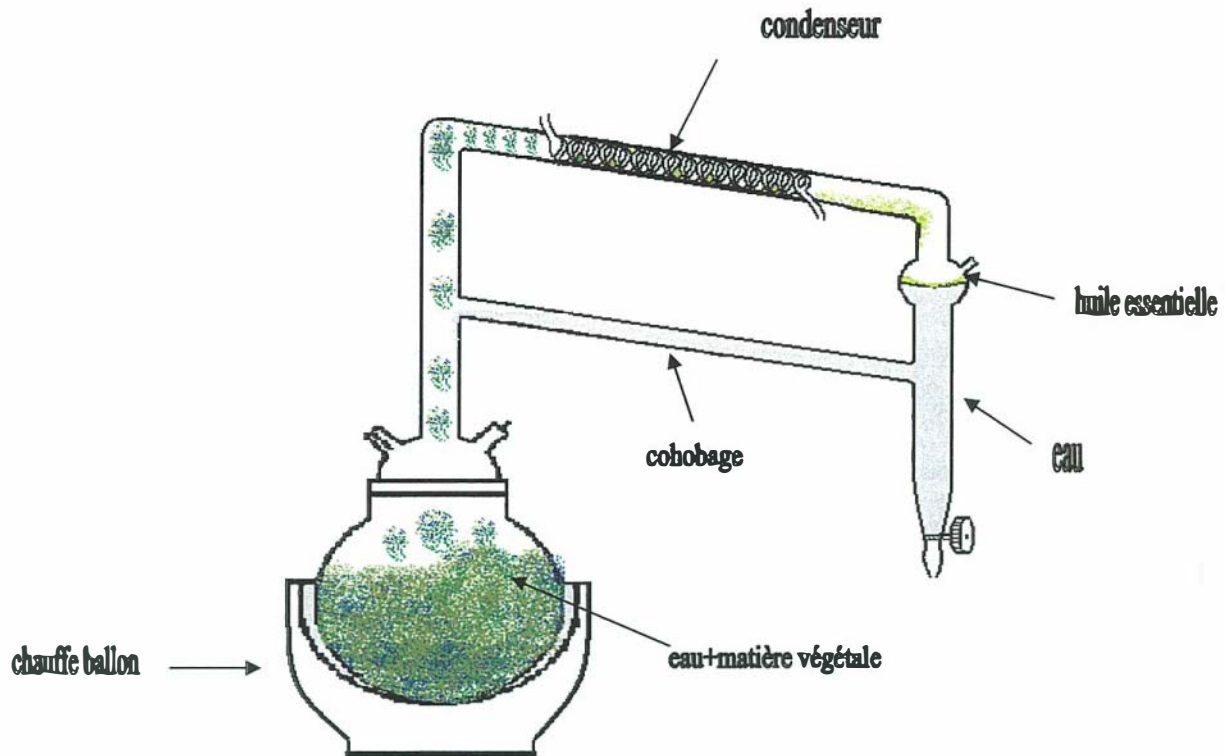


Figure 19: Appareillage d'hydrodistillation de type Clevenger.

## IIB. 2.2 Conditions opératoires d'hydrodistillation

300 grammes de matière végétale et un volume de 3 litres d'eau ont été placés dans un ballon en verre de 6 litres dans un appareil de type Clevenger. La matière végétale est ainsi immergée dans l'eau. La distillation s'opère à pression atmosphérique. Le chauffe ballon permet de chauffer le mélange hibiscus/eau, l'essence est entraînée par la vapeur qui est condensée dans un serpentin refroidi par un courant d'eau froide (réfrigérant). Un séparateur - ou essencier - permet de séparer l'eau de l'huile par différence de densité.

## IIB.2.3 Distillation –Extraction Simultanées (D.E.S), (Likens-Nickerson)

Le procédé de distillation-extraction simultanée a été conçu par Likens et Nickerson en 1964, qui ont donné leurs noms à l'appareillage (figure 20)<sup>[30,31]</sup>. Cet appareil est l'un des plus polyvalents et les plus utilisés pour extraire les arômes.

L'appareil comprend deux ballons, l'un contenant l'eau et la matière végétale, l'autre contenant un solvant organique. Dans le ballon de plus grande dimension (500 mL), chargé en eau, on introduit l'isolat végétal à fractionner. L'autre ballon, plus petit (50 mL), contient un solvant organique apolaire tel que le pentane, l'hexane, ou le dichlorométhane.

Préparation de l'échantillon :

- l'échantillon a été préparé avec 25g de matière végétale (hibiscus) et 200 mL d'eau, le tout est placé dans un ballon de 500 mL.
- Le deuxième ballon de 50 mL contient 30 mL de hexane.

Les deux ballons sont chauffés jusqu'à ébullition de leur contenu. L'eau est destinée à entraîner les composés volatils par co-distillation, le solvant à les solubiliser. La géométrie de l'appareil est telle que la vapeur d'eau aromatisée et les vapeurs de solvant se rencontrent dans un réfrigérant où a lieu une extraction vapeur-vapeur. Au fur et à mesure de la condensation, les solvants s'écoulent dans une cohobe et se séparent en deux phases vers leur ballon générateur de vapeurs respectives permettant un cycle continu d'extraction-séparation. L'évaporation du solvant conduit à la récupération d'une fraction aromatique concentrée. La position relative des deux tubulures de reflux diffère selon que la densité du solvant est supérieure ou inférieure à celle de l'eau.

Cette méthode est plus particulièrement utilisée pour l'étude d'une matière première détenue en quantité très réduite, en vue de déterminer la composition chimique de sa partie volatile, par exemple une concrète ou un échantillon végétal rare<sup>[31,32]</sup>.

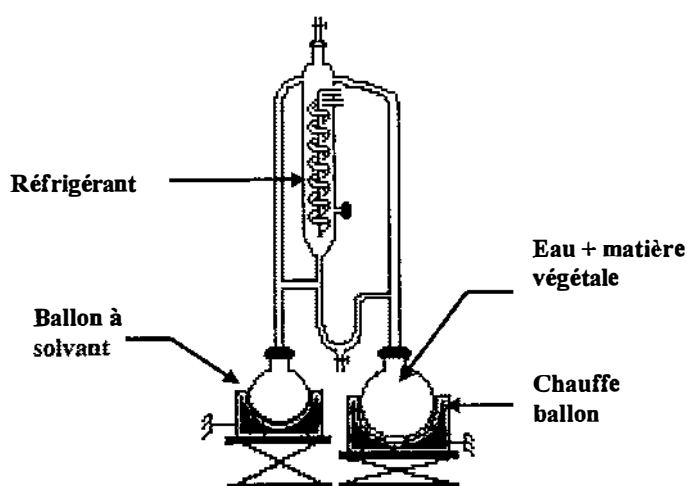


Figure 20: Représentation schématique de l'appareillage Likens-Nickerson.

### IIB.2.4 Extraction par Soxhlet

La méthode normée du soxhlet (NF V 03-903)<sup>[27]</sup> (fig. 21) a servi de référence pour la détermination de la concrète. 15g des calices d'hibiscus sont disposés dans une cartouche cellulosique poreux laquelle est introduite dans un extracteur de type soxhlet, équipé à sa base d'un ballon de 500 mL dans lequel 250 mL d'hexane ou dichloromethane sont introduits (figure 26). Le solvant est mis en ébullition dans le ballon, sa vapeur passe par le tube latéral et se condense dans le réfrigérant. Le solvant remplit progressivement la chambre d'extraction contenant le solide, se charge d'une partie du produit à extraire et la solution est ensuite siphonnée automatiquement dans le ballon dès que la chambre d'extraction est pleine. L'extraction dure 6 heures, la durée d'extraction étant calculée à partir de l'ébullition du solvant. Nous avons fait varier le nombre de siphonnages de 30 pour l' hexane et 36 pour le dichlorométhane, ce qui correspond à une durée extraction de 6 heures soit un siphonnage toutes les 10 à 12 minutes. Le mélange recueilli est soumis à une concentration sous vide, par évaporateur rotatif. Ce traitement s'effectue à température modérée (40°C). A son issue, on récupère la fraction concrète. Les fractions de concrète obtenues sont diluées dans l'éthanol puis glacées à (-15°C) pendant 4 heures et filtrées à froid pour obtenir l'absolu.

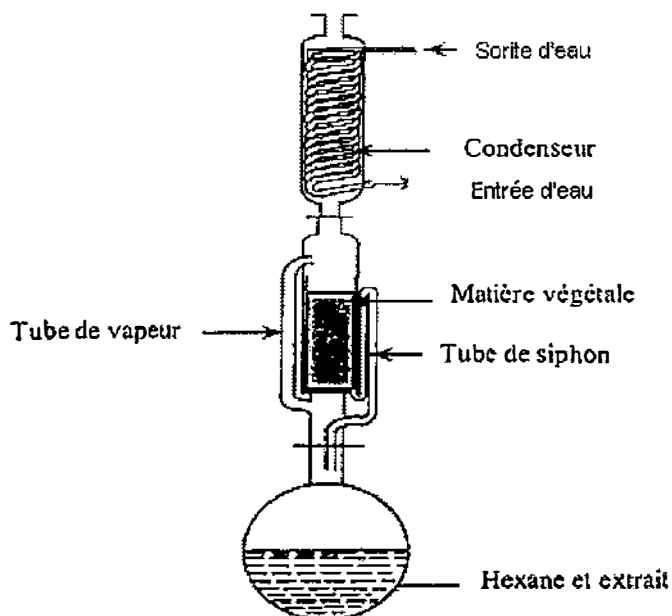


Figure.21: Appareil de type Soxhlet

## **IIB. 2.5 Macération**

En immergeant 15 grammes des calices de l'hibiscus dans 200 mL de solvant (hexane), dans un récipient en verre. On laisse le mélange macérer pendant 3 jours en agitant tous les 2 jours. Après sept jours de macération, l'extrait est filtré et séché avec du sulfate de sodium anhydre puis concentré par évaporateur rotatif. On récupère la concrète laquelle est ensuite diluée dans l'éthanol (5mL) chaud. La solution alcoolique sera placée à -15°C pendant 4 heures, puis filtrée à froid pour obtenir l'absolu.

## **IIB.2. 6 E.M.A.U.S (Extraction, Macération Assistée par Ultrasons).**

Cette technique consiste à soumettre la matière première et le solvant à l'action des ultrasons. Elle permet, en utilisant une technique simple avec une durée d'extraction souvent réduite. On immerge dans une fiole 15 grammes de calices d'hibiscus dans 200 mL de solvant (hexane). Ce récipient est placé dans un appareil générateur d'ultrasons contenant de l'eau froide maintenue à une température comprise entre 25-28°C. Le milieu est ensuite agité pendant 160 minutes. L'extrait est filtré et séché avec du sulfate de sodium anhydre puis concentré par évaporateur rotatif. On récupère la concrète. Cette dernière est diluée dans de l'éthanol (5mL) chaud, puis elle est placée à environ à -15°C pendant 4 à 8 heures. Une filtration à froid permet d'obtenir de l'absolu.

## **IIB.2.7 Conditions d'analyse de CPG/SM des calices de l' Hibiscus**

A partir de chromatogrammes obtenus sur un spectromètre de masse (MS) TRACE 2000 Finnigan, couple à un chromatographe en phase vapeur (CPG), équipé d'une colonne RTX 5 Resteck de paramètres 30m \* 0,25 mm, 0,25 µm. La (composition de la phase stationnaire: 5 % diphényle et 95 % diéthyl polysiloxane), nous avons procédé à quelques identifications.

Paramètres utilisés :

- CPG/SM : TRACE 2000 Finnigan
- Colonne: RTX-5 Resteck 5 % diphényle et 95 % diéthyl polysiloxane
- Température initiale : 100 °C (1min)
- Température finale: 230 °C
- Gradient de température : 5 °C/minutes

- Délai : 5 minutes
- Injecteur mode splitless : 250 °C
- Gaz vecteur : 1,2 mL/minutes
- Mode d'ionisation : impact électronique (EI+)
- Tension du détecteur : 350 V
- Type d'acquisition : TIC

L'identification des composés a été réalisée sur la base de comparaison des spectres de fragmentation obtenus avec ceux de la banque de données WILEY 275. Le spectre de fragmentation correspond à une répartition des ions regroupés aux valeurs nominales entières les plus proches de leur masses réelles et dont les intensités sont exprimées en % d'intensité du pic le plus intense, appelé pic de base.

### **IIB.3 Détermination de la composition des huiles d'*Hibiscus sabdariffa***

#### **IIB.3 1 Méthodes d'analyse à partir des graines de l'hibiscus**

L'étude comparative des extractions a été effectuée avec des graines d'hibiscus provenant de trois pays : le Vietnam, le Sénégal et le Mexique. Chaque manipulation a été effectuée en trois exemplaires.

##### **IIB.3.1.1 Extraction à chaud au Soxhlet**

La méthode norme du soxhlet (NF EN ISO 659) a servi de référence pour la détermination de la teneur en huile. Une quantité donnée de graines d'hibiscus (30 g) est pesée et ensuite broyée. La poudre des graines d'hibiscus obtenue est ensuite disposée dans une cartouche cellulosique laquelle est introduite dans un extracteur de type soxhlet, équipé à sa base d'un ballon de 1 litre dans lequel 200 mL de solvant (cyclohexane) ont été insérés. L'extraction a été réalisée en trois exemplaires. La durée d'extraction est de 6 heures, durée que l'on considère suffisante pour épuiser le produit. L'extrait est concentré sous pression réduite et pesé.

##### **IIB.3.1.2 Extraction à froid (par centrifugation)**

Environ 7,0 g de graines d'hibiscus des trois variétés sont broyées et dissous dans 20 mL de cyclohexane et centrifugé à 3500 rpm pendant 5 minutes. La phase supérieure est prélevée puis filtrée. L'ajout d'isohexane, la centrifugation et le prélèvement de la phase supérieure sont répétés 3 fois. L'extrait est concentré sous vide.

### IIB.3.1.3 Accelerated solvent extractor (ASE 200 Dionex)<sup>[33,34]</sup>

La méthode ASE (Accelerated Solvent Extractor) (figure 22) repose sur le même principe que la méthode du Soxhelt. Cette récente technique d'extraction par solvant organique fonctionne à des températures et des pressions élevées de façon à accroître l'efficacité de l'extraction. L'extraction s'effectue dans des cellules métalliques contenant une masse de broyat connue et se déroule automatiquement selon les étapes décrites ci-dessous. Ces paramètres sont programmés préalablement via une interface électronique. A la différence de la méthode de référence du Soxhlet, cette technique présente l'avantage d'être rapide (30 min par échantillon), peu onéreuse (utilisation de quantités moindres de solvant) et nécessitant peu de manipulation (24 extractions programmables). La comparaison des méthodes ASE et Soxhelt a montré que ces deux techniques permettent d'extraire la totalité de l'huile. La méthode ASE permet le dosage d'un grand nombre d'échantillons et de récupérer les huiles extraites nécessaires à l'analyse du profil en acides gras<sup>[33-35]</sup>.

Exemple : extraction effectuée (tableau 9), avec des graines du Vietnam par soxhlet/ ASE. Après évaporation du solvant (sous pression réduite et à 40°C), la quantité d'huile est pesée et exprimée en g d'huile par rapport à 100g de matière sèche de broyat de grain.

Paramètres	Consignes
Température	105 °C
Pression	100 bars
Volume de solvant	30 mL
Solvant	Cyclohexane
Durée de l'extraction	35 min
Volume de rinçage	5,5 mL
Durée de la purge	120s
Nombre de cycle d'extraction	4

Appareillage	graines (g)	Solvant (mL)	Durée	Rendement (%)
ASE	13	30	50 min	19.5
Soxhelt	20	200	6 hrs	20.2

\* moyenne de 3 essais

Tableau 9 : Rendement de concrètes obtenues lors des extractions ASE/ Soxhlet dans l'isohexane



Figure 22 : ASE 200 commercialisé par DIONEX<sup>[33]</sup>

### **IIB.3 .2 Caractérisation des propriétés physico-chimiques des Huiles *d'Hibiscus sabdariffa***

Les analyses normées sont extraites du Recueil des Normes Françaises sur les Corps Gras, Graines Oléagineuses et Produits Dérivés publié par l'AFNOR<sup>[27]</sup>. Les caractéristiques physico-chimique des trois variétés d' huiles étudiées, la masse volumique, le point de fusion, les indices de réfraction, de saponification, d'acide, d'iode ainsi que la teneur en protéine, cendre ont été déterminés selon des méthodes normalisées AFNOR<sup>[27]</sup>. Dans tout les cas, trois déterminations d'indice ont été réalisées simultanément pour un même essai.

#### **IIB.3.2.1 Indice de saponification**

L'indice de saponification, IS, est déterminé par la norme (NF T60-206)<sup>[27]</sup>. Il correspond au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour saponifier 1 g de matière grasse. 25 mL de KOH 0,5 M (d'hydroxyde de potassium) dont le titre est connu avec précision sont ajoutés dans un ballon contenant 5 g d'huile. Le tout est porté à ébullition pendant 3 heures. On y ajoute de la phénophtaléine et le mélange est titré avec HCL 0,5 M jusqu'à disparition de la couleur rouge. On effectue un essai à blanc (sans huile).

L'indice de saponification est donné par la formule suivante :

$$I_s = \frac{(V_0 - V_1) M * 56,1}{M_s}$$

$V_0$ : volume d'HCL titrant pour le blanc (mL),

$V_1$ : volume d'HCL titrant pour l'échantillon (mL),

M: molarité d'acide chlorhydrique (mol/L) (0,4999),

$M_s$ : masse de l'échantillon en (mg)

### IIB.3.2.2 Indice d'Acide

L'indice d'acide, (IA), correspond au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres présents dans un gramme de corps gras AFNOR T60-204<sup>[27]</sup>. On prépare une solution de KOH 0,1M. L'échantillon (10 g d'huile) est dissout dans de l'alcool préalablement neutralisé avec KOH 0,1M en présence de phénophtaléine. Une coloration violette au point équivalent doit subsister quelques instants. L'indice d'acidité exprimé en pourcentage d'acide libre est calculé comme suit :

$$I_s = \frac{(V_0 - V_1) N \times 56,1}{M_s}$$

$V_0$ : volume d'HCL titrant pour le blanc en mL

$V_1$ : volume d'HCL titrant pour le échantillon en mL

M: molarité d'acide chlorhydrique (mol/L) (0,4999)

$M_s$ : masse de l'échantillon en mg.

### IIB.3.2.3 Indice d'Iode

Cet indice permet de déterminer l'insaturation globale d'un corps gras (NF T60-203)<sup>(27)</sup>. L'indice d'iode, II, d'une huile végétale se fait par dissolution dans un solvant, dans lequel on ajoute du réactif de Wijs et une solution d'iodure de potassium. L'iode libre est ensuite titré par une solution de thiosulfate de sodium. L'échantillon (5 g d'huile) est dissout dans 20mL d'un mélange à volumes égaux cyclohexane/acide acétique et l'on ajoute 25 mL de réactif Wijs. Laisser les fioles dans l'obscurité pendant 1h. Ajouter 20mL de solution de thiosulfate de sodium à 0,1M en présence d'empois d'amidon et titrer jusqu'à disparition de la couleur brune. Effectuer un essai à blanc. L'indice d'iode, II, exprimé en grammes pour 100g de corps, est donné par l'équation :



$$W_i = \frac{(V_1 - V_2) N \times 12,69}{M_s}$$

$V_1$ : volume de thiosulfate titrant pour le blanc en mL

$V_2$ : volume de thiosulfate titrant pour l'échantillon en mL

M: molarité de thiosulfate de sodium (mol/L) (0,0985)

$M_s$ : masse de l'échantillon en mg.

### IIB.3.2.4 Mesure de la Densité

La densité relative d'une substance est le rapport entre la masse d'un certain volume de cette substance, à 20°C, et la masse d'un volume égal d'eau, à la même température (NF T60-204)<sup>[27]</sup>. Les densités des huiles de graines ont été mesurées à l'aide d'un pycnomètre 10mL, à 20°C. Les masses volumiques (g) ont été calculées par rapport à celle de l'eau distillée à la même température par la formule suivante :

$$P = (M_2 - M_0) / (M_1 - M_0)$$

$M_2$ : masse du pycnomètre rempli d'huile

$M_0$ : masse du pycnomètre vide

$M_1$ : masse du pycnomètre rempli d'eau.

## IIB.3.3 Détermination de la composition chimique des huiles d'*Hibiscus sabdariffa*

### IIB.3.3.1 Analyse des acides gras

La teneur en acides gras a été déterminée par analyse des esters méthyliques d'acides gras en chromatographie phase gazeuse (CPG) selon la norme NF EN ISO 5508 qui nécessite deux étapes préliminaires : l'extraction et l'estérification des acides gras.

L'extraction des acides gras correspond à la solubilisation des triglycérides contenus dans l'huile dans un solvant organique. Cette étape est suivie d'une méthyl-trans-estérification qui consiste à ajouter un groupement méthyle aux acides gras libérés pour former des esters méthyliques d'acides gras pour en faciliter la séparation. En effet, cette dérivatisation permet de rendre les acides gras plus volatils, garantissant la stabilité nécessaire à l'analyse CPG. 20mg d'huile de graines extraite par soxhlet, sont pesés dans un tube à essais. L'huile est solubilisée dans 5 mL de Tert-butyl-méthyl éther (TBME). Après agitation, 100 µL sont prélevés et transférés dans un vial adapté pour l'analyse en CPG.

### IIB.3.3.2 Dosage des esters méthyliques d'acides gras par CPG

La séparation et le dosage des esters méthyliques d'acides gras, par chromatographie en phase gazeuse (CPG), constituent la dernière étape de l'analyse des huiles. Cette technique de séparation des composants d'un mélange repose sur la différence d'affinité des substances à analyser vis-à-vis de la phase stationnaire. En CPG, la phase mobile est appelée gaz vecteur. La méthode consiste à vaporiser l'échantillon liquide à analyser dans le gaz vecteur (l'hélium). Le flux gazeux passe dans la colonne de séparation, à travers de laquelle les composants de l'échantillon se déplacent à des vitesses influencées par le degré d'interaction de chaque constituant avec la phase non-volatile stationnaire. Les molécules présentant la plus grande interaction avec la phase stationnaire sont plus fortement retardées et inversement pour celles dont l'interaction est moins forte. En sortie de colonne, les composés sont détectés par un détecteur FID (Flame Ionisation Detector) et leur signal est amplifié. L'élution s'effectue donc par ordre croissant de masses moléculaires ( $C_{14}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{18}$ ,...) et du nombre d'insaturations ( $C_{18}$ ,  $C_{18:1}$ ,  $C_{18:2}$ ,...) [35,36].

La proportion relative d'acides gras est quantifiée par une interface informatique qui permet l'intégration de l'aire des pics séparés rapportée à la somme des aires intégrées. La comparaison du temps de rétention de chaque pic avec le profil d'un mélange d'huile de composition connue (rapeseed oil mix, Supelco, USA) permet d'identifier chaque acide gras séparé.

### IIB.3.3.3 Conditions d'analyse du profil d'acides gras.

150  $\mu$ L du mélange huile/TBME issus de l'extraction d'acides gras sur huile (FAME) sont transestérifiés par un ajout de 50  $\mu$ L de Triméthylsulfonium hydroxyde (TMSH). Cette réaction a lieu au moment de l'injection sous l'effet de la température et forme des esters méthyliques d'acides gras. Le profil d'acides gras d'une huile est réalisé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sur chromatographe 3800 de Varian® dans les conditions suivantes :

- Colonne : CPSelect CB (FAME) (50m\*0,25mm,film=0,25 $\mu$ m),
- Gaz vecteur: Hélium. Pression en tête de colonne 100 Kpa.
- Température de four : gradient de température, 185°C/min, pendant 40 minutes, puis montée en température de 185 à 250°C à 15°C/min, maintien à 250°C pendant 10 minutes,
- injecteur : splitless à 250 °C,

- volume injecté : 1  $\mu$ L,
- détecteur : FID à 250°C.

Les données sont traitées à l'aide du logiciel Star.

#### **IIB.3.3.4 Détermination de la teneur en phytostérols**

50  $\mu$ L de solution d'étalon interne de cholestanol sont dissous dans du chloroforme. Après évaporation du chloroforme, environ exactement 100 mg d'huile de graines sont ajoutés au cholestanol. La saponification est réalisée par ajout de 2 mL de KOH 1 M dans l'éthnaol, suivie d'une agitation au vortex et d'un chauffage de 30 minutes à 60°C. Après refroidissement, les ajouts successifs de 1 mL d'eau distillée et 3 mL d'isohexane, suivis d'une décantation, permettent d'obtenir un biphasé sur laquelle la phase supérieure hexanique est prélevée. L'ajout d'isohexane, la décantation, et le prélèvement de la phase supérieure sont répétés 2 fois. Les 2 phases supérieures sont regroupées et 160  $\mu$ L sont prélevés dans un microtube en vue de leur analyse en CPG.

#### **IIB.3.3.5 Analyses des stérols par CPG**

Le dosage des phytostérols a été effectué avec une méthode développée par (Malcherery-Nagel®). Au moment de l'injection, les phytostérols sont silylés par ajout de 1mL de N-méthyl-N-triméthylsilyl-heptafluorobutyramide (MSHFBA, Macherey-Nagel) mélangé à 50  $\mu$ l de 1-méthyl imidazole (Sigma). Le mélange réactionnel est chauffé 5 min à 105°C pour favoriser la silylation. 1 $\mu$ L de dérivés stérol triméthylsilyl éther sont injectés.

- Colonne : Parkin-Elmer, CPSIL 5CB 30m (D: 0,25mm, film=0,25 $\mu$ m),
- Gaz vecteur: Hélium. Pression en tête de colonne 100 Kpa.
- Injecteur : 55°C pendant 0,5min, 200°C/min jusqu'à 320°C, puis 30°C/min jusqu'à 350°C, et 350°C pendant 2,5 min.
- Température de four : 160°C pendant 0,5min, 10°C/min jusqu'à 260°C, 2,5°C/min jusqu'à 300°C, puis 25°C/min jusqu'à 350°C et 350°C pendant 1,5 min.
- Détecteur FID : 365°C.
- Volume injecté:1 $\mu$ l,

### **IIB.3.3.6. Extraction de tocophérol**

La méthode décrite dans la norme (IUPAC 2,432 et norme ISO 9936 : 1997) concerne la détermination des teneurs en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , et  $\delta$ , tocophérols (appelés globalement tocols) dans les corps gras par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), en polarité de phase normale. Par extension, cette méthode est utilisée pour la détermination des tocols dans les extraits lipidiques obtenus à partir d'huiles de *l'hibiscus sabdariffa* provenant de trois pays. Une gamme d'étalonnage est utilisée pour réaliser un étalonnage externe basé sur l'aire des pics. L'extraction des graines à été effectuée à froid par centrifugation en utilisant le cyclohexane. Suivre le même protocole que celui décrit au (IIB.3.1.2), en précisant le matériel et la méthode d'extraction des graines à froid. A chaque analyse, environ 10 mg d'huile d'hibiscus des trois variétés sont dissous dans 1 mL de cyclohexane. Deux prises d'essai sont effectuées par échantillon.

### **IIB.3.3.7 Dosage par étalonnage externe**

Une solution-mère de référence de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , tocophérols, à 200 ppm, est préparée dans du cyclohexane. La détermination de leur concentration est effectuée par UV lors de chaque série d'analyses. Pour chaque série de dosage, une solution étalon à injecter est préparée à partir de chaque solution-mère de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , tocophérols, préalablement dosée par UV. Les concentrations sont de 0,2 à 10 ppm.

### **IIB.3.3.8 Condition chromatographique des Tocophérols (CLHP)**

Parmi les différentes méthodes d'analyse des tocophérols, la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) sur phase normale a été retenue. L'analyse des tocophérols a été effectuée sur l'appareil Dionex RF 2000 équipée d'une pompe isocratique P 680.

Paramètres utilisés :

- Colonne: KROMASIL 100 sil 5,0  $\mu$ m 250 x 4,0 mm
- Détecteur fluorimétrique, la longueur d'excitation et émission sont à 290 et 317 nm
- Phase mobile: Isooctane 99,5 %, Isopropanol 0,5 %
- Boucle : 20  $\mu$ l.

### IIB.3.4 Détermination de cendres

L'incinération du produit est conduite à  $550\text{ °C} \pm 15\text{ °C}$  dans un four à moufle, à chauffage électrique, jusqu'à une masse pratiquement constante, (NF V 03-922). Les échantillons pesés de graines broyées d'hibiscus sont chauffés à  $550\text{ °C}$  pendant 3 heures. La calcination est obtenue à  $550\text{ °C}$  jusqu'à l'obtention de cendres blanches, gris clair ou rougeâtres, visiblement dépourvues de particules de charbon. L'échantillon est refroidi dans le dessiccateur et pesé dès qu'elle a atteint la température du laboratoire. Le taux de cendres est calculé de la manière suivante :

$$\text{Taux de cendres (\%)} = (M_2 - M_1) / M_1 - M_0$$

$M_0$ : est la masse, en grammes, de la capsule d'incinération,

$M_1$ : est la masse, en grammes, de la capsule d'incinération chargée avec la prise d'essai

$M_2$ : est la masse, en grammes, de la capsule d'incinération avec les cendres.

### IIB.3.5 Détermination de la teneur en protéine

Il s'agit du dosage d'azote, réalisé par la méthode Kjeldahl (Kjeltec TM 2200, Foss). Les premiers dosages ont été réalisés avec une chaîne en flux continu, une fois les échantillons minéralisés. Par la suite, les dosages ont été effectués avec un système Kjeltec Tecator, par minéralisation et distillation à la vapeur en milieu basique des sels d'ammonium formés. 0,2 à 0,8 g d'échantillon sont pesés et mis dans des tubes de minéralisation ; on y ajoute un catalyseur à base de sulfate de cuivre et de potassium et 12 mL d'acide sulfurique concentré. Après avoir laissé les tubes au repos pendant 2-3 heures, ils sont chauffés à  $400\text{ °C}$  jusqu'à ce que la minéralisation devienne complète (le contenu des tubes devient incolore). Une fois refroidi, et après ajout de 80 mL d'eau distillée et 60 mL d'une solution de soude à 40%, le milieu a été distillé. Le distillat a été récupéré par bullage dans 30 mL d'une solution d'acide borique à 4%, additionné de vert de bromocrésol et de rouge de méthyle. L'ammoniac a été alors titré par une solution d'acide chlorhydrique à 0,106M, préalablement étalonné par de la soude à 0,1M. Le virage est déterminé par le changement de coloration de la solution du bleu au violet. Le taux d'azote est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ azote} = ((V-V_0) \times 0,2 \times 14.01)/ms \times 100$$

V: volume d'acide utilisé pour la titration de l'échantillon en mL

V<sub>0</sub>: volume d'acide nécessaire pour le titrage du blanc

ms: masse d'échantillon sec en mg .

La teneur en protéines est calculée selon l'estimation standard qui consiste à multiplier le pourcentage d'azote par un coefficient reconnu au niveau international de 6,25.

## **CHAPITRE IIC1**

**Résultats et discussion sur les calices de**

***Hibiscus sabdariffa* L.**

## IIC1. 1. Analyse de l'huile essentielle extraite par l'hydrodistillation à partir des calices

### IIC1. 1.1 Etudes préliminaires sur l'hydrodistillation

Pour déterminer le meilleur rendement, en huile essentielle, des calices de l'*Hibiscus sabdariffa*, une étude préliminaire a été menée sur l'*Hibiscus sabdariffa* du Vietnam. Plusieurs expériences d'hydrodistillation ont été effectuées en faisant varier la durée d'hydrodistillation, la quantité de calices séchées et le volume d'eau (tableau 10). Ces paramètres ont retenu notre attention durant tous les essais afin de suivre l'évolution de la production horaire et de la nature des composés recueillis. Pour pouvoir conclure quant à la valeur de ces paramètres, il convient de réaliser un compromis optimum entre :

- la productivité (durée des distillations effectuées),
- la valorisation de la matière première (ou rendement en huile essentielle par rapport à la matière première consommée). De nos essais, les meilleurs rendements ont été obtenus avec les conditions suivantes :

- durée limitée d'hydrodistillation : huit heures,
- quantité de matière végétale utilisée : 300 grammes,
- volume d'eau : 3 litres.

No d'essai	Quantité Matière Végétale (gr) <sup>1</sup>	Eau (Litre)	Matière sèche/eau (g/l)	% d'humidité <sup>2</sup>	Durée de distillation (hr)	H.E obtenu (gr) <sup>3</sup>	Rendement (%) <sup>4</sup>
1	200	3	66,6	15,0	8	0,08	0,04
2	200	3	66,6	15,0	8	0,08	0,04
3	300	3	100,0	15,1	8	0,20	0,07
4	300	3	100,0	15,1	8	0,21	0,07
5	400	5	80,0	15,0	8	0,18	0,05
6	400	5	80,0	15,0	8	0,17	0,05
7	500	4	125,0	15,1	8	0,18	0,04
8	500	4	125,0	15,0	8	0,17	0,03

Tableau 10: Résultats obtenus par l'hydrodistillation d'*Hibiscus sabdariffa* du Vietnam

1. calice séché
2. % d'humidité de la partie extraite
3. gr d'huile essentielle obtenue par hydrodistillation par 100gr de matière sèche
4. rendement en gr d'huile essentielle obtenue par 100gr de matière sèche

Nous avons généralisé ces conditions pour l'étude des deux autres espèces d'*Hibiscus sabdariffa*, ceux du Sénégal et du Mexique.



### IIIC1. 1.2 Résultats et discussion sur l'analyse de la fraction volatile obtenue par Hydrodistillation.

L'échantillon d'hibiscus du Vietnam a été fourni par la Société AMPHARCO, à Ho Chi Minh Ville (Vietnam). L'hibiscus du Sénégal a été acheté au marché de Thiès (Sénégal), celui du Mexique a été fourni par la Société AMARE, « Asociacion Mexicana de Agro-Recursos » (Mexique).

Le calendrier des récoltes, les techniques de cueillette, de conservation et de séchage nous sont inconnus... Les résultats des études complémentaires des calices séchés de l'*hibiscus sabdariffa* de trois pays (Vietnam, Sénégal et Mexique), par hydrodistillation (tableau 10) montrent des variations des différents rendements en huiles essentielles, en fonction de l'origine de la matière première.

Ainsi, les huiles essentielles ont été obtenues avec un rendement moyen de  $6,1 \times 10^{-2}$  % pour l'espèce provenant du Vietnam, de  $5,2 \times 10^{-2}$  % pour celle du Sénégal et de  $4,1 \times 10^{-2}$  % pour celle du Mexique (tableau 11). Très peu d'huiles essentielles est présente dans le calice. L'extraction de cette huile, verte et visqueuse à température ambiante, débute après 1h00 d'hydrodistillation. L'huile récupérée pourrait être constituée majoritairement d'acides gras puisqu'elle est solide à température ambiante. En principe, la teneur des plantes en huiles essentielles est faible, de l'ordre de 1 à 3 %, à l'exception du clou de girofle de (14 à 19%), du macis (10 à 13%), de la noix de muscade (8 à 9 %) et de la cardamome (4 à 10 %)<sup>[36,37]</sup>.

Origine de l'hibiscus	% d'humidité	Dure de distillation (hr)	Huile essentielle* [g]	Rendement* [%]	Ecartype
Vietnam	11,5	6,0	0,19	0,06	0,02
Sénégal	12,0	6,0	0,16	0,05	0,03
Mexique	14,00	6,0	0,16	0,04	0,01

\* moyenne de 3 essais

Tableau 11: Résultats comparatifs obtenus par hydrodistillation des huiles essentielles d'*hibiscus sabdariffa* du Vietnam, du Sénégal et du Mexique.

Afin d'optimiser ce rendement, nous avons procédé à l'étude cinétique de l'entraînement à la vapeur d'eau, en fractionnant cette opération en intervalles de 60 minutes. La figure 12 représente les résultats obtenus. On remarque qu'une durée d'entraînement à la vapeur de 300 à 360 minutes permet de récupérer la majorité de l'huile essentielle. Notons qu'il convient de limiter au maximum la durée de cette opération, afin d'éviter les dégradations thermiques.

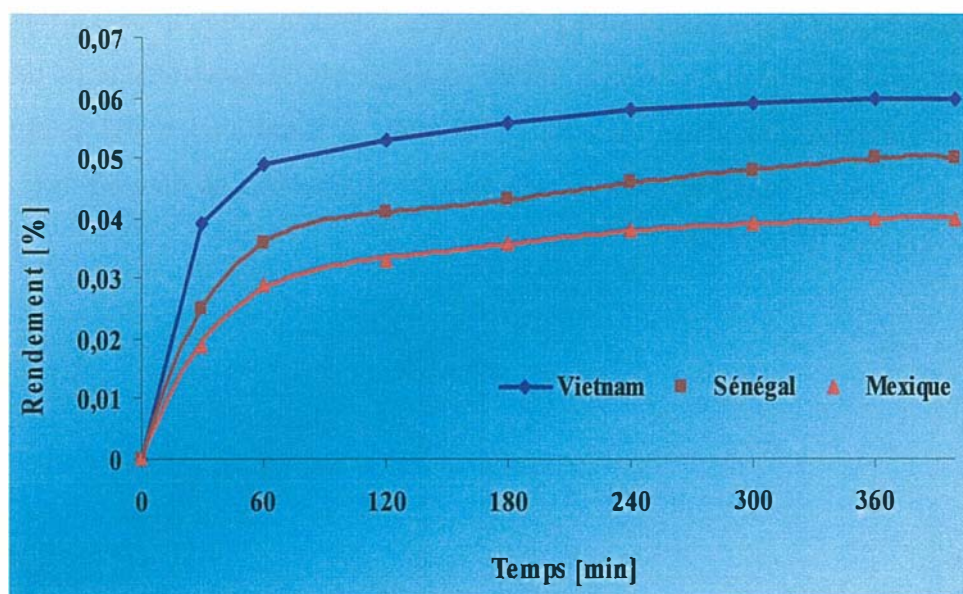


Figure 23: Etude cinétique de l'extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur à partir de l'*Hibiscus sabdariffa* des trois pays.

Le développement des moisissures et des micro-organismes est favorisé par l'humidité qui peut provenir de la plante elle-même, d'une mauvaise aération du lieu de conservation ou de l'humidité du sol, facteurs qui peuvent accélérer les processus de fermentation ou d'oxydation de certains constituants végétaux. Aussi, est-il souvent nécessaire, dans un premier temps, de soumettre les produits récoltés au séchage par le soleil, en sachant qu'un séchage trop prolongé au soleil influence non seulement la couleur mais modifie aussi sans doute la nature des composés extractibles<sup>[38]</sup>.

Par conséquent, nous avons jugé important, avant toute extraction, de noter la couleur<sup>[26]</sup> et la teneur en humidité des trois échantillons d'hibiscus étudiés. Lors d'une étude

future, afin d'optimiser les rendements en telle ou telle molécule, il sera également nécessaire d'étudier aussi la morphologie des espèces d'*hibiscus* soumises à l'expérimentation.

D'après les résultats de nos déterminations, la teneur en humidité, pour les trois hibiscus, se situe entre 10 et 14 %. Cela montre que le séchage au soleil au stockage n'est pas totalement efficace. Cependant, il faut reconnaître que ce mode de séchage est le plus simple et le plus économique, ce qui explique qu'il soit le plus utilisé dans ces pays. De plus, si elle est bien conduite, c'est aussi la méthode la moins destructrice.

Les extraits d'huiles essentielles provenant de l'hydrodistillation des calices d'hibiscus du Vietnam, du Mexique et du Sénégal ont été analysés sur un spectromètre de masse couplé à un chromatographe en phase gazeuse (CPG/SM). L'identification des composés a été réalisée sur la base de comparaison des spectres de fragmentations obtenus avec ceux de la banque de données WILEY 275.

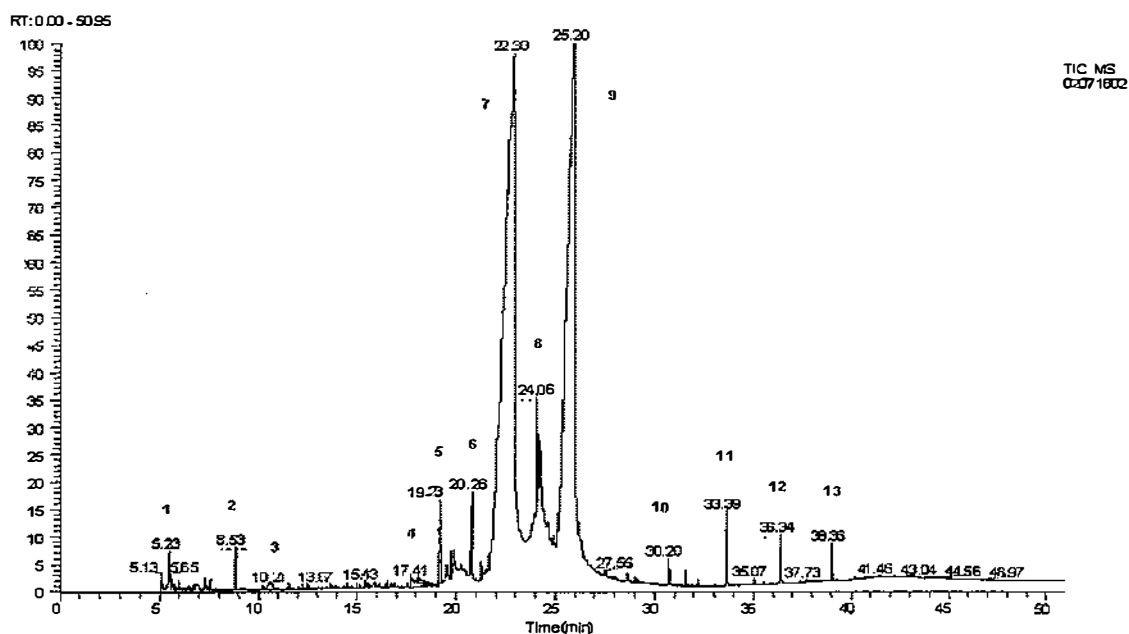


Figure 24 : Chromatogramme de la fraction aromatique d'*hibiscus sabdariffa* L.

Des signaux des chromatogrammes des huiles essentielles obtenus, nous en avons identifié 13 (Tableau 12). Nous constatons que la très grande majorité des composés sont l'acide hexadécanoïque (oléïque) et l'acide octadécadiénoïque (linoléïque). Ils représentent 43,12 % et 45,19 % pour l'hibiscus du Vietnam, 41,40 % et 44,53 % pour celui du Sénégal et 41,31% et 44,60% pour le celui du Mexique. Nous avons également identifié l'eugénol dans toutes les variétés.

N° de pic	Composés	Formule	Vietnam	Sénégal	Mexique
1	décénol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0,30	0,28	0,30
2	eugénol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	0,54	0,75	0,51
3	époxyde bisabolène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0,12	0,10	0,15
4	acide tétradécanoïque	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	1,05	1,22	1,27
5	éicosène	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	1,62	2,06	1,70
6	hexadécanoïate de méthyle	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	4,46	4,35	4,43
7	acide hexadécanoïque	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	<b>42,12</b>	<b>41,40</b>	<b>41,31</b>
8	octadécadiénoïate de méthyle	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	3,15	3,13	3,19
9	acide octadécadiénoïque	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	<b>45,19</b>	<b>44,53</b>	<b>44,60</b>
10	docosane	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	0,44	0,37	0,50
11	pentacosane	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	0,52	0,75	0,56
12	heptacosane	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	0,43	0,62	0,51
13	octacosane	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	0,36	0,37	0,50

Tableau 12: Composés des fractions aromatiques d'*hibiscus sabdariffa* du Vietnam, du Sénégal et du Mexique en (%) relatif.

La fraction obtenue est très riche en acides gras, lui conférant cet aspect solide à température ambiante. La présence d'acides gras, en quantité importante, confirme l'hypothèse d'hydrolyse de triglycérides d'acides gras<sup>[39]</sup>. Il est intéressant de remarquer qu'il s'agit de composés relativement « lourds ». Il ne faut donc pas chercher l'arôme de l'hibiscus parmi ces composés « lourds ». Cet arôme proviendrait d'une combinaison des dérivés terpéniques (pour les notes aromatiques) et des dérivés du sucre (pour l'odeur de caramel). D'autre part, l'évolution des dérivés aliphatiques d'acides gras peut masquer l'arôme global de l'hibiscus<sup>[40,41]</sup>. La molécule aromatique peut également être isolée par distillation/extraction à partir de calices de l'hibiscus ; par contre, le processus de séchage a pu réduire, particulièrement la quantité de trois arômes dominants, terpinéol, linalol et limonène. Des calices frais de l'hibiscus sont nécessaires afin d'identifier ces composés aromatiques<sup>[40]</sup>.

## IIC1. 2 Résultats et discussion sur l'efficacité extractive des différentes techniques et solvants

Dans les tableaux 13, 14 et 15 sont donnés les rendements moyens, en « concrètes », à partir des calices d'hibiscus du Vietnam, du Sénégal et du Mexique respectivement (masse « concrète »/masse initiale). Ils ont été calculés sur trois essais pour les quatre techniques différentes.

Les rendements moyens d'extraits pour les calices d'hibiscus du Vietnam, avec l'hexane, sont de

- 1,7 % pour la technique du soxhlet,
- 1,3 % par les ultrasons (E.M.A.U.S),
- 1,1 % pour la macération
- et 0,8 % pour la distillation-extraction simultanées (DES), Likens-Nickerson,

Pour le dichlorométhane ces rendements moyens sont

- de 2,3 % pour la technique du soxhlet,
- 1,7 % pour les ultrasons (E.M.A.U.S),
- 1,6 pour la macération,
- 1,3 % pour la distillation-extraction simultanées (DES), Likens-Nickerson.

Méthode d'extraction	Durée d'extraction	Mass de Concrète (g)	Rendement % <sup>*</sup> moyenne	Ecart type
<b>Soxhelt</b> Hexane Dichlorométhane	6 h	0,24	1,7	0,01
		0,35	2,3	0,02
<b>EMAUS</b> Hexane Dichlorométhane	2 h	0,21	1,3	0,06
		0,25	1,7	0,01
<b>Macération</b> Hexane Dichlorométhane	3 jours	0,18	1,1	0,03
		0,24	1,6	0,02
<b>DES</b> Hexane/ Eau Dichloro/Eau	3 h	0,11	0,8	0,01
		0,20	1,3	0,02

\* moyenne de 3 essais

Tableau 13: Comparaison des rendements en « concrète » d'*Hibiscus sabdariffa* du Vietnam par les différentes techniques d'extraction et de solvants.

## Chapitre IIC1. Résultats et discussion sur les calices de l'*Hibiscus sabdariffa*

Pour les calices du Sénégal, les rendements moyens d'extraits, par l'hexane, sont

- de 1,4 % pour la technique du soxhlet,
- 1,0 % pour les ultrasons (E.M.A.U.S),
- 0,9 % pour la macération,
- et 0,6 % pour la distillation-extraction simultanées (DES), Likens-Nickerson.

Pour le dichlorométhane les rendements moyens sont

- de 1,9 % pour la technique du soxhlet,
- 1,5 % pour les ultrasons (E.M.A.U.S),
- 1,4 pour la macération,
- 1,0 % pour la distillation-extraction simultanées (DES), Likens-Nickerson.

Méthode d'extraction	Durée d'extraction	Mass de Concrète (g)	Rendement % Moyenne*	Ecart type
<b>Soxhelt</b> Hexane Dichlorométhane	6 h	0,22	1,4	0,06
		0,28	1,9	0,05
<b>EMAUS</b> Hexane Dichlorométhane	2 h	0,15	1,0	0,05
		0,21	1,5	0,01
<b>Macération</b> Hexane Dichlorométhane	3 jours	0,15	0,9	0,03
		0,19	1,4	0,02
<b>DES</b> Hexane/ Eau Dichloro/Eau	3 h	0,07	0,6	0,01
		0,15	1,0	0,03

\* moyenne de 3 essais

Tableau 14: Comparaison des rendements en « concrète » d'*hibiscus sabdariffa* du Sénégal par différentes techniques d'extraction et de solvants.

Pour les calices d'hibiscus du Mexique, les rendements moyens des extraits par l'hexane sont

- de 1,3 % pour la technique du soxhlet,
- 0,9 % pour les ultrasons (E.M.A.U.S),
- 0,8 % pour la macération
- 0,6 %, pour la distillation-extraction simultanées (DES), Likens-Nickerson.

Pour le dichlorométhane, les rendements moyens sont :

- de 1,8 % pour la technique du soxhlet,
- 1,4 % pour les ultrasons (E.M.A.U.S),
- 1,3 pour la macération
- et 0,9 % pour la distillation-extraction simultanées (DES), Likens-Nickerson.

Méthode d'extraction	Durée d'extraction	Mass de Concrète (g)	Rendement % Moyenne *	Ecart type
<b>Soxhelt</b> Hexane Dichlorométhane	6 h	0,22	1,3	0,04
		0,28	1,8	0,03
<b>EMAUS</b> Hexane Dichlorométhane	2 h	0,15	0,9	0,03
		0,21	1,4	0,02
<b>Macération</b> Hexane Dichlorométhane	3 jours	0,12	0,8	0,04
		0,14	1,3	0,02
<b>DES</b> Hexane/ Eau Dichloro/Eau	3 h	0,08	0,6	0,02
		0,14	0,9	0,01

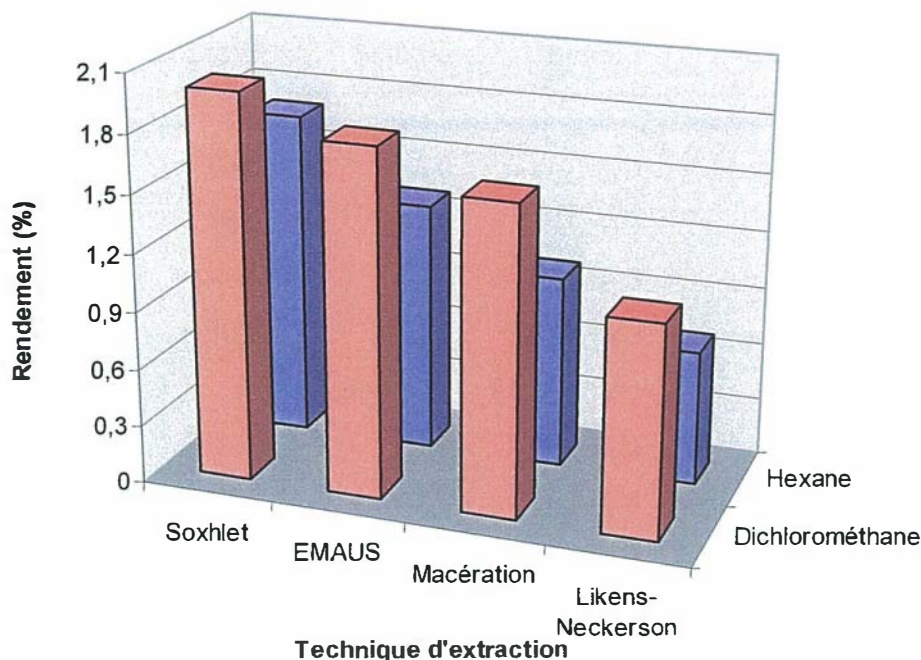
\* moyenne de 3 essais

Tableau 15: Comparaison des rendements en « concrète » d'*Hibiscus sabdariffa* du Mexique par différentes techniques d'extraction et de solvants.

Quelle que soit la technique d'extraction, si on compare les deux solvants, le dichlorométhane fait preuve d'une efficacité largement supérieure à celle de l'hexane (figure 25). Dans le cas de l'extraction par soxhlet, de bons rendements (2,3 % et 1,7 %) ont été obtenus quel que soit le solvant. Par contre, l'hexane ne permet pas d'atteindre des rendements suffisants avec les trois autres techniques d'extraction.

L'efficacité supérieure du dichlorométhane peut s'expliquer par sa polarité et son faible point d'ébullition ( $t_{eb} = 40^{\circ}\text{C}$ ) d'où une pénétration efficace et, d'autre part, par son pouvoir extractant. Cela favorise la pénétration et la diffusion du solvant dans les cellules ou organites renfermant l'essence et donc facilite la libération de cette dernière. Le rendement le plus important a été obtenu par extraction au soxhlet. Cependant, cette méthode consomme de grands volumes de solvant et le temps d'extraction est long (entre 6 à 8 heures) et la macération nécessite 3 jours. La macération assistée par ultrasons (EMAUS) peut être considérée comme une méthode plus rapide et efficace. Elle permet, en utilisant une technique simple, d'obtenir un rendement élevé en extrait, avec une durée d'extraction souvent limitée<sup>[39]</sup>. L'extraction par Likens-Nickerson montre une faible reproductibilité du fait de l'équilibre difficile à atteindre entre les vapeurs de solvant et celles de l'eau. Cependant, elles

permettent de caractériser sélectivement les composés volatils présents dans les calices d'hibiscus, avec moins des acides gras.



Figures 25: Comparaison de l'influence du solvant et de la technique d'extraction sur le rendement

### IIC1. 2.1 Résultats des analyses par CPG/SM

Pour l'analyse qualitative, réalisée sur un spectromètre de masse couplé à un chromatographe en phase gazeuse (CPG/SM), nous avons analysé des extraits en « concrète » obtenus par différentes techniques, toujours sur des calices d'hibiscus des trois pays cités ci-dessus: la distillation-extraction simultanées (D.E.S), la macération, les ultrasons (E.M.A.U.S) ou par soxhlet. Dans les composés volatils de la concrète extraite des calice d'hibiscus, par les techniques de soxhlet, d'ultrason (EMAUS) et de macération, nous avons identifié un plus grand nombre (20) de composés lourds en particulier, les hydrocarbures saturés de C<sub>14</sub> à C<sub>30</sub> et des composants stéroliques (Tableaux 16, 17 et 18).

Par exemple, pour les extraits provenant de l'hibiscus du Vietnam : les composés majoritaires sont l'acide octadécanoïque (oléique ; 19,83%), l'acide octadécadiénoïque (linoléique ; 43,12%). Mais nous trouvons aussi le  $\beta$ -sitostérol (15,82%), le stigmastérol (5,04%) et le campestérol (4,19%).

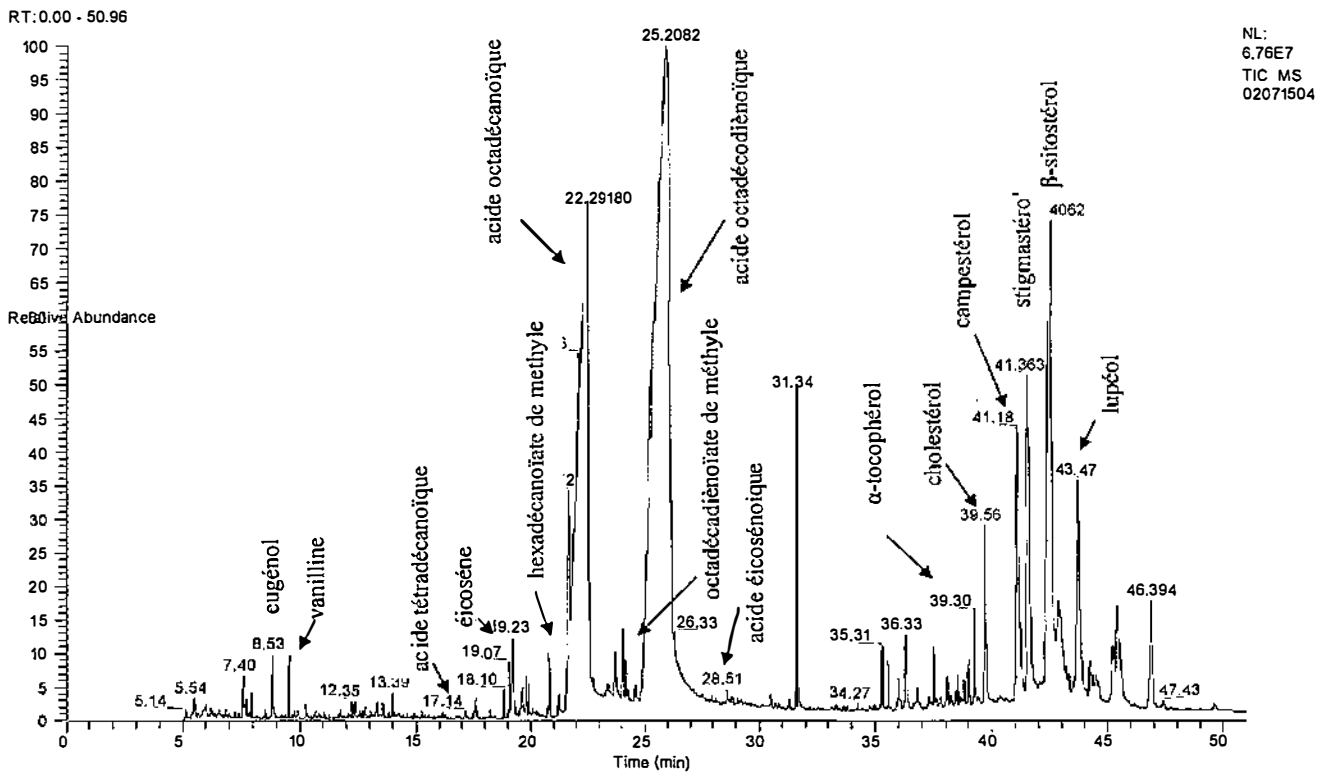


Chapitre IIC1. Résultats et discussion sur les calices de l'*Hibiscus sabdariffa*

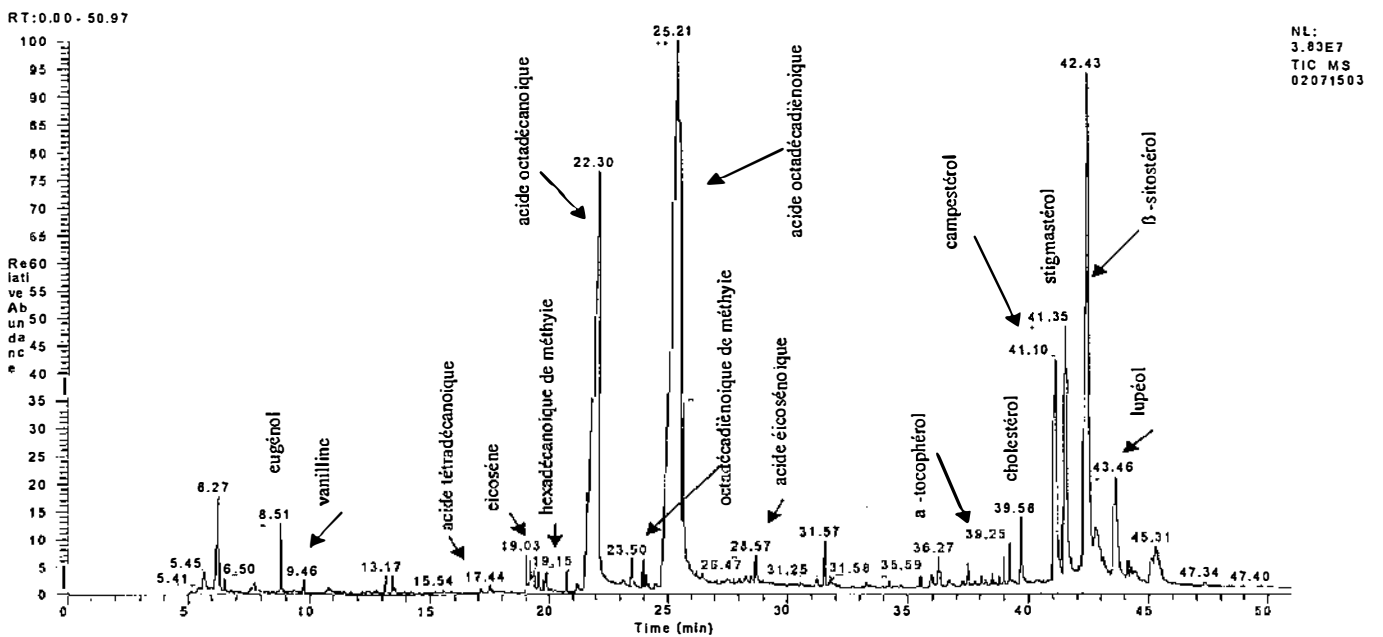
Nous retrouvons des pourcentages analogues pour les autres extraits des hibiscus du Sénégal ou du Mexique.

TR	Composés	Formule	Soxhlet	Ultrason	Mécaration	D.E.S
8,50	eugénol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	0,53	0,67	0,50	16,52
9,47	vaniline	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0,19	0,58	0,16	-----
10,19	époxyde de bisabolène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	----	-----	-----	0,10
17,40	acide tétradécanoïque	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	0,05	0,08	0,06	0,09
19,04	éicosène	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	0,53	0,62	0,42	0,18
19,21	farnésylacétone	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O	----	-----	-----	6,12
21,25	hexadécanoïate de méthyle	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	2,66	3,61	2,42	3,01
22,30	acide octadécanoïque	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	19,83	20,13	20,01	52,51
24,07	octadécadiénoïate de méthyle	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	0,13	0,15	0,11	0,71
25,20	acide octadécadiénoïque	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	43,12	44,02	44,32	13,62
28,55	acide éicosénoïque	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	0,14	0,11	0,10	-----
30,19	docosane	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> -----	-----	-----	-----	3,68
33,41	pentacosane	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> -----	-----	-----	-----	3,12
36,32	heptacosane	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> -----	-----	-----	-----	0,34
39,25	α-tocophérol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	1,97	2,33	1,91	-----
39,53	cholestérol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub>	2,95	3,49	2,92	-----
41,11	campestérol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	4,19	4,22	4,01	-----
41,35	stigmastérol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	5,04	5,25	4,82	-----
42,37	β-sitostérol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	15,82	11,01	13,11	-----
43,46	lupéol	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	2,65	3,66	2,63	-----

Tableau 16: Composés identifiés d'hibiscus du Vietnam par différentes techniques d'extraction, avec le dichlorométhane.



Figures 26: Chromatogrammes des absolues d'hibiscus du Vietnam obtenus par Ultrasons (solvant : (dichlorométhane))



Figures 27 : Chromatogrammes des absolues d'hibiscus du Vietnam obtenues par Soxhlet (solvant dichlorométhane)

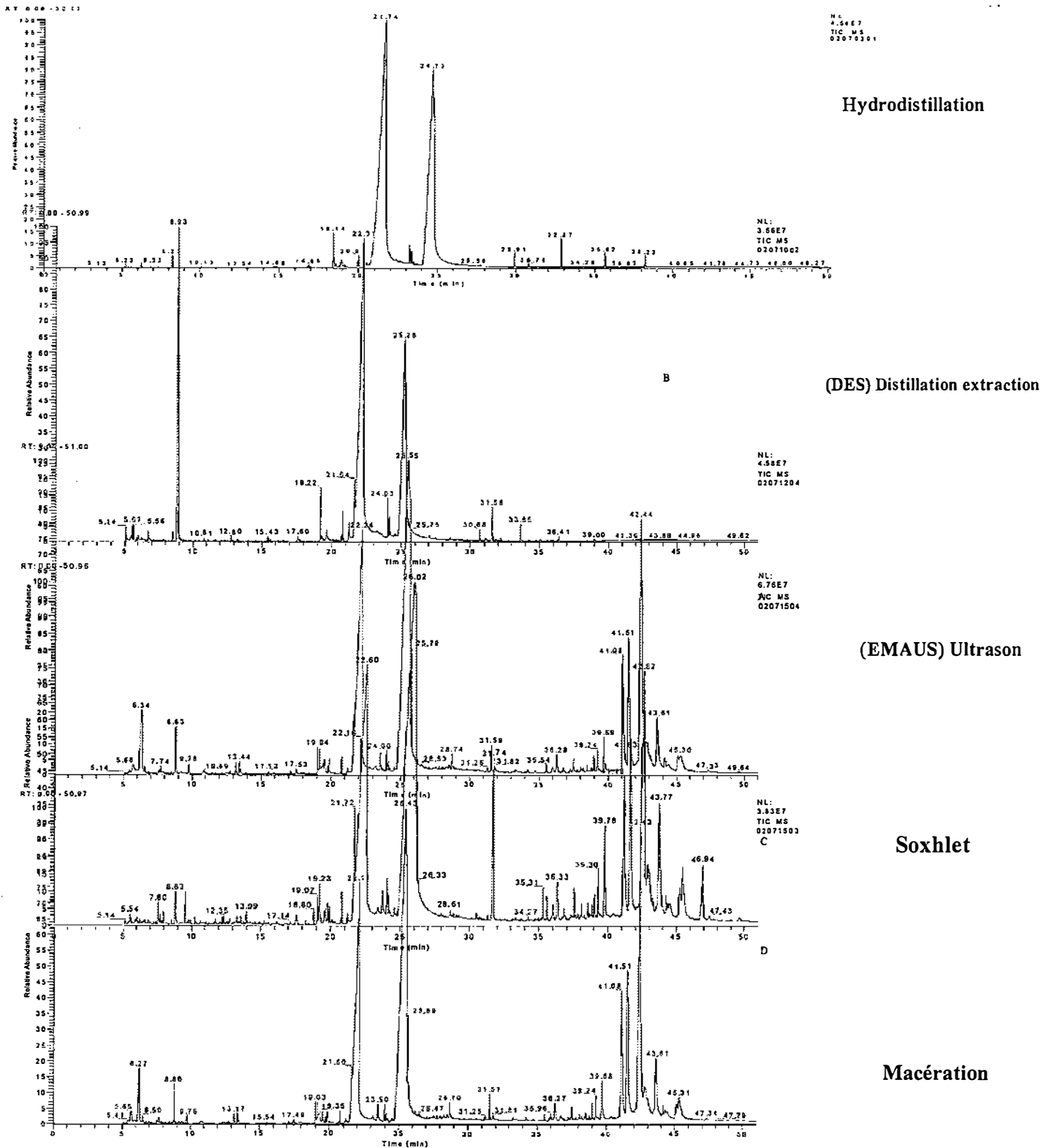
TR	Composés	Formule	Soxhlet	Ultrason	Mécaration	SDE
8,50	eugénol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	0,48	0,61	0,50	15,50
9,47	vaniline	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0,22	0,72	0,15	-----
10,19	époxyde de bisabolène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	----	-----	-----	0,15
17,40	acide tétradécanoïque	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	0,07	0,10	0,11	0,12
19,04	éicosène	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	0,52	0,50	0,52	0,17
19,21	farnésylacétone	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O	----	----	-----	6,12
21,25	hexadécanoïate de méthyle	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	2,60	3,00	3,90	3,01
22,30	acide octadécanoïque	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	19,83	20,21	19,88	53,35
24,07	octadécadiénoïate de méthyle	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	0,12	0,12	0,16	0,71
25,20	acide octadécadiénoïque	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	42,10	43,60	43,50	14,00
28,55	acide éicosénoïque	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	0,13	0,14	0,19	-----
30,19	docosane	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	-----	-----	-----	3,90
33,41	pentacosane	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	-----	-----	-----	3,20
36,32	heptacosone	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	-----	-----	-----	0,36
39,25	α-tocophérol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	2,20	2,10	2,60	-----
39,53	cholestérol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub>	3,12	3,30	2,90	-----
41,11	campestérol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	4,10	4,15	4,20	-----
41,35	stigmastérol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	4,20	5,20	5,11	-----
42,37	β-sitostérol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	14,82	12,15	13,90	-----
43,46	lupéol	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	2,50	3,30	3,51	-----

Tableau 17: Composés identifiés d'hibiscus du Sénégal par différentes techniques d'extraction avec le dichlorométhane.

TR	Composés	Formule	Soxhlet	Ultrason	Mécaration	SDE
8,50	eugénol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	0,55	0,58	0,52	16,13
9,47	vaniline	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0,21	0,62	0,20	-----
10,19	époxyde de bisabolène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	-----	-----	-----	0,14
17,40	acide tétradécanoïque	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	0,02	0,06	0,09	0,15
19,04	éicosène	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub>	0,50	0,50	0,49	0,22
19,21	farnésylacétone	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O	-----	-----	-----	6,17
21,25	hexadécanoïate de méthyl	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	2,90	2,65	4,05	3,12
22,30	acide octadécanoïque	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	20,80	20,35	19,40	53,20
24,07	octadécadiénoïate de méthyle	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	0,13	0,18	0,15	0,81
25,20	acide octadécadiénoïque	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	42,12	42,25	43,12	13,57
28,55	acide éicosénoïque	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	0,17	0,22	0,24	-----
30,19	docosane	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	-----	-----	-----	3,02
33,41	pentacosane	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	-----	-----	-----	3,11
36,32	heptacosone	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	-----	-----	-----	0,50
39,25	α-tocophérol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	1,99	2,45	2,62	-----
39,53	cholestérol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub>	2,97	3,35	2,97	-----
41,11	campestérol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	4,30	4,10	3,11	-----
41,35	stigmastérol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	5,14	5,59	5,20	-----
42,37	β-sitostérol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	15,35	14,01	14,15	-----
43,46	lupéol	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	2,85	2,66	4,05	-----

Tableau 18: Composés identifiés d'hibiscus du Mexique par différentes techniques d'extraction.

Chapitre IIC1. Résultats et discussion sur les calices de *Hibiscus sabdariffa*



Figures 28 Comparaison de chromatogrammes des absolues d’Hibiscus du Vietnam obtenus par 5 techniques d’extraction solvant : dichlorométhane

A partir de figure 28, on peut faire deux remarques :

- a) Si l'on compare l'extrait obtenu par soxhlet avec l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation, on s'aperçoit que les chromatogrammes ne sont pas identiques : les produits obtenus sont donc différents, le pouvoir « extracteur » d'un solvant est plus performant que celui de l'eau, même chaude.
- b) Que les produits extraits par solvants sont essentiellement des stérols.

Par les techniques de distillation extraction simultanées (DES), nous avons identifié un composé phénolique «eugénol» que a été obtenu avec un quantité très élevée (figures 28). L'eugénol est l'un des composants principaux des calices de *l'hibiscus sabdariffa* et est également l'un des composants importants des clous de girofle. L'eugénol est thermiquement stable pendant la période de séchage <sup>[40,41]</sup>. Dans le tableau 19, nous pouvons remarquer que les composés, obtenus lors de nos études d'extraction par solvant sur *l'hibiscus sabdariffa*, sont quasiment les mêmes que ceux mentionnés dans la littérature pour l'*hibiscus tiliaceus* du Brésil <sup>[40]</sup>.

<i>Hibiscus sabdariffa</i> Nos résultats	<i>Hibiscus tiliaceus</i> <sup>[40]</sup>
	benzophénone
acide tradécanoïque	acide tradécanoïque
éicosène	éicosène
hexadécanoïate de méthyle	hexadécanoïate de méthyle
acide octadécanoïque	acide octadécanoïque
octadécadiénoïate de méthyle	octadécadiénoïate de méthyle
acide octadécadiénoïque	acide octadécadiénoïque
acide éicosénoïque	-
$\alpha$ -tocophérol	$\alpha$ -tocophérol
cholestérol	cholestérol
stigmastérol	stigmastérol
campestérol	campestérol
$\beta$ -sitostérol	$\beta$ -sitostérol
Lupéol	-

Tableau 19: Composés identifiés dans l' « absolue » d'*Hibiscus sabdariffa* L. et d'*hibiscus tiliaceus* L., de la famille Malvaceae.

## IIC1. 2.2 Conclusion

Cette étude comparative des méthodes d'extraction des calices de *l'hibiscus sabdariffa*, à partir de 5 techniques d'extraction (Hydrodistillation, Soxhlet, et Liken-Nickerson, par ultrasons (E.M.A.U.S) et macération), et avec 3 solvants différents (eau/hexane/dichlorométhane), montre une grande différence qualitative et quantitative.

### ***D'un point de vue rendement d'extraction:***

La fraction aromatique des calices *d'hibiscus sabdariffa*, obtenue en très faible quantité, à raison d'un rendement de  $4,1 \times 10^{-2}$  à  $6,1 \times 10^{-2}$  %. Elle est très riche en acides gras, lui conférant cet aspect solide à température ambiante. La « concrète » obtenue par extraction des soxhlet, macération et ultrason a permis d'obtenir un rendement d'extraction convenable (de 1,3 à 2,3 par dichlorométhane et 0,8 à 1,7 par l'hexane).

Le temps d'extraction et la quantité de solvant sont nettement réduits lorsque nous utilisons la méthode d'extraction par ultrasons qui nous semble être la plus efficace. En effet, avec cette méthode, en utilisant le dichlorométhane comme solvant, le temps d'extraction n'est que de 160 min seulement. Tandis qu'avec ce même solvant, même en quantité supérieure, la technique de la macération nécessite 3 jours et celle du soxhlet 6 heures.

Si nous comparons les rendements en fonction des différents paramètres du mode opératoire, nous constatons que la méthode par soxhlet est relativement performante, quel que soit le solvant utilisé, hexane ou dichlorométhane, avec un meilleur résultat pour le dichlorométhane cependant. Dans tous les cas, le dichlorométhane semble être un solvant de choix pour exploiter les calices d'hibiscus. Mais il est répertorié (C3) dans la classification CMR<sup>1</sup>. Il est donc recommandé, si c'est possible, de le remplacer par d'autres solvants moins toxiques.

### ***D'un point de vue de la composition:***

Nos résultats montrent que la technique d'extraction employée influence la composition des produits obtenus. Douze (12) composés ont été identifiés avec l'huile essentielle (hydrodistillation) alors que ce nombre monte jusqu'à 21 avec la « concrète » (extraction par solvant). Les composés majoritaires correspondent aux acides octadécanoïque

---

<sup>1</sup> La classification CMR répertorie les substances cancérogènes (C) mutagènes (M) toxiques pour la reproduction, (R). Dans chaque catégorie, le danger diminue de la catégorie 1 à la catégorie 3. (source : [www.inrs.fr](http://www.inrs.fr)).

(oléique) et octadécadiénoïque (linoléique). Dans les extraits des « concrètes » d'hibiscus, extraite par la technique de soxhlet, d'ultrason (EMAUS) et de macération, nous avons identifié, en particulier, des hydrocarbures saturés de C<sub>14</sub> à C<sub>30</sub> et un certain nombre de stérols que sont le β-sitostérol, le campesterol et le stigmastérol. Par les techniques de distillation extraction simultanées (DES), nous avons identifié l'eugénol en quantité très élevée. D'ailleurs, ce composé se retrouve dans tous les extraits, en quantités variables.

La présence d'esters méthyliques ou éthyliques d'acide gras peut être considérée comme un élément caractéristique de cette plante de la famille des Malvacés<sup>[40]</sup>. Il est intéressant de noter l'abondance de quelques dérivés du stérol : c'est aussi un autre aspect typique de l'hibiscus pour son utilisation éventuelle en tant qu'antibiotique et anti-inflammatoire<sup>[40]</sup>.



## **CHAPITRE IIC2.**

### **Résultats et discussion sur les huiles des graines de l'*Hibiscus sabdariffa* L**

## IIC2. Extraction et caractérisation des huiles des graines de l'hibiscus

### IIC2. 1.1 Propriétés physico-chimiques des huiles

Les caractéristiques physico-chimiques des trois variétés d'huiles étudiées, la masse volumique, le point de fusion, les indices de réfraction, de saponification, d'acide, d'iode ainsi que la teneur en protéines et en cendres ont été déterminée selon des méthodes normalisées AFNOR<sup>[42]</sup>. Les tests physico-chimiques peuvent permettre d'évaluer les caractéristiques des huiles données et ce, pour un objectif bien spécifique. L'analyse de ces résultats physico-chimiques des trois variétés d'huiles d'hibiscus (Tableau 20) montre de légères différences caractéristiques.

Les valeurs moyennes des masses pour 1000 graines d'hibiscus sont respectivement (39,0 g), pour l'hibiscus du Vietnam, (21,3 g) pour celui du Sénégal et (19,7 g) pour la variété du Mexique. Les propriétés physiques des graines déterminent la façon dont elles ont été manipulées pendant la fabrication<sup>[43]</sup>. Il est important de noter que, plus les graines sont lourdes, plus la quantité d'huile extraite sera élevée<sup>[44]</sup>.

Caractéristique <sup>a</sup>	Espèces			Literature	
	Vietnam	Mexique	Sénégal	Soja <sup>[45,46]</sup>	Tournesol <sup>[46,47]</sup>
Masse des graines 1000(g)	39,0 ± 0,03	19,70 ± 0,02	21,31 ± 0,01	50-400	30-80
Humidité (%)	8,0 ± 0,8	7,7 ± 0,4	9,0 ± 0,5	2,57	4,96
Huile (%)	22,5 ± 0,1	19,3 ± 0,3	19,4 ± 0,4	15,08	40,32
Protéine (N % x 6.25)	23,18 ± 0,2	22,6 ± 0,6	22,4 ± 0,7	17,94	24,1
Cendre (%)	5,2 ± 0,7	4,4 ± 0,5	4,6 ± 0,4	3,50	3,28
Indice de réfraction (25°C)	1,462 ± 0,5	1,461 ± 0,03	1,463 ± 0,02	1,472	1,469
Masse volumique (25°C)	0,927 ± 0,001	0,926 ± 0,001	0,928 ± 0,002	0,922	0,923
Indice d'acide (mg KOH/g)	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,4	1,3
Saponification (mg KOH/g)	198,2 ± 0,8	197,2 ± 0,8	196,7 ± 0,7	195,2	194,0
Indice d'iode (mg iode/g)wajs	96,6 ± 1,4	95,2 ± 1,5	95,8 ± 0,8	94,0	82,4
<sup>b</sup> hydrates de carbone totaux (%)	41,2 ± 1,1	45, ± 1,7	44,8 ± 1,9	55,30	27,34

<sup>a</sup>moyenne de 3 essais

<sup>b</sup>hydrates de carbone, calculé par la différence, [100-(humidité + cendre + huile + protéine)]<sup>[48,49]</sup>.

Tableau 20: Indices physico-chimiques des huiles de l'Hibiscus des trois espèces retenues.

## Chapitre IIC2. Résultats et discussion sur les huiles des graines de l'hibiscus

Les rendements d'extraction d'huiles végétales sur des graines de l'échantillon vietnamien (22,5 %) sont légèrement meilleurs que pour les deux autres variétés, celle du Sénégal (19,4 %) et celle du Mexique (19,3 %). Ces variations pourraient être expliquées par la diversité de la maturité du phénotype des huiles végétales. La quantité d'huiles contenue dans ces trois hibiscus est équivalente à celle issue d'hibiscus provenant du Soudan <sup>[50]</sup>, et d'Inde <sup>[51]</sup>, et également de l'huile de soja <sup>[45]</sup>.

Les graines contiennent des quantités élevées de protéines (23 %) et d'hydrates de carbone (45 %). Elles constituent une excellente source d'énergie et de protéines et présentent une bonne teneur en nutriments essentiels. Le contenu des protéines est comparable à celui des huiles classiques comme celle du tournesol <sup>[46-47]</sup> et du soja <sup>[52]</sup>. La teneur en cendres pour les trois espèces du Vietnam, du Sénégal et du Mexique sont respectivement de 5,2 %, 4,6 % et 4,4 %. Ces résultats semblent indiquer que les graines d'hibiscus contiennent un pourcentage plus élevé en matière minérale. Les valeurs pour l'indice de réfraction et la densité sont très proches de celles publiées sur l'huile d'olive, l'huile de tournesol et l'huile de soja <sup>[47,53]</sup>

Les huiles extraites d'hibiscus présentent toutes un indice de saponification et un indice d'iode importants. La différence entre les trois hibiscus provenant de trois pays différents n'est pas significative. Les indices de ces huiles sont comparables à ceux d'huiles conventionnelles comme le soja et tournesol <sup>[45,46]</sup>. La valeur du taux de saponification indique le poids moléculaire moyen, tandis que la teneur en iode exprime le degré d'insaturation. La faible valeur de l'indice d'acide caractérise la pureté et la stabilité des huiles. L'indice d'acidité pour les trois variétés est faible ce qui pourrait permettre une utilisation alimentaire.

### **IIC2. 1.2 Composition en acide gras**

Les acides gras sont dérivés en esters méthyliques pour être analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire. Des mélanges d'esters méthyliques d'acides gras (FAME) <sup>[54-55]</sup> de référence sont identifiés par des échantillons analysés par comparaison des temps de rétention des mélange d'esters méthyliques d'acides gras (FAME). Les acides gras sont identifiés en fonction de leurs temps de rétention. Leur taux est déterminé par le rapport entre l'aire des pics correspondants et la somme des aires des pics de tous les acides gras.

## Chapitre IIC2. Résultats et discussion sur les huiles des graines de *l'hibiscus*

Les résultats des analyses d'acides gras des graines de l'hibiscus (tableau 21) montrent la présence de 12 acides gras. L'acide palmitique (20,2 à 20,4 %), l'acide stéarique (4,3 à 5,3 %), l'acide oléique (29,9 à 37,2 %) l'acide linoléique (35,3 à 41,4 %) sont des acides gras majoritaires dans toutes les variétés de l'hibiscus. Ces 4 acides gras représentent en moyenne 97 % des acides gras totaux. La variation du taux des acides gras est notable en fonction de la provenance géographique. Les acides gras saturés (C16:0, C18:0) avec les acides gras insaturés (C18:1, C18:2) représentant environ 95 % des acides gras totaux. La teneur en acide gras de l'huile d'hibiscus est comparable à celle de l'huile de coton et de soja <sup>[46]</sup>.

Acides gras <sup>a</sup>	Espèces	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.			Littérature	
		Vietnam	Mexique	Senegal	Coton <sup>[46]</sup>	
<u>Soja<sup>[46,55]</sup></u>						
Myristique C14:0		0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,29 ± 0,04	0,5-1,3	< 0,2
Palmitique C16:0		20,43 ± 0,2	20,19 ± 0,03	20,28 ± 0,33	17-31	8-13
Palmitoléique C16:1		0,31 ± 0,03	0,37 ± 0,01	0,42 ± 0,07	< 1	< 0,2
Stéarique C18:0		4,28 ± 0,4	5,30 ± 0,02	4,39 ± 0,1	-	2-5
Elaidique C18:1n9		0,58 ± 0,03	0,35 ± 0,01	0,57 ± 0,01	-	-
Oléique C18:1		37,20 ± 0,1	29,96 ± 0,10	31,51 ± 1,5	13-21	17-26
Linoléique C18:2		35,29 ± 2,3	41,43 ± 0,33	40,59 ± 1,4	34-36	50-62
Linoléique C18:3		0,21 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,24 ± 0,04	< 1	4-10
Eicosanoïque C20:0		0,64 ± 0,04	0,9 ± 0,01	0,70 ± 0,12	0,31	< 1,2
Eicosenoïque C20:1		0,27 ± 0,06	0,42 ± 0,1	0,5 ± 0,03	0,41	< 0,4
Béhénique C22:0		0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,1	0,30 ± 0,05	< 0,2	< 0,5
Lignocerique C24:0		0,31 ± 0,03	0,43 ± 0,1	0,37 ± 0,01	-	-

<sup>a</sup> moyenne de 3 essais

Tableau 21: Teneur en acides gras des huiles de graines d'*Hibiscus sabdariffa* L (g/100 g)

En effet dans les pays en développement, les carences en micronutriments, en particulier en fer, les vitamines liposolubles représentent un problème de santé publique aux conséquences physiologiques et économiques non négligeables<sup>[57,58]</sup>. L'huile d'hibiscus est riche en acides gras mono et poly-insaturés, de type oméga ( $\omega$ -3,  $\omega$ -6 et  $\omega$ -9). Cette composition correspond parfaitement aux recommandations nutritionnelles actuelles <sup>[59]</sup>. Par ailleurs, l'acide stéarique présent dans l'huile d'hibiscus est le meilleur acides gras saturé

## Chapitre IIC2. Résultats et discussion sur les huiles des graines de *l'hibiscus*

pour la santé car il n'augmente pas la concentration en cholestérol et est facilement transformé en acide oléique par le foie<sup>[60]</sup>.

Le tableau 22 permet de comparer les résultats de nos recherches sur l'hibiscus du Vietnam et les résultats trouvés dans la littérature à propos des huiles des graines d'hibiscus d'autres origines. Ces huiles sont des sources d'acides gras essentiels : acide oléique (C18:1) et linoléique (C18:2). L'huile d'*hibiscus sabdariffa* d'Egypte fournit en plus l'acide linoléique ( $\omega$ -3) à 5 % et l'acide arachidonique ( $\omega$ -6) à 3 %. Ces acides gras sont essentiels pour le cerveau durant la mutation infantile<sup>[61]</sup>.

Acide gras	<i>Hibiscus Vietnam</i> <i>Nos résultats</i>	<i>Hibiscus</i> <sup>[50]</sup> <i>sabdariffa</i> <i>Egypte</i>	<i>Hibiscus</i> <sup>[51]</sup> <i>sabdariffa</i> <i>Inde</i>	<i>Hibiscus</i> <sup>[50]</sup> <i>sabdariffa</i> <i>Soudan</i>	<i>Hibiscus</i> <sup>[51]</sup> <i>cannabinus</i>	<i>Hibiscus</i> <sup>[68]</sup> <i>esculentus</i>
Myristique	0,2	0,3	traces	0,3	traces	0,2
Palmitique	20	15	20	20	19	30
Stéarique	4	-	2	4	-	3
Oleique	37	39	25	38	29	19
Linoléique	35	22	47	36	46	41
Linoléique	0,2	5	1	-	traces	-
Arachidonique	0,6	3	-	-	-	0,3
Béhénique	0,3	0,2	-	-	-	-

Tableau 22: Composition comparée en acide gras en (%) entre l'huile d'*hibiscus sabdariffa* du Vietnam et celle d'autres hibiscus.

La composition et la nature en acides gras des huiles végétales sont non seulement des éléments déterminants pour leur intérêt sur le plan alimentaire, diététique et pharmacologique, mais également pour leurs débouchés non alimentaires<sup>[63]</sup>. Les acides gras provenant de l'hydrolyse chimique ou enzymatique des huiles sont souvent utilisés par les industriels de la lipochimie en tant qu'intermédiaires suite à leurs modifications par synthèses chimiques. Ils trouvent alors des applications dans des domaines tels que les émulsifiants, lubrifiants synthétiques et fluides, ainsi que dans les industries du textile, du papier, pharmaceutique, cosmétique et des matières plastique<sup>[63,64]</sup>.

L'huile de *Hibiscus sabdariffa* du Vietnam (tableau 22) renferme davantage d'acides gras saturés que les espèces d'*Hibiscus cannabinus* et l'*Hibiscus sabdariffa* d'Egypte, mais moins que l'*Hibiscus esculantus*. Cette caractéristique confère à l'huile d'Hibiscus du Vietnam des applications dans le domaine des biolubrifiants et des biotensioactifs, dans la

composition de détergents (lessives, adoucissants, liquides vaisselle, produits d'entretien et agents de surface), et des produits cosmétiques et pharmaceutiques<sup>[65-67]</sup>.

### IIC2.1.3 Composition en Stérol

Pour la détermination de la composition stérolique des graines de l'hibiscus provenant de trois pays, nous avons appliqué deux méthodes d'extraction. L'extraction par soxhlet (à chaud) et l'extraction à froid par centrifugation en utilisant le cyclohexane comme solvant. L'analyse des insaponifiables obtenus a été réalisée par chromatographie (CPG/FID).

Stérols <sup>a</sup>	Espèces <i>Hibiscus sabdariffa L</i>			Littérature	
	Vietnam	Mexique	Sénégal	Coton <sup>[46]</sup>	arachide <sup>[46]</sup>
<b>Extraction à chaud par cyclohexane</b>					
Cholestérol	1,67 ± 0,22	1,87 ± 0,30	1,80 ± 0,51	-	< 0,4
Campestérol	12,92 ± 1,1	15,82 ± 1,3	15,81 ± 1,3	4-8	16-19
Stigmastérol	3,60 ± 0,91	4,68 ± 1,8	4,74 ± 1,2	< 1	6-9
$\beta$ -Sitostérol	80,16 ± 1,2	74,88 ± 2,5	74,93 ± 1,1	86,93	61-67
d5-Avenastérol	1,93 ± 1,3	2,75 ± 1,1	2,72 ± 0,2	2-3	7-9
<b>Extraction à froid par cyclohexane</b>					
Cholestérol	1,25 ± 0,06	1,82 ± 0,74	2,06 ± 0,88	-	-
Campestérol	13,31 ± 1,1	15,24 ± 1,3	15,41 ± 1,1	-	-
Stigmastérol	3,75 ± 1,3	5,15 ± 2,5	5,08 ± 2,1	-	-
$\beta$ -Sitostérol	79,55 ± 1,5	74,16 ± 1,2	73,96 ± 2,2	-	-
d5-Avenastérol	2,14 ± 1,0	3,63 ± 2,3	3,49 ± 1,3	-	-

<sup>a</sup> moyenne de 3 essais

Tableau 23: Teneur en stérols de l'huile des graines d'Hibiscus provenant de différentes origines et extraite selon 2 procédés.

Il n'existe pas de différence entre les 2 types d'extraction sur la composition en stérols. Selon les 2 procédés, les 5 stérols majoritaires et présents dans toutes les huiles étudiées (tableau 23) : le cholestérol, le campestérol, le stigmastérol, le  $\beta$ -sitostérol et le d5-avénastérol. Dans toutes les espèces d'huile, le  $\beta$ -sitostérol est prédominant, (80,16 %) pour l'hibiscus du Vietnam, (74,93%) pour celui du Sénégal et (74,88 %) pour celui du Mexique. Le  $\beta$ -sitostérol entraîne la régression de tumeurs bénignes de la prostate et réduit la formation

plaquettaire chez le rat<sup>[68]</sup>. L'Hibiscus du Vietnam possède la plus forte teneur en  $\beta$ -Sitostérol. Le campestérol est présent en grande proportion (12-16 %), le stigmastérol à 3,60-4,74 %, le d5-avenastérol à 2,14- 3,49. Le cholestérol (1,67-2,06 %) est un stérol majoritairement présent pour l'ensemble des espèces étudiées (exemples : le coton et l'arachide tableau 23). Grâce à leur structure et leur fonctionnalité, et à partir des résultats obtenus, plusieurs voies de valorisation sont possibles. Les stérols végétaux ou phytostérols sont des corps gras organiques naturels qui font l'objet de nouveaux développements et de nouvelles applications. Du point de vue alimentaire : une supplémentation en phytostérols aurait un effet hypocholestérolémiant et limiterait ainsi le risque de maladies cardiovasculaires<sup>[68-70]</sup>.

### **IIC2.1.4 Détermination des teneurs en Tocophérols**

Pour la détermination des teneurs en tocophérols des graines de l'hibiscus provenant de trois pays. L'analyse est réalisée directement sur l'insaponifiable des huiles de l'hibiscus extrait à froide par le cyclohexane. Parmi les différentes méthodes d'analyse des tocophérols, la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) sur phase normale a été retenue.

<b>Tocophérols</b>	<b>Espèces <i>Hibiscus sabdariffa L</i></b>			<b>Littérature</b>	
	<b>Vietnam</b>	<b>Mexique</b>	<b>Sénégal</b>	<b>Maïs<sup>[46]</sup></b>	<b>Colza<sup>[46]</sup></b>
$\alpha^*$	18,4 ± 0,5	10,2 ± 0,2	8,3 ± 0,1	8-22	15-20
$\beta^*$	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,1	< 3	0,5
$\gamma^*$	80,6 ± 0,6	86,1 ± 0,3	87,5 ± 0,4	68-89	62-80
$\delta^*$	0,9 ± 0,1	2,7 ± 0,4	2,6 ± 0,5	2-7	1-3

<sup>a</sup> moyenne de 3 essais

Tableau 24: Teneurs en tocophérols de l'Hibiscus provenant d'origine défférente.

Les résultats des analyses des tocophérols des huiles d'hibiscus (tableau 24) montrent la présence d'alpha, bêta, gamma, et delta tocophérols. La teneur en tocophérol pour les trois espèces du Vietnam, du Mexique et du Sénégal sont respectivement de 18,4 % 10, 2 %, 8,3 % pour le alpha, 0,6 %, 0,8 %, 1,5% pour le bêta, 80,6 % 86,1 %, 87,5% pour le gamma et 0,9 %, 2,7 %, 2,6 %)pour le delta tocophérols. Le  $\gamma$ -tocophérol est majoritaire et présent dans les trois variétés d'hibiscus. La teneur en  $\alpha$ -tocophérol pour l'huile vietnamienne (18 %) est légèrement meilleures que pour les autres variétés, Mexique (10 %) et Sénégal (8 %).

L'huile végétale constitue la meilleure source de tocophérols. Les formes de vitamine E les plus fréquemment rencontrées à ce niveau sont l' $\alpha$ -tocophérol et le  $\gamma$ -tocophérols. L'huile de palme est la seule à contenir l' $\alpha$ -, le  $\gamma$ - et le  $\delta$ -tocotriénols, mais en moindre quantité. L'huile de tournesol ne renferme que de l' $\alpha$ -tocophérol, qui est aussi la forme prédominante dans l'huile d'olive. Le  $\gamma$ -tocophérols est le représentant majeur dans l'huile de noix et l'huile de maïs. L'huile de soja, quant à elle, contient surtout du  $\gamma$ -tocophérols et du  $\delta$ -tocophérol<sup>[71]</sup>. La teneur en acide gras de l'huile d'hibiscus est comparable à celle de l'huile de coton et de soja. La richesse en composés mineurs apporte à l'huile de table un intérêt nutritionnel supplémentaire. L' $\alpha$ -tocophérol, présent en quantité importante dans l'huile d'hibiscus, possède une activité vitaminique E qui lui confère des propriétés anti-oxydantes bénéfiques pour la santé. Ces molécules jouent un rôle dans la prévention contre les maladies cardiovasculaires, et particulièrement l'athérosclérose<sup>[72]</sup>. L'effet des tocophérols sur d'autres maladies, telles que certains cancers (prostate, poumons, pancréas) et des maladies neurodégénératives (Alzheimer), sont actuellement à l'étude et laisse présager de nombreuses autres vertus de ces molécules<sup>[72]</sup>.

### IIC.2.5 Conclusion

Ces résultats confirment l'importance de l'étude de la composition des variétés d'*hibiscus* provenant de 3 continents, en stérols, tocophérols, acides gras et par rapport à leurs caractéristiques physico-chimiques. On a observé des différences significatives liées à la variété et à l'origine géographique et culturelle (effet des sols, du climat, etc). Les propriétés physico-chimiques des huiles étudiées présentent une grande similarité avec celles relevées pour l'huile de soja ou de tournesol. Les indices d'acide, assez bas, témoignent de la parfaite stabilité des huiles extraites. Les graines d'*Hibiscus sabdariffa*, qui fournissent 20 % d'huile pour 100 g de tourteau (obtenu après l'extraction des graines), pourraient être bon sujet d'étude dans les domaines alimentaires à la fois pour les huiles et le tourteau riche en éléments essentiels (huiles et acides aminés) dans les pays à risques alimentaires. A l'instar des protéines du soja, les protéines d'*Hibiscus sabdariffa* trouvent des débouchés dans le secteur alimentaire, principalement pour l'alimentation animale (bétail et animaux domestiques).



## Chapitre IIC2. Résultats et discussion sur les huiles des graines de *l'hibiscus*

La forte teneur en phytostérols des graines de *l'hibiscus*, notamment en  $\beta$ -Sitostérol, (80 %), présente un intérêt particulier dans l'alimentaire grâce aux propriétés de la réduction du taux de cholestérol sanguin des phytosterol <sup>[72]</sup>. Par ailleurs, la richesse en stérols des graines d'*Hibiscus* permet également d'envisager des applications non alimentaires. Le domaine des cosmétiques, pharmaceutiques, s'ouvrent également aux phytostérols doués de propriétés multifonctionnelles.

En effet, les stérols confèrent souvent aux corps gras certaines propriétés pharmacologiques et cosmétologiques spécifiques et rentrent dans la composition de laits démaquillants, de soins restructurants et de crèmes nutritives contre le vieillissement. Certains produits incorporent des insaponifiables totaux en cosmétologie. Ces composés insaponifiables sont aussi bien recommandés dans l'alimentation qu'en médecine, pour leurs activités anti-cancéreuses et ou anti-inflammatoires.

## Références bibliographique

- [1]. CLYDESDALE, F.M., FRANCIS, F.J., MAIN, J.H., 1979. Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). Anthocyanins colorants for beverages and gelatin desert. J. food protection., (42) 3, 204-207.
- [2]. ESSELEN, W. B., SAMMY, G.M., 1973. Roselle a natural red food colorant. food prod. Dev, (7) 1, 80-86.
- [3]. McCALEB, R., 1996. Roselle production manual (*Hibiscus sabdariffa*). Herb Research foundation, USA.
- [4]. BRIDLE, P., TIMBERLAKE, C.F., 1997. Anthocyanins as natural food colorant selected aspects. Food chem., (58) 1-2, 103-109.
- [5]. TSAI, P.J., MCNTOSH, J., PEARCE, P., CAMDEN, B., JORDAN, B.R., 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. Food Res. Inter. 35, 351-356.
- [6]. POUGET, M.P, VENNAT, B., et al. 1990. Identification of Anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. Lebensmittel Wissenschaft and Techn. 23 (2), 101-102.
- [7]. POUGET, M.P., LE JEUNE, B., et al. 1990. Extraction analysis and study of the stability of *Hibiscus Anthocyanins*. Lebensmittel Wissenschaft and Techn. (23) 2, 103-105.
- [8]. SATO, K., GODA, Y., YOSHIIHIRA, K., NOGOUCHII, H., 1991. Structure and contents of main coloring constituents in the calyces of *Hibiscus sabdariffa* and commercial Roselle color. J. food hyg. Soc. Japan, (32) 4, 301-307
- [9]. AHMED, AW. K., HUDSON, .B.J.F., 1982. The fatty acid composition of *Hibiscus sabdariffa* seed oil. J. Sci. Food Agr. 33, 1305-1309.
- [10]. ÇALIÇIR, S., ÖZCAN, M., HACISEFEROĞULLARI, H., UĞUR YILDIZ M., 2005. Study on some physico-chemical properties of Turkey okra (*Hibiscus esculenta* L.) seeds. J. Food Eng. 68, 73-78.
- [11]. SENA, L.P., VANDERJAGT, D.J., RIVERA, C., TSIN, A.T.C., MUHAMADOU, O., MILLSON, M., 1998. Analysis of nutritional components of eight famine foods of the Republic of Niger. Plant Foods Hum. Nut. 52, 17-30.
- [12]. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985. WHO/FAO Report: Energy and protein requirement.
- [13]. REO, P.U., 1996. Nutrient composition and biological evaluation of mesta (*Hibiscus sabdariffa*) seeds : Plant foods Hum. Nut.,1, 27-34.
- [14]. SMITH, G.C., GRIVETTI L, E., 1994. Cultural use of edible wild plants in Burkina Faso, West Africa. FASEB J., 8, A183.

- [15]. MORTON, J. F., 1987. Roselle, Pp. 281-286. In: C.F Dowing (ed). Fruits of warm climates, Media, Inc., Greensboro, NC, USA.
- [16]. ASSAF, M.H., 1998. Phytochemical study for the contents of *Hibiscus sabdariffa* L. seeds cultivated in Egypt. Bull. Pharm. Scie. (21) 1, 75-80.
- [17]. SMITH, G. C., CLEGG, M. S., KEEN, C. L., GRIVETTI L, E., 1996. Mineral values of selected plant foods common to southern Burkina Faso and to Niamey, Niger, West Africa. J. Food Sci. Nutr. 47, 41-53.
- [18]. MAHMOUD, B.M., ALI, H.M., HOMEDIA, M.M, BENNET, J.L., 1994. Significant reduction in chloroquine bioavailability following coadministration with the Sudanese beverages Aradaib, Karkade (*hibiscus sabdariffa* L.) and Lemon. J. Antimicrob Chemo., 5, 1005-1009.
- [19]. FARJI, H M, TARKHANI, H.A, 1999. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension : J. Ethnopharm., 65, 231-236.
- [20]. KIRDPON, S., NAKORN, S.N., KIRDPON, W., 1994. Change in urinary chemical composition in healthy volunteers after consuming Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L) juice. J. Med. Ass. Rhai. 6, 314-42.
- [21]. CHEN, CH.C., CHOU, F.P., HO, Y.C., LIN, W.L., et al. 2005. Inhibitory effects of *Hibiscus sabdariffa* L. extract on low density lipoprotein oxidation and anti-hyperlipidemia in fructose-fed and cholesterol-fed-rats. J. Sci. Food. Agri. (84) 15, 1989-1996.
- [22]. TSENG, T.H., KAO, E.S., CHU, C.Y., CHOU, F.P., WU, L., et WANG, C.J., 1997. Protective effects of dried flowers extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hypertension. Food chem. Toxic., 35, 1159-1164.
- [23]. OBIEFUNA, P.C., Owolabi, et al., 1994. The petal of *Hibiscus sabdariffa* produces relaxation of isolated rat aorta. Inter. J. Pharmacogn. (32) 1, 69-74.
- [24]. CHOHUAN, U.K., Shukla, R.N., 1984. Sterols of some Malvaceae with particular emphasis on cholesterol occurrence. J. Sci. Res. India. (6) 1, 49-50.
- [25]. AL, M.B., 1991. Investigation of the antispasmodic potential of *Hibiscus sabdariffa* calyces. J. Ethnopharm., 31, 249-257.
- [26]. FINTRAC INC., 1999. Etude de Marché sur l'*Hibiscus sabdariffa* L. 1746 Washington, DC.
- [27]. AFNOR, 1993. Corps gras, graines Oléagineuses, produits dérivés. Recueil des Normes Françaises. 5 ème Edition.
- [28]. KIRAN, B., SINGH, G., 2002. Essential oil composition of damask rose distilled under different pressures and temperature. Flav. Frag. J., 17, 136-140.

- [29]. KOEDAM, A., 1982. The influence of some distillation conditions on essential oil composition in aromatics plants: Basic and applied aspects. Martinus Nijhoff Publishers Netherlands. 229-236.
- [30]. CAI, J., LIU, B., QINGDE, SU., 2001. Comparision of simultaneous distillation extraction and solid-phase microextraction for the determination of volatile flavor components. J. Chrom. 930, 1-7.
- [31]. CHAINTREAU, A., 2001. Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity-review. Flav. Frag. J. 16, 136-148.
- [32]. MÜLLER, P.M., LAMPARSKY, D., 1991. Perfumes art, science and technology., Ed. Elsevier Applied Science Zürich, Switzerland.
- [33]. DIONEX, Manuel du système d'extraction rapide ASE 2000. 88 p.
- [34]. CAMEL, V., 2000. Approche comparative de trois techniques récentes d'extraction : SFE, ASE et MAE, Spectre Anal.. 216, 21-24.
- [35]. ZULOAGA,, O., ETXEBARRIA, N., FERNANDEZ, L., MADARIAGA, J., 1998. Comparison of accelerted solvent extraction with microwave-assisted extraction and soxhlet for extarction of chlorinated biphenyls in soils samples. Trends. Anal. Chem. (17) 10, 642-647.
- [36] WILLEM, J.P., 2002. Les huiles essentielles : médecine d'avenir. Editions du Dauphin, Paris.
- [37]. KÖNIG, A.W., RIECK, A., HARDT, I., GEHRCKE, et al., 1994. Enantiomeric composition of the chiral constituents in essential oils, Part 2: Sesquiterpenes Hydrocarbons., J. High Res. Chrom., 315-320.
- [38] VERES, K., VARGA, A., DOBOS, Z., MATHE, H.I., 2003. Investigation of the composition and stability of the essential oils of *Origanum vulgare ssp, vulgare L.* and *O. Vulgare ssp.* Chromatographia. (57) 12, 95-98.
- [39]. MELECCHI, M.I., MARTINEZ, M.M., ABAD, F.C., ZINI, P.P., 2002. Chemical composition of *Hibiscus tiliaceus L.* flowers : A study of extraction methods. J. Sep. Sci. 25, 86-90.
- [40]. CHEN, S.H, HUANG, T.C., HO, C.T., et TSAI, P.J., 1998. Extraction analysis and study on the volatils in Roselle tea . J. Agr. food chem. (46) 3, 1101- 1105.
- [41]. LAWRENCE., B.M., 1984. The botanical and chemical aspets of oregano. Perfum. Flav. (9) 5, 41-51.
- [42]. ASSOCIATION FRANCAISE DE NORMALISATION., 1998. Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés, Recueil de normes Françaises., AFNOR NORMES, 5<sup>ème</sup> Edition.
- [43]. JULIANO, B. O., PEREZ, C. M., ARD, M. K., 1990. Grain quality characteristics of export rice in selected markets. Cereal Chem.. 192-197.
- [44]. ATTI, M. B., 2003. Some characteristics of nigalla (*Nigella sativa L.*) seed cultivated in Egypt and its profile. Food Chem., 83, 63-68.
- [45]. KARLESKIND, A., 1992. Manuel des corps gras. Ed Tec. & Doc. Lavoisier, Paris., Vol.1-2.
- [46]. CAMPBELL, E.J., 1983. Sunflower oil, J.Am. Oil Chem., 60, 387-392.

- [47]. SINGH, N., SINGH, R., KAUR, K., Singh, H., 1999. Studies of the physico-chemical properties and polyphenoloxidase activity in seeds from hybrid sunflower (*Helianthus annuus*) varieties grown in India. Food Chem. 241-247.
- [48]. BESBES, S., BLECKER, C., DEROANNE, C., DRIRA, N. E., ATTIA, H., 2004. Date seeds: chemical composition and characteristic profiles of the lipid fraction. Food Chem. 84, 577-584.
- [49]. ENNOURI, M., EVELYNE, B., LAURENCE, M., HAMADI, A., 2005. Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils., Food Chem. 93, 431- 437.
- [50] ABU-TARBOUSH, H.M., AHMED, S.B., AL-KAHTANI, H.A., 1997. Some nutritional and functional properties of Karkade (*Hibiscus sabdariffa*) seed products. Amer. Assoc. Cereal. Chem. 74 (3), 352-355.
- [51]. SAROJINIE, G. RAO, C., LASKSHIMINARAYAN, G., 1984. Physico-chemical characteristic and fatty acid composition of *Hibiscus sabdariffa* and *Hibiscus cannabinus*. Indian J. Oil. Tech. Asso. (2) 15, 65-67.
- [52]. EL, A.T., Khalil, A.H., 1994. Characteristics of roselle seeds as a new source of protein and lipid. J. Agr. Food Chem., (42) 9, 1996-1900.
- [53]. JACOTOT, B., 1997. Intérêt nutritionnel de la consommation de l'huile d'olive. OCL, (4) 5, 373-374.
- [54] INDARTI, E., MAJID, M.I.A., HASHIM, R., CHONG, A., 2005. Direct FAME synthesis for rapid total lipid analysis from fish oil and cod liver oil. J. Food. Comp. Anal. 18, 161-170.
- [55]. EDER, K., 1995. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. J. chrom., B., 671, 113-131.
- [56]. JANSSEN, H.G., BOERS, W., STEENBERGEN, H., HORSTEN, R., FLOTTER, E., 2003. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography, gas chromatography: evaluation of the applicability for the analysis of edible oils and fats. J. Chrom. 1000, 385-400.
- [57]. CIN, Conférence Internationale sur Nutrition, 1992. Les grands enjeux des stratégies nutritionnelles. Rome: FAO/OMS.
- [58]. LATHAM, M., 1997. Human nutrition in the developing world, FAO, Rome (Italy). Food and Nutrition Div., JobNum: W0073E.
- [59]. DURAND, G., GUESNET Ph, CHALON, S, ALESSANDRI, JM, LEBRANCHU, Y., 2002. Importance nutritionnelle des acides gras poly-insaturés. In " Aliments fonctionnels ", Coord. M. Roberfroid, Ed. TEC & Doc-Lavoisier, 175-212, Paris.
- [60] JACOTOT, B., 1994. Acides gras mono-insaturés alimentaires et protéines; intérêt du régime méditerranéen. OCL., 6 (1), 86-93.

- [61]. TSANG, R.C., LUCAS, A., NANY, R., ZLOTKIN, S., 1993. Nutritional needs of the practical infant science basis and practical guidelines, SM Innis: Fat., Publish: Williams and Wilkins. Baltimore, USA., pp 65-86.
- [62]. CAMCIUC, M., DEPLAGNE, M., VILAREM, G., GASEZT, A., 1998. Okra *Abelmoschus esculentus* L. (Moench) a crop with economic potential for set asude acreag France. Ind. Crops. Prod. 7, 257-264.
- [63]. MORIN, L., DRONNE, Y., REQUILLART., 1994. La demande non-alimentaire des huiles et des graisses. OCL, 1(3), 188-191
- [64]. STEVENS, C.V., VERHÉ, R.G., 2004. Renewable bioresources scope and modiifcation for non-food applications. Ed. John Wiley & Sons, ltd, West Sussex, England.
- [65]. LATON, J.F., 1997. Les lipides en cosmétologie. 1997. OCL, 4 (4): 275-281.
- [66]. WACHTER, R., SALKA, B., MAGNET, A., 1995. Phytosterols-actives substances of vegetable origin in cosmetics. Cosmetics and toiletries magazine., 110, 72-82.
- [67]. PARANT, B., 1999. Utilisation des oléagineux de nature oléique-colza , tournesol-dans l'industrie des tensiactifs. OCL. 6,393-395.
- [68]. WORLD HEALTH ORGANISATION 1998. Obsity: preventing and managing the global epidemic. Technical report series, No. 894. Geneva: WHO, p 276.
- [69]. FARQUHAR, R.W., 1996. Plant sterols : their biological effects in humans. Handbook of lipids in human nutrition, CRC Prss Inc., USA., 11-105.
- [70]. PIAT, J. KERCHOFFS, A.J.M., & MENSINK, R., 2000. Therapeutice potential of plant sterols and stanols. Curre. Opin. Lipido. 11, 571-576.
- [71]. PIIRONEN, V., LINDSAY, D.G., MIETTINEN, T.A., TOIVO, J., et LAMPI, A.M., 2000. Review. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. J. Sci. Food Agri., 80, 939-966.
- [72]. LEGER, C.L., 2000. La vitamine E: état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardiovascular, biodisponibilité. OCL., 7 (3), 258-265.

## **CHAPITRE III *Artemisia annua***

**Etude agronomique et phytochimique pour le développement  
d'un traitement viable, accessible et efficace du paludisme  
au Cambodge et au Sénégal.**

### **IIIA.1 Rappel bibliographique-Artémisia annua**

#### **IIIA. 1.1 Le Paludisme**

Le paludisme est une infection due au parasitisme des globules rouge par un protozoire du genre Plasmodium. Quatre espèces spécifiques de plasmodies parasitent l'homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*. Ils se distinguent par leur morphologie, leur prévalence, morbidité, leur aire de répartition et des particularités de leur cycle<sup>[3]</sup>. *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus fréquente et responsable d'accès fébriles simples susceptible de se transformer en accès grave dits pernicioeux, mortels en l'absence de traitement. *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* sont responsables uniquement d'accès simples<sup>[4,5]</sup>.

*Plasmodium falciparum*, le plus intensément implanté et le plus redoutable, est le seul donnant la mort. Son incubation est de sept à douze jours. Il est responsable de la fièvre tierce maligne, de l'accès pernicioeux et, indirectement, de la fièvre bilieuse hémoglobinurique. Il évolue sans rechute, avec simplement des reprises, ou recrudescences, sa longévité est inférieure à un an mais on n'observe pas d'accès dû à *Plasmodium falciparum* plus de deux mois après le départ d'une zone d'endémie.

*Plasmodium vivax*, très répandu, mais moins que *Plasmodium falciparum*, a une incubation d'environ quinze jours, pouvant s'étendre jusqu'à neuf mois ou plus. Il est responsable de la fièvre tierce bénigne, et peut donner des rechutes à brève ou longue échéance selon les souches.

*Plasmodium ovale*, sévit en Afrique inter-tropicale. Son incubation peut être longue, de quinze jours à quatre ans. Il donne également une fièvre tierce bénigne, mais avec des rechutes tardives, jusqu'à cinq ans.

*Plasmodium malariae*, est de distribution géographique clairsemée. Après trois semaines d'incubation, il donne une fièvre quarte, et parfois des complications rénales. Sa longévité peut aller jusqu'à vingt ans.



### IIIA. 1.2 Le Cycle parasitaire

Le paludisme est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique femelle, du genre *Anophèles* (figure 29), elle-même infectée après avoir piqué un homme impaludé : la femelle, en prenant le repas de sang nécessaire à sa ponte, injecte le parasite à son hôte. Les mâles ne piquent pas. La transmission de *Plasmodium* d'un homme à un autre se fait donc par l'intermédiaire du moustique. Il existe un seul cas de contamination inter-humaine directe, lorsqu'une femme enceinte infectée contamine son enfant par voie transplacentaire.<sup>[6]</sup>

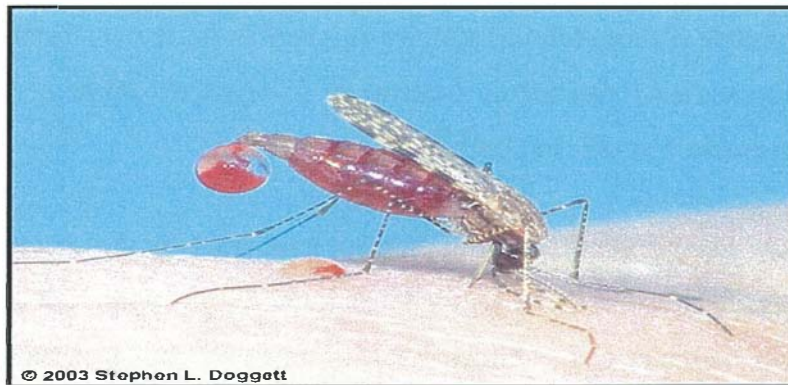


Figure 29: Moustique du genre anophèles

Le cycle de *Plasmodium* est complexe et comporte deux étapes essentielles : un cycle asexué chez l'homme, et un cycle sexué chez le moustique. L'anophèle femelle injecte à l'homme le parasite sous forme de "sporozoïte". Celui-ci migre rapidement, *via* la circulation sanguine, vers le foie. Il pénètre dans la cellule hépatique, où il se divise très activement pour donner naissance, en quelques jours, à des dizaines de milliers de nouveaux parasites : les "mérozoïtes". La cellule du foie éclate en libérant ces parasites dans le sang: là, ils pénètrent à l'intérieur des globules rouges et se multiplient<sup>[6]</sup>. Lorsque ces derniers éclatent à leur tour, les mérozoïtes libérés dans la circulation sanguine infectent de nouveaux globules rouges. A chaque cycle de réplication des mérozoïtes, des parasites sexués mâles et femelles (gamétocytes) sont formés à l'intérieur des globules rouges.

### IIIA.1.3 Morbidité et mortalité

Le paludisme est la maladie tropicale la plus répandue dans le monde. Elle sévit dans des zones habitées par 40 % de la population mondiale, soit 2,3 milliards de personnes exposées. L'incidence annuelle est estimée de 300 à 500 millions de cas chaque année. 90 % des cas de paludisme concernent l'Afrique sub-saharienne<sup>[6]</sup>. Après l'échec du plan mondial d'éradication des années 1950, le paludisme demeure donc un problème majeur de santé publique. Depuis 1980, de nouveaux programmes nationaux de lutte sont mis progressivement en place, mais ils ne parviennent pas encore à le maîtriser. En dehors de l'Afrique, 70 % des cas mondiaux de paludisme sont observés dans six pays : l'Inde, le Brésil, l'Afghanistan, le Vietnam, la Colombie, les Iles Salomon<sup>[7]</sup>. La mortalité qui est pratiquement toujours due à *Plasmodium falciparum* est estimée entre 1,5 et 2,7 millions de sujets chaque année, dont environ 1 million d'enfants de moins de cinq ans<sup>[6]</sup>.

En Chine, vers le milieu des années 1970, le lancement d'une campagne décisive de lutte antipaludique associe la lutte antivectorielle à des actions rigoureuses de dépistage et de traitement du paludisme. Un résultat important de la campagne menée contre le paludisme en Chine est la mise au point de dérivées de l'artémisinine pour lutter contre les cas de *P. falciparum* résistants à la chloroquine<sup>[6]</sup>. Par contraste, les moyens déployés pour essayer d'améliorer la situation du paludisme en Afrique subsaharienne sont relativement limités. La lente amélioration des conditions de vie et l'accès à un médicament bon marché et efficace, la chloroquine, ont contribué à une légère tendance à la baisse de la mortalité paludéenne en Afrique, entre les années 1950 et le début des années 1980. Mai aujourd'hui, la situation est alarmante face à la propagation de souches *P. falciparum* chloroquino-résistantes<sup>[8]</sup>.

### IIIA.1.4 Répartition géographique

Les exigences bioécologiques du cycle parasitaire expliquent en grande partie la répartition du paludisme dans le monde (figure 30). En zones tropicales et intertropicales chaudes et humides, le paludisme, principalement dû à *P. falciparum*, sévit sur le mode endémique stable, caractérisé par une transmission très intense<sup>[9]</sup>.

Des intensités de transmission modérée, avec des variations saisonnières très intenses et des fluctuations d'une année à l'autre, caractérisent une autre forme de paludisme que l'on désigne sous le nom de paludisme endémique instable et qui s'observe dans la plupart des autres régions impaludées, notamment en Asie, en Amérique centrale et en Amérique du Sud<sup>[6]</sup>. En zones subtropicales et tempérées chaudes, le paludisme, le plus souvent dû à *P. vivax*, est saisonnier<sup>[9]</sup>. Enfin des épidémies de paludisme peuvent aussi survenir dans de grandes parties de la péninsule indienne, au Sri Lanka, et dans certain pays d'Amérique du Sud<sup>[10]</sup>.

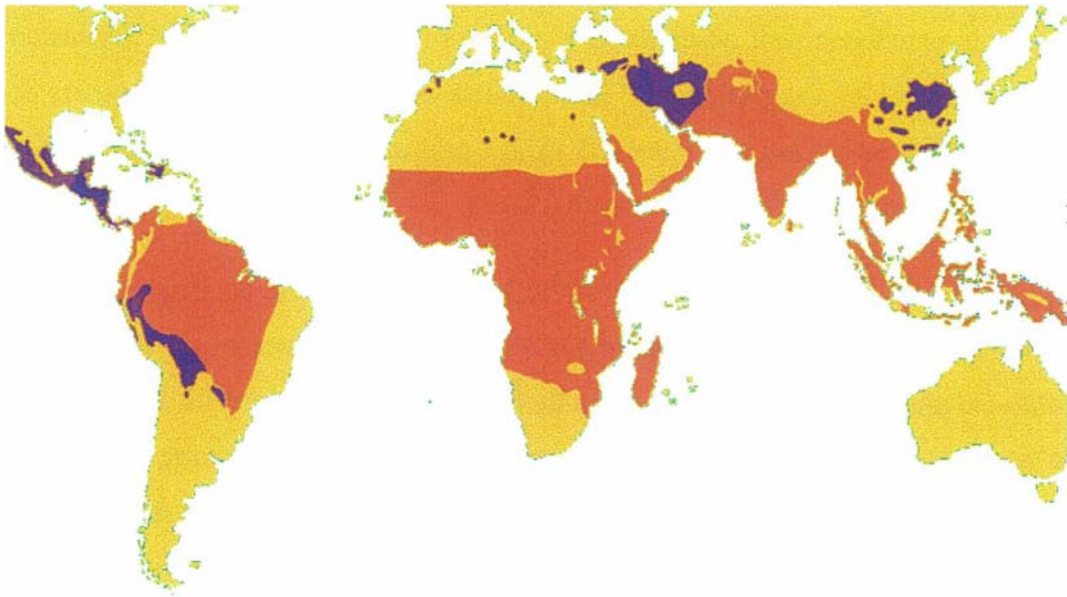


Figure 30: Evaluation épidémiologique de la situation du paludisme

- ▶ Les zones où il y a transmission du paludisme
- ▶ Zones à transmission limitée.
- ▶ sont figurées les zones dans lesquelles le paludisme a disparu, a été éradiqué ou n'a jamais sévi.

En Afrique, les taux de transmission, à l'intérieur d'un même pays, peuvent s'échelonner de situations instables épidémiques à une transmission saisonnière stable ou une transmission pérenne. De bons exemples de telles variations à l'intérieur d'un même pays sont fournis par le Soudan, le Kenya, l'Éthiopie ou le Nigéria.

En Asie, la répartition est très variable selon les pays. Au Vietnam, les zones les plus exposées au risque de transmission du paludisme sont situées d'une part au Nord (Lai Chau, Hoang Lien Son, et Ha Tuyen), à l'extrême Sud (Minh Hai) et au centre (Kontum, Darlak, Lam Dong et Song Be)<sup>[10]</sup>, de même, en Thaïlande le risque prédomine essentiellement aux zones de collines forestières du nord du pays. En Chine, *P. falciparum* est transmis dans les provinces de Hainan et de Yunan, le reste du pays est exposé essentiellement à *P. vivax*<sup>[11]</sup>..

## IIIA. 2 *Artemisia annua* plante anti-paludique

### IIIA.2.1 Historique

La mise en évidence scientifique de l'utilité d'*Artemisia annua* pour le traitement du paludisme a été réalisée en Chine dans les années 60. Durant cette période de guerre, les populations vietnamiennes et les troupes américaines subissaient de larges pertes liées au paludisme. Pour venir en aide à son voisin vietnamien, Mao Zedong lance alors un vaste programme de recherche dirigé par le professeur Tu You-you de l'Académie de médecine traditionnelle chinoise, qui vise à valider, à l'aide de techniques modernes, les vertus thérapeutiques attribuées aux plantes par la tradition. La médecine chinoise est une médecine ancestrale, et de nombreuses plantes médicinales sont recensées dans une pharmacopée qui date de plus de 2000 ans. Les chercheurs chinois ont alors recensé toutes les références de produits qui pouvaient être efficaces contre la fièvre<sup>[12, 13]</sup>.

La plante qui leur a semblé alors posséder le meilleur potentiel se nomme Qing Hao (l'herbe bleue) et il s'agit en fait de l'*Artemisia annua*<sup>[12]</sup>. La plus ancienne référence de son utilisation thérapeutique a été découverte dans une recette trouvée dans une tombe datant de 169 Av. JC., où elle était alors prescrite contre 52 sortes de maux dont notamment plusieurs fièvres et les hémorroïdes. En 1971, les premiers essais sont effectués chez une souris atteinte de la malaria et infestée par le parasite *Plasmodium berghei*. En quelques heures, toute trace du parasite avait disparu du sang de l'animal. Une année plus tard, la molécule responsable de cet effet est isolée et baptisée " qinghaosu " (extrait de l'herbe bleue). Des traitements à base de qinghaosu sont rapidement mis en place, et les patients atteints par la malaria guérissent.

La découverte de ce composé par la Chine permet peut-être d'expliquer la réticence et le temps qu'ont mis les organismes internationaux à valider ce nouveau traitement. Suite à des contre-expertises américaines, il faudra attendre l'article de Klayman<sup>[13]</sup> en 1985 pour que la communauté internationale reconnaisse enfin l'efficacité de l'artémisinine. Cependant, les essais cliniques scientifiques permettant le lancement d'un nouveau médicament ont demandé des années à se mettre en place, alors qu'en Chine et au Vietnam des millions de personnes étaient déjà soignées par l'artémisinine sous différentes formes.

### III.2.2 Description botanique

Le genre *Artemisia* L. appartient à la famille des Astéracées (Composées) et compte environ 400 espèces qui sont principalement réparties dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord. Ce genre est classé dans la sous famille des Asteroïdeae et la tribu des Anthemideae. A l'intérieur du genre, seules *A. annua* et *A. klotzchiana* présentent un cycle annuel<sup>[12]</sup>.

*Artemisia annua* L. (*A. annua*) est une herbacée annuelle originaire d'Asie (plus probablement de Chine). Il s'agit d'une plante très odorante. Elle dégage une odeur aromatique grâce à ses composés aromatiques concentrés dans la partie aérienne, et à la présence de canaux à huiles essentielles. La tige principale de la plante est généralement simple, sillonnée-striée de taille très variable selon son origine (de 20 cm à 2 m). Des rameaux alternés partent dès la base et possèdent des feuilles aromatiques bi-ou tripennatiséquées, à lobes dentés-pectinés (Figure 31).

Figure 31: Plant d'*A. annua*



Source: Savajo1 Nomad RSI 2004

Les inflorescences sont terminales et forment une panicule de capitules globuleux de couleur jaune pâle de 2-3 mm de diamètre. Ces capitules (fig. 32) contiennent des fleurs centrales hermaphrodites et des fleurs femelles périphériques. Les fleurs centrales possèdent une corolle tubulaire à 5 lobes, elles sont composées de 5 étamines aux anthères courtes. Les fleurs périphériques possèdent une corolle glanduleuse formée de 2 à 4 lobes.

Toutes les fleurs sont potentiellement fertiles, les ovaires sont inférieurs et uniloculaires et chacun génère un akène obovoïde de 1mm de hauteur, glabre et finement strié<sup>[12]</sup>. La plante est naturellement pollinisée par les insectes et le vent. *Artemisia annua* est une herbacée annuelle, il s'agit d'une plante de jour court, avec une photopériode critique de 13,5 heures<sup>[12]</sup>.



Figure 32: Capitule d'*Artemisia annua*. (Source A.Endrias 2005).

### IIIA.2.3 Noms Vernaculaires

Nom Scientifique :	<i>Artémisia annua</i> L.
Français :	Armoise.
Anglais:	Sweet Annie; Annual wormwood.
Chinois :	Qinghao

### IIIA.2.4 Origine phytogéographique

*Artemisia annua* est une plante d'origine asiatique. Elle a pour origine les régions tempérées de Chine (40°N). Elle est présente parmi la végétation naturelle des steppes, à une altitude de 1000-1500 mètres. Son aire de distribution naturelle semble cependant beaucoup plus large, s'étendant du sud de la Sibérie, au Vietnam et au nord de l'Inde<sup>[13,14]</sup>. *Artemisia annua* a depuis été introduite dans un très grand nombre de régions comprenant l'Europe, les Etats Unis, et l'Amérique du Sud (Argentine). Plus récemment, des cultures expérimentales ont été mises en place dans des régions intertropicales Afrique, Brésil<sup>[12,16]</sup>.

L'origine des souches d'*Artemisia annua* est importante car la production d'artémisinine est largement liée à la floraison. Celle-ci étant dépendante de la durée journalière de lumière (la photopériodicité), les expérimentations en zones tropicales se basent donc sur une présélection variétale, voire une hybridation, pour pouvoir obtenir des plantes adaptées à leur milieu. Plusieurs auteurs considèrent que cette plante de floraison de jour court n'atteindrait pas une biomasse suffisante en zones intertropicales<sup>[15]</sup>, alors que les expérimentations sur des souches à floraison tardive montrent de bons résultats de production. La plante, dans ces régions, semble mieux s'adapter pour la production d'artémisinine en altitude 1500 m qu'au niveau de la mer<sup>[17]</sup>.

### IIIA.2.5 Utilisation des armoises

Les feuilles d'*Artemisia annua* ont des propriétés antiseptiques, digestives, fébrifuges. Les infusions de feuilles sont traditionnellement utilisées pour traiter la fièvre, les rhumes et les diarrhées. Les feuilles sont également utilisées en application externe, sur les abcès. Les armoises appartiennent toutes au genre *Artemisia*. Parmi les plus connues, *Artemisia absinthium* sert de base à la préparation de l'absinthe. Cette boisson alcoolisée, aujourd'hui interdite en France, était traditionnellement utilisée en Europe contre les fièvres paludiques. *Artemisia dranunculus* (*estragon*) est utilisée pour ces propriétés aromatiques en tant que condiment<sup>[16,17]</sup>.

## IIIA.3 L'Artémisinine

### IIIA.3.1 Structure chimie et synthèse

*artémisinine*, est une lactone sesquiterpénique de la série des cardinanes, isolée de l'*artemisia annua* par des chercheurs chinois en 1972, puis nommé artémisinine en 1985<sup>[12,13]</sup>. De formule brute  $C_{15}H_{22}O_5$ , sa structure a été établie par analyses chimiques<sup>[18]</sup> et spectrales<sup>[19,20]</sup>. Sa configuration a été déterminée aux rayons X<sup>[21,22]</sup>. Son spectre infrarouge révèle un pic intense à  $1745\text{ cm}^{-1}$  qui correspond à la fonction lactone du composé, ainsi que 3 pics, respectivement à 831, 881 et  $1115\text{ cm}^{-1}$ , qui correspondent à une fonction peroxyde<sup>[21,22]</sup>. En effet, la molécule possède un pont peroxyde, une structure très rarement rencontrée dans la nature<sup>[12]</sup>, (figure 33).

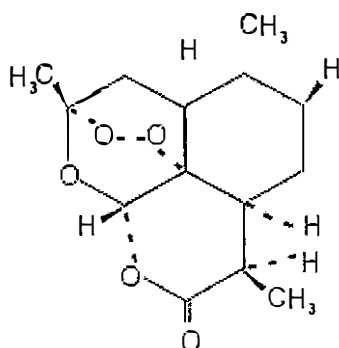


Figure 33: Molécule d'artémisinine

L'artémisinine pure se présente sous la forme d'aiguilles cristallines, inodores, de couleur blanche, dont le point de fusion se situe à 156-157 °C. Sa masse moléculaire est de 282,14 (g/mol<sup>-1</sup>) La molécule est sensible aux milieux basiques et acides. Elle demeure stable dans les solvants neutres, même chauffée jusqu'à 150 °C. Elle conserve sa structure lorsqu'elle est chauffée durant 2,5 min à 200° C mais elle se décompose après 10 min à 190 °C. Elle est également stable à la lumière<sup>[13]</sup>. Et n'absorbe pratiquement pas dans les UV. Cette observation concernant la stabilité de la molécule à la chaleur est importante à considérer pour la préparation et le conditionnement du médicament.

### III.3.2 Artémisinine mode d'action et les dérivés d'artémisinine

La première démonstration de l'activité antipaludique de l'artémisinine a été réalisée en 1972, lors d'un test *in vivo* effectué sur des souris infectées avec le parasite *Plasmodium berghei*. L'administration d'artémisinine a permis l'élimination du parasite du sang des cobayes<sup>[23]</sup>. Dans les années qui suivirent, les chercheurs chinois réalisèrent de nombreux essais *in vitro* et *in vivo*, y compris chez l'homme, qui confirmèrent l'efficacité de la molécule contre plusieurs souches de Plasmodium, notamment celles devenues résistantes à la chloroquine et à la méfloquine<sup>[24]</sup>. Son intérêt thérapeutique vient aussi des excellents résultats obtenus avec certains cas de malaria cérébrale avancée, une forme grave de la maladie, provoquée par le parasite *Plasmodium falciparum* lorsque plus de 5 % des érythrocytes sont infectés<sup>[24]</sup>. Depuis, de très nombreux essais *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés, de même que de multiples tests cliniques, dont les résultats ont fait l'objet de revues détaillées<sup>[12,13, 25,26]</sup>.



Ces travaux ont largement confirmé l'action de cette molécule contre divers parasites responsables du paludisme, ainsi que l'efficacité, généralement supérieure, de dérivés tels que l'artésunate de sodium et l'artéméther. En effet, dans le but d'augmenter la solubilité de l'artémisinine, ainsi que pour améliorer son action, plusieurs dérivés ont été synthétisés (figure 34). Les plus prometteurs sont actuellement des dérivés de la dihydroartémisinine et peuvent être classés en trois catégories : les dérivés carbonatés, les dérivés ester (artésunate de sodium), l'artésunate, soluble dans l'eau et les dérivés éther (artéméther et artééther) solubles dans l'huile<sup>[27]</sup>. Tous ces composés induisent une disparition de la fièvre et des parasites du sang. Leur action est plus rapide que celle de la plupart des antimalariques classiques<sup>[26]</sup> et ils sont généralement bien tolérés<sup>[28]</sup>.

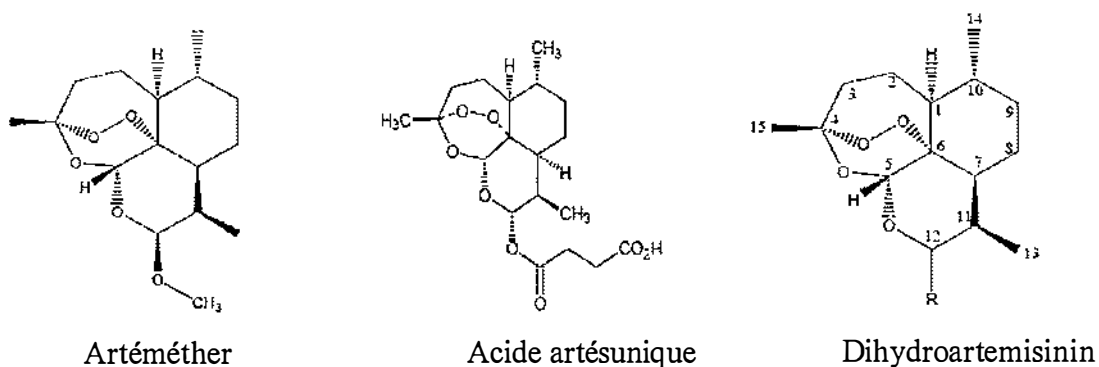


Figure 34: L'artémisinine et ses principaux dérivés utilisés pour le traitement de la malaria

L'artémisinine agit particulièrement contre le stade érythrocytaire des agents de la malaria. Cette molécule permet de tuer le parasite de la malaria à tous les stades. Plusieurs auteurs ont décrit son mode d'action d'un point de vue biochimique : une première étape concerne l'activation de la molécule avec une scission du pont peroxydique de la molécule qui est catalysée par la présence d'ions Fer libres (Fe II), d'origine hémoglobinique (radical hème libre). Cette rupture entraîne la seconde phase, nommée alkylation, où est généré un composé électrophile instable qui forme une liaison covalente avec des protéines synthétisées par le parasite et interfère ainsi avec son métabolisme. Les membranes du parasite sont alors endommagées et les vacuoles alimentaires libèrent dans le cytoplasme leurs enzymes hydrolytiques qui provoquent la mort du *Plasmodium*<sup>[29,30]</sup>.

Depuis l'isolement de l'artémisinine en 1972, plus d'un million de malades, en Asie, en Afrique et en Amérique du Sud, ont été traités avec cette molécule ou un de ses dérivés, principalement l'artésunate et l'artéméther<sup>[31]</sup>. Actuellement, l'artémisinine est disponible en Chine et au Vietnam, sous forme de capsules et de suppositoires. Elle est moins onéreuse que ses dérivés mais également moins active ; des résultats probants ont toutefois été obtenus avec les suppositoires chez des enfants souffrants de malaria aiguë<sup>[32]</sup>. Par ailleurs, l'artéméther, sous forme injectable, est aujourd'hui enregistré dans plusieurs pays d'Afrique, d'Amérique du Sud et bien sur d'Asie du Sud-Est. Mais le dérivé le plus prometteur est certainement l'artésunate, que ce soit sous forme injectable, de comprimés ou de suppositoire. Des médicaments confectionnés avec cette molécule sont disponibles depuis quelques années déjà en Chine, en Thaïlande, en Birmanie et au Vietnam et au Brésil<sup>[33]</sup>.

### IIIA.3.3 Toxicité

L'artémisinine et ses dérivés ont l'avantage de présenter peu d'effets toxiques. Les différents effets secondaires à ces traitements sont : des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales, rarement une bradycardie, une baisse des réticulocytes ainsi qu'une élévation modérée et transitoire des transaminases. L'emploi de l'artéméther et de ses dérivés, lors de la grossesse, est contre-indiqué lors du premier trimestre, en raison de l'embryolétalité observée chez le rat et le lapin, mais l'utilisation d'artémisinine et de ses dérivées n'est pas considérée comme dangereuse durant les deux seconds trimestres de la grossesse<sup>[33]</sup>. Parmi les autres avantages, citons le fait que les traces d'artémisinine et de ses dérivés, quel que soit leur mode d'absorption, sont rapidement éliminées du sang.

Les composés peuvent cependant avoir, potentiellement, des effets neurotoxiques à fortes doses. En effet des lésions neurologiques ont été observées dans des expérimentations sur des chiens et des chats. Artéméther et artééther sont les produits qui présentent les risques les plus importants d'un point de vue neurophysiologique. Le problème des recrudescence de crises est souvent soulevé dans les études cliniques utilisant des traitements à base d'artémisinine et ses dérivés.

Plusieurs médicaments associant artémisinine et d'autres molécules antipaludiques, telles que des tétracyclines et la méfloquinine, ont été proposés pour diminuer ces risques de recrudescences<sup>[34,35]</sup>.

### IIIA.3.4 Résistance

Il n'a pas été signalé de résistance à l'artémisinine ou à ses dérivés. La sensibilité des isolats cliniques et des souches de laboratoire variait par rapport à ces médicaments, mais rien ne prouve que ce soit lié à des échecs thérapeutiques<sup>[34,35]</sup>. L'étude de laboratoire a également montré que des souches résistantes à la méfloquine semblaient moins sensibles à l'artémisinine. C'est probablement en relation avec le fait que ces deux médicaments ont une action synergique<sup>[36]</sup>. Les observations sur le terrain appuient celles des laboratoires. Par exemple, on a observé une forte sensibilité *in vitro* à la méfloquine, la quinine et l'artésunate pour des isolats provenant du district de Yaha dans le sud de la Thaïlande, région où la méfloquine donne des taux de guérison élevés dans le traitement du paludisme à *falciparum*. Dans le même temps, dans la province de Tak, à la frontière du Myanmar, la sensibilité à l'artésunate et à la méfloquine a décliné entre 1991 et 1994, période pendant laquelle ni l'artémisinine, ni aucun de ses dérivés n'étaient disponibles en Thaïlande<sup>[36]</sup>.

### IIIA.4 Méthodes de production

Parmi les études existantes, de nombreuses sont conduites dans des conditions contrôlées pour pouvoir mieux comprendre les processus impliqués dans la biosynthèse d'artémisinine et tenter d'augmenter les productions de ce principe actif. Les expérimentations portent sur des cultures cellulaires, des cultures *in vitro* de tissu végétal.

#### IIIA.4.1 Approche synthétique

La demande d'artémisinine augmentant fortement en comparaison de l'offre, la synthèse de la molécule serait une solution attractive pour les laboratoires. Cependant, sa structure complexe rend une synthèse totale très difficile. La première synthèse totale de la molécule proposée en 1983 comporte 13 étapes à partir de la molécule (-)-isopulegol. Plusieurs autres voies de production, uniquement synthétiques, ont été proposées mais selon Dhingra<sup>[37]</sup>, elles restent trop complexes, peu productives et économiquement non rentables. L'alternative à cette synthèse organique totale pourrait être celle d'utiliser des bio précurseurs proches. Ainsi, l'artémisinine peut être facilement synthétisée à partir d'acide artémisinique avec un rendement de 40 %. L'avantage de cette méthode est que l'acide artémisinique est présent en quantité 8 à 10 fois supérieure dans la plante que l'artémisinine. Le nombre d'étapes nécessaires pour passer de l'acide artémisinique à l'artémisinine est de quatre à cinq<sup>[37]</sup>. Un autre bio précurseur de l'artémisinine est l'artesannuin-B qui peut être également extrait de la plante pour la production synthétique d'artémisinine<sup>[26]</sup>.

### IIIA.4.2 Approche biotechnologique

En considérant que la plante est la meilleure source d'artémisinine, les recherches biotechnologiques ont été développées pour sa production, ceci incluant la production par des cultures de tissus, des cultures de cellules et à partir de la plante intacte. La propagation *in vitro* d'*Artemisia annua* a été largement étudiée, elle permet de produire de l'artémisinine à partir de tissus différenciés. Le niveau d'artémisinine atteint est alors de 0,28%<sup>[38]</sup>. D'autres recherches utilisant des techniques de biologie moléculaire en isolant des gènes codant pour la production d'artémisinine sont en cours<sup>[39]</sup>.

Malgré tous ces projets, on constate que la production d'artémisinine, à l'aide de ces techniques, reste coûteuse et peu productive. Ainsi l'artémisinine continue donc à être extraite de cultures végétales extérieures d'*Artemisia annua*<sup>[40]</sup>. Suivant cet axe de recherche, Delabays et al<sup>[40]</sup>, considèrent que les principaux progrès qu'on peut espérer dans le domaine de production d'artémisinine viendraient de la sélection et de l'hybridation de cultivars à haut rendement de production en artémisinine. Dans son travail de thèse particulièrement complet, Delabays<sup>[12]</sup>, aborde les différentes étapes nécessaires à la domestication d'une espèce et prouve que, pour *Artemisia annua*, la sélection de génotype productif est particulièrement stable et efficace.

## IIIA. 5. Les différents stades de croissance et le cycle biologique

### IIIA.5.1 La phénologie

La phénologie d'une plante est la description des différents stades de développement d'une plante au cours de la saison<sup>[12]</sup>. Peter Blanc<sup>[41]</sup>, distingue 3 étapes principales dans la phénologie d'*A.annua*. Elles sont nommées "rosette", "élongation de la tige" et "floraison". Le premier stade correspond au stade juste après la germination ou la plante forme une touffe de feuilles sans développement de la tige. Le second est celui de la croissance de la tige ainsi que des rameaux latéraux jusqu'à l'induction de la floraison. D'autres auteurs Raharianaivo<sup>[42]</sup> distinguent plusieurs phases dans le stade floraison : un stade "intermédiaire". La floraison a également été divisée en huit étapes distinctes qui vont de l'élongation des rameaux florifère à la maturation des akènes. Delabays<sup>[12]</sup> a étudié la variation des durées pour chacune des étapes, elles sont très variables selon les origines géographiques, les lignées et les conditions

de croissance. Le stade rosette dure ainsi de 4 à 8 semaines et le stade élongation de 1 à 5 mois selon le photopériodisme qui détermine la floraison.

### IIIA.5.2 L'initiation de la floraison

Un facteur important à prendre en compte pour la culture d'*artémisia annua* est la durée du jour. *Artémisia annua* est une plante de jour court, c'est à dire que sa floraison débute lors de la diminution de la durée du jour. Selon les lignées et leur origine géographique, ce caractère est variable car fixé et adapté à un environnement précis. La variation de durée de jour au cours d'une année diminue en s'approchant de l'équateur et certains auteurs ont considéré que la culture d'*Artemisia annua* ne serait pas réalisable en zones tropicales du fait de ce caractère lié au photopériodisme<sup>[43]</sup>. Plusieurs expérimentations ont démontré que la plante peut pousser sous des latitudes tropicales, l'utilisation de lignées adaptées par sélection ou par hybridation permet l'obtention de teneurs en artémisinine importantes<sup>[12]</sup>.

### IIIA.5.3 Densité

La densité de plantation d'*A.annua* joue sur le rendement, des densités importantes permettent d'obtenir un rendement supérieur (figure 35), cependant à de fortes densités la compétition entre les plantes réduit considérablement leurs tailles. On a une augmentation importante du rendement jusqu'à environ 10 plantes/m<sup>2</sup>, la courbe arrivant presque à saturation (autour de 6 t/ha). Si la culture est effectuée dans des jardins une densité faible (1 plante/m<sup>2</sup>) peut permettre d'associer la plante avec d'autres cultures.

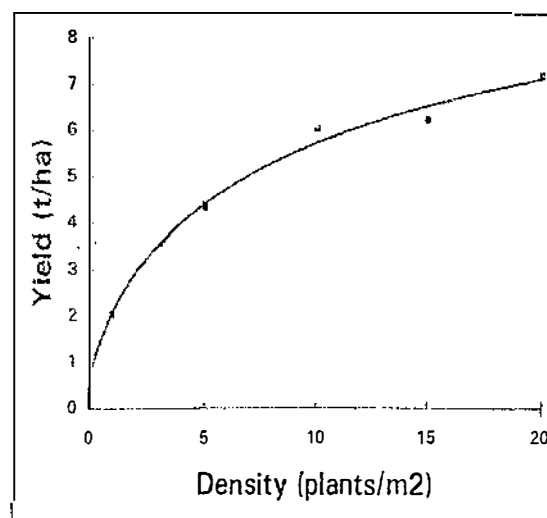


Figure 35: Rapport entre densité de culture et rendement <sup>[16]</sup>.

### IIIA.5.4 Nutrition, fertilité et sol

Bien qu'il n'existe pas beaucoup de données sur la réponse d'*A.annua* aux principaux nutriments (N, P, K), des essais en Inde ainsi qu'aux USA ont montré qu'une carence en azote provoquait une baisse de la teneur en artémisinine. Or les sources d'azote proviennent

essentiellement des nitrates ions  $\text{NO}_3^-$  - ou des ions ammonium  $\text{NH}_4^+$  - apportés par les engrais. Comme les ions nitrates  $\text{NO}_3^-$  sont très facilement lessivables, l'élément azote risque de faire défaut si on se trouve dans les zones tropicales qui sont soumises à d'intenses précipitations. Dans ce cas, la méthode et le moment d'application du fertilisant est essentiel. Il faudra alors fractionner les apports durant la saison des pluies. Dans le cas de la culture à Mondolkiri le problème ne se pose pas puisque l'on commence la culture à la fin de la saison des pluies et que celle-ci se finira avant le début de la saison des pluies suivante.

D'après Laughlin et al <sup>[16]</sup>, *A.annua* a été cultivée sur une grande variété de sols, et sa capacité à coloniser des zones « poubelles » montre sa grande adaptabilité. Seul un pH trop acide (5.0-5.5) peut-être préjudiciable pour certaines variétés. *A.annua* ne nécessite pas d'avoir un sol riche pour pousser. De plus l'utilisation d'engrais chimique est inexistante au Mondolkiri. Les sols basaltiques du Mondolkiri semblent donc pouvoir supporter la culture.

### IIIA.5.5 Irrigation

Peu d'études existent concernant l'irrigation d'*Artemisia annua*. La plante peut pousser sur des sols et sous des climats très variés, aussi l'irrigation à apporter dépendra principalement des conditions climatiques. De façon générale, le sol doit rester humide. Ceci est particulièrement important dans le stade précédent la floraison car un stress hydrique risque de diminuer considérablement la récolte d'artémisinine<sup>[16]</sup>. En région sèche, Anamed<sup>[44]</sup> conseille de planter les plants un peu plus profondément dans le sol (5cm).

### IIIA.5.6 La récolte et le séchage

Les observations effectuées sur la localisation, dans la plante, de l'artémisinine et les variations de concentration selon la saison<sup>[14]</sup>, ont permis de déterminer des techniques appropriées pour la récolte d'*Artemisia annua*. Il est important de considérer la phénologie de la plante pour déterminer sa date de récolte. Les méthodes de récoltes utilisées sont variées : soit manuelles, soit mécanisées et industrielles. La technique de récolte employée par Nomad RSI sera la technique manuelle. La concentration d'artémisinine est plus importante dans les feuilles, c'est donc cette partie qui sera récoltée. La récolte doit être effectuée juste lorsque les premières fleurs apparaissent. Après la récolte des feuilles, les tiges peuvent être laissées sur pied et produiront éventuellement de nouvelles feuilles. Les tiges peuvent également servir à faire du compost. La technique proposée par Anamed<sup>[44]</sup> est la suivante : en tenant la plante retirer les feuilles en descendant la main du haut vers le bas. Retirer les morceaux de tiges puis découper les feuilles en lamelles de 1 cm.

Le séchage doit être réalisé à 50°C, soit au soleil en période humide, soit à l'ombre en période sèche. Après trois jours, les feuilles peuvent être broyées avec une grille à trous très fins.

### IIIA.6 Variations de la concentration en artémisinine

#### IIIA.6.1 Selon les parties de la plante

L'artémisinine n'est pas présente dans les racines, elle se concentre dans les feuilles de la partie supérieure de la plante. Plus précisément, l'artémisinine s'accumule dans des trichomes glandulaires présents sur la surface des feuilles, sur la corolle et sur le réceptacle des fleurettes<sup>[15]</sup>.

#### IIA.6.2 Les différentes lignées

*Artemisia annua* comme de nombreuses plantes annuelles et rudérales présente une grande variabilité morphologique. Peu d'études existent sur ce sujet Delabays<sup>[12]</sup> a mis en évidence qu'elle présente un polymorphisme marqué pour plusieurs caractères. Le port de la plante peut varier considérablement. Du point de vue de sa morphologie florale, les descriptions montrent une variabilité dans la découpe des feuilles et dans la pilosité de la plante. Les principaux polymorphismes étudiés sont les caractères phytochimiques. Les compositions en huiles essentielles<sup>[45]</sup> ainsi que les teneurs en artémisinine sont également très variables. Delabays<sup>[12]</sup> a démontré l'existence de polymorphismes sur plusieurs caractères l'habitus, la morphologie des feuilles, la phénologie, la teneur en artémisinine.

Le tableau 25 montre la variation de teneur en artémisinine qui peut aller de 0.02 % à 1.38% selon sa provenance et selon la partie de la plante sélectionnée. Dans des cultures réalisées en Suisse à partir de lignées d'origine très diverses, Delabays<sup>[12]</sup>, montre que le taux d'artémisinine varie entre 0.05% et 1.07% dans les feuilles sèches. Plusieurs études ont montré que la concentration d'autres bio précurseurs de l'artémisinine comme l'acide artémisinique varie également considérablement, indiquant ainsi qu'il existe pour *A.annua* différents chimiotypes selon leur origine géographique<sup>[46]</sup>.

Origine	Type	Teneur en Artémisinine (% MS)	Référence bibliographiques
Allemagne	Sauvage	0.02	Singh et al <sup>[47]</sup>
USA (Connecticut)	Sauvage	0.06	Charles et al <sup>[48]</sup>
Argentine	Sauvage	0.10	Acton et al <sup>[49]</sup>
Inde	Sauvage	0.11	Sharma et al <sup>[45]</sup>
Chine	Hybride	0.14	Charles et al <sup>[48]</sup>
USA (Dakota)	Sauvage	0.21	Charles et al <sup>[48]</sup>
Espagne	Sauvage	0.24	Delabays et al <sup>[50]</sup>
Vietnam	Sauvage	0.46	Wallaart et al <sup>[46]</sup>
Pays bas	Tétraploïde	0.52	Wallaart et al <sup>[46]</sup>
Chine	Sauvage	0.60	Liu et al <sup>[18]</sup>
Chine	Sauvage	0.79	Anonymous <sup>[24]</sup>
Vietnam	Sauvage	0.86	Woerdenbag et al <sup>[51]</sup>
Chine	Sauvage	1.07	Delabays et al <sup>[50]</sup>
Suisse	Hybride	1.38	Delabays <sup>[12]</sup>

Tableau 25: Teneur en artémisinine dans différents échantillons de feuilles sèche d'*Artemisia annua*.



## Références Bibliographiques

- [1]. World Health Organisation, 2005. World malaria report. Roll back malaria. WHO, Geneva, Switzerland.
- [2]. BABIKER, H.A., MACKINNON, M.J., 2005. Drug resistance in malaria : Its population biology and implications for control. *Acta Tropica*. 94, 161-162.
- [3]. DENIAU, M., 1995. Paludisme : épidémiologie, étiologie, physiopathologie, diagnostic, évolution, traitement, principes de la prévention individuelle. *Revue du Praticien*. 45, 2325-2333.
- [4]. SIMON, F., LAVARDE, V., 1999. Paludisme : épidémiologie, étiologie, physiopathologie, diagnostic, évolution, traitement principes de la prévention individuelle. *Revue du Praticien*. 49, 81-87
- [5]. WERY, M., 1995. Le *plasmodium* parasites de l'homme. Paludisme ou malaria. *Protozoologie médicale*, Ed. de Boeck Université : pp. 149-178.
- [6]. DANIS, M., et GENETILINI, M. 1998. Le *paludisme*, ce fléau mondial. *Revue du Praticien*. 48,254-256.
- [7]. MALVY, D., DJOSSOU, F., THIEBAUT, R., et LE BRAS, M., 2000a. Plasmodies-Malaria. Formes cliniques, diagnostic. *Encyl. Med. Chir. Maladies infectieuses*. 80-507-A-20, pp. 1-16.
- [8]. OMS, 1999. Liste des médicaments essentiels. *Who drug Information*. 13, 249-262.
- [9]. PERRONNE, C., 2000. *Paludisme*, *Maladies infectieuses 2* ; Ed. Doin : pp. 89-97.
- [10]. RECEVEUR, M., BLANC, B., MALVY, D., THIEBAUT, R., et LE BRAS, M., 2000. Le paludisme au Vietnam : quelle connaissance du risque pour le voyageur ?. *Bull. Soc. Path. Ex.*, 3: pp. 119-120.
- [11]. BOUCHAUD, O., LANOGHET, C., et COULAUD, J. 1998. Prophylaxie du paludisme. *Revue du Praticien*. 48, 279-286.
- [12]. DELABAYS, N., 1997. Biologie de la reproduction chez *Artemisia annua* L. et génétique de la production en artemisinine. Contribution à la domestication et à l'amélioration génétique de l'espèce. Thèse de Doctorat. Université de Lausanne.
- [13]. KLAYMAN, D.L., 1985. Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China *Science* 228, 1049-1054.
- [14]. FERREIRA, J.F.S., JANICK, J., 1996. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua* . pp. 579-584. In : J.Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA.
- [15]. KEYS, J.D., 1996. *Chinises herbs*. Swindon books company, London. Pp. 216-217.

- [16]. LAUGHLIN, J.C., HEARLEWOOD, G.N. and BEATTEAIE, B.M., 2002. Cultivation of *Artemisia annua*. pp. 159-195. In, Wright CW (Ed.), *Artemisia*. Taylor and Francis, Londres.
- [17]. LIERSCH, R., SOICKE, H., STEHIR, et TULLNER, H.U, 1986. Artemisinin in *Artemisia annua* during one generation period. *Planta medica* 7, 387-390.
- [18]. LIU, J.M., NI., FAN, J.F, TU, Y.Y., WU, Z.H., WU, Y.L and CHOU, W.S., 1979. Structure and reaction of arteannuin. *Acta Chim. Sin.* 37, 129-143.
- [19]. ZHONGSHAN, W., NAKASHIMA, T.T., KOPECKY, K.R., and MOLINA, J., 1985. Qinghaosu: <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C- nuclear magnetic resonance spectral assignments and luminescence. *Can. J. Chem.* 63, 3070-3074.
- [20]. BLASKO, G., CORDELL, G.A., and LANKIN, D.C., 1988. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR assignment of artemisinin (qinghaosu). *J. Nat. Prod.* 51, 1273-1276.
- [21]. ZHANG, S.D., ZHANG, J.P., WU, B.M., YAO, J.X., and LIN, X.Y., 1981. Studies on the crystal structure of bromo Qinghaosu. *Acta. Phys. Sin.* 30, 976-982.
- [22]. LEBAN, I., GOLIC, L., and JAPELJ, M., 1988. Crystal and molecular structure of qinghaosu. a redetermination. *Acta Pharm. Jugosl.* 38, 71-77.
- [23]. HEIN, T.T ANONYME, 1979. Qinghaosu antimalaria coordinating research group. Antimalarial studies on qinghaosu. *Chin. Med. J.* 92, 811-816.
- [24]. HEIN, T.T, 1982. China cooperative research group on Qinghaosu and its derivatives as antimalarials. Chemical studies on qinghaosu (artemisinin). *J. Trad. Chin. Med.* 2, 3-8.
- [25]. TANG, W., EISENBRAND, G., 1992. Chinese drugs of plants origin. Chemistry, pharmacology and use in traditional and modern medicine. Springer-Verlag, Berlin, 159-174.
- [26]. HIEN, T.T., WHITE, N.J., 1993. Qinghaosu. *Lancet.* 341, 603-608.
- [27]. TRIGG, P.I, 1990. Qinghaosu (artemisinin) as an antimalarial drug. *Econ. Med Plant. Res.* 3, 20-55.
- [28]. NOSTEN, F., 1991. Artemisinin: large community studies. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 45-46.
- [29]. Mc INTOSH, H.M., OLLIARO, P. 1998 b. Artemisinin derivatives in the treatment of severe malaria. The Cochrane Library. London, BMJ Publishing
- [30]. BASCO, L.K., LE BRAS, J., 1993. In vitro activity of artemisinin derivatives against Africa isolates and clones of Plasmodium falciparum. *American J. Trop. Med. Hyg.* 49, 301-307.

- [31]. MESHNICK, S.R., 1994. The mode of action of antimalarial endoperoxydes. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, suppl. 1 :31-32.
- [32]. WHITE, N., 1994. Artemisinin: current statut. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, 3-4.
- [33]. HIEN, T.T, TAN, D.T.H., CUC, N.T.K., et ARNOLD, K., 1991. Comparative effectiveness of artemisinin suppositories and oral quinine ion children with acute falciparum malaria. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 85, 210-211.
- [34]. BALINT, G.A., 2001. Artemisinin and its derivatives. An important new class of antimalarials agents. Pharm. therap., 90, 261-265.
- [35]. WONGSRICHANALAI, C., WIMONWATTRAWATEE., T., SOOKTO, P., et al. 1998. In vitro suscepibility of *Plasmodium falciparum* in Thailand. Bulletin of the world Health organization.
- [36]. EZEDINACHI, E., 1996. In vivo efficacy of chloroquine, halofantrine, pyrimethaminesulfadoxine, and qinghaosu (artesunate) in the treatment of malaria in Nigeria. Central Africa Journal of Medicine. 42, 109-111.
- [37]. DHINGRA, V., VISHWESHWAR, R., et LAKSHMI, N., 2000. Minireview. Current status of Artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. Life Science. (66) 4, 279-300.
- [38]. WHIPKEY, A., SIMON, J.E., CHARLES, D.J., and JANICK, J., 1992. In vitro production of artemisinin from *Artemisia annua* L. J. Herbs Spices Med. Plants. 1, 15-25.
- [39]. WHITE, N., 1997. Assesment of pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. Antimicrob. Agent. Chemo. 41, 1413-1422.
- [40]. DELABAYS, N. JENELTEN, U., PARIS, M., PIVOT, D., et GALLAND, N., 1994. Aspects agronomiques et génétiques de la production d'artémisinine à partir d'*Artemisia annua*. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hort. 26, 291-296.
- [41]. PETER-BLANC, C., 1992. Développement et biologie de la reproduction de l'*Artemisia annua* L. Travail de diplôme, Université de Lausanne 52, p.
- [42]. RAHARINAIVO, J.N., 1993. Contribution au lancement de la culture du qinghaosu ou *Artemisia annua* L. comme plante antipaludique à Madagascar. Mémoire de fin d'Etudes, Ecole Supérieurs des Sciences Agronomiques, Antananarivo, 52 p.
- [43]. FERREIRA, J.F.S., JANICK, J., 1995. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. Int. J. Plant Sci. 156, 807-815.
- [44]. ANAMED, *Artemisia annua* Anamed: Malaria et la medecine naturelle: Documentation. www.anamed.net.
- [45]. SHARMA, A., BINDRA, R.L., TEWARI, R., 1991. *Artemisia annua*: Cultiviation, utilization and chemical studies. Current Res. Med. Arom. Plants. 13, 46-60.

- [46]. WALLAART, T.E., PRAS, N., BEECKMAN, A.C., et QUAX, W.J., 2000. Seasonal variation of Artemisinin precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin : proof for the existence of chemotypes. *Planta medica.*, 66, 57-62.
- [47]. SINGH, A, VISHWAKARMA, R.A., et HUSAN, A., 1988. Evaluation of *Artemisia annua* strain for higher artemisinin production. *Planta medica.* 7, 475-476.
- [48]. CHERLES, D.J., SIMON, J.E., WOOD, K.V., et HEINSTEIN, P., 1990. Germplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extrcats. *J. Nat. Prod.*, 53, 157-160.
- [49]. ACTION, N., KLAYMAN, D.L., 1985. Artemisinin a new sesquiterpene lactone endoperoxyed from *Artemisa annua*. *Planta Medica.* 51, 441-442.
- [50]. DELABAYS, N., BENAKIS, A., at COLLET, G., 1993. Selecation and breeding for high artemisinin (Qinghaosu) yielding strains of *Artemisia annua* L. *Acta Hort.*,330, 203-207.
- [51]. WOERDENBAG, H.J., PRAS, N.G., BANG, B.T., BOS, R., VAN UDEN W., et al., 1994. Artemisinin, related sesquiterpenes and essential oil in *Artemisia annua* during one vegetation period in Vienam. *Planta Med.*, 60, 272-275.
- [52]. MUELLER, M.S., KARHAGAOMBA, I.B., HIRT, H.M, WEMAKOR, E., 2000. The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: gricultural, chemical and clinical aspects. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 487-493
- [53]. ALIN, M.H., AHSTON, M., KIHAMIA, C.M. et al. 1996a. Clinical efficacy and pharmacokinetics of artemisinin monotherapy and in combination with mefloquine in patients with falciparum malaria. *Journal of Clinical Medicine*, 41, 587-592.

## **CHAPITRE IIIB**

### **Contexte du projet de coopération scientifique inter-universitaire**

## **Chapitre IIIB.1 Contexte du projet de coopération scientifique inter-universitaire**

L'objectif global du projet est de contribuer à la lutte contre le paludisme au travers de recherches coordonnées sur les potentialités de production et d'utilisation de la plante *A. annua*. Ce type de recherche s'inscrit dans un objectif de développement international car sa finalité est de permettre l'accès à des modalités de soins géographiquement et financièrement accessibles pour les populations rurales du Cambodge et du Sénégal.

Le projet consiste d'une part à établir les conditions de production les plus favorables dans deux régions du Cambodge et du Sénégal dans lesquelles le paludisme est largement prévalent et connaît une résistance aux traitements classiques. D'autre part, des recherches concernant l'extraction des composés actifs de la plante sont menées en parallèle. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une coopération internationale entre le laboratoire de Chimie de l'Université de Toulouse, la Faculté de Pharmacie de Dakar et l'Université d'Agriculture de Phnom Penh. Il est financé par l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF), qui permettra à des étudiants et chercheurs des 3 universités partenaires de se rencontrer et d'enrichir leurs connaissances.

### **IIIB.1.1 Partenaires et thématiques de recherche**

- L'Université Royale d'Agriculture de Phnom Penh au Cambodge mènera des études agronomiques sur la mise en culture *d'artemisia annua* dans la province Mondolkiri : conditions de culture, données environnementales (ensoleillement, arrosage, dates des semis et des récoltes), caractéristiques du sol, rendement, afin de définir protocole de mise en culture de la plante *Artemisia Annua* permettant un taux optimum de principe actif.
- Le Laboratoire de Pharmacognosie et Botanique (LPB) des l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar: a pour rôle de mener une étude biosytématique comparée entre les plantes cultivées.
- Le Laboratoire de Chimie Agro-industrielle de Toulouse, (INPT) se charge de toute la partie extraction et analyse des principes actifs ainsi que des tests des différentes méthodes d'analyse des parties de la plante :

- déterminer les caractéristiques générales et la composition chimique des différentes parties de la plante.
- Evaluer les teneurs en principes actifs dans différentes configurations.
- L'ONG Nomad RSI conduit des études agronomiques et assure la mise en culture de la plante. Cette structure centralise l'ensemble des travaux. Elle sera à la suite de cette première étude chargée de développer et de permettre l'application des résultats de ces travaux de recherches dans ses programmes de solidarité internationale.

Cette étude comparative relève d'un intérêt fondamental car les deux pays concernés sont fortement touchés par le fléau du paludisme. Cependant les conditions bioclimatiques diffèrent largement entre les deux pays et l'étude de faisabilité parallèle entre Asie et Afrique permet de cerner le potentiel réel d'*Artemisia annua*.

## **IIIB.2 Essai de mise en culture d'*Artemisia annua* par Nomad au Cambodge et au Sénégal en 2002**

En 2002, Nomad a ainsi essayé de cultiver la plante au Cambodge, ainsi qu'au Sénégal, mais ces 2 essais ont échoué, les plantes étant mortes à des stades précoces. Ainsi afin de répondre aux questions agronomiques posées par ces échecs de la première mise en culture, ainsi qu'à celles soulevées par la bibliographie existante sur la culture, Nomad a voulu mettre en place un véritable essai agronomique au Mondolkiri, ainsi qu'une plantation au Sénégal. Les résultats permettent de comparer le potentiel agronomique d'*Artemisia annua* dans les deux pays. Cette expérimentation est intégrée au projet A.U.F avec trois universités. En parallèle de l'expérimentation, une étude ethnobotanique sur les plantes médicinales utilisées dans le traitement du paludisme, des fièvres et des troubles de l'appareil digestif auprès des minorités ethniques, s'est déroulée entre les mois de décembre 2003 et d'octobre 2004, financée par l'organisation France Liberté.

Au Sénégal, afin d'assurer une production d'*Artemisia annua* et compte tenu des enseignements de la première année du projet, Nomad a choisi de travailler avec des associations locales, déjà constituées, reconnues pour leur travail et leurs compétences dans le

domaine. une collaboration avec ENDA-Tiers monde (environnement, développement, action) dans le tiers monde. Une équipe de l'organisation internationale basée au Sénégal.

Au Cambodge, la présence de l'équipe de Nomad permettra de développer une étude pluridisciplinaire mettant en valeur l'intérêt de ce type de pratique. L'approche agronomique nécessite la récolte des données climatiques et édaphiques ainsi que le suivi des cultures.

➤ **Objectif de l'essai:**

- Déterminer si le Mondolkiri possède des conditions adéquates à la culture d'*A. annua* par la population locale, en vue de son utilisation comme antipaludique.

➤ **Objectifs secondaires :**

- Tester une variété adaptée aux conditions agro écologiques du Mondolkiri,
- Chercher un itinéraire technique pertinent, c'est-à-dire lié aux pratiques agricoles locales.
- Apprécier les résultats de production d'artémisinine. Sont-ils suffisants et réguliers ?

### **IIIB.3 Le programme Nomad au Mondolkiri- Cambodge**

Depuis 2000, Nomad RSI mène un projet opérationnel de recherche qui porte spécifiquement sur le paludisme. Cette maladie représente l'une des premières causes de mortalité et de morbidité du Mondolkiri, particulièrement parmi la population Phnong bénéficiaire des projets de Nomad. La première phase du projet a consisté en un recueil de données environnementales, bio-médicales, et ethno-médicales en lien avec le paludisme. La seconde phase a pour objectif de permettre la mise en place d'interventions de santé autour de la malaria. Ces interventions portent notamment sur le développement de programmes d'éducation sanitaire et sur l'amélioration des échanges d'informations entre les groupes cibles (communautés locales, autorités provinciales de santé et institutions nationales telle que le Centre National de Malaria (CNM)). La troisième phase a pour objectif de pouvoir proposer un traitement efficace contre la malaria qui puisse être préparé localement. Dans cette perspective, la mise en culture et le conditionnement sous forme de thé d'*Artemisia annua* au Mondolkiri semble bien correspondre à ces attentes. Cette solution a déjà démontré son efficacité dans des projets similaires (Anamed, dans près de 50 pays).



### **IIIB.3.1 La situation du paludisme au Mondolkiri**

Selon Maurice (1993), le poids écrasant du paludisme est un des facteurs essentiel de la vie des Montagnards, ce qui a contribué à leur isolement. Les habitants des plaines ont toujours eu une forte aversion envers ces montagnes fortement impaludées. Il cite L.C Brumpt et V.C Brumpt medecin de l'époque coloniale : « Malgré des conditions de vie défavorables, les populations montagnardes et forestières, encore au stade de l'organisation tribale, ont pu subsister dans les régions hautement palustre, hantées par l'*Anopheles minimus*. Le paludisme a constitué la meilleure protection de ces tribus faiblement organisées contre des peuples entreprenant à forte natalité, cherchant sans cesse de nouveaux espaces vitaux ».

Cependant aujourd'hui, comme on a pu le voir dans le paragraphe précédent, les montagnards du Mondolkiri sont en plein bouleversement de leur société, le paludisme devient donc un frein à l'essor et au développement économique en affaiblissant considérablement les forces de ces populations et en maintenant leur faible démographie. Le taux de mortalité lié au paludisme dans la province est en effet 6 fois plus important que dans le reste du pays (ADB, 2000).

D'après une étude de l'ONG Health Net International (HNI, 2003), le paludisme est encore perçue par la population comme étant le plus gros problème de santé. Même si ces dernières années le taux d'incidence de la maladie a diminué passant de 76/1000 en 2000 à 33/1000 en 2002. Ceci largement du aux actions menées par le Centre national de malariologie (CNM) ainsi que par les ONG travaillant dans la zone (MDM, HNI, Nomad RSI), qui ont notamment développé un programme de distribution de moustiquaires de grande ampleur. Pourtant, les cas de paludisme chronique, généralement non répertoriés, contribuent à alimenter un cercle vicieux, baisse de l'immunité, faible santé, baisse du travail et pauvreté<sup>[1]</sup>.

### **IIIB.3.2 Caractéristiques géographiques et climatiques du Cambodge**

Le royaume du Cambodge couvre une superficie de 181 000 km<sup>2</sup> et s'étend sur 580 km d'est en ouest et sur 450 du nord au sud. Situé entre les latitudes 10° et 14°30' Nord, ce pays tropical présente une ouverture maritime sur le golfe de Thaïlande au sud ouest et partage ses frontières terrestres avec le Vietnam (est et sud-est), le Laos (extrême nord-est) et la Thaïlande (ouest et nord). Situé en plein cœur de la péninsule indochinoise, il peut être divisé en deux régions géomorphologiques principales (figure 41).



## Chapitre IIIB1. Contexte du projet de coopération scientifique inter-universitaire

De plus, les déplacements à l'intérieur de la province restent très difficiles (ornières creusées en saison des pluies, rochers émergeant à la surface du sol, zones sableuses au nord de la province). Historiquement considérée comme le territoire des minorités ethniques, la province est aujourd'hui composée à 65 % de Phnongs, 30 % de Khmers et 5 % d'autres ethnies comme les Stiengs, Kruengs, Krols, Jaraïs, Tampuans, ainsi que des Chams, Laotiens et Vietnamiens.

Capitale provinciale, Senmonorom est située à 380 Km de Phnom Penh. L'accès se fait quasiment uniquement par la route et dure 8h en saison sèche et 12h ou plus en saison des pluies. Deux points de frontière avec le Vietnam sont ouverts permettant le développement d'un commerce transfrontalier.

La province ne possède aucune route goudronnée et, en dehors de la piste reliant la capitale provinciale à celle du pays, la circulation est très difficile. Ainsi, durant la saison des pluies, les difficultés de transport laissent beaucoup de zones de la province uniquement accessibles à pied, à dos d'éléphant ou par charrette. Depuis 2004 des axes routiers permettant de relier les différents districts de la province sont en voie de réalisation. D'après les autorités provinciales, la population en 1999 était de 36300 habitants avec une densité de 2 habitants/Km<sup>2</sup>. Les estimations pour 2003 montrent une augmentation à 40 000 habitants pour une densité de 2,8 habitants/Km<sup>2</sup>. Ceci essentiellement dû à l'arrivée de nouveaux migrants Khmer. (ADB, 2000). (Maurice, 1993).

## **CHAPITRE IIIC**

**Matériels et méthodes : *Artemisia annua***

## **IIIC1. Essai de mise en culture au Cambodge**

### **IIIC1.1.1 Les graines d'*Artemisia annua***

La variété des graines utilisée est fournie par Anamed<sup>[44]</sup>. C'est un hybride issu du croisement entre lignées provenant d'une variété chinoise et d'une variété vietnamienne appelée A3. Ce qui soulève la question de la durabilité de la culture. En effet, les graines produites par la plante ne sont pas réutilisables, elles perdent leur teneur en artémisinine et la quantité de biomasse est beaucoup plus faible (revue d'information d'Anamed). Afin de résoudre ce problème, Anamed propose de multiplier végétativement la plante par bouturage.

Après la première année de culture, il est également envisageable d'utiliser une multiplication végétative par bouturage d'un plant de l'année précédente. D'après Anamed, une plante de 2 mètres peut être bouturée en 1000 petits tronçons de 2 cm de long qui pourront être replantés à 1 cm de profondeur pour donner de nouveaux plants.

### **IIIC1.1.2 Sites de mise en culture**

#### **IIIC1.1.2.1 Localisation**

**Site 1** : La parcelle de l'expérimentation (fig. 37) est située à une altitude de 747m, sur le versant sud-est d'un vallon du plateau du Yok laich, au creux duquel s'écoule un ruisseau. Le champ est légèrement en pente (inférieur à 5%) contre un petit bois qui longe le ruisseau. La végétation est composée d'un tapis de graminées de 10 à 20 cm de haut. Les sols formés sur le plateau sont issus de la dégradation de la nappe de basalte. Ils sont très épais, plus de 3 mètres par endroits et majoritairement composés d'argiles, probablement de la kaolinite. La nature exacte de la roche mère m'étant inconnue et aucune analyse du sol n'ayant été faite, il m'est difficile de dégager ses caractéristiques pédologiques et l'intérêt agronomique de la parcelle.

Afin d'améliorer le potentiel de culture, sur chaque micro-parcelle du site 1, le sol a été retourné sur 50 cm. De plus, *Eupatorium odoratum* a été incorporée afin non seulement d'alléger le sol mais aussi d'en améliorer sa teneur en matière organique. C'est une plante envahissante colonisant les milieux dégradés, largement utilisée au Cambodge comme engrais vert et insecticide. Un apport de fumure animale a été également effectué avant la transplantation au champ.

## Chapitre IIIC1. Matériels et méthodes essai de mise en culture au Cambodge

**Site 2** : Situé sur une petite île de la rivière qui s'écoule à Senmonorom, le site 2 est au creux de la vallée de l'Oragouis. La végétation est beaucoup plus diversifiée et plus dense que sur le plateau. On remarque sur la parcelle une prédominance d'*Imperata cylindrica* (2 à 2,5m de haut). Le site contient également des touffes d'*Eupatorium odoratum* (2 à 3m de haut) et de nombreuses ronces entremêlées. Des espèces caractéristiques des zones humides sont également présentes. Des arbres de 8 à 15m bordent le champ par endroit. Le sol est de couleur brun-rouge, sa teneur en matière organique semble plus élevée que sur le site 1 ; il colle et tâche les doigts. Sa situation géographique, bas-fond de vallée, permet en effet au site de recevoir alluvions et colluvions. Ils se déposent en période de pluie et de crue de la rivière, rendant ainsi le sol beaucoup plus sableux/ limoneux que sur le plateau. La proportion argile/ limon/ sable est bien différente de l'autre site, le sol est plus léger, moins compact et plus humide. De plus il est protégé du lessivage des fortes pluies par un léger couvert forestier, présent par endroit.

### IIIC1.1.2.2 Le Climat

En hiver (mi-novembre à mi-février), les températures sont comprises entre 10°C et 31°C et entre 16°C et 36°C en été (mi-février à Mai).

Les précipitations durant la saison sèche, qui correspond à la saison de la culture (novembre à avril), sont inférieures à 200mm.

### IIIC1.1.2.3. Dispositif expérimental

Le modèle expérimental correspond à un plan en trois blocs complets aléatoire répétés sur deux sites (figure 37).



## Chapitre IIIC1. Matériels et méthodes essai de mise en culture au Cambodge

Figures 37: Repiquage sur le site 1 (Source N. Savajol Nomad RSI).

Sur chacun des sites trois blocs ont été séparés et les traitements sont répétés dans chaque bloc. La description des sites permet la construction de ces blocs, chacun devant être le plus homogène possible.

Pour le site 1 ; il a ainsi été décidé d'agencer les blocs perpendiculairement à la pente, afin d'éviter l'hétérogénéité liée à la pente et à la proximité de la forêt. Le champ est un rectangle de 38m de long sur 18m de large, chaque bloc placé dans la longueur contient 8 modalités de 3m sur 4m (12m<sup>2</sup>) séparés par des bordures.

Sur le deuxième site, les blocs ont été placés en fonction de l'ombrage créé par les arbres bordant le champ. Le bloc 1 est ombragé le matin et le soir tandis que les 2 autres blocs ne subissent pas d'ombrage.

Tableau 26: Récapitulatif des modalités de culture

<b>Caractéristiques</b>	<b>RP</b>	<b>2p</b>	<b>4p</b>	<b>Ni</b>	<b>S2</b>
Plante/m <sup>2</sup>	1	2	4	1	1
Irrigation	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Site	1	1	1	1	2
Fertilisation	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Travail du sol	Oui	Oui	Oui	Oui	Non

(RP, 2p, 4p, Ni, S2 abréviations des modalités de culture)

### **IIIC1.1.2.4 L'analyse de sol (Cambodge)**

Le sol est une matrice complexe composée, en première simplification, d'une partie minérale et d'une partie organique. C'est un milieu vivant, en perpétuelle évolution. La nature et l'activité d'un sol dépend d'un nombre important de facteurs :

- conditions naturelles telles que le climat (température, taux d'humidité,...),
- type de faune et de flore présent
- conditions liées à l'activité humaine (agriculture, urbanisme....) et toutes activités polluantes (rejets industriels, ménagers, utilisation de fertilisants et pesticides en agriculture,...).

Le statut organique du sol, évalué par les taux de carbone et d'azote, a souvent été considéré comme un indicateur fiable de la qualité du sol. Ceci est dû aux effets positifs de la matière organique sur les propriétés physiques (structure, stabilité, porosité), chimiques (cations échangeables, capacité d'échange cationique (CEC), pH).

## Chapitre IIIC1. Matériels et méthodes essai de mise en culture au Cambodge

L'effet d'une pratique sur le statut du sol, l'hétérogénéité du sol, les risques de maladies et les contraintes du calendrier agricole pourraient bien diminuer les rendements de la biomasse végétale.

Le sol des deux sites expérimentaux de culture au Mondolkiri, est basaltique et majoritairement composé d'argiles, probablement de la kaolinite. La nature exacte de la roche mère étant inconnue et aucune analyse du sol n'ayant été faite, il a été difficile de dégager ses caractéristiques pédologiques et son intérêt agronomique. Il nous a semblé donc intéressant d'étudier dans un premier temps ces échantillons sans appliquer de transformations chimiques ou physiques.

Les objectifs de cette étude étaient de dresser les propriétés physico-chimiques du sol (le carbone organique, la CEC et la granulométrie - texture-) pour les utiliser comme indicateurs de la qualité des sols et de la durabilité des systèmes de culture dans les deux sites expérimentaux.

### **IIIC1.1.2.5 Résultats et discussion**

Les analyses physico-chimiques ont permis de caractériser les différents sols sur les deux sites et de corrélérer les différents variables. Le résultat sont données dans le tableau 27.

<b>Analyse du sol</b>	<b>Site-1</b>	<b>Site-2</b>
Sables Grossiers (0,2 à 2 mm)	4,7 ± 0,2	9,6 ± 0,1
Sables Fins (0,05 à 0,2 mm)	18,4 ± 0,1	27,9 ± 0,3
Limons Grossiers (0,02 à 0,05 mm)	4,6 ± 0,2	8,9 ± 0,5
Limons Fins (0,002 à 0,02 mm)	12,9 ± 0,3	15,0 ± 0,4
Argile (<0,002 mm)	54,3 ± 0,1	33,5 ± 0,2
pH <sub>eau</sub>	5,4 ± 0,1	5,9 ± 0,2
pH <sub>KCl</sub>	4,4 ± 0,02	5,0 ± 0,01
Carbone organique %	28,9 ± 0,02	26,6 ± 0,02
Matière Organique %	50,1 ± 0,9	45,6 ± 1,1
Azote Kjeldhal %	0,23 ± 0,2	0,25 ± 0,4
Rapport C/N	12,6 ± 0,4	10,6 ± 0,3
Capacité d'échange cationique (CEC)	12,27 ± 0,3	12,0 ± 1,4



## Chapitre IIIC1. Matériels et méthodes essai de mise en culture au Cambodge

(méq/100g de terre fine)		
Potassium échangeable $K_{\text{cmol+kg}^{-1}}$	$0,91 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$
Calcium échangeable $Ca_{\text{cmol+kg}^{-1}}$	$0,97 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,4$
Magnésium échangeable $Mg_{\text{cmol+kg}^{-1}}$	$1,5 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,5$
Rapport Mg/CEC	$12,2 \pm 0,3$	$19,1 \pm 0,2$
Rapport K/CEC	$7,4 \pm 0,5$	$8,3 \pm 0,4$
Rapport CA/CEC	$7,9 \pm 0,1$	$14,9 \pm 0,1$
Rapport K/Mg	$60,8 \pm 0,7$	$43,5 \pm 0,3$
Cuivre Cu ppm	$0,91 \pm 0,01$	$1,02 \pm 0,01$
Zinc Zn ppm	$0,43 \pm 0,02$	$1,7 \pm 0,02$
Fer Fe ppm	$14,7 \pm 0,03$	$27,5 \pm 1,1$
Manganèse Mn ppm	$11,6 \pm 0,4$	$19,4 \pm 1,3$

Tableau 27 : Résultats des valeurs moyennes d'analyses de sol

Les moyennes ont été établies à partir de trois blocs dans chacun des sites expérimentaux, sachant que les valeurs relatives à chaque bloc ne présentent pas de différences significatives.

### - Texture du sol :

La granulométrie permet d'évaluer la stabilité structurale du sol, en particulier les risques de battance, d'après la proportion existant entre les argiles et les limons, ainsi que la solidité de l'état de la structure du sol et ses résistances aux agents de dégradation<sup>[1,2]</sup>.

Le sol du site-1 appartient à la catégorie des sols argileux. Les sols argileux contiennent plus de 25 % d'argile. Ce sont généralement des sols riches qui retiennent bien l'eau et les éléments nutritifs. Ils sont toutefois mal aérés, mal drainés et ils ont tendance à être alcalins. De plus, ils sont difficiles à travailler, ils se réchauffent lentement au printemps et ils se compactent facilement<sup>[3]</sup>.

Le sol du site-2 est classé parmi la catégorie des sols sableux limono-argileux. Il contient de 20 à 35 % d'argile, moins de 28 % de limon et 45 % ou plus de sable. Les sols sableux sont principalement constitués de sables grossiers. Ces sols se travaillent bien et se réchauffent rapidement au printemps. Ils offrent une bonne aération et un bon drainage.

Les sols limoneux sont surtout formés de sables fins et de limons. Ces sols sont «battants», c'est-à-dire qu'ils ont tendance à former une croûte en surface sous l'effet des pluies et des arrosages, ce qui les rend imperméables à l'eau et l'air. Ils se colmatent aussi

très facilement, ce qui a pour effet d'asphyxier les racines des végétaux et l'activité des organismes vivants du sol<sup>[1-3]</sup>.

En raison de son caractère argileux, le sol du site-1 est plus lourd, et plus compact donc peut engendrer des phénomènes d'asphyxie racinaires. A l'inverse, le sol du site-2 est davantage sableux et apparaît donc plus équilibré et propice au développement des végétaux.

#### **-Acidité**

Les  $pH_{eau}$ ,  $pH_{KCl}$  permettent de mesurer le degré d'acidité ou d'alcalinité d'un sol. Les deux sols sont globalement de nature acide (~5,5), ce qui correspond aux conditions idéales de croissance de *artemisia annua*. Toutefois, notons que le sol du site-1 présente une acidité plus élevée que celui du site-2.

#### **-Teneur en matière organique**

La matière organique contribue à la structure du sol et à une bonne alimentation des végétaux. Il est donc logique que la quantité nécessaire de matière organique soit en rapport avec la quantité d'argile. La matière organique renferme à la fois du carbone et de l'azote dans des proportions qui varient avec son état de décomposition (rapport C/N, carbone/azote). Un rapport correct C/N, compris entre 9 et 12, indique un sol sain où la vie microbienne est active, la matière organique bien décomposée, c'est-à-dire un humus stable<sup>[5,6]</sup>.

Compte tenu du fait que le pourcentage de carbone organique des sols argileux classiques est d'environ 30 %, on peut affirmer que les sols des sites 1 et 2 sont particulièrement riches en matière organique (site 1 : 50 %, site 2 : 45 %). Ces taux élevés peuvent être liés à l'historique du sol (ancien marécage) mais aussi à la présence de carbone fossile important. Cependant, le caractère acide que présentent les deux sites réduit l'activité microbienne qui induit une modification des formes de matières organiques<sup>[6]</sup>.

**Au niveau du rapport carbone/azote**, nous pouvons remarquer que le site-1 et le site-2 ont de bons rapports C/N, ce qui leur confère une bonne activité.

#### **-Capacité d'échange cationique (CEC).**

Les cations jouent un rôle important dans le sol. Ils n'interviennent pas seulement en tant qu'éléments nutritifs, mais, ont aussi un rôle essentiel dans le statut acide du sol, le maintien de l'activité biologique générale et de la structuration du sol. Leur caractérisation

d'analyse est la capacité d'échange cationique (CEC), ou quantité maximale de cations de toutes sortes qu'un poids déterminé de sol (habituellement 100g) est capable de retenir<sup>[6]</sup>

Il est possible de distinguer 3 types de sols selon leur % de CEC<sup>[7]</sup> :

- CEC < 10 méq : le sol a une faible possibilité de stockage et il est indispensable de faire des apports réduits d'engrais à chaque épandage.
- CEC > 15 méq : le sol a un gros réservoir de stockage et avant de le fertiliser, il faut vérifier que la plante a vraiment des besoins très importants.
- CEC entre 10-15 méq : le sol est apte à libérer les éléments minéraux en quantités normales. La fertilisation consiste à réapprovisionner le sol après avoir observé la diminution des réserves dans la CEC.

Il apparaît donc que le site 1 aussi bien que le site 2, qui possèdent une CEC de 12, constituent des sols ayant de bonnes réserves en éléments minéraux.

#### **-Teneur en sels minéraux**

Dans les sols cultivés, les rapports quantitatifs entre les cations ont une très grande importance. Il est essentiel de maintenir un équilibre nutritionnel entre les cations bivalents ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) et monovalents ( $\text{K}^+$ )<sup>[7,8]</sup>. Le calcium est généralement présent en quantité suffisante pour assurer les besoins des plantes cultivées. Le magnésium et le potassium sont deux cations indispensables à la vie des plantes : Mg en tant que cofacteur de plusieurs enzymes et élément constitutif de la chlorophylle, K comme agent catalytique de la synthèse des glucides et du transfert des divers nutriments<sup>[9]</sup>.

Les deux sites atteignent une teneur suffisante en sels minéraux et les rapports sels minéraux - capacité d'échange cationique (CEC) sont convenables. En particulier le sol du site 2 possède une teneur en calcium et en magnésium presque deux fois plus élevée que celui du site 1. Or le calcium et le magnésium sont des éléments minéraux essentiels au développement végétatif des plantes.

#### **-Tenure en oligo-élément**

Les oligo-éléments sont indispensables à la vie des plantes et des micro-organismes du sol. Certains sont prélevés sous la forme cationique ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) et d'autres sous la forme anionique (B, Mo). Bien qu'ils n'interviennent qu'à faible dose, leur rôle physiologique est considérable. Ils occupent, en effet, des sites actifs au sein des enzymes des micro-organismes et de la plante : enzymes respiratoires (Cu, Fe), enzymes de la

### Chapitre IIIC1. Matériels et méthodes essai de mise en culture au Cambodge

photosynthèse (Mn, Fe, Zn, Cu) et de la réduction des nitrates absorbés par les plantes (Fe, Mo)<sup>[9]</sup>.

Le caractère acide des sols des deux sites accorde une meilleure disponibilité en oligo-éléments, ce qui explique le fort pourcentage remarqué. La teneur en zinc est plus faible pour le site 1 (0,43 ppm) et le site 2 (1,7 ppm).

Les sols étudiés sont, en général, assez pauvres en cuivre. Les teneurs relevées sont pratiquement toutes en dessous de 2 ppm, cette valeur représentant le seuil critique en cuivre. Ces faibles teneurs reflètent les fortes teneurs en calcaire de ces sols. En effet, la richesse des sols en calcaire actif entraîne une insolubilisation des oligo-éléments et diminue leur assimilabilité<sup>[8]</sup>.

Les teneurs en fer sont élevées, généralement supérieures à 10 ppm, respectivement 15 et 27 ppm pour le site 1 et le site 2.

Les teneurs en manganèse sont relativement élevées (12 ppm pour le site 1 et 20 ppm pour le site 2). Le cuivre, le manganèse et le fer jouent un rôle important dans l'humification car ils catalysent les processus d'oxydation des polyphénols<sup>[24]</sup>.

## **CHAPITRE IIIC2**

### **Essai de mise en culture au Sénégal**

## IIIC2. Essai de mise en culture au Sénégal

### IIIC2. 2.1 Historique du projet

Le programme proposé doit permettre le développement de l'utilisation de la plante *Artemisia annua* comme remède au paludisme, suivant les recommandations de l'OMS de «valoriser les ressources locales de santé et les médicaments à base d'artémisinine». Pour cela, plusieurs étapes sont nécessaires : permettre la mise en culture de la plante au Sénégal, son étude phytochimique et la formation de personnes-relais sur les aspects de culture et de préparation du médicament.

Dans le cadre du projet de mise en culture de l'*Artemisia annua*, la mise en place de cultures expérimentales au Sénégal permet d'explorer les potentialités de cultiver la plante dans un pays fortement touché par le paludisme. Cette étude est réalisée parallèlement à celle du Cambodge afin de comparer les résultats dans deux régions concernées par les problématiques liées au traitement du paludisme.

Ce projet a été réalisé en partenariat avec l'O.N.G. sénégalaise ENDA et l'université Cheikh Anta Diop de Dakar. Le partenariat avec l'université de Dakar se déroule dans le cadre de l'AUF, et permettra de comparer les résultats obtenus au Cambodge et au Sénégal. Ainsi toute la logistique et la conception du programme ont été pris en charge par ENDA et l'université de Dakar.

### IIIC2. 2.2 L'objectif général du projet

L'objectif général du projet est l'étude de la mise en culture et de l'utilisation thérapeutique de *Artemisia annua* (AA) au Sénégal,

Les objectifs spécifiques sont :

1. Une étude agronomique de la plante dans plusieurs conditions de culture (en conditions expérimentales et dans le cadre d'un projet pilote en conditions rurales)
  - Connaître le rendement (biomasse de feuilles fraîches/sèches ; teneur en artemisinine ; rendement/ha)
  - Proposer un itinéraire technique (date de semis, bouturage, période récolte)
  - Connaître le potentiel de production pour différents sites
  - Evaluer les meilleures options pour développer la culture d'AA en fonction de l'encadrement technique requis et des objectifs.
2. Une validation de l'efficacité thérapeutique d'AA sous forme d'infusion

3. Une étude de marché (coût de production, lieu de distribution, public cible)
4. Une information du public sur l'utilisation d'AA

### **IIIC2.2.3 La résistance aux antipaludiques au Sénégal**

La résistance à la chloroquine a été détectée au Sénégal pour la première fois *in vitro* en 1984 puis *in vivo* en 1987, d'abord en Casamance (région de Mlomp). Elle atteint aujourd'hui plus de 50% dans cette région et a également gagné la majeure partie du pays entraînant une recrudescence de la mortalité palustre, surtout chez les enfants de moins de 5 ans<sup>[11,12]</sup>. On observe actuellement un taux d'échec thérapeutique supérieur à 25% dans 4 sites sentinelles (taux en constante augmentation) et une résistance parasitologique *in vitro*<sup>[11]</sup> variant de 30 à 60%<sup>[13]</sup>. Pour le chloroquine/amodiquine, actuellement, les échecs thérapeutiques sont de l'ordre de 3 à 7% mais l'apparition rapide de la résistance, dès son introduction et les taux actuellement observés en Afrique de l'Est, font craindre le pire<sup>[14]</sup>.

### **IIIC2.2.4 Localisation de la mise en culture**

Les essais expérimentaux ont été effectués au jardin botanique du centre Madésahel à Mbour et au jardin botanique de l'université Cheikh Anta Diop à Dakar. ENDA-Madésahle (méthodes appliquées au développement du sahel) fait partie de l'Association des Jardins Botaniques de France et des pays francophones. Un essai villageois est de plus mené dans le périmètre maraîcher des fermes de la région des Niayes.

Pour cela des tests ont été prévus dans le jardin de plantes du Centre Madésahel avec des parcelles arrosées respectivement à l'eau de robinet et à l'eau de puits. D'autres tests devraient être faits dans un village sous la supervision de femmes. Cette première phase est composée de deux étapes de trois mois chacune et avait débuté en juillet 2004.

### **IIIC2.2.5 Semis et élevage des plantules**

Le semis a été réalisé dans un bac en bois de 3 cm en sachets individuels. Ils ont été remplis avec un mélange sable/compost (50/50) préalablement bouilli afin d'éliminer les graines adventices. Environ 400 graines d'Anamed ont été semées le 02 juin 2004 dans les 2 pépinières. Elles ont été recouvertes par un film plastique :

- 20 plantes ont été séparées en sachets pour l'expérimentation 1 (effet des eaux d'arrosage),
- 10 plantes sont arrosées avec de l'eau plate

- et 10 plantes avec eau du puits.

La pépinière est arrosée tous les jours à l'aide d'un vaporisateur afin de conserver une atmosphère toujours humide. 26 jours après avoir été mis en pots, les plants sont transplantés sur chacun des deux sites. Ils sont arrosés tous les jours après la transplantation pendant une semaine, puis la fréquence d'arrosage est diminuée, tous les 2 jours puis tous les 3 jours.



## **CHAPITRE IIIC3**

### **Méthodes d'analyses**

### IIIC3. Methodes d'analyses

#### IIIC.3.1 Echantillonnage du matériel végétal

La quantité en artémisinine a été déterminée sur des échantillons de *Artemisia annua* sèches du Cambodge à différents stades de développement physiologique (figure 38) :

- en bourgeons : apparition des bourgeon (A)
- à l'apparition des fleurs (environ 50% de fleurs mures) (B),
- à pleine floraison (100% de fleurs mures) (C).

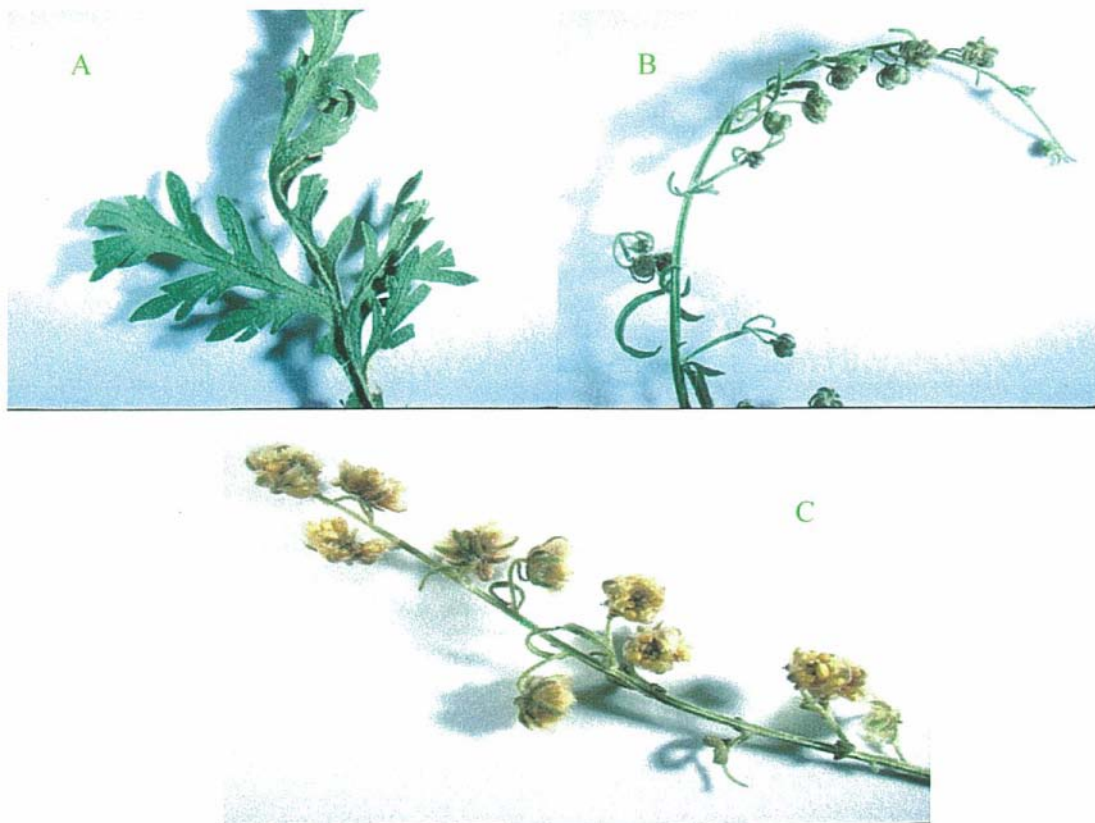


Figure 38 : Stades physiologiques de récolte d'*Artemisia annua* (A : feuille au stade bourgeon, B : inflorescence au stade 50% de floraison et C : à 100% de floraison) (Source : Endrias).

et de la date de récolte (février, mars et avril 2004), par site expérimental et leur modalités de culture. Environ 90 échantillons ont été extraits, tous les échantillons utilisés sont donc issus de plantes récoltées au champ, séchées durant une dizaine de jours entre 35 et 40 °C, effeuillées,

puis finement moulues. Chaque analyse comporte donc 4 parties : la biomasse foliaire générale et les 3 échantillons. Nous avons effectué une mesure de la masse de chacune des ces 4 parties à l'aide d'une balance. Un échantillon représente la biomasse foliaire sèche d'un individu, ainsi pour chaque analyse les 3 plantes prélevées au cours de la récolte constitue un échantillon. Le rendement en artémisinine est aussi lié à la quantité de biomasse produite. Le rendement correspond à la quantité d'artémisinine produite pour 1 ha, et représente par la formule :

$$Y = \text{masse de matière sèche (kg/ha)} \times \text{teneur en artémisinine (g/kg)}$$

### IIIC.3.2 Choix de la méthode d'analyse de l'*Artemisia annua*

Pour notre étude de la production d'artémisinine dans l'*Artemisia annua* pour les deux sites expérimentaux, il nous fallait disposer de techniques d'analyse de la teneur en artémisinine à partir d'échantillons de plantes. Il convenait de trouver une méthode alliant les avantages d'une précision suffisante avec une mise en oeuvre rapide, permettent d'effectuer un grand nombre d'analyses.

La technique chromatographie liquide à haute pression, avec détection électrochimique (CLHP-EC), est certainement la méthode d'analyse de l'artémisinine la plus sensible et la plus sélective. L'utilisation d'un tel détecteur exige cependant un appareillage particulier, car l'ensemble du système doit être totalement exempt d'oxygène (tuyauterie en acier inoxydable, chauffage et dégazage continu de la phase mobile)<sup>[15]</sup>. Par ailleurs, la préparation de l'électrode de détection, de même que la stabilisation du système de détection nécessite beaucoup de temps. Enfin, chaque échantillon doit également être dégazé avant l'injection.

Une difficulté majeure de l'artémisinine, due fait de l'absence de chromophore dans la molécule, c'est qu'elle ne réagit que très faiblement aux UV.

Il s'agit donc d'une méthode délicate d'utilisation, peu adaptée à la réalisation de grandes séries d'analyses en un court laps de temps, nécessaires aux travaux de sélection. Pour ces derniers, nous avons finalement opté pour la méthode par chromatographie sur couche mince avec quantification par densitomètre. Une analyse complémentaire de l'*Artemisia annua* du Cambodge a été effectuée par chromatographie liquide haute pression couplée à la spectrométrie de masse

### **IIIC.3.3 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)-Densitométrie**

#### **IIIC.3.3.1 Extraction de l'*Artemisia annua***

La méthode CCM s'inspire de celle décrite par Delabays<sup>[12,54]</sup>. 100 mg de feuilles et de fleurs sèches sont réduites en poudre puis mixées pendant 30 secondes dans 5 ml de toluène. L'extrait est centrifugé (3770 tours/minute) durant cinq minutes. La concentration en artémisinine est établie en se référant à la droite d'étalonnage.

#### **IIIC.3.3.2 Solution standard**

Une solution mère d'artémisinine à 1 mg/ml est préparée dans du toluène. Cinq standards sont préparés à partir de cette solution pour être déposés sur la plaque de silice. Leurs concentrations en artémisinine sont de 50, 100, 150, 200, et 250 ng/μL. La lecture se fait au densitomètre. La droite d'étalonnage est tracée en rapportant la concentration en artémisinine à la surface de la tache du spot (fig. 40).

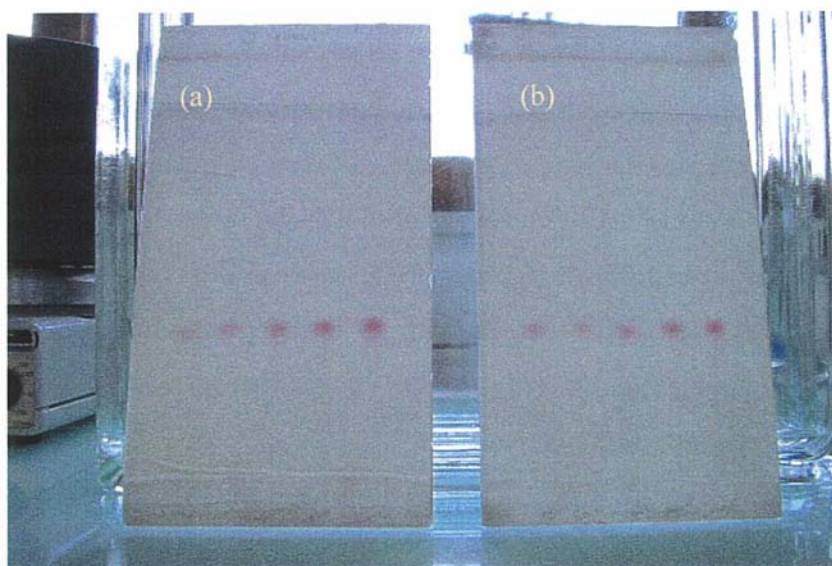
#### **IIIC.3.3.3 Dosage de l'artémisinine par (CCM) densitomètre**

2,0 μl d'extrait sont déposés automatiquement sur une plaque avec gel de silice (10x20 cm), 5 dépôts par plaque ont été effectués à 15 mm du bord inférieur de la plaque, à 20 mm, à 35 mm, à 50 mm, à 65 mm, 80 mm de largeur. L'éluant de migration est composé d'un mélange d'hexane et d'éther diéthylique. La migration dure 60 minutes. La révélation s'effectue en immergeant la plaque pendant 10 secondes dans une solution composée d'acide acétique, d'acide sulfurique et d'anisaldéhyde, puis en la disposant pendant 10 minutes sur une plaque chauffante réglée à 100°C (tableau 28).

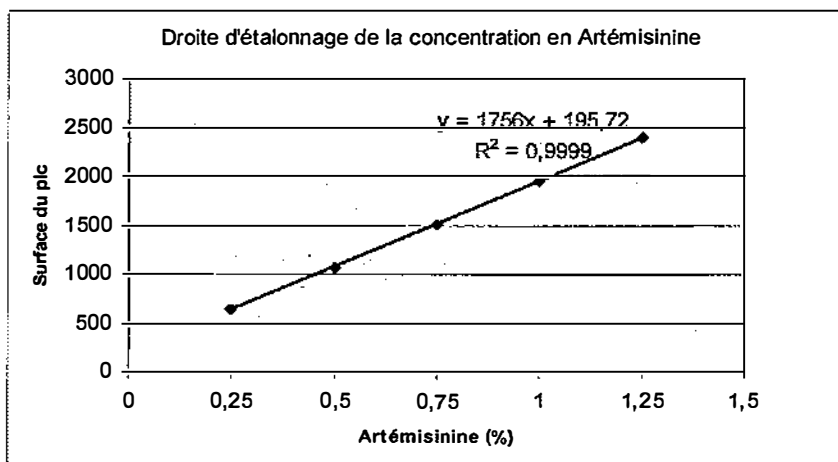
Le dosage est réalisé par densitomètre à l'aide d'un scanner Camag (Camag tlc scanner), couplé à un logiciel. La lecture se fait en absorbance à une longueur d'onde de 530 nm, en utilisant une lampe au tungstène.

Plaque	Plaque recouverte de silice 60 F <sub>254</sub> (Merk), 25 µm
Application	10x20 cm
Application	Dépôts automatiques
Quantité	2 µl
Position	Les spots sont déposés à 15 mm du bord inférieur de la plaque
<b>Migration</b>	
Solvants	24 mL <i>n</i> -hexane et 20 mL diéthyl éther
Distance	4,5 cm
Cuve	Cuve à double compartiment
Type	Linéaire ascendante
Saturation	Une paroi de la cuve est tapissée de papier buvard. La plaque déposée dans le compartiment vide est conditionnée dans la vapeur des solvants durant 30 minutes. La chromatographie débute lorsque la cuve est inclinée de façon à remplir le deuxième compartiment du mélange de solvants.
<b>Révélation</b>	
Révéléateur	200 mL d'acide acétique 4 mL d'acide sulfurique 2 mL d'ansaldéhyde
Technique	Immersion
Température	100 °C
Dépôts automatiques	DESAGA TLC-Applicator AS 30
Densitomètre	DESAGA CD 60

Tableau 28 : Mode opératoire de la chromatographie sur couche mince et densitomètre



Figures 39 (a) standards d'artémisinine en (%) (b) extraites d'*artemisia annua* Sur une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) .



Figures 40 : Droite d'étalonnage de la concentration en artémisinine soumise au densitomètre

Une analyse complémentaire de l'*Artemisia annua* du Cambodge a été effectuée par chromatographie liquide haute pression couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS/MS), et qui n'a montré aucune différence significative avec le méthode CCM-densitometrie et confirme les résultats obtenus. (Configuration LC-MS/MS en Annexes.)

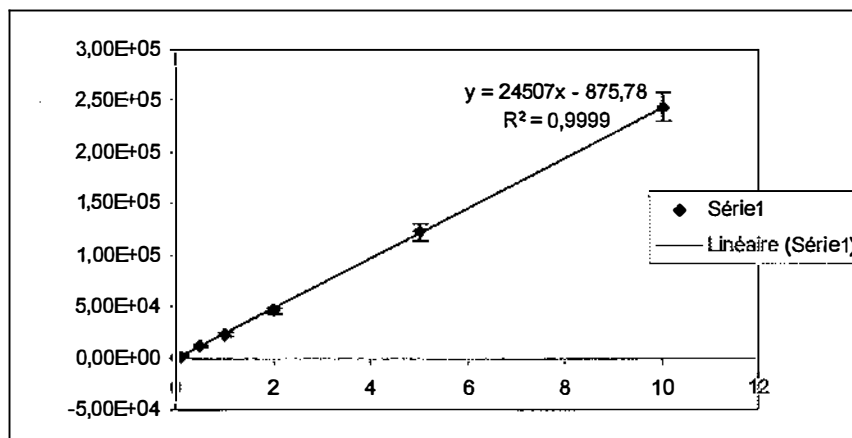


Figure 41: Droite d'étalonnage pour l'analyse quantitative de l'artémisinine par LC-MS/MS

## **IIIC.4 Analyses statistiques**

L'analyse de variance est utilisée de façon à mettre en évidence des différences entre traitements pour un paramètre donné. La variance a été analysée à deux ou trois niveaux afin de dégager les effets des principaux facteurs et ceux des interactions entre facteurs, incluant le stade physiologique, la date de récolte et le site expérimental, les modalités de culture, le nombre de jours entre la transplantation et la récolte et leurs interactions sur la teneur en artémisinine et le rendement en artémisinine.

Le test de Newman & Keuls a permis d'analyser statistiquement la différence entre moyennes avec un seuil de tolérance à 5; 1 et 0,1 % lorsque l'effet est significatif. Les analyses de variance ont été réalisées grâce au logiciel Sigmastat (Version 2,0 USA)

## **IIIC.5 Analyses des sols (Cambodge)**

### **IIIC.5.1 Le prélèvement et analyses de sols**

Le prélèvement de sol se situe dans deux sites expérimentaux au Mondolkiri Cambodge. Un échantillon est constitué par le mélange de 3 blocs de prélèvements répartis sur une jugée homogène. Le sol de chaque site a été recueilli à une profondeur de 0 à 10 cm. Les échantillons ont été séchés à 100 °C pendant 24 h.

### **IIIC.5.2 Granulométrie**

Il s'agit de la mise en suspension des particules minérales d'un échantillon de terre fine et stabilisation de cette suspension en particulier après destruction des agrégats par l'attaque à l'eau oxygénée. Par la suite, les particules sont dispersées à l'aide d'un dispersant alcalin (Héxamétaphosphate de sodium). La séparation des différentes classes de particules est réalisée par sédimentation et par gravité pour les fractions fines (<50µm) et par tamisage pour les fractions supérieures. Le prélèvement des fractions fines est effectué à la pipette ( Argile, limon fin et limon grossier). Les résultats sont exprimés en % de la terre fine.

### **IIIC.5.3 pH et conductivité électrique**

Le pH est déterminé selon la norme française (ISO10390) sur une suspension de sol préparée dans cinq fois son volume. Puis agitation pendant 5 minutes un échantillon de 5 mL de sol dans 20 mL d'eau. Ensuite la lecture du pH est notée après deux heures par pH/mV-mètre (pH330/SET). La conductivité électrique, exprimée en µS/cm, est mesurée par conductimètre (LF330/SET).

### **IIIC.5.4 La Matière organique**

La détermination de la matière organique est faite selon la méthode (AFNOR). L'oxydation d'un échantillon de sol par le bichromate de potassium en milieu acide, et le dosage en retour de l'excès du potassium par du sel du Mohr permettent de déterminer le carbone organique (Corg). La matière organique est obtenue en multipliant le (Corg) par un facteur (1,82) et est exprimée en %.

### **IIIC.5.5 L'Azote total par la méthode Kjeldahl**

Un échantillon contenu dans une papillote de papier est minéralisé en présence de 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré et d'une pastille de catalyseur Cu-Se (Kjeltabs, perstrop Analytical : 1,65 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, 16mg Se/pastille). La minéralisation est réalisée à froid pendant environ 12 heures, puis à chaud dans un minéralisateur (1016 Digester, Tecator). La récupération des produits de minéralisation et le dosage de l'ammoniac sont faits automatiquement par l'appareil Kjelytec auto 1030 analyser, Tecator. L'azote est exprimé en milligrammes par gramme.

### **IIIC.5.6 La capacité d'échange cationique**

La capacité d'échange cationique (CEC) et le taux de saturation en cations échangeables sont déterminés au pH du sol à l'aide d'une solution de chlorure de baryum, à faible concentration ionique selon la norme française (ISO11260). Les cations échangeables après extraction sont dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer Analsts 100) : le potassium (K) à flamme (air/acétylène) à la longueur d'onde  $\lambda = 766,5$  nm ; le calcium (Ca) à flamme (air/acétylène) à la longueur d'onde  $\lambda = 422,7$  nm ; le (Mg) à flamme (air/acétylène) à la longueur d'onde  $\lambda = 285,2$  nm. Ces cations échangeables sont exprimées en centimoles de charges positives : kg (cmol<sup>+</sup>/kg) et en % de la CEC.

La CEC est déterminée après saturation du sol par une solution du sulfate de magnésium (0,1N) et aussi dosage du magnésium qui reste en excès. La CEC est exprimée en centimoles de charges positives/ kg de sol (cmol<sup>+</sup>/kg).



### IIIC.5.7 Dosage des micro-éléments : Fer, Cuivre, Zinc et Manganèse

L'extraction des formes solubles de cuivre (Cu), de fer (Fe) de zinc (Zn) et de manganèse (Mn) est effectuée dans une solution mixte, ajustée à pH 7,3 de triéthanolamine (TEA, de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) d'acide diéthylènetriamine -pentaacétique (DTPA) et dans un rapport prise d'essai/solution égal à  $\frac{1}{2}$  (M/V).

Le dosage est réalisé par spectrophotométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer Analsts 100) : le fer à flamme (air /acétylène) à la longueur d'onde  $\lambda = 248,3$  nm; le cuivre à flamme (air/acétylène) à la longueur d'onde  $\lambda = 324,7$  nm ; le zinc à flamme (air/acétylène) à la longueur d'onde  $\lambda = 213,9$  nm. Le manganèse à la flamme (air/acétylène) à la longueur d'onde  $\lambda = 279,5$  nm. Les micro-éléments sont exprimés en ppm.

### IIIC.6 Méthodes de distillation-extraction

L'étude comparative des extractions a été effectuée avec des feuilles sèches d'*Artemisia annua* du Cambodge sur des plantes aux trois différents stades de développement décrits précédemment. Chaque manipulation a été préparée en deux exemplaires. L'analyse qualitative a été réalisée par spectromètre de masse couplé à un chromatographe en phase gazeuse (CPG/SM).

#### IIIC.6.1 L'hydrodistillation

L'échantillon a été préparé avec 30 grammes d'*artemisia*, bourgeons, 50% de fleurs, et 100% de fleurs dans 200 mL d'eau en deux exemplaires. L'hydrodistillation a suivi le même protocole que celui décrit au (IIB.2.1) et précisé dans la partie « matériels et méthodes » sur l'hibiscus.

#### IIIC.6.2 Conditions d'analyse de CPG/SM

Les chromatogrammes ont été obtenus sur un spectromètre de masse (MS) TRACE 2000 Finnigan, couplé à un chromatographe en phase vapeur (CPG), équipé d'une colonne RTX 5 Resteck, de paramètres 30m \* 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ . La composition de la phase stationnaire a été de 5 % diphenyle et 95 % diéthyl polysiloxane. Des identifications ont été menées.

**Paramètres utilisés :**

- CPG/SM : TRACE 2000 Finnigan
- Colonne: RTX-5 Resteck 5 % diphényle et 95 % diéthyle polysiloxane
- Température initiale : 50 °C (1min)
- Température finale: 200 °C
- Gradient de température : 3 °C/minutes
- Délai : 5 minutes
- Injecteur mode splitless : 250 °C
- Gaz vecteur : 1,2 mL/minutes
- Mode d'ionisation : impact électronique (EI+)
- Tension du détecteur : 350 V
- Type d'acquisition : TIC

L'identification des composés a été réalisée sur la base de comparaison des spectres de fragmentations obtenus avec ceux de la banque de données WILEY 275. Le spectre de fragmentations correspond à une répartition des ions regroupés aux valeurs nominales entières les plus proches de leur masses réelles et dont les intensités sont exprimées en % d'intensité du pic le plus intense, appelé pic de base.

**IIIC.6.2 Méthode des indices de rétention**

Le terme d'indice de rétention est utilisé lorsque les analyses sont pratiquées avec une programmation de température. L'appellation "indice de Kovats" est réservée à celles réalisées en condition isotherme. Une fois les deux indices calculés, on les compare avec ceux détenus en référence pour le même appareillage et dans des conditions opératoires identiques. On parvient ainsi à présumer l'identification de composés préalablement identifiés dans d'autres produits.

L'indice de rétention est calculé selon la formule suivante :

$$I_R = 100 \frac{T_{R(i)} - T_{R(z)}}{T_{R(z+1)} - T_{R(z)}} + 100 \cdot Z$$

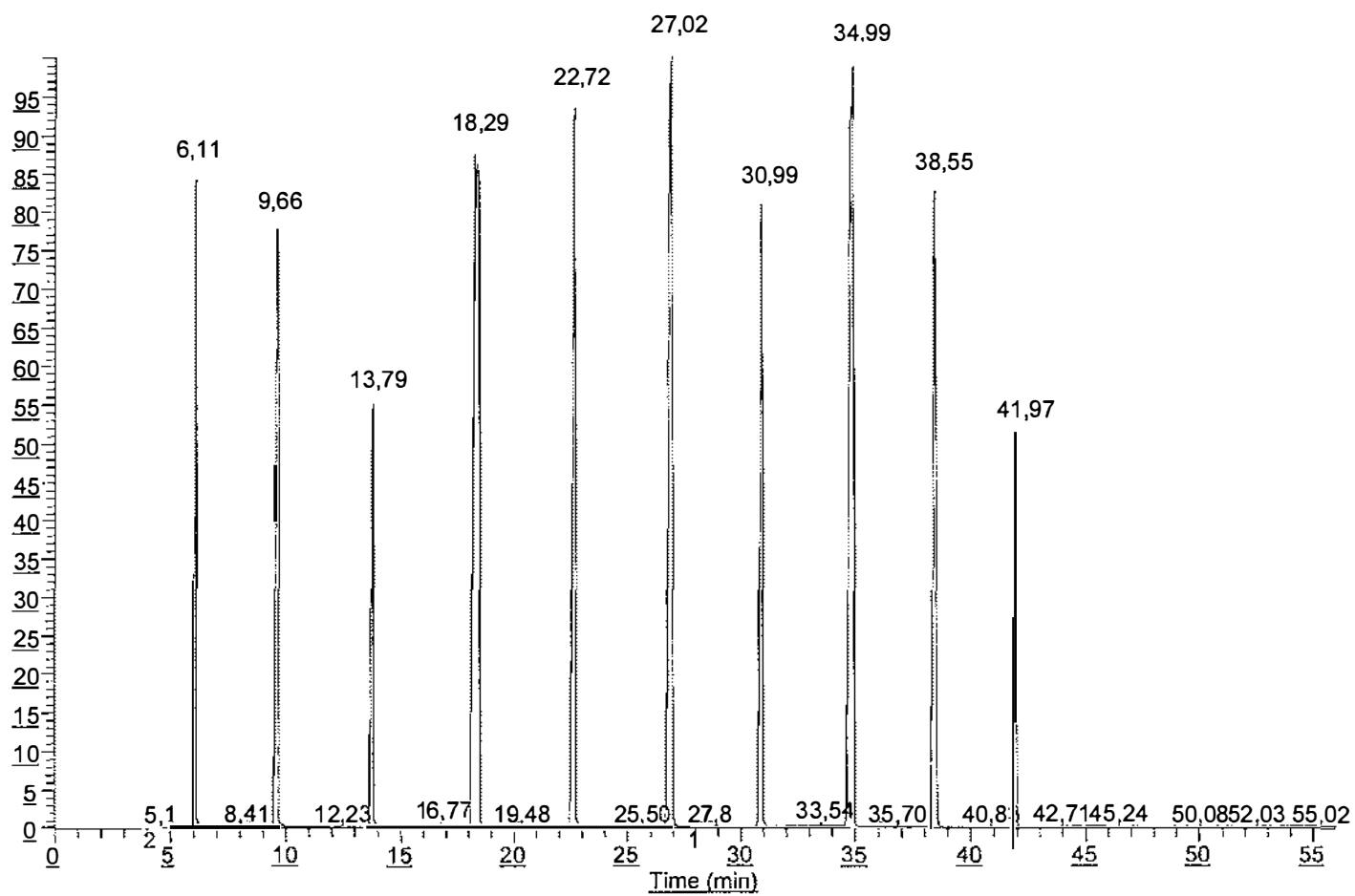
$T_{R(i)}$ : temps de rétention du composé i.

$T_{R(z)}$ : temps de rétention de l'alcane z

$T_{R(z+1)}$ : temps de rétention de l'alcane z+1

Z : nombre d'atomes de carbone de l'alcane z.

Figures 42: Chromatogramme d'alcane (C<sub>9</sub> à C<sub>18</sub>)



## CHAPITRE III

### Résultats et discussion : *Artemisia annua*

## IIID. Résultats et discussion sur *Artemisia*

### IIID1.1 Cultivée au Cambodge

#### IIID1.1.1 Effets des modalités de culture sur la production d'artémisinine extraite des fleurs

L'analyse de variance montre l'effet des 3 facteurs mis en œuvre lors de nos expérimentations (date de récolte, site expérimental et stade physiologique) (tableau 29). Elle révèle un effet hautement significatif du stade physiologique et du site expérimental et un effet significatif de la date de récolte sur la teneur en artémisinine. Seule l'interaction "site" par stade "physiologique" présente un effet significatif sur le pourcentage d'artémisinine.

	Date de récolte	Site	Stade physiologique	DR*S	DR*SP	S*SP	DR*S*SP	Résidus
MS	0,0077	0,046	0,046	0,00019	0,0023	0,0079	0,00048	900,18
p	*	***	***	NS	NS	*	NS	

- : significatif pour  $p < 0,005$  ; \*\*significatif pour  $p < 0,01$  ; \*\*\* significatif pour  $p < 0,0001$  ; NS: non significatif ; MS : Mean Square ; p: valeur de probabilité

Tableau 29: Effets de la date de récolte (DR), du site (S), du stade physiologique (SP) et de leur interaction sur la teneur en artémisinine (%/matière sèche)

	Date de récolte	Site 1				Site 2			
		01/02	01/03	10/04	moyenne	01/02	01/03/	10/04	moyenne
Stade physiologique	Bourgeon	0,85 a	0,83 a	0,82 a	<b>0,83 a</b>	0,86 a	0,85 a	0,85 a	<b>0,85 a</b>
	50% floraison	0,61 b	0,64 b	0,59 b	<b>0,61 b</b>	0,71 b	0,71 b	0,65 b	<b>0,69 b</b>
	100% floraison	0,55 c	0,57 c	0,55 bc	<b>0,56 c</b>	0,58 c	0,60 c	0,57 c	<b>0,58 c</b>
<b>moyenne</b>		<b>0,67 a</b>	<b>0,68 a</b>	<b>0,65 a</b>	<b>0,67 b</b>	<b>0,72 a</b>	<b>0,72 a</b>	<b>0,69 a</b>	<b>0,71 a</b>

Pour chaque site, les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de  $\alpha=5\%$ .

En gras, figurent, par site, les valeurs moyennes des valeurs obtenues pour les 3 dates de récolte (ligne) et les 3 stades physiologiques (colonne).

En grisé, figurent les valeurs moyennes entre site quels que soient la date de récolte et le stade physiologique.

Tableau 30: Effets du stade physiologique et de la date de récolte par site expérimental sur la teneur en artémisinine (%).

Le tableau 30 présente l'impact des facteurs «stade de développement physiologique» (bourgeon, 50% floraison et 100% floraison) et de la date de récolte (février, mars et avril 2004) par site expérimental et de leur interaction sur la teneur en artémisinine.

Il apparaît que la moyenne du pourcentage d'artémisinine est significativement plus élevée lorsque les plantes sont cultivées sur le site 2 par rapport au site 1, quels que soient le stade physiologique de prélèvement et la date de récolte.

Il existe un gradient dans la teneur en artémisinine en fonction de l'âge des fleurs (stade physiologique), quels que soient le site de culture et la date de récolte. En effet, plus les fleurs sont immatures, plus la teneur en artémisinine est importante (site 1 : 0,85 ; 0,69 et 0,58% ; site 2 : 0,83 ; 0,61 ; et 0,56% pour les bourgeons, 50% floraison et 100% floraison respectivement). La teneur en artémisinine diminue avec l'apparition des fleurs. La date de récolte de la matière végétale n'influence pas la teneur en artémisinine quels que soient le site de culture et le stade physiologique.

### IIID1.1.2 Effets des modalités de culture sur la production d'artémisinine extraite des feuilles

Caractéristiques	RP	2p	4p	Ni	S2
Plante/m <sup>2</sup>	1	2	4	1	1
Irrigation	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Site	1	1	1	1	2
Fertilisation	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Travail du sol	Oui	Oui	Oui	Oui	Non

(RP, 2p,4p,Ni, S2 : abréviations des modalités de culture)

Tableau 31: Rappel des Modalités de culture

L'analyse de variance montre un effet hautement significatif du nombre de jours entre la transplantation et la récolte sur la teneur et le rendement en artémisinine; tandis que les modalités de culture influencent uniquement le rendement en artémisinine (tableau 32).

Variable		Modalités de culture (MC)	Nombre de jours entre la transplantation et la récolte (NJ)	MC *NJ	Résidus
Teneur en artémisinine	MS	0,0041	0,072	0,00083	0,34
	p	NS	***	NS	
Rendement en Artémisinine	MS	18,79	61,59	5,33	2,76
	p	***	***	***	

\* : significatif pour  $p < 0,005$  ; \*\*significatif pour  $p < 0,01$  ; \*\*\* significatif pour  $p < 0,0001$  ; NS: non significatif; MS : Mean Square ; p: valeur de probabilité

Tableau 32: Effets des modalités de culture (MC) et du nombre de jours (NJ) entre la transplantation et la récolte et de leur interaction sur la teneur (% de la matière sèche) et le rendement (kg/ha) en artémisinine

a)

Teneur en artémisinine		Nombre de jours entre la transplantation et la récolte			
		70	100	140	<b>moyenne</b>
Modalités de culture	RP	0,85 a	0,83 a	0,82 a	<b>0,83 a</b>
	2P	0,77 b	0,72 b	0,76 b	<b>0,64 b</b>
	4P	0,75 b	0,76 b	0,76 b	<b>0,75 b</b>
	NI	0,73 b	0,70 b	0,70 b	<b>0,71 b</b>
	S2	0,87 a	0,86 a	0,85 a	<b>0,86 a</b>
<b>moyenne</b>		<b>0,79 a</b>	<b>0,67 a</b>	<b>0,68 a</b>	

b)

Rendement en artémisinine par surface foliaire		Nombre de jours entre la transplantation et la récolte			
		70	100	140	<b>Moyenne</b>
Modalités de culture	RP	0,77 g	1,36 f	2,31 d	<b>1,48 d</b>
	2P	1,88 e	2,02 e	2,47 d	<b>2,12 c</b>
	4P	2,26 d	2,60 c	3,36 b	<b>2,74 b</b>
	NI	0,39 h	0,19 h	0,45 h	<b>0,34 e</b>
	S2	2,68 c	5,90 b	7,33 a	<b>5,30 a</b>
<b>moyenne</b>		<b>1,60 c</b>	<b>2,41 b</b>	<b>3,18 a</b>	

Les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de  $\alpha=5\%$

Tableau 33: Effets de la modalité de culture et du nombre de jours entre la transplantation et la récolte sur la teneur (% de la matière sèche) (a) et le rendement (kg/ha) (b) en artémisinine.

La modalité S2 permet d'obtenir le rendement en artémisinine le plus élevé pour toutes les durées entre la transplantation et la récolte (5,30 kg/ha). Plus la durée entre la transplantation et la récolte est longue, plus le rendement en artémisinine est élevé (3,18 ; 2,41 et 1,60 pour 140, 100 et 70 jours respectivement). Ce résultat peut s'expliquer par la biomasse végétative dont le rendement est maximal dans le cas où les plantes sont récoltées 140 jours après leur transplantation (30,8 ; 24,4 et 13,8 pour 140, 100 et 70 jours respectivement) (Tableau 34).

Nombre de jours entre la transplantation et la récolte		70	100	140	<b>Moyenne</b>	Ecart type
Modalités de culture	RP	9,85 b	17,9 c	21,7 b	<b>16,48</b>	6,05
	2p	13,5 b	15,3 b	18,1 b	<b>15,63</b>	2,32
	4p	8,31 b	9,43 b	12,3 b	<b>10,01</b>	2,06
	NI	3,62 c	2,87 d	6,64 c	<b>4,38</b>	2,00
	S2	33,6 a	76,5 a	95,4 a	<b>68,50</b>	31,67
<b>moyenne</b>		<b>13,8 c</b>	<b>24,4 b</b>	<b>30,8 a</b>		

Tableau 34: Effets de la modalité de culture et du nombre de jours entre la transplantation et la récolte sur la biomasse (g/ plante) à différentes dates de récolte. Source : N. Savajol, Nomda RSI<sup>[15]</sup>

## IID1.2 Discussion

### I. Modification de la teneur en artémisinine dans les plantes

#### 1. Les teneurs en artémisinine varie selon l'âge des organes reproducteurs

Nos résultats montrent une teneur en artémisinine maximale dans les bourgeons. En outre, cette teneur diminue avec l'âge de la fleur. Le moment de commencer la récolte est donc essentiel à déterminer, le taux maximum d'artémisinine dépendant fortement du stade de développement qu'a atteint la plante. Les auteurs ont remarqué un pic d'artémisinine, cependant celui-ci peut apparaître, en pleine floraison<sup>[16,17]</sup> ou juste avant la floraison<sup>[18-20]</sup>.

Un facteur important à prendre en compte pour la culture *d'artémisa annua* est la durée du jour. *Artemisia annua* est une plante de jour court, c'est à dire que sa floraison débute lors de la diminution de la durée du jour. Selon les lignées et leur origine géographique, ce caractère est variable car fixé et adapté à un environnement précis.

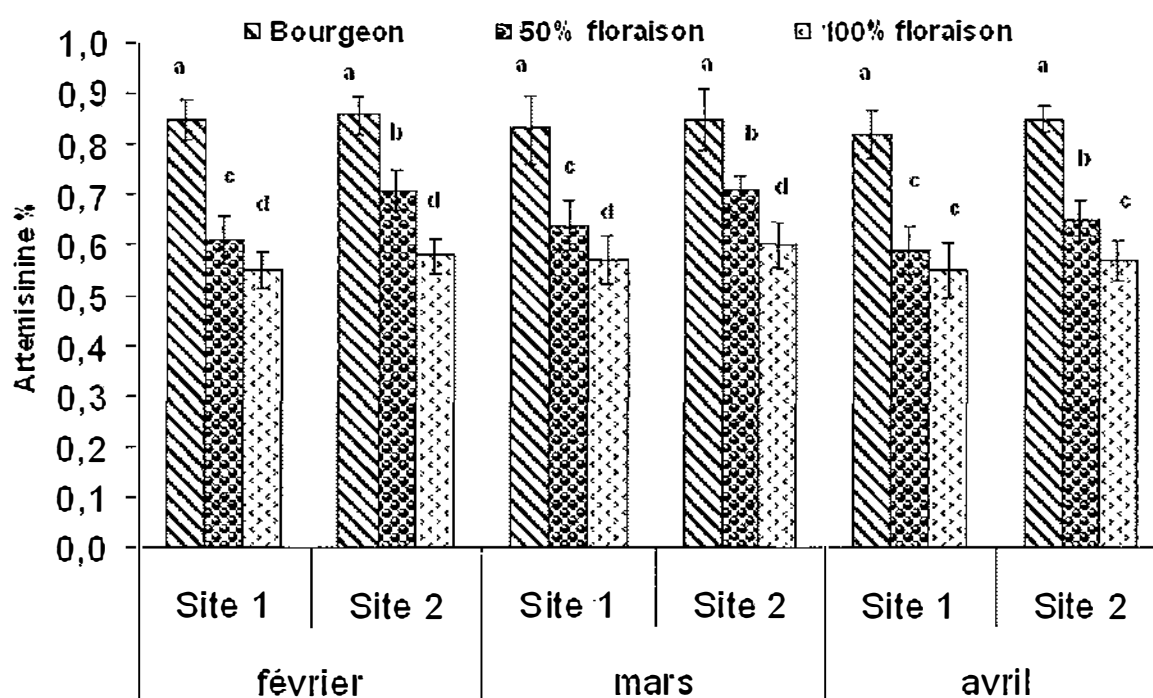


Figure 43 - Effets des facteurs du site et du stade physiologique par date de récolte



La variation de durée de jour au cours d'une année diminue en s'approchant de l'équateur et certains auteurs ont considéré lié au photopériodisme<sup>[17]</sup>. Plusieurs expérimentations ont démontré que la plante peut pousser sous des latitudes tropicales, l'utilisation de lignées adaptées par sélection ou par hybridation permet l'obtention de teneurs artémisinine importantes<sup>[21]</sup>.

D'après Laughlin<sup>[22]</sup> les variations entre le stade physiologique peuvent être attribuées aux conditions climatiques, aux écotypes, aux pratiques culturales ou à une combinaison de ces facteurs. Le moment où apparaît ce pic étant essentiel afin d'obtenir une concentration optimale en artémisinine, la détermination expérimentale de ce pic pour toute nouvelle aire de production est plus pertinente que de se fier uniquement aux publications.

Parmi les nombreuses caractéristiques pour lesquelles *Artemisia annua* présente une importante variabilité, la variation de teneur en artémisinine qui peut aller de 0,02 % à 1,38% selon sa provenance et selon le stade sélection sur la plus forte (Cf. partie bibliographie IIIA,5,10). Cette variation relevée dans la littérature a évidemment de multiples causes. Outre l'utilisation de méthodes d'extraction et d'analyse très diverses, les conditions de collecte et de préparation des échantillons sont également très variables. A cet égard, le soin apporté à la séparation des tiges et des feuilles est déterminant, puisque l'artémisinine est localisée principalement dans ces dernières<sup>[21]</sup>.

Les expérimentations menées ont mis en évidence une teneur en artémisinine maximale, dans les bourgeons. D'après Laughlin<sup>[22]</sup>, la concentration en artémisinine commence à augmenter deux semaines avant la floraison, et elle est maximale au début de la floraison. Ce stade correspondant à la fin du stade de croissance végétative verticale. La concentration en métabolites secondaires augmente lorsque la plante subit un stress, comme présence temporaire de brouillard nocturne. Le stress peut être également hydrique<sup>[23]</sup>. Or le développement des organes reproducteurs à la suite d'un stress est un phénomène couramment observé qui permet d'augmenter leur chance de survie. Le rôle physiologique de l'artémisinine reste difficile à déterminer et n'est que très peu abordé dans la littérature. On peut toutefois supposer qu'une molécule active, telle que l'artémisinine, a un rôle dissuasif auprès des prédateurs éventuels, et ainsi permet d'accroître les chances de survie lors de la floraison. Cette hypothèse pourrait expliquer qu'il y ait une teneur non négligeable en artémisinine dans les fleurs et qu'elle soit maximale dans les organes reproducteurs les plus fragiles comme les bourgeons.

Donc pour obtenir des plantes avec une forte teneur en artémisinine, il est très important de prendre en compte le stade de floraison. Il ne faut pas laisser passer le stade bourgeons car par la suite la teneur en principe actif chute rapidement avec le développement des fleurs et cette culture demandera donc un suivi régulier. Une technique pourrait être de faire des passages réguliers (toutes les deux semaines) dans les plantations et de récolter les plantes au fur et à mesure que les bourgeons apparaissent.

## 2. Les teneurs en artémisinine des fleurs varient selon le site expérimental

D'après Brandes et al<sup>[10]</sup>, *Artemisia annua* est une plante colonisant les berges de rivière ou de ruisseau. De ce fait, il n'est pas étonnant de voir que sur le site 2, situé sur une île au sein d'une rivière, les plantes se sont beaucoup mieux développées. Non seulement la fertilité et l'humidité du sol a du jouer mais également sa structure et sa texture, plus de sable et de limons, donc un sol plus aéré. La disponibilité en eau est un facteur important de la culture d'*Artemisia annua*, la modalité non irriguée présente une teneur en artémisinine faible et attesté donc, la d'une meilleure production en artémisinine des plantes cultivée avec irrigation durant cette période de l'année. De plus les 2 premiers mois de culture, phase d'élevage du plant, nécessitent un arrosage régulier. Les 2 sites de l'étude se situent près d'un point d'eau permettant leur irrigation, ce qui n'est pas le cas du miir champ non irriguée situé en pleine forêt<sup>[1]</sup>.

## 3. Le décalage de la date de récolte ne modifie pas les teneurs en artémisinine des fleurs

Comme il est évoqué dans la partie bibliographique, la durée pendant laquelle la plante fleurit peut être très variable. Ainsi entre l'élongation du rameau florifère et la maturation des akènes, il peut se passer de 1 à 5 mois<sup>[21]</sup>. S'il y a bien une action de la durée du jour sur le déclenchement de la floraison, il peut être intéressant de voir s'il ne faudrait pas démarrer la culture d'*Artemisia annua* plus tôt dans l'année afin de lui allouer plus de temps pour se développer, la récolte se ferait en décembre et ainsi obtenir une production supérieure. De plus cette période de culture correspond à celle utilisée par les Phnongs, qui cultivent leur champ en saison des pluies pour récolter le riz en début de saison sèche.

Dans notre essai, la mortalité dans la modalité non irriguée démontre qu'*Artemisia annua* ne peut être cultivée sans irrigation à la période que nous avons testée, cependant il serait intéressant d'essayer la culture avec irrigation réduite durant une saison plus humide.

## II. Modifications de rendement en artémisinine<sup>1</sup>

### 1. Le choix du site et la densité de peuplement influencent la teneur et le rendement en artémisinine des feuilles

En ce qui concerne le rendement, en artémisinine des feuilles il apparaît qu'il est plus élevé sur le site 2 par rapport au site 1 et selon la densité de peuplement et l'apport d'irrigation. Ces résultats sont liés au développement maximum des feuilles : dans ces conditions le développement foliaire est optimal.

Ces résultats sont expliqués par le fait que le site principal de culture (site1), avec quatre modalités de culture (RP, 2P, 4P, et NI), est situé sur le plateau, un type de terrain qui n'est pas cultivé par les autochtones, en raison de la compaction, la latérisation et donc la faible fertilité des sol<sup>[15]</sup>. Malgré l'amélioration de la texture et structure du sol et l'incorporation d'engrais vert qui a permis à la plante de se développer correctement, les résultats restent très en deçà de ceux obtenus sur le S2 (site 2), qui est situé sur les dômes. Les analyses de sol confirment que le S2 est plus fertile, en particulier en termes de teneurs en éléments minéraux. La culture de la plante sur les dômes herbeux mondolkirien reste possible mais serait coûteuse en travail et intrants si on souhaite améliorer les rendements. Non seulement le travail du sol semble indispensable, mais en plus une fertilisation, au moins azotée, en est indissociable afin d'obtenir des rendements en feuilles suffisants. Ceci peut s'expliquer par le rendement en feuilles qui est plus élevé dans le cas où la densité est la plus élevée.

Une solution alternative, mais également coûteuse en travail, serait l'augmentation de la densité. On a bien vu que pour le site 1, même à partir de 4 plantes /m<sup>2</sup>, l'effet de la densité sur la biomasse produite reste faible. Ainsi, il pourrait être intéressant sur un site comme celui-là de planter à de fortes densités, plus de 20 plantes/m<sup>2</sup>, pour envisager une augmentation du rendement en feuilles à l'hectare<sup>[25]</sup>.

Sur un site plus fertile, comme le site 2, les plantes se développent mieux, notamment les axes secondaires qui donnent un port plus buissonnant.(Cf. figure 44), et pourrait expliquer l'augmentation de biomasse végétative observée.

---

<sup>1</sup> Il est important de rappeler que le rendement intègre la production en biomasse et la teneur en artémisinine.



Figures 44 - Site 2 pendant la récolte

## **2. Le temps entre la transplantation et la récolte modifie le rendement en artémisinine des feuilles.**

La production de biomasse feuilles varie selon les divers facteurs étudiés (période de semis, humidité, durée de la culture). Il semble que la durée de la culture d'*A. annua* n'a pas été assez longue pour obtenir un développement maximum de la plante, 70 à 140 jours entre le repiquage au champ et la récolte. Ainsi les rendements en feuilles obtenues sont faibles par rapport à ceux obtenus dans d'autres essais en zone tropicale et peuvent être corrélés aux rendements en artémisinine. Il faut donc nuancer ces résultats car l'essai a été réalisé sans utilisation de techniques modernes, avec un budget faible et a peut-être engendré une durée de culture trop courte. Cette réduction du rendement en feuilles peut expliquer que le maximum du potentiel de production d'artémisinine ne soit pas exprimé, et donc que le rendement en artémisinine soit plus faible<sup>[28]</sup>.

De plus, allonger la durée de la culture permettrait de réaliser plusieurs récoltes dans un cycle de culture. En effet d'après Kumara<sup>[26]</sup>, *artemisia annua* peut être récoltée une première fois en laissant le pied, qui repartira et donnera une nouvelle récolte, on arriverait ainsi à 4 récoltes au cours d'un cycle de culture ce qui permettrait d'obtenir des rendements 3 à 4 fois supérieurs. De plus on a vu que la quantité maximum d'artémisinine est atteinte lorsque la plante est en bourgeon et qu'elle se situe dans les feuilles, on récoltera donc ici au moment où le taux d'artémisinine est le plus haut.

Il apparaît à la lecture des résultats que les différentes dates de mise en culture n'étaient pas assez éloignées pour trouver de différences importantes. On note toute fois pour la seconde date de culture que, la croissance de la plante était supérieure à toutes les autres, ce qui pourrait montrer que la culture de la plante est plus favorable en début d'année.

**IIID1. 2 Composés volatiles d'*Artemisia annua* extraits par l'hydrodistillation**

L'hydrodistillation est réalisée sur la plante d'*Artemisia annua* (en bourgeons, à l'apparition des fleurs environ 50% de fleurs matures et en pleine floraison 100% de fleurs matures). Les conditions opératoires sont décrites dans la partie expérimentale (IIC.6). L'analyse qualitative a été réalisée par spectromètre de masse couplé à un chromatographe en phase gazeuse (CPG/SM). L'identification des constituants a été faite sur la base de la comparaison de leurs indices de rétention et spectre de masse avec ceux des composés de référence de la littérature et figurant dans la banque de données.

Stade de développement	Huile essentielle [g] <sup>*</sup>	Rendement [%] <sup>*</sup>
Bourgeon	0,21	0,42 ± 0,02
Début floraison	0,31	0,61 ± 0,03
Floraison	0,52	1,0 ± 0,01

<sup>\*</sup> moyenne de 3 essais

Tableau 35 : Résultats quantitatifs de l'extraction de l'huile essentielle de l'*Artemisia annua* (site-2) du Cambodge.

Les résultats des extractions par la technique d'hydrodistillation ont montré des variations des différents rendements en huile essentielle en fonction du stade de développement des plantes. L'huile essentielle obtenue est visqueuse et possède une couleur jaune clair avec une odeur très agréable. Les rendements en huile essentielle (Tableau 35) montrent 0,42 % pour le bourgeon, 0,61 % pour le début de floraison et 1,0 % pour la floraison. Le rendement en huile essentielle d'*Artemisia annua* varie considérablement selon le stade de développement de la plante. On constate que le meilleur rendement est obtenu en floraison (+30 % par rapport au bourgeon et +58 % par rapport à la fleur immature. Le potentiel et la composition de l'essence dépendent de la maturité de l'organe. Cette constatation tout à fait classique en pharmacognosie, peut s'expliquer par de multiples facteurs. Ceux-ci sont principalement le stade auquel la plante a été récoltée, associé probablement au génotype et à l'environnement, dans lequel elle a poussé<sup>[22]</sup>.

Constituants	T.R.	I.R. <sup>b</sup>	Bourgeons	Début floraison	Floraison
<b>Monoterpenes</b>					
$\alpha$ -Pinène	7,56	939	2,5	0,1	1,3
Camphène	8,30	954	6,1	0,3	3,6
$\beta$ -Pinène	9,57	978	0,3	0,1	0,3
Myrcène	9,50	992	0,6	3,5	3,1
$\alpha$ -Terpinène	10,20	1017	tr	tr	tr
p-Cymène	11,39	1026	1,0	1,6	1,7
Cinéole-1-8	11,20	1030	<b>9,2</b>	<b>10,5</b>	<b>15,0</b>
Artémisia Ketone	12,55	1062	tr	tr	tr
Limonène	14,10	1029	nd	tr	tr
Camphre	16,40	1146	<b>51,8</b>	<b>52,3</b>	<b>51,4</b>
Bornéol	17,57	1169	0,2	1,2	0,6
<b>Sesquiterpenes</b>					
$\alpha$ -Terpineol	18,58	1189	tr	1,0	0,4
Verbenone	21,53	1205	tr	nd	0,1
$\alpha$ -cubebène	23,41	1351	0,1	tr	0,1
Copaène	26,38	1377	0,3	2,0	2,1
Caryophyllène	28,29	1408	3,4	3,5	3,2
Farnesène	29,27	1443	<b>4,3</b>	<b>12,6</b>	<b>6,4</b>
Humulène	29,55	1448	1,6	1,5	1,3
Germacrène-D	30,02	1485	<b>13,5</b>	<b>5,7</b>	<b>5,1</b>
$\alpha$ -Cadinène	31,04	1539	0,2	0,1	0,2
Spathulenol	34,50	1575	2,5	2,0	3,0
Caryophyllène oxide	36,30	1578	1,5	1,7	1,2
Globulol	37,45	1585	0,1	0,18	0,2
Hydrocarbures monoterpènes			10,5	5,6	10,0
Monoterpènes oxygénés			61,0	62,8	66,4
Hydrocarbures Sesquiterpènes			27,5	30,3	22,9
<b>Total</b>			<b>99,0</b>	<b>98,7</b>	<b>99,3</b>

<sup>a</sup> identification réalisée à partir des indices de rétention, des bibliothèque (NIST, Agilent, France) et de la littérature

<sup>b</sup> indice de rétention calculé à partir des alcanes.

Nd: non détecté

tr : traces (<0.1%).

Tableau : 36 Composition chimique (%) de l'huile essentielle de l'*Artemisia annua*

Le tableau. 36 donne la composition chimique des huiles essentielles recueillies par hydrodistillation. Elles sont principalement constituées d'hydrocarbures monoterpéniques, monoterpènes oxygénés et sesquiterpènes oxygénés. Les compositions chimiques obtenues sont pratiquement identiques, seules les abondances de certains composés varient. Les signaux des chromatogrammes des huiles essentielles nous ont permis d'identifier 22 composés. Globalement, nous constatons que la très grande majorité des composés sont le camphre, le Cinéole-1-8, le germacrène-D, et le farnésène quel que soit le stade de maturité des fleurs. Toutefois, ces 4 composés présentent des différences vis-à-vis du stade de développement de la fleur. En effet, le camphre (tr : 16,41) représente environ 50 % de l'huile essentielle et ne varie que très peu en fonction du stade de maturité.

En revanche, on observe un maximum pour le 1,8 cinéole (tr : 11,39) en fin de floraison (15 %) alors que le pourcentage de farnésène (tr : 29,31) est maximal au début de la floraison (12,6) et le germacrène (tr : 31,03) au niveau des bourgeons (13,5 %).

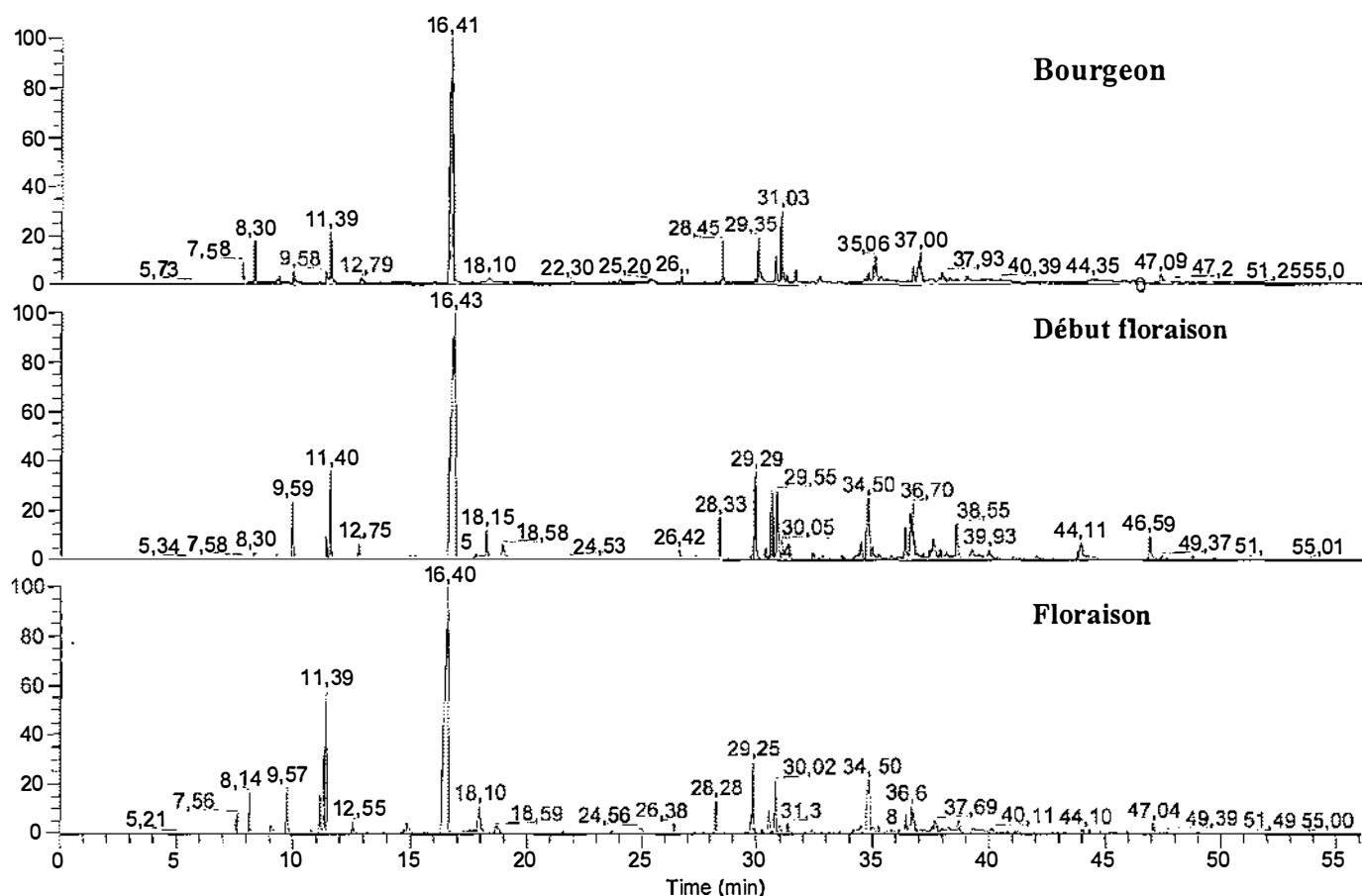


Figure 45 : Chromatogramme d'huile essentielle d'*Artemisia annua*

### **IID1. 3 Conclusions**

Afin d'obtenir des plantes avec une teneur en artémisinine optimale, notre étude montre qu'il est important de prendre en compte le stade de floraison. Le « bourgeon » accumule le maximum d'artémisinine : en effet, la teneur en principe actif chute rapidement avec le développement des fleurs. Une technique pourrait être de faire des passages réguliers (toutes les deux semaines) dans les plantations et de récolter les plantes au fur et à mesure que les bourgeons apparaissent.

Le site a aussi un effet significatif sur la biomasse et le choix de site fertile pour mettre en place des cultures d'*Artemisia annua* est donc primordial. Faire appel à des fertilisations n'est pas envisageable du fait de leur prix et des problèmes que cela pose dans la mise en culture de plantes médicinales.

*Artemisia annua* est également la source d'huile essentielle qui se trouve dans les feuilles et les fleurs. L'huile essentielle extraite d'*Artemisia annua* a atteint un maximum au stade plane floraison. L'étude en composés volatils de l'huile essentielle a également révélé la présence de maximum variant selon le stade de maturité comme dans le cas du camphre, germacrène et 1-8, cinéole dont la concentration est optimale dans les bourgeons et floraison. Avec l'intérêt croissant pour *Artemisia* pour la production de médicaments antipaludéens, le volume potentiel d'huile essentielle disponible est intéressant pour l'industriel parfumerie ou des industries chimiques en général.

L'essai de mise en culture d'*artemisia annua* au Mondolkiri a permis de montrer que la plante peut être cultivée dans cette région, avec un rendement et une teneur en artémisinine suffisants. Le résultat le plus significatif est l'importance de l'humidité du sol pour le bon développement de la plante, en l'absence d'un système d'irrigation la parcelle de culture devra être située sur une zone relativement humide (S2 par rapport à S1).



**Résultats et discussion sur *Artemisia annua*  
Cultivée au Sénégal**

## IIID2. Cultivée au Sénégal

### IIID2. 1.1 Date de récolte et nombre de jours entre la transplantation et la récolte

A Chaque date de récolte espacée de 15 jours les plantes ont été récoltées afin d'être mesurées et pesées. Les analyses de la teneur en artémisinine ont été réalisées par CCM densitomètre sur le matériel sec. La figure 46 montre que la hauteur des plantes augmente jusqu'à 105 jours après le repiquage

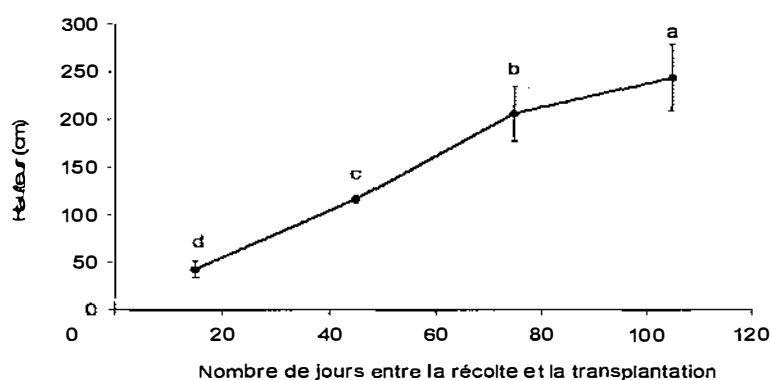
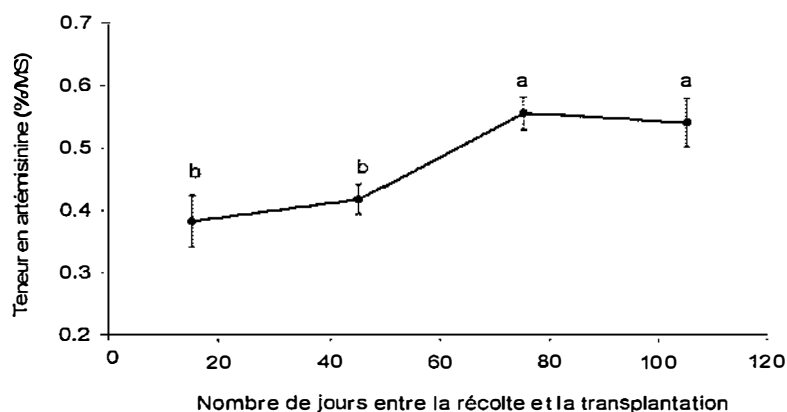


Figure 46: Hauteur de plantes nombre de jours entre la transplantation et la récolte  
Les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de  $\alpha=5\%$

La teneur en artémisinine est caractérisée par une augmentation régulière en début de culture entre 15 (juillet) et 75 jours de culture (septembre). Le taux maximum d'artémisinine, (0.56%), est donc obtenu 75 jours après la transplantation au champ au mois de septembre. Puis se stabilise dès lors que la plante entre en floraison, 2 mois et demi après le repiquage (figure 47)



Figures 47 : Evolution de la teneur en artémisinine (%/à la matière sèche) en fonction du nombre de jours et la transplantation

Les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de  $\alpha=5\%$

La figure 48 montre que la masse de feuille récoltée diminue entre 75 et 105 jours. Cette période (75) correspond également au pic de teneur en artémisinine (figure 47), la concentration diminuant ensuite sensiblement. C'est également à cette période que les fleurs apparaissent induisant un assèchement des feuilles du à l'investissement de la plante dans la floraison. Le pic en artémisinine correspond bien à l'apparition de bourgeon (comme observé au (Cambodge). Cette période correspond à l'installation de la saison sèche au Sénégal, il semble donc que le stress hydrique est induit une floraison suivi d'un flétrissement du feuillage.

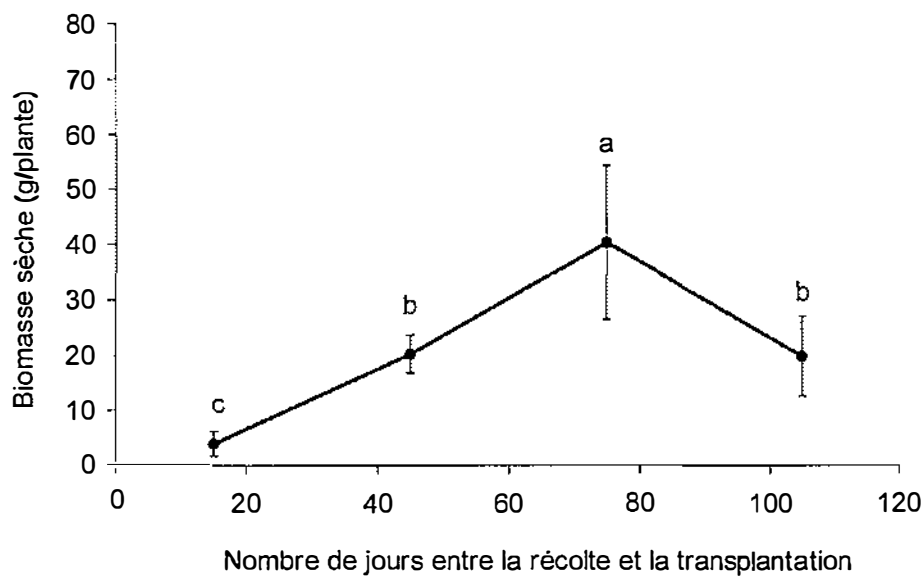


Figure 48 : Biomasse des feuilles sèches (g/plante)

Les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de  $\alpha=5\%$

## **IIID2. 1.2 Conclusion**

Les résultats de cette étude, même si celle-ci reste modeste scientifiquement comparé au protocole expérimental mis en place au Cambodge, permettent de confirmer les caractéristiques culturelles de la plante. La période de récolte optimale, associant une teneur en artémisinine forte et une biomasse importante, est courte (autour de 75 jours de culture au Sénégal). Elle correspond à la période d'apparition des bourgeons. Il est important de noter la sensibilité de la plante à la sécheresse, cette donnée étant particulièrement importante en Afrique sahélienne. Les teneurs en artémisinine obtenues au Sénégal sont plus faibles que celles du Cambodge. Ceci peut être lié à divers facteurs tels que le climat ou le respect du protocole de récolte et de séchage, ces facteurs n'ont pas pu être identifiés dans le cadre de cette étude étant donnée les différences de conditions expérimentales. Entre autres les difficultés de gestion (matérielles et humaines) étaient plus fortes au Sénégal qu'au Cambodge (ou Nomad dispose d'une équipe permanente).

## Références bibliographiques

- [1]. USDA-SCS, (United states departement of agriculture soil conservation services), 1974. Definiation and abbreviation for soil description. West Technical Services Centre, Portland, OR.
- [2]. JONES, R.J.A., SPOOR, G., THOMASSON, A.J.,. 2003. Vulnerability of subsoils in europe to compaction: a preliminary analysis. Soil. Tillage. Res. 73, 131-143.
- [3]. SCHOENEBERGER, P.J., WYSOCKI, D.A., BENHAM, E.C, 1998. Field book for describing and sampling soils. Natural resources conservation services, USDA, National Soil Survey Center, Lincoln, NE USA.
- [4]. FARHURST, T.H., LEFROY, R.D..B., MUTERT, E.W., et al. 1998. Soil fertility recapitatlization in acid upland soils in Southeast Asia: the exmample of Indonesia. In: Proceedings of the 16<sup>th</sup> World Congress of Soil Science, Montpellier, France.
- [5] RAWLS, W.J., PACHEPSKY, Y.A., RITCHE, J.C., 2003. Effect of soil organic carbon on soil water retentation. GEODERMA., 116, 61-76.
- [6]. BREMNER, J.M., MULVANEY, C.S 1982. Nitrogen total: methods of soil analysis part 2. Chemical and microbiological properties. Agrononmy, Vol 9, 2<sup>nd</sup> Edition. American Soc. Agronomy, Madison, WI, USA, pp. 595-641.
- [7]. SOLTNER, D., 1996. Les bases de la production végétale. Tome 1 Le sol et son amélioration. 21<sup>e</sup> édition, Collection Sci. Tech. Agr., 463 pages.
- [8]. McGRATH, S.P., CUNLIFFE, C.H., 1985. A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Ni, Pb, Cr, Co, and Mn from soils and sewage sludges. J. Sc. Food. Agr. 36, 794-798.
- [9].MARSCHNER, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second Edition, Academic Press Inc, 889 pages.
- [10]. DUCHAUFOUR, PH., 1991. Pédologie sol, végétation, environnement. Edition Mosson 3<sup>ém</sup> édition. 289
- [11] MARQUET, I., 2003. Accessibilité aux antipaludiques au Sénégal effets de l'introduction de l'association Artesunate/Amodiaquine. Mémoire de DESS de Santé Publique, Université d'Orsay-ParisXI.
- [12]. SOKHNA C., MOLEZ JF., NDIAYE P. et coll. Test in vivo de chimiosensibilité de *plasmodium falciparum* à la chloroquine au Sénégal : évolution de la résistance et estimation de l'efficacité thérapeutique. Bull. Soc. Pathologie exotique 1997 ; 80(2) : 83-89.
- [13]. AGNAMEY P., BRASSEUR P., CISSE M. et coll. Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in African children ; a randomised, multicentre trial. The Lancet 2002 ; 359 : 1365-1371.

- [14]. FAYE O., LO M., GAYE O. et coll. Connaissances et circuits thérapeutiques relatifs au paludisme en zone rurale Sénégalaise. *Médecine tropicale* 1997 ; 57 : 161-164
- [15].SAVAJOL, N., 2004. Expérimentation sur un antipaludique, *l'Artemisia annua*, au Cambodge. Mémoire de fin d'études. Nomad RSI, Toulouse.
- [16]. SINGH, A, VISHWAKARMA, R.A., et HUSAN, A., 1988. Evaluation of *Artemisia annua* strain for higher artemisinin production. *Planta medica*. 7, 475-476.
- [17]. FERREIRA, J.F.S., 1995. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *Int. J. Plant Sci.*, 156, 807-815.
- [18]. ACTION, N., KLAYMAN, D.L., 1985. Artemisinin a new sesquiterpene lactone endoperoxyed from *Artemisa annua*. *Planta Medica*. 51, 441-442.
- [19].WOERDENBAG, H.J, 1994. Artemisinin related sesquiterpenes and essential oils in *Artemisia annua* during a vegetation period in Vietnam. *Planta Med.*, 60, 272-275.
- [20]. LIERSCH, R., SOICKE, H., STERH, et TULLNER, H., 1986. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one generation period. *Planta Med*. 7, 387-390.
- [21]. DELABAYS, N., 1997. Biologie de la reproduction chez *Artemisia annua* L. et génétique de la production en artemisinine. Contribution à la domestication et à l'amélioration génétique de l'espèce. Thèse de Doctorat. Université de Lausanne.
- [22]. LAUGHLIN, J.C., HEARLEWOOD, G.N., BEATTEAIE, B.M., 2002. Cultivation of *Artemisia annua*. pp. 159-195. In, Wright CW (Ed.), *Artemisia*. Taylor and Francis, Londres.
- [23].WALLART, T.E., PRAS, N., BEECKMAN, A.C., et QUAX, W.J., 2000. Seasonal variation of Artemisinin precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin : proof for the existence of chemotypes. *Planta medica*., 66, 57-62.
- [24]. BRANDES,D., MÜLLER, M., 2001. 44<sup>th</sup> IAVS Symposium : vegetation and ecosystem functions *Artemisia annua* accessfull invading species. Freising-Weihenstephan: Technical University Braunschweig, 21p.
- [25]. LAUGHLIN, J.C., 1993. Effect of agronomic practices on plant yield and antimalarial constituents of *Artemisia annua* L. *Acta Hort*, 33, 53-61.
- [26]. KUMARA, S. 2004. High yields of Artemisinin- a review. *Royal. Soc.Trop. Med. Hyg.* 88, suppl. 1, p.21-22.
- [27]MUELLER, M.S., RUNYAMBO, N., WAGNER, I., BORRMANN, S., DIETZ, K., HEIDE, L., 2004. Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 98, 318-321.
- [28].WILLCOX, M., BODEKER, G., BOURDY, G., DHINGRA, V., FALGUET J., FERREIRA, J.F.S., GRAZ B., HIRT, H-M., HSU, E., DE MAGALHAES, P, PROVENDIER, D., and WRIGHT, C.W., (2004), *Artemisia annua* as a traditional herbal

antimalarial *In*: Traditional medicinal plants and malaria, Merlin L Wilcox, G. Bodeker and P. Rasaoanaivo (eds.) Boca Raton, CRC Press

[29]. SCHOENEBERGER, P.J., WYSOCKI, D.A., BENHAM, E.C, 1998. Field book for describing and sampling soils. Natural resources conservation services, USDA, National Soil Survey Center, Lincoln, NE USA.

[30]. FARHURST, T.H., LEFROY, R.D..B., MUTERT, E.W., et al. 1998. Soil fertility recapitalization in acid upland soils in Southeast Asia: the exmaple of Indonesia. In: Proceedings of the 16<sup>th</sup> World Congress of Soil Science, Montpellier, France.

[31] RAWLS, W.J., PACHEPSKY, Y.A., RITCHE, J.C., 2003. Effect of soil organic carbon on soil water retentation. GEODERMA., 116, 61-76.

[32]. BREMNER, J.M., MULVANEY, C.S 1982. Nitrogen total: methods of soil analysis part 2.Chemical and microbiological properties. Agronomy, Vol 9, 2<sup>nd</sup> Edition. American Soc. Agronomy, Madison, WI, USA, pp. 595-641.

[33]. SOLTNER, D., 1996. Les bases de la production végétale. Tome 1 Le sol et son amélioration. 21<sup>e</sup> édition, Collection Sci. Tech. Agr., 463 pages.

[34]. McGRATH, S.P., CUNLIFFE, C.H., 1985. A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Ni, Pb, Cr, Co, and Mn from soils and sewage sludges. J. Sc. Food. Agr. 36, 794-798.

[35].MARSCHNER, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second Edition, Academic Press Inc, 889 pages.

[36]. DUCHAUFOUR, PH., 1991. Pédologie sol, végétation, environnement. Edition Mosson 3<sup>ém</sup> édition. 289 Pages.

## **Conclusion générale et perspectives**



## Conclusion Générale et Perspectives

Mon travail de thèse avait pour objectif d'étudier les méthodes et les conditions d'extraction des composés d'intérêt pour des pays en voie de développement extraits à partir de l'*Hibiscus sabdariffa*.

Dans une première partie, l'étude menée sur Hibiscus permis de mettre en évidence l'influence des conditions opératoires de différentes techniques d'extraction, à partir de calice (huile essentielle, et concrète) et à partir de graines (huile végétale).

Nous avons pu déterminer les caractéristiques et la composition chimique des fractions aromatiques extraites des calices et des graines d'Hibiscus en vue de leur valorisation industrielle.

Le choix des méthodes d'extraction et analytiques pour détermination de la composition des huiles des graines, a été effectué sur la plate-forme lipochimique (UMRA INR/ENSIACET).

L'analyse des composés aromatiques des calices d'hibiscus a été réalisée à l'ENFA Ecole Nationale de Formation Agronomique (Toulouse)

Dans un premier temps, les huiles essentielles et les concrètes extraites de calices d'Hibiscus sabdariffa provenant de 3 pays différents (Mexique, Sénégal, Vietnam) ont été comparées pour la composition chimique et le rendement d'extraction. Il apparaît que l'origine des calices n'influence pas la composition chimique alors que le rendement d'extraction varie : il est plus élevé lorsque les calices proviennent du Vietnam par rapport au Mexique et enfin au Sénégal. Puis, 4 techniques d'extraction différentes des concrètes ont également été comparées, ainsi que l'utilisation de 2 solvants différents dans le but d'optimiser le rendement d'extraction. Les résultats nous ont permis de quantifier l'influence du rapport pondéral matière végétale/solvant et de la durée d'extraction sur le rendement. Quelle que soit la technique d'extraction, l'efficacité du dichlorométhane est largement supérieure à celle de l'hexane.

L'analyse qualitative de l'huile des graines d'Hibiscus que le pourcentages d'acides gras et les teneurs en stérols sont tout à fait remarquables et qu'elle peut se positionner comme nouvelle source d'huile végétale pour l'alimentation. C'est un champ d'application intéressant permettant de valoriser l'*Hibiscus sabdariffa* du Vietnam, du Sénégal et du Mexique. Après séparation des acides gras saturés (acide palmitique + acide stéarique) et des acides gras insaturés (acide linoléique + acide oléique). La diversité des acides gras dans l'alimentation

humaine et leur apport en quantités appropriées et équilibrées étant nécessaire pour la prévention d'un grand nombre de maladies liées à la sous alimentation des pays en voie de développement. La richesse, en acide linoléique et oléique, de l'huile des graines d'hibiscus s'avère être une bonne matière première pour la consommation après raffinage dans les pays à vocation agricole.

En s'appuyant sur des données bibliographiques nos résultats ont montré que l'hibiscus sabdariffa possède également de sérieux atouts pour d'autres utilisations alimentaires comme la génération des nouvelles boissons, tant que colorants, de plus en plus utilisés en alimentation.

Enfin un bilan de nos investigations sur la constitution chimique très complexe de cette huile essentielle ou absolue a été exposé, en particulier pour les composés les plus volatils.

En conclusion, ce travail a permis d'obtenir une idée de la composition chimique générale de *Hibiscus sabdariffa* qui pourra servir de point de départ pour les futurs travaux de recherches dans la perspective d'une valorisation de cette espèce végétale.

Nous proposons de compléter les données acquises par les orientations suivantes:

- Amélioration du rendement en huile essentielle, grâce aux données concernant la production durant la période récolte (cueillette, séchage...),
- Etude de la stabilité et des propriétés des colorants anthocyanes présentes dans les calices d'*Hibiscus sabdariffa*,
- Etude de la tige d'*Hibiscus sabdariffa* pour définir leurs propriétés des fibres surtout la cellulose,
- Prospection pour la valorisation des acides gras, par exemple : acide palmitique (plastifiants détergents, lubrifiants) acide linoléique (peintures, résines) contenues dans les graines d'Hibiscus.
- Proposition de nouvelles formulations aromatiques pour de nouvelles boissons à partir des calices d'Hibiscus,
- Implantation locale d'unités de productions industrielles de ces boissons.

Une seconde plante a fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse et participe également à la phase préliminaire qui permettra de déterminer le potentiel réel d'*Artemisia annua* au Cambodge et au Sénégal comme plante antipaludique.

L'essai de mise en culture d'*artémisia annua* au Mondolkiri (Cambodge) a permis de montrer que la plante peut être cultivée dans cette région, avec un rendement et une teneur en artémisinine suffisants. Le résultat le plus significatif est l'importance de l'humidité du sol pour le bon développement de la plante, en l'absence d'un système d'irrigation la parcelle de culture devra être située sur une zone relativement humide.

Ce travail a également permis d'amorcer une réflexion sur l'itinéraire technique (densité, dates de mise en culture, irrigation, ...), mais celui-ci dépendra du système de culture qui devra être mis en place (plantation ou micro culture locale).

D'un point de vue agricole, *Artemisia annua* semble pouvoir s'intégrer au Cambodge, il serait intéressant de comparer les rendements dans des régions de plaines. L'utilisation de bouture peut aussi être une perspective intéressante favorisant une multiplication rapide et peu coûteuse par rapport aux graines hybrides. Cependant les premiers essais en cours montrent une initiation rapide de la floraison qui risque de limiter les rendements.

L'introduction d'une plante et sa domestication reste un processus long. Ce projet a permis de réunir les compétences de plusieurs organismes universitaires autour d'un objectif commun: trouver un traitement accessible contre le paludisme.

Cette démarche et ces expérimentations innovantes au Cambodge ont atteint leur objectif en permettant de prouver la faisabilité de la culture. Les rendements en artémisinine, même s'ils n'atteignent pas ceux obtenus dans d'autres régions tropicales, sont encourageants pour un premier essai. L'utilisation de ces résultats et la poursuite du travail pourraient permettre au Cambodge d'intégrer *Artemisia annua* dans son système agricole. La gestion de ces cultures demandera une attention particulière pour être intégrée aux différents systèmes traditionnels. Mais la possibilité d'utiliser *Artemisia annua* en association avec d'autres cultures est une option à explorer.

La production de matériel végétal ne résout cependant pas la question de sa commercialisation et de sa transformation. La transformation par un laboratoire cambodgien (université de pharmacie) pourrait être une solution permettant une production de médicament peu coûteux. Etant donné la législation cambodgienne, l'utilisation d'infusion de feuilles d'*Artemisia annua* ne pourra être prescrite qu'après des essais épidémiologiques rigoureux. Même si des travaux montrent l'intérêt de ce mode de prescription<sup>[27,28]</sup>, d'autres essais soulèvent la polémique vis-à-vis de cette méthode et conseillent l'utilisation d'association

artémisinine-mefloquine pour limiter les risques de recrudescence de crises. Il serait certainement intéressant de porter des recherches sur l'association d'*Artemisia annua* et d'autres plantes antipaludéennes en tisane suivant les formules traditionnelles chinoises.

Les teneurs en artémisinine obtenues au Sénégal sont plus faibles que celles du Cambodge. Ceci peut être lié à divers facteurs tels que le climat ou le respect du protocole de récolte et de séchage, ces facteurs n'ont pas pu être identifiés dans le cadre de cette étude étant données les différences de conditions expérimentales. Entre autres les difficultés de gestion (matérielles et humaines) étaient plus fortes au Sénégal qu'au Cambodge (ou Nomad dispose d'une équipe permanente).

A l'issue de cette étude, les résultats montrent que la culture en *Artemisia annua* peut être envisagée en zones tropicales, cette culture demande cependant une technicité relativement importante, même si le marché d'*Artemisia annua* semble lucratif et pourrait permettre de développer des médicaments produits localement, des itinéraires techniques agronomiques rigoureux doivent être suivis et la mise en culture d'*Artemisia annua* pour être durable demande une attention particulière au transfert technique. Dans ce sens les collaborations avec les universités Cambodgienne et Sénégalaise se sont révélées particulièrement appropriées permettant de créer une dynamique d'échanges scientifiques entre pays du Sud à partir d'une équipe toulousaine rassemblant laboratoire universitaire et ONG.

## **ANNEXES**

Annexes

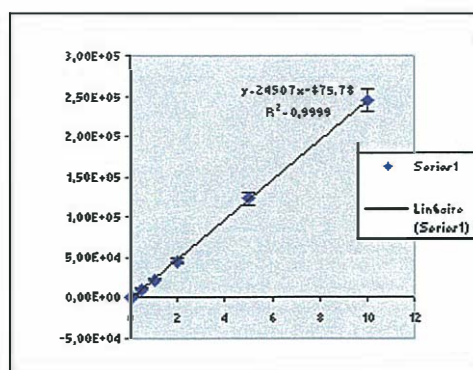
3 témoins d'artémisinine (1 g/L MeOH) analysés 3 fois chacun

Std 1 (ppm)	Aire	Std 2 (ppm)	Aire	Std 3 (ppm)	Aire
0,01	1,46E+02	0,01	1,13E+02	0,01	9,55E+01
0,025	3,71E+02	0,025	2,65E+02	0,025	3,77E+02
0,05	1,03E+03	0,05	1,08E+03	0,05	4,66E+02
0,1	2,65E+03	0,1	1,90E+03	0,1	1,97E+03
0,5	1,32E+04	0,5	1,01E+04	0,5	1,29E+04
1	2,51E+04	1	2,19E+04	1	2,44E+04
2	5,12E+04	2	4,57E+04	2	4,93E+04
5	1,33E+05	5	1,18E+05	5	1,37E+05
10	2,68E+05	10	2,42E+05	10	2,61E+05
R <sup>2</sup>	0,99991	R <sup>2</sup>	0,99977	R <sup>2</sup>	0,99925

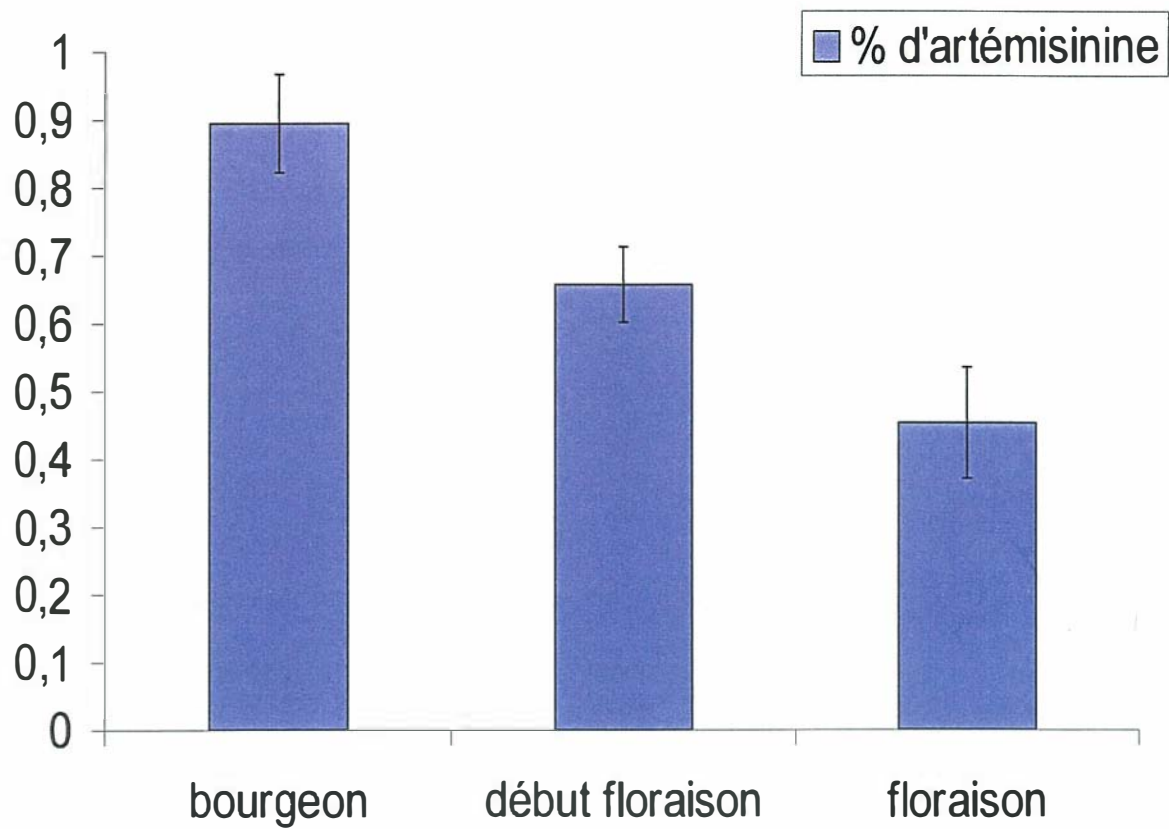
0,01	1,05E+02	0,01	1,85E+02	0,01	1,01E+02
0,025	2,76E+02	0,025	3,39E+02	0,025	4,25E+02
0,05	1,01E+03	0,05	1,01E+03	0,05	1,09E+03
0,1	1,97E+02	0,1	2,19E+03	0,1	1,54E+03
0,5	1,05E+04	0,5	1,12E+04	0,5	1,14E+04
1	2,14E+04	1	2,26E+04	1	2,17E+04
2	4,49E+04	2	4,63E+04	2	4,55E+04
5	1,14E+05	5	1,18E+05	5	1,19E+05
10	2,27E+05	10	2,42E+05	10	2,49E+05
R <sup>2</sup>	0,99992	R <sup>2</sup>	0,99983	R <sup>2</sup>	0,99940

0,01	1,97E+02	0,01	1,53E+02	0,01	9,55E+01
0,025	3,69E+02	0,025	3,30E+02	0,025	3,77E+02
0,05	9,83E+02	0,05	1,25E+02	0,05	4,66E+02
0,1	1,74E+03	0,1	1,82E+03	0,1	1,97E+02
0,5	1,06E+04	0,5	9,72E+03	0,5	1,29E+04
1	2,09E+04	1	2,21E+04	1	2,44E+04
2	4,16E+04	2	4,16E+04	2	4,93E+04
5	1,14E+05	5	1,15E+05	5	1,37E+05
10	2,21E+05	10	2,26E+05	10	2,61E+05
R <sup>2</sup>	0,99959	R <sup>2</sup>	0,99966	R <sup>2</sup>	0,99920

	Moy aires	SEM
0,01	1,32E+02	3,37E+01
0,025	3,48E+02	4,01E+01
0,05	8,07E+02	3,03E+02
0,1	1,58E+03	6,22E+02
0,5	1,14E+04	1,07E+03
1	2,27E+04	1,27E+03
2	4,62E+04	2,55E+03
5	1,23E+05	8,59E+03
10	2,44E+05	1,39E+04
R <sup>2</sup>	0,99987	

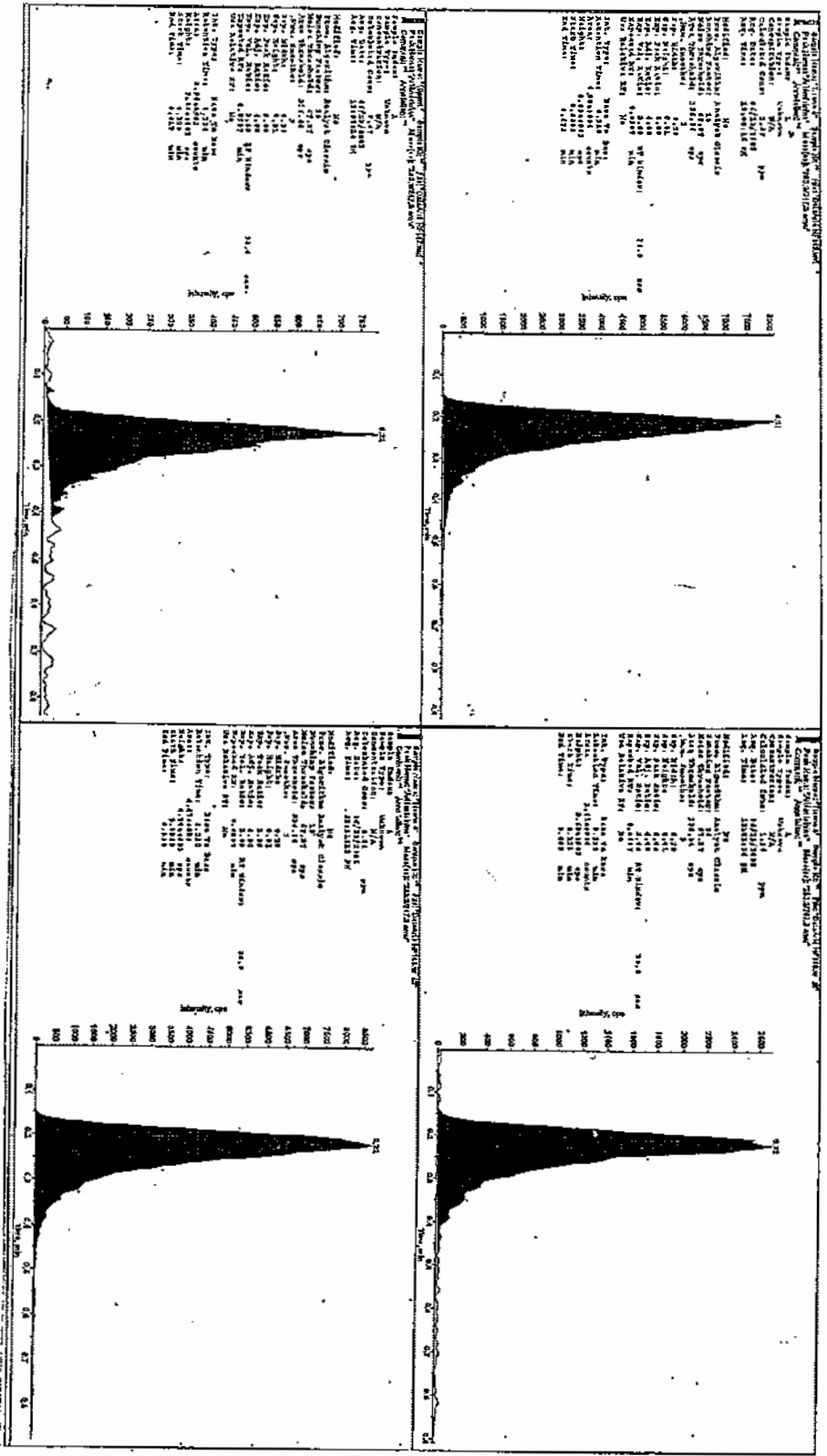


Annexe 1. Standard artémisinine droite d'étalonnage pour l'analyse quantitative de par LC/MS/MS



Annexe 2. Teneur en artémisinine (%) à la matière sèche en fonction de stade physiologique de la plant analyses par LC/MS/MS

Annexes



Servicio Comunitat de Operacions de Massa 318599  
 Universitat Paul Sabatier, 116 route de Narbonne  
 31063 Toulouse Cedex 04

Acq: Data: 2006/06/23  
 Scan: 1000 (1) N/A

Annexe: 3 Chromatogrammes du standard d'artémisinine et d'extrait d'*Artemisia annua*



## Annexes

### Conditions d'analyse LC/MS/MS

Spectrométrie de mass	: QTrap (Constructeur Applied biosystems)
Pump :	Agilent 110 G1312A
Autosampler	Agilent 1100 G1313A
Q1 Mass (amu) :	283,20
Q3 Mass (amu) :	247,20
CE (Energy collision) :	15,00
DP (Dedustrering Potential)	5,0
FIA (Flow Injection Analyses) Sans colonne	
Flow rate: ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	500
A(%): MeoH	100 %
Volume injecté:	20 $\mu\text{L}$