

## **MASTER : BIODIVERSITE ET ENVIRONNEMENT**

### **INTITULE DE LA MATIERE : PHYTOCHIMIE**

#### **RESUME DES CHAPITRES**

**Crédits : 2**

**Coefficients : 1**

**Enseignante : Sabah BOUMERFEG**

### **CONTENU DE LA MATIERE**

#### **I- PHARMACOGNOSIE ET CHIMIE DES PRODUITS NATURELS D'ORIGINE VEGETALE**

##### **1. LES METABOLITES PRIMAIRES**

- 1.1. Les protéines
- 1.2. Les glucides
- 1.3. Les lipides

##### **2. LES METABOLITES SECONDAIRES**

###### **2. 1. Les composés phénoliques**

- 2.1.1. Classification
  - 2.1.1.1. Les acides phénoliques
  - 2.1.2.1. Les tanins
  - 2.1.3.1. Flavonoïdes

###### **2. 2. Les alcaloïdes**

- 2.2.1. Rôle des alcaloïdes chez la plante
- 2.2.2. La classification des alcaloïdes
- 2.2.3. Structure et activités biologiques de quelques alcaloïdes

###### **2. 3. Les terpénoïdes**

- 2.3.1. Classification, biosynthèse et structure des terpénoïdes
- 2.3.2. Les huiles essentielles
- 2.3.3. Rôle biologique des terpenoïdes

#### **II. CHIMIE ANALYTIQUE : TECHNIQUES UTILISEES EN PHYTOCHIMIE**

- 1- Extractions.
- 2- Chromatographie.
- 3- Méthodes d'analyse structurale « spectroscopiques ».

## CHAPITRE 1 : PHARMACOGNOSIE ET CHIMIE DES PRODUITS NATURELS D'ORIGINE VÉGÉTALE

### 1. LES MÉTABOLITES PRIMAIRES

**Définition :** Un métabolite primaire est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ce composé a généralement une fonction physiologique dans cet organisme, c'est-à-dire une fonction intrinsèque. Un métabolite primaire est typiquement présent dans de nombreux organismes taxonomiquement éloignés. Il est également désigné par métabolite central, qui prend même le sens plus restrictif de métabolite présent dans tous les organismes ou cellules en croissance autonome. Inversement, un métabolite secondaire n'est pas directement impliqué dans ces processus physiologiques fondamentaux (indispensables) d'un organisme, mais possède typiquement une fonction *écologique* importante, c'est-à-dire une fonction relationnelle. Un métabolite secondaire est typiquement présent dans un ensemble taxonomiquement restreint d'organismes (Plantes, Champignons, Bactéries...). Les métabolites primaires sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule, de l'organisme :

- les acides aminés, source primaire de construction des Protéines
- les glucides, source d'énergie, paroi cellulaire
- les lipides, source d'énergie, membranes cellulaires

**1.1. Les protéines :** Une protéine est une macromolécule biologique composée d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques (chaîne polypeptidique). En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient au moins 20 acides aminés, et de peptide pour des assemblages de plus petite taille. Les protéines sont des éléments essentiels de la vie de la cellule : elles peuvent jouer un rôle structural (comme l'actine), un rôle dans la mobilité (comme la myosine), un rôle catalytique (les enzymes), un rôle de régulation de la compaction de l'ADN (les histones) ou d'expression des gènes (les facteurs de transcription), etc. En somme, l'immense majorité des fonctions cellulaires sont assurées par des protéines.

**1.2. Les glucides :** Les glucides forment 1 à 2% de la masse cellulaire. Ils contiennent du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène. Ces deux derniers atomes sont présents dans le même rapport 2 : 1 que dans l'eau, c'est pourquoi les glucides sont parfois appelés hydrates de carbone. Ce sont des molécules organiques caractérisées par la présence de chaînons carbonés porteurs de groupements hydroxyles, et de fonctions aldéhydes ou cétoniques. En fonction de leur volume et de leur solubilité, les glucides sont classés en *monosaccharides* ou *oses* (1 sucre), en *disaccharides* ou *osides* (2 sucres), et en *polysaccharides* ou *polyosides* (nombreux sucres).

**1.3. Les lipides :** Les lipides sont des graisses qui se trouvent dans la nature sous deux formes :

- les triglycérides qui ont essentiellement un rôle énergétique
- les phospholipides formés à partir de diglycérides qui ont un rôle physiologique au niveau des membranes cellulaires.
- les stéroïdes dans laquelle on trouve le célèbre cholestérol. Ce sont aussi les composants essentiels de certaines hormones (les stéroïdes) et de la membrane cellulaire des eucaryotes. .

Les acides gras saturés qui sont principalement d'origine animale ont une forme linéaire. Ils sont généralement solides à température normale. Ces molécules forment des structures compactes qui ont tendance à rigidifier les membranes cellulaires et à limiter les échanges.

Les acides gras insaturés (monoinsaturés et poly-insaturés) ont une forme en V ou en U qui favorisent la fluidité membranaire car l'empilement des phospholipides est moins compact. Les acides gras polyinsaturés sont généralement liquides à la température de la pièce et se retrouvent principalement dans les huiles végétales (maïs, soja, tournesol, noix, lin).

### 2. LES MÉTABOLITES SECONDAIRES

**Définition :** Les métabolites secondaires ne participent pas directement aux processus vitaux de la cellule, mais assurent néanmoins des fonctions écologiques importantes. Chez les plantes, les métabolites secondaires sont importants à la survie et à la propagation de l'espèce. Il joue chez celles-ci

différents rôles, comme des phéromones ou des signaux chimiques permettant à la plante de s'adapter à l'environnement, de moyens de défense contre les herbivores, les pathogènes ou les compétiteurs. D'autres protègent la plante des radiations solaires ou encore facilitent la dispersion du pollen et des graines.

Les métabolites secondaires sont des composés organiques :

- Molécules existant en très grand nombre, d'une variété structurale extraordinaire
- Marquent l'identité d'une espèce, familles ou genres
- Impliquées dans une écologie chimique inter-espèces
- Applications pharmaceutiques

## **TYPES ET ORIGINE DES METABOLITES SECONDAIRES**

On peut identifier trois types de métabolites secondaires:

- Molécules (phénoliques Voie de l'acide shikimique et acétate/malonate).
- Alcaloïdes (Acides aminés).
- Terpénoïdes ( l'IPP (isopentenyl diphosphate), une molécule à 5 C).

### **2.1. LES POLYPHENOLES**

Les polyphénols constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Ils résultent de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate. Les polyphénols possèdent plusieurs groupement phénoliques, avec ou sans d'autres fonctions (OH, carboxyle, ...).

Les polyphénols peuvent être subdivisés en 03 classes principales : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins.

#### **2.1.1. Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques se trouvent dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales. Comme exemple d'acides phénoliques, on cite : acide caffeique, acide protocatechique, acide ferulique, acide sinapique et acide gallique. Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prebiotique, antioxydant, antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et chélateurs.

#### **2.1.2. Les tanins**

Ce sont des polyphénols polaires d'origine végétale, existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines, leurs poids moléculaire s'étendent de 500 à 3000 et ils peuvent avoir plusieurs activités biologiques dont l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antifongique, antitumorale, antivirale et antidiarrhéique.

#### **2.1.3. Les flavonoïdes**

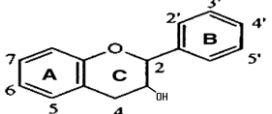
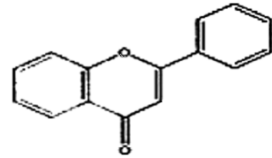
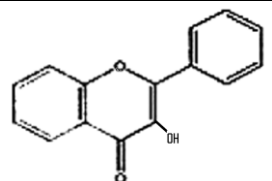
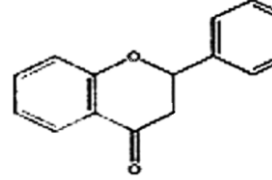
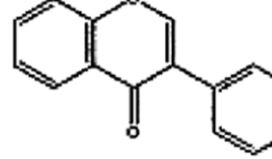
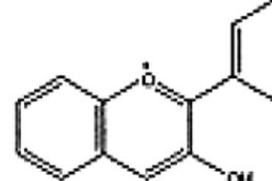
Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Presque toujours hydrosolubles, ce sont des pigments quasiment universels des végétaux et sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Les flavonoïdes sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV, ils jouent aussi un rôle dans la défense des plantes contre les micro-organismes pathogènes, dans la fertilité des plantes et dans les interactions plante-microbe. Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs (les anthocynes, les aurones et les chalcones). Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes, les feuilles (salade, chou, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits.

##### **2.1.3.1. Structure chimique, classification et biosynthèse**

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés, ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3. Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone. (**Figure1**). Le réarrangement de ce squelette selon un motif 1, 2-diphénylpropanique permet d'engendrer des isoflavonoïdes ;

Les flavonoïdes peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire. Dans les plantes, les flavonoïdes peuvent être présents sous forme C- ou O-glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone ou génines (**Tableau1**).

**Tableau1** : Classification et structure des flavonoïdes

| Classe                        | Structure générale                                                                  | Flavonoïde                                             | Substituant                                                                             |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Flavanol                      |    | catéchine<br>epicatéchine                              | 3, 5, 7, 3', 4'-OH<br>3, 5, 7, 3', 4'-OH                                                |
| Flavone                       |    | chrysine<br>apigenine<br>rutine<br>luteoline           | 5,7-OH<br>5, 7, 4'-OH<br>5, 7, 3', 4'-OH, 3-rutinoside<br>5, 7, 3', 4'-OH               |
| Flavonole                     |    | kaempferol<br>quercétine<br>myricétine<br>tamarixétine | 3, 5, 7, 4'-OH<br>3, 5, 7, 3', 4'-OH<br>3, 5, 7, 3', 4', 5'-OH<br>3, 5, 7, 3'-OH, 4-OMe |
| Flavanone<br>(dihydroflavone) |    | naringène<br>naringénine<br>taxifoline                 | 5,4'-OH, 7-rhamnoglucose<br>5, 7, 4'-OH<br>3, 5, 7, 3', 4'-OH                           |
| Isoflavone                    |   | genistéine<br>genistéine<br>daïdzéine<br>daïdzéine     | 5, 4'-OH, 7-glucose<br>5, 7, 4'-OH<br>4'-OH, 7-glucose<br>7, 4'-OH                      |
| Anthocyanidines               |  | apigénidine<br>cyanidine                               | 5, 7, 4'-OH<br>3, 5, 7, 4'-OH, 3, 5-OMe                                                 |

**2.1.3.2. Activité biologiques des flavonoïdes :** L'activité antioxydante des flavonoïdes, dont leur capacité à piéger les radicaux libres, chélation des ions métalliques ou inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux, a permis de leur attribuer plusieurs activités biologiques ; Antiallergiques Anti-inflammatoires Anti-ulcéreux Anticancéreux Antidiabétique Antiviral Anticarcinogène Hypotenseur et diurétique Antispasmodique, Anti-bactérien, Hépatoprotectrice, Vasodilatateur.

**2.2. LES ALCALOÏDES :** Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. Depuis l'identification du premier alcaloïde - à savoir la morphine - à partir de l'opium en 1806, plus de dix mille alcaloïdes ont été isolés des plantes. Les alcaloïdes sont principalement extraits des plantes fleurissantes, mais on les trouve également chez quelques animaux comme les fourmis, les grenouilles et les coccinelles. Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane. Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon l'espèce de la plante, ils s'accumulent uniquement dans les écorces, dans les racines, dans les feuilles ou dans les fruits. Dans la pomme de terre, les tubercules comestibles ne contiennent pas d'alcaloïdes, tandis que les parties vertes contiennent la solanine toxique (*Solanum Tuberosum*). La partie dans laquelle les alcaloïdes s'accumulent n'est pas forcément celle où ils sont synthétisés. Dans le tabac par exemple, la nicotine (*Nicotiana Tabacum*) (2) est produite dans les racines mais transférée ensuite vers les feuilles où elle est stockée.

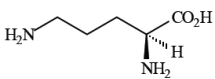
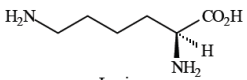
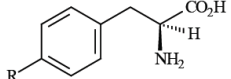
### 2.2.1. Rôle des alcaloïdes chez la plante

Le rôle des alcaloïdes dans les plantes est souvent inconnu, et leur importance dans le métabolisme de la plante n'est pas très bien définie. Une plante peut contenir plus de cent alcaloïdes différents, mais en général leur concentration ne représente pas plus de 10% du poids sec. L'existence de plantes ne contenant pas d'alcaloïdes démontre que ces composés ne sont apparemment pas essentiels à leur reproduction. Pourtant, plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent, un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes. La nicotine empêche la croissance des larves du tabac. Le composé pur est également appliqué comme insecticide efficace. En outre, des alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV. Ils constituent aussi une réserve de substances capables de fournir l'azote ou d'autres fragments nécessaires au développement de la plante. Parfois, ils n'ont pas de rôle précis et sont simplement des sous-produits du métabolisme végétal.

### 2.2.2. La classification des alcaloïdes

On estime qu'il y a plus de 10 000 alcaloïdes différents déjà isolés (ou détectés) à partir de sources végétales, animales ou de micro-organismes. Proposer une classification pour les alcaloïdes est une tâche difficile, en raison du grand nombre de composés connus et surtout à cause de la diversité structurale. L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Une façon raisonnable est alors de classer les alcaloïdes en groupes, selon leur précurseur biosynthétique. Il existe cependant un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur. Dans ces cas-là, l'atome d'azote est incorporé à un stade avancé de la biosynthèse par réactions d'amination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones (tableau 2).

**Tableau 2** : quelques types d'alcaloïdes et leur précurseur acide aminé

| Acide aminé                                                                                                                     | Type d'alcaloïde                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <br>Ornithine                                 | Pyrrolidines, pyrrolizidines, tropanes       |
| <br>Lysine                                   | Pipéridines, quinolizidines, indolizidines   |
| <br>R = H, Phénylalanine<br>R = OH, Tyrosine | Alcaloïdes du type éphédrine, isoquinoléines |

## 2.3. LES TERPENOÏDES

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est  $(C_5H_8)_n$  dont le  $x$  est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et  $n$  peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule  $C_5H_8$ . Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.)

### 2.3.1. Classification, biosynthèse et structure des terpénoïdes

Les terpènes ont été isolés chez les champignons, des algues marines et des insectes, mais la plus grande partie des ces substances est retrouvée dans les plantes. La synthèse des terpénoïdes est généralement associée à la présence des structures histologiques spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface de tissus des plantes. Les principales structures cellulaires produisant les terpénoïdes sont soit des cellules à essence, soit des poils sécréteurs stipités ou sessiles, soit des poches sécrétrices, soit enfin des canaux sécréteurs. Le réticulum endoplasmique et dans certains cas les plastides sont les organites dans lesquels les terpénoïdes sont synthétisés.

Les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires (avec les flavonoïdes et les alcaloïdes). Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène : hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes (C40) et polyterpènes

### 2.3.1.1. Hémiterpènes

Dans la nature, il existe peu de composés naturels ayant une formule de C<sub>5</sub> ramifiée; parmi certains composés naturels trouvés chez les plantes qui peuvent être considérés comme hémiterpène, seul l'isoprène a toutes les caractéristiques biogénétiques des terpènes.

### 2.3.1.2. Monoterpènes

Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurales : les monoterpènes linéaires (acyclique), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques) (fig.B2). Ils résultent d'une fusion typique tête-à-queue des unités d'isoprène.

#### a) Les monoterpènes acycliques

Le géranyl pyrophosphate (GPP), le premier composé issu du mévalonate est le précurseur de cette catégorie de monoterpènes. Dans ce groupe, le géraniol est le plus répandu dans le règne végétal.

#### b) Les monoterpènes monocycliques

Ces composés sont formés à partir du néryl pyrophosphate (NPP) ou du géranyl pyrophosphate (GPP). Les composés aromatiques sont les plus importants dans cette catégorie, comme le p-cymène et ses dérivés hydroxyles qui se trouvent associés avec le  $\alpha$ -terpinène.

Ces composés se trouvent dans un grand nombre d'huiles essentielles, surtout celles issus des conifères. La plupart de ces monoterpènes font partie des familles pinane, bornane ou thujane tandis que les familles fenchane et carane sont moins représentées. Les monoterpènes majeurs issus du pinane sont l'pinène et le pinène qui sont largement distribués dans les plantes. Le bornéol, l'isobornéol et le camphre sont les terpènes les plus importants dans la famille bornane. Les terpènes les plus communs de thujane sont les cétones thujone et isothujone, les alcools et les hydrocarbures associés. Le 17 fenchone (cétone) et les alcools ( $\alpha$ -fenchol et  $\beta$ -fenchol) sont des constituants majeurs de la famille fenchane. Enfin, le car-3-ène est le seul monoterpène commun de la famille carane.

### 2.3.1.3. Sesquiterpènes

Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules dont les plus caractéristiques sont présentées à la **figure 4**. Les sesquiterpènes se divisent en plusieurs catégories structurales, acyclique, monocyclique, bicyclique, tricyclique, polycyclique.

#### a) Les sesquiterpènes acycliques

Ils sont susceptibles d'être dérivés de *trans*, *trans*-farnésyl pyrophosphate (FPP) qui constitue l'analogue de la génération des monoterpènes acycliques à partir de GPP. Généralement tous les monoterpènes acycliques ont un analogue sesquiterpène direct.

#### b) Les sesquiterpènes monocyclique

Les sesquiterpènes monocycliques sont divisés principalement en 4 familles: Bisabolan, Germacran, Eleman et Humulan (figure B4). Le zingibérène est un exemple de la famille du Bisabolan, que l'on retrouve par exemple dans l'essence de Gingembre. Le periplanone dérivé du germacrane est une phéromone sexuelle chez la blatte.

#### c) Les sesquiterpènes polycycliques

Parmi les sesquiterpènes polycycliques, le caryophyllène est le plus important, que l'on retrouve principalement dans le poivre et certaines épices.

### 2.3.1.4. Diterpènes

Les diterpènes sont des substances avec 20 atomes de carbone (C<sub>20</sub>) élaborées à partir de 4 unités d'isoprène ; ils se forment à partir de leur précurseur, le géranylgéranylpyrophosphate (GGPP). Ces composés sont principalement présents dans les plantes supérieures dans les résines ou les gibbérélines, ainsi que dans les champignons.

### 2.3.1.5. Sesterpènes

Les sesterpènes sont des composés en C<sub>25</sub>, construits à partir de 5 unités d'isoprène. L'acide mévalonique (MVA) semble être le précurseur de cette classe. Ils ont été isolés des plantes, des champignons, des insectes, et des éponges. Il y a plus de 150 sesterpènes bien connus, parmi lesquels une trentaine a une structure de furfurane, dérivé du 3,7,11,15,19- Pentaméthyleicosane.

Les sesterterpènes sont plutôt rares dans la nature ; ils se trouvent soit sous forme linéaire soit cyclique, avec un, deux, trois ou quatre cycles.

### 2.3.1.6. Triterpènes

Les triterpènes en C<sub>30</sub> sont produits à partir de deux molécules de farnésylpyrophosphate (FPP) par une fusion de tête-à-tête. Il y a plus de 1700 triterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme tétracyclique ou pentacyclique, la forme acyclique étant très rare. Parmi les triterpènes acycliques, le squalène (figure B8) est le précurseur des autres triterpènes, et aussi des stéroïdes végétaux. La plupart de triterpènes sont des alcools, sous

forme libre ou glycoside (les saponines) ou ester. Les triterpènes libres sont des composants principaux des résines ou du latex des végétaux. La vitamine D2 est un produit dérivé de triterpène.

#### 2.3.1.7. Tetraterpènes

Les caroténoïdes sont des tetraterpènes, les plus typiques étant les apocaroténoïdes, les diapocaroténoïdes, les mégastigmanes.

#### 2.3.1.8. Polyterpènes

En général, les polyterpènes ou polyisoprènes se composent de plus de 8 unités d'isoprène. Ces terpènes se trouvent souvent sous deux formes isomériques cis- et trans. Le cis-polyisoprène se trouve dans le caoutchouc indien, alors que le polyisoprène-trans est la partie principale de gutta-percha. En plus Chicle représente un mélange de 1:2 de deux isomères cis- et trans-. Les prenylchoinones sont des polyterpènes comptant jusqu'à 10 unités d'isoprène, parmi eux, on rencontre les vitamines K1 et K2 et la vitamine E

#### 2.3.2. Les huiles essentielles

Depuis l'antiquité, certaines caractéristiques et fonctions biologiques de terpènes étaient connues pour l'homme et celles-ci ont été utilisées indirectement par l'exploitation des épices en tant que parfums et conservateurs. Plus tard, la recherche sur les composés actifs a abouti à l'extraction des terpènes notamment volatils à partir des plantes. Ces extraits végétaux dont les composants majeurs sont les mono- et sesquiterpènes s'appellent les huiles essentielles (HES).

Les HES ou les volatiles, sont des liquides aromatiques obtenus à partir de différentes parties de plantes (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorce, fruits, herbes et bois) le plus souvent par la méthode de distillation à la vapeur d'eau. Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes constituent les composants actifs les plus importants des HES, dont les mono- et sesquiterpénoïdes forment la majeure partie.

#### 2.3.3. Rôle biologique des terpénoïdes

Les plantes produisent une grande variété de produits formés à base d'isoprène, certains d'entre eux sont des métabolites primaires comme des stéroïdes et des groupes prosthétiques des enzymes et vitamines en chaînes latérales (vitamine K, E). Certains sont des hormones végétales comme l'acide abscisique ou les gibbérélines (diterpènes). Cependant la majorité des composés terpéniques sont des métabolites secondaires sans fonction directe dans la croissance des végétaux. Ces métabolites sont responsables de la couleur et l'odeur des plantes et des épices (piments, curies), certains d'entre eux ont des fonctions écologiques importantes mais la majorité (les mono- et sesquiterpènes) possèdent une activité antimicrobienne contre un large éventail des bactéries et champignons. Par ailleurs, un certain nombre de terpènes ont des propriétés toxiques, répulsives ou attractives pour d'autres organismes, ce qui a conduit à la conviction qu'ils ont des rôles écologiques dans les interactions antagonistes ou mutualistes entre les plantes et plantes-animaux. Ici nous avons évoqué deux rôles principaux des terpénoïdes connus dans la nature. Certains terpènes sont toxiques vis-à-vis de certains insectes ou nématodes. Cette action pouvant s'effectuer par une action directe sur les récepteurs du goût.

## CHAPITRE 2 : CHIMIE ANALYTIQUE : TECHNIQUES UTILISEES EN PHYTOCHIMIE

### 1. EXTRACTIONS.

L'extraction est utilisée pour extraire sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange initial, sur la base de propriétés chimiques ou physiques. Le but de l'extraction est d'isoler une ou plusieurs molécules à partir d'un organisme (animal ou végétal) selon diverses techniques.

**1.1. TECHNIQUES D'EXTRACTION :** L'homme utilise des colorants, des parfums, des arômes, et des extraits de produits naturels depuis la haute Antiquité, par différentes techniques:

- a. **La filtration:** Depuis les temps préhistoriques, l'homme utilise un lit de sable ou de mousse pour rendre une eau boueuse (pleine de boue) limpide (claire et transparente).
- b. **Le pressage :** Consiste à exercer une pression sur une orange pour obtenir le jus, ou à écraser des fleurs pour extraire les arômes.
- c. **L'enfleurage :** Est une forme d'extraction utilisée en parfumerie. Il repose sur le pouvoir d'absorption d'une huile essentielle par les corps gras. Par exemple, les fleurs fragiles sont posées sur des cadres enduits de graisse animale très pure et inodore qui absorbe le parfum des fleurs au contact; en fin de séchage, les graisses sont imprégnées de substances odorantes.
- d. **La décoction :** Cette méthode est très ancienne. Elle consiste à chauffer la racine ou l'écorce d'une plante avec de l'eau; jusqu'à ce que cette dernière soit bouillante et les constituants se dissolvent.

- e. **L'infusion** : Elle consiste à verser de l'eau bouillante sur des plantes (les feuilles ou les fleurs) finement broyées puis les laisser tremper pour dissoudre leurs principes actifs.
- f. **La macération** : Consiste à laisser séjourner à froid un solide dans un liquide pour en extraire les constituants solubles dans ce liquide.

**1.1.7. L'EXTRACTION PAR SOLVANT** : C'est un procédé qui permet d'extraire des composés qui ne peuvent pas l'être avec de l'eau. Elle consiste à faire passer, par solubilisation, la substance à extraire dans un solvant. Celui-ci peut être de l'eau, mais généralement il s'agira d'un solvant organique: éthanol, cyclohexane, éther de pétrole, toluène, etc. L'extraction par solvant fait intervenir trois étapes.

- La mise en contact du solvant avec la substance contenant le composé à extraire
  - La décantation; Est réalisée à l'aide de l'ampoule à décanter.
  - Le séchage et la filtration ; Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant. On filtre ensuite pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau. Généralement, par la suite le solvant est évaporé pour récupérer l'extrait seul
  - Le choix du solvant obéit à des critères et nécessite la connaissance des paramètres physique et caractéristiques de ce solvant.
- **L'état physique du solvant**: Le solvant doit être liquide à la température et à la pression où la réalisation de l'extraction.
  - **La miscibilité du solvant**: Le solvant doit être non miscible à la phase qui contient initialement le composé à extraire.
  - **La solubilité**: Le composé à extraire doit être très soluble dans le solvant. C'est-à-dire, beaucoup plus soluble dans le solvant que dans le milieu où il se trouve initialement (milieu aqueux en général).
  - **La densité du solvant**: ce paramètre détermine si la phase organique, contenant le composé à extraire, se trouve au dessus ou en dessous de la phase aqueuse dans l'ampoule à décanter. Les solvants d'extraction doivent être aussi:
  - **Facilement éliminés** : après extraction et donc avoir un point d'ébullition bas. Leur point d'ébullition doit être le plus éloigné possible de celui des produits à extraire
  - **Inertes chimiquement** vis-à-vis de la solution à extraire.
  - **Peu toxiques** que possible.

■ **L'ENTRAÎNEMENT A LA VAPEUR OU L'HYDRODISTILLATION** : Elle consiste à extraire les parfums des plantes (huiles parfumées ou huiles essentielles) par la vapeur

■ **L'entraînement à la vapeur**: Consiste à bouillir un mélange d'eau et de substance naturelle contenant le composé à extraire (huile essentielle). La vapeur entraîne les huiles essentielles contenues dans le produit brut. Par la suite, ces vapeurs sont condensées à l'aide d'un réfrigérant.

■ **Le relargage**: est une technique qui consiste à séparer une substance en solution de son solvant en introduisant une autre substance plus soluble qui prend sa place. Le relargage peut être suivi d'une distillation.)

■ **La décantation**: Est réalisée dans une ampoule à décanter, dans laquelle le mélange se sépare en deux phases non miscibles. Une phase aqueuse, plus dense, se situe dans la partie inférieure et une phase organique, de densité plus faible et contenant les huiles essentielles se situent au dessus

■ **Le séchage et la filtration**: Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, il est important de faire agir un déshydratant (C'est le séchage). Pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau il faut réaliser une filtration.

## 2 .CHROMATOGRAPHIE.

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange (un soluté ou extrait brut en plusieurs fractions. Cette séparation se fait par entraînement d'une phase mobile le long d'une phase stationnaire. il y a donc une distribution ou partition des composants entre ces deux types de phase.

### TYPES DE CHROMATOGRAPHIE

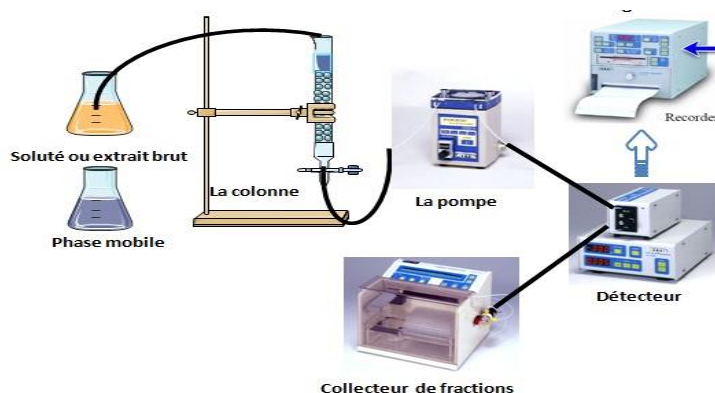
Chromatographie sur colonne et chromatographie de surface

**I. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE** : La phase mobile permet aux composés du soluté de se déplacer dans la colonne selon une vitesse différente, en fonction de:



- L'affinité à la phase stationnaire (Une substance qui a une affinité à la phase stationnaire, elle sera fixée et donc le déplacement dans la colonne est très lent)
- La solubilité dans la phase mobile (Une substance qui est très soluble dans la phase mobile, elle se déplace dans la colonne très vite).

Ce qui donne des Vitesses de déplacement différentes, et ça permet leur séparation



### Équipement chromatographique

- ✚ **Soluté ou extrait brut:** Solution qui contient les différents constituants cellulaires qu'on veut purifier.
- ✚ **La phase stationnaire:** phase fixe ou un gel (constituée de microbilles ou granules) se trouve dans une colonne, ces granules :
  - **Peuvent être poreuse**
  - **Portent une charge ionique**
  - **Portent un site d'affinité**
- ✚ **La phase mobile:** est un liquide ou tampon qui passe et se déplace à travers la phase stationnaire, en entraînant les constituants du soluté. Elle doit être soluble, Elle ne doit pas interagir avec la phase stationnaire mais uniquement avec les constituants du soluté.
- ✚ **La colonne :** Elle peut être en verre, plastique ou en inox (forte pression), la dimension est variable. C'est le support qui porte la phase stationnaire (gel ou résine) à travers ce gel, la phase mobile passe.
- ✚ **La pompe :** Permet de régler le débit de la phase mobile à travers la colonne.
- ✚ **Le détecteur :** Cet élément évalue la quantité de chacun des constituants séparés. Le détecteur envoie un signal électronique vers un enregistreur
- ✚ **L'enregistreur :** dessinera les pics en fonction de leur intensité. L'ensemble des pics est appelé chromatogramme.
- ✚ **Le collecteur de fractions :** un appareil qui permet de collecter les différentes fractions du soluté (par exp. 2ml/tube)

### MODE OPERATOIRE

1. Préparation du gel
2. Remplissage de la colonne
3. Équilibration de la colonne (tampon A)
4. Injection de l'échantillon
5. Éluion (tampon B)
6. Récupération des fractions
7. Analyse du chromatogramme
8. Régénération du gel (tampon de régénération)

### 1. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE OU FILTRATION SUR GEL

Il s'agit ici d'une séparation des protéines selon leur taille ou forme utilisant un tamis moléculaire. Une colonne de chromatographie pour filtration sur gel est remplie d'un gel (billes creuses et poreuses). C'est une chromatographie dont la colonne est remplie d'un gel poreux, le diamètre des pores est proche de la taille des molécules à séparer.

Les grosses molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues et donc éluées en premier. Les petites molécules et les molécules de taille moyenne sont éluées plus tardivement, elles pénètrent dans les pores du gel (sont inclus dans le gel), leur migration est donc retardée.

### 1.2. Caractéristique des gels

- **La porosité** : Détermine le pouvoir filtrant (microporeux ou macroporeux)
- **Inertie chimique** : Pas de pouvoir adsorbant vis-à-vis des solutés ni d'interaction avec la phase mobile
- **Stabilité physicochimique** : Résistance à la T°, pression (gel rigide: 5-20 atm, gel mou, pression <1atm)
- **Granulométrie** : La taille des granules du gel (10-120µM: pour les particules plus ou moins grosses, <40µM: particules fines)
- **La Forme** : La forme qui assure un écoulement uniforme de la phase mobile est la forme sphérique)
- **La nature** : les gels peuvent être en dextran, polyacrylamide et agarose.

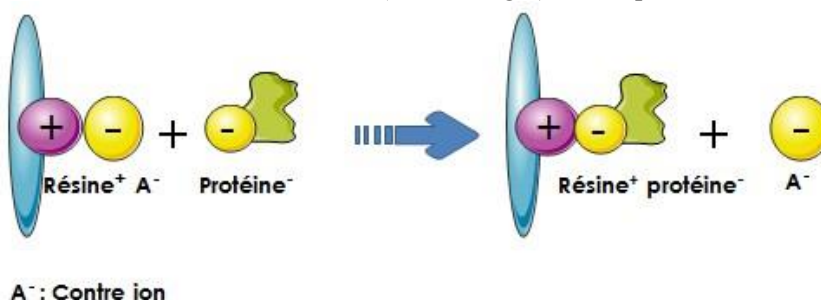
#### Application:

- Dessalage
- Purification
- Élimination des virus (stérilisation)
- Détermination du PM

**2. CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEUR D'ION** : est une technique où la séparation est en fonction de la charge électrique. La phase stationnaire est un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions électrostatiques (ioniques) avec des protéines ionisées. Dans cette chromatographie, la colonne est remplie d'une phase stationnaire porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement. Il s'agit d'une séparation des protéines basée sur des interactions ioniques réversibles entre:

1. une phase stationnaire appelée échangeurs d'ion et
2. des contre ions échangeables ou mobiles et
3. un soluté ou protéine chargé

La phase stationnaire est constituée d'une matrice (résine ou gel) sur laquelle est fixé des groupements chargés



### 2.2. Les différents types d'échangeurs

**a- Échangeur anionique** : qui échange réversiblement des anions. Un échangeur anionique est chargé positivement.

**b- Échangeur cationique** : qui échange réversiblement des cations. Un échangeur cationique est chargé négativement.

#### MODE OPERATOIRE

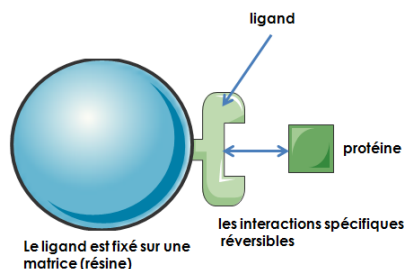
1. Choix du gel
2. Choix de la phase mobile
3. Conditions de travail
4. Remplissage de la colonne
5. Équilibration de la colonne (fixation des contre ions)
6. Injection de l'échantillon (l'étape de fixation ou adsorption des protéines)
7. Élution (étape de désorption par la Fi ou pH)
8. Récupération des fractions
9. Analyse du chromatogramme
10. Régénération du gel

L'élution est réalisée en modifiant le pH ou en augmentant la force ionique. Le pH influe sur la charge nette de la protéine (caractère amphotère) :

- Si  $pH > p_i$  :  $p_n^-$  : Pour éluer cette protéine, il est nécessaire de diminuer le pH, La protéine sera chargée positivement, elle décrochera de la résine
- Si  $pH < p_i$  :  $p_n^+$  : Pour éluer cette protéine, il est nécessaire d'augmenter le pH, La protéine sera chargée négativement, elle décrochera de la résine

### 3. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

C'est une méthode de purification ou séparation basée sur les interactions spécifiques réversibles entre un ligand et une protéine. Le ligand est fixé sur une matrice (résine) directement ou indirectement à l'aide d'un bras espaceur.



**Matrice ou résine :** Peut être en dextran, agarose et polyacrylamide, elle Permet la fixation chimique du ligand (directement ou indirectement)

**Bras espaceur c'est une** Chaîne polycarbonnée(C6-C8) intercalé entre la matrice et le ligand

**Ligand :** C'est la molécule fonctionnelle, Fixée directement ou indirectement sur la matrice.

#### MODE OPERATOIRE

1. Choix de la phase mobile
  2. Remplissage de la colonne
  3. Équilibration de la colonne
  4. Injection de l'échantillon
  5. Lavage de la colonne pour éliminer les substances non adsorbées
  6. Éluion des substances adsorbée ou fixée :
- **Éluion non spécifique :** C'est l'augmentation de la concentration en sels, ou en changeant le pH.
  - **Éluion spécifique :** L'utilisation d'un tampon d'éluion qui contient un compétiteur « ligand non fixé »
7. Récupération des fractions
  8. Analyse du chromatogramme
  9. Régénération du gel

**II. CHROMATOGRAPHIE DE SURFACE :** La chromatographie sur couche mince (CCM) est basée sur des phénomènes d'adsorption. la phase mobile ou l'éluant est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide

#### 5.2. PRINCIPE

- ⊙ déposer l'échantillon dans la cuve,
- ⊙ l'éluant ou le solvant monte à travers la phase stationnaire
- ⊙ Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant.
- ⊙ Cette vitesse est en fonction de:

1. L'affinité à la phase stationnaire
2. La solubilité dans la phase mobile

### 3. METHODES D'ANALYSE STRUCTURALE « SPECTROSCOPIQUES »

**1. Définition:** Le mot spectrophotomètre est dérivé du latin **spectrum**, qui signifie image, et du grec **phos** ou **photos**, qui signifie lumière. Les méthodes spectroscopiques se basent sur l'absorption ou l'émission de radiation du spectre électromagnétique par beaucoup de molécules quand les électrons changent de niveaux énergétiques. L'interaction de l'énergie de la lumière avec la matière est utile pour **déterminer les composés** et leur **concentration** dans des mélanges de matière. Le spectre électromagnétique se situe dans la gamme des rayons-γ jusqu'aux ondes radio de très basse énergie. Beaucoup de régions du spectre sont utilisées pour obtenir des informations sur la composition des échantillons (Figure 1).

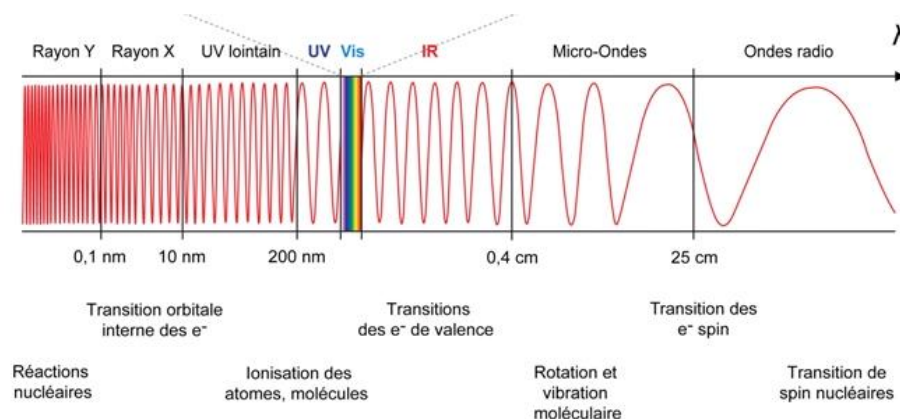


Figure 1. Le spectre électromagnétique.

## 2. SPECTROSCOPIE ET SPECTROMÉTRIE

La **spectroscopie** est la science qui traite des interactions de différents types de rayonnement avec la matière. Les mesures spectroscopiques sont largement appliquées aux analyses environnementales inorganiques, telles que les analyses de spéciation des métaux.

La **spectrométrie**, quant à elle, concerne l'instrumentation et les mesures pour des études spectroscopiques, à l'heure actuelle, la majorité des méthodes analytiques environnementales pour les polluants organiques sont basées sur des mesures spectrométriques couplées à des techniques séparatives telles que la chromatographie.

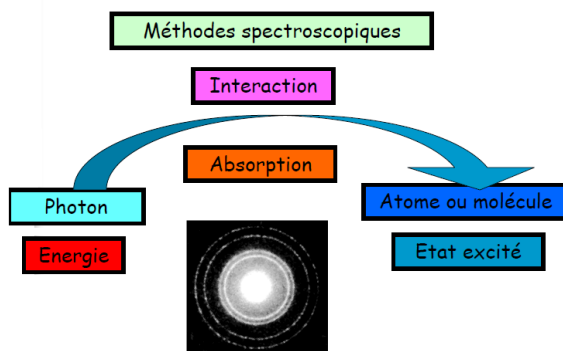
Lorsqu'un atome est chauffé ou qu'il subit une décharge électrique, un de ses électrons de sa couche périphérique (ou plus rarement des couches internes) passe du niveau fondamental à un niveau d'énergie supérieur appelé niveau d'état excité. Ce phénomène s'appelle l'absorption. Lorsque l'électron redescend, il émet de l'énergie sous forme lumineuse (photon) : c'est l'émission. Ces deux phénomènes peuvent être exploités pour servir de méthodes d'identification.

## 3. TYPES DE SPECTROSCOPIE

Les techniques spectroscopiques peuvent être classées selon le processus de mesure : **absorption, émission et diffusion du rayonnement électromagnétique** (Figure 2).

L'interaction rayonnement-matière peut causer une redirection du rayonnement et/ou des transitions entre les niveaux d'énergie des atomes ou des molécules.

- Une transition d'un niveau inférieur vers un niveau plus haut d'énergie avec transfert d'énergie du champ de rayonnement vers l'atome ou la molécule est appelée **absorption**.
- Une transition d'un niveau plus élevé vers un niveau inférieur est appelée **émission** si l'énergie est transférée de l'atome ou de la molécule vers le champ de rayonnement.
- La déviation de la lumière due à l'interaction avec la matière est nommée **diffusion**, et s'effectue avec ou sans transfert d'énergie, c'est-à-dire que le rayonnement diffusé a une longueur d'onde légèrement différente ou égale à celle du rayonnement incident.



**Conclusion :** La spectroscopie est la mesure de l'analyse de la radiation électromagnétique **absorbée, dispersée ou émise** par des **atomes, molécules** ou d'autres **espèces chimiques**. Les analyses se réalisent dans les régions de **l'ultraviolet, du visible, de l'infrarouge (IR), du rayonnement X, des micro-ondes** et de **la fréquence radio** du spectre électromagnétique.

L'absorption de la radiation produit une **transition des électrons** entre les niveaux électroniques de la molécule. Ensuite, l'électron peut revenir à son **état d'équilibre** par **émission de radiation** ou par **fluorescence**, correspondant à des différences d'énergie (Tableau 1).

**Tableau1 : techniques spectrométriques**

| Techniques                                                                             | Principe                       | Applications                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------|
| Spectroscopie Arc/spark<br>Spectrométrie d'émission de Plasma<br>Photométrie de Flamme | Émission atomique              | Analyse quantitative des métaux               |
| Spectrométrie de fluorescence aux rayons X<br>Spectrométrie de fluorescence atomique   | Émission fluorescence atomique |                                               |
| Spectrométrie d'absorption atomique                                                    | Absorption atomique            |                                               |
| Spectrométrie UV, Vis, IR                                                              | Absorption moléculaire         | Analyse quantitative des éléments et composés |
| RMN                                                                                    | Absorption nucléaire           | Analyse structurale des composés organiques   |

### 3.1. SPECTROSCOPIE ATOMIQUE

La spectroscopie d'absorption ou d'émission atomique est probablement la plus ancienne méthode analytique utilisée dans le monde. Elle inclut deux méthodes d'analyse quantitative qui peuvent être utilisées pour mesurer les concentrations d'environ 70 éléments (métaux, métalloïdes et non-métaux).

**3.1.1. Principe:** Le principe dépend des mesures faites dans un analyte qui est transformé sous la forme d'atome libre (atomisation). Une fois que les atomes ne peuvent plus tourner ou vibrer comme les molécules, dans ce cas seulement, des transitions électroniques ont lieu quand l'énergie est absorbée. Les atomes dans l'état fondamental absorbent l'énergie dans une certaine longueur d'onde produite par une source composée par les mêmes atomes à être analysé à partir d'une source (**lampe avec cathode creuse**). Cette source produit une radiation électromagnétique intense avec une longueur d'onde similaire à celle absorbée par les atomes. (Figure) Lorsqu'on excite un **atome** par un apport externe d'**énergie** (énergie thermique, rayonnement électromagnétique, bombardement de **neutrons**, etc.), les **électrons** de la couche externe de cet atome peuvent passer d'un état énergétique  $E_m$  à un état d'énergie supérieure  $E_n$ . Ces électrons passent alors à un niveau supérieur instable, plus éloigné du **noyau**, puis tendent ensuite à revenir à leur niveau initial par une transition durant laquelle ils émettent un **photon** d'énergie  $E$  définie par la relation :

$$|E_n - E_m| = h\nu_{nm} = hc / \lambda_{nm}$$

- Où -  $h$  est la constante de Planck ( $h = 6,63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ ),  
 -  $c$  la vitesse de la lumière ( $c = 3,00 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  
 -  $\lambda_{nm}$  la longueur d'onde  
 -  $\nu_{nm}$  la fréquence du rayonnement associé au photon

La sensibilité se situe dans la gamme des parties par million (ppm) et parties par milliard (ppb), avec des avantages additionnels notamment la vitesse, la grande sensibilité et les coûts modérés de l'instrument.

### 3.1.2. TECHNIQUES DE SPECTROMÉTRIE ATOMIQUE

La sélection de la méthode à utiliser dépend du nombre d'analyses et de la concentration à déterminer

**Tableau 1.** Techniques de spectrométrie atomique

| Technique                                               | Excitation                 | Détection              |
|---------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Photométrie par flamme                                  | Flamme chimique            | UV-Vis radiation émise |
| Spectrométrie par Absorption atomique (AAS)             | Absorption de radiation EM | Radiation EM absorbée  |
| Spectroscopie Arc/spark                                 | Décharge électrique        | UV-Vis radiation émise |
| Spectrométrie d'émission de Plasma                      | Plasma Gazeux              | UV-Vis radiation émise |
| Plasma – Spectrométrie de masse                         | Plasma Gazeux              | Ions                   |
| Spectrométrie de fluorescence de rayons X Spectrométrie | Irradiation par rayons X   | Rayons X Fluorescents  |

**3.1.3. APPLICATIONS :** La spectrométrie d'absorption atomique permet le dosage de nombreux matériaux inorganiques (roches et minerais, métaux et alliages..., citons notamment :

- ✓ En métallurgie : l'analyse des altérations du bronze, l'effet des produits de nettoyage de l'argent,

- ✓ l'analyse des constituants majeurs et mineurs de céramiques,
- ✓ le dosage du Ca, Sr, Zn dans les os,
- ✓ analyse des éléments traces pour identification des pierres,
- ✓ la dégradation des verres.
- ✓ L'AAS trouve aussi des applications à l'étude et la conservation des documents graphiques :
- ✓ dosage des charges minérales dans les papiers, en particulier pour l'étude des
- ✓ méthodes de désacidification
- ✓ dosage des particules métalliques (Cu, Fe...) dans le papier

### 3.2. SPECTROSCOPIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

RMN signifie Résonance magnétique nucléaire: il s'agit d'une technique d'analyse qui permet de déterminer la structure d'une molécule organique. Elle consiste à soumettre une molécule à un champ magnétique. Ce dernier permet de faire résonner les atomes d'hydrogène de la molécule. Les différentes fréquences de résonance des atomes d'hydrogène sont consignées dans un graphique permettant de déterminer la structure de la molécule

- Propriétés magnétiques du noyau de l'atome d'hydrogène : Un atome d'hydrogène ne comporte qu'une seule particule dans son noyau. Le proton se comporte comme un petit aimant : le noyau de l'atome d'hydrogène possède des propriétés magnétiques dues à une grandeur typiquement quantique appelée le spin. Un aimant possède un moment magnétique que l'on peut symboliser par un vecteur. En l'absence de champ magnétique les moments magnétiques sont orientés de manière aléatoire. Soumis à un champ magnétique les moments magnétiques des noyaux s'orientent. Deux orientations sont possibles :

- même sens que le champ magnétique
- sens opposé au champ magnétique

**3.2.1. Principe :** La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique qui repose sur le magnétisme du noyau. Elle est fondée sur la mesure de l'absorption d'une radiation dans le domaine des fréquences radio par un noyau atomique dans un champ magnétique fort. Elle constitue l'une des plus puissantes méthodes de détermination de la structure des espèces aussi bien organiques qu'inorganiques.

Le principe de la RMN du proton consiste à :

- 1- Utiliser un champ magnétique  $H_0$  pour orienter les "spins" nucléaires des atomes,
- 2- Exciter ces spins par une onde radio à la fréquence de résonance, ce qui fait basculer certains spins
- 3- Après l'excitation, les spins reviennent à leur état initial (relaxation).

Grâce à la spectroscopie RMN, on peut identifier des noyaux d'atomes comme celui de l'hydrogène ou du carbone. Cette technique est très efficace avec les molécules organiques car l'hydrogène est très présent (Figure).

#### 3.2.2. APPLICATIONS DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

- ✓ la **résonance magnétique nucléaire (RMN)** qui est à la base de l'**imagerie par résonance magnétique (IRM)** ; technique d'imagerie médicale permettant d'obtenir des vues en deux ou trois dimensions de l'intérieur d'un corps ;
- ✓ la **résonance paramagnétique électronique (RPE)** ou résonance de **spin** électronique (RSE), qui est notamment utilisée pour l'analyse de **matériaux** et en **datation archéologique**.
- ✓ Dans le domaine de la chimie, cette spectrométrie permet d'identifier des composés organiques. Elle permet d'étudier des protéines, des acides nucléiques à des concentrations milli molaires.
- ✓ Dans la dynamique nucléaire, les études par RMN des liquides mettent en œuvre la relaxation nucléaire (phénomène d'évolution d'un système de spins nucléaires vers l'équilibre thermodynamique suite aux interactions avec son environnement).
- ✓ Dans les polymères, la RMN est utilisée pour étudier les mouvements moléculaires. On peut également y rechercher le taux de cristallinité.

### 3.3. SPECTROSCOPIE MOLÉCULAIRE

Tout comme les atomes, **les molécules** possèdent des niveaux d'énergie correspondant à leurs énergies de **rotation** et de vibration. Par conséquent, un spectre moléculaire est bien plus complexe qu'un spectre atomique. On observe généralement des groupements de raies caractéristiques appelés **bandes** et l'on qualifie souvent les spectres moléculaires de **spectres de bandes**.

#### 3.3.1. SPECTROSCOPIE DE VIBRATION DANS L'INFRAROUGE I (IR)

Le rayonnement infrarouge, découvert par Frédéric Wilhelm Herschel en 1800, est une onde électromagnétique qui s'étend de 0,8  $\mu\text{m}$  à 1000  $\mu\text{m}$ . Il est arbitrairement divisé en 3 régions,

- Proche-IR 0,8-2,5  $\mu\text{m}$       13300-4000  $\text{cm}^{-1}$
- IR moyen 2,5-25  $\mu\text{m}$       4000-400  $\text{cm}^{-1}$
- IR-lointain 25-1000  $\mu\text{m}$       400-10  $\text{cm}^{-1}$

Même si les régions du proche et du lointain IR ont suscité un certain intérêt, l'utilisation de la spectroscopie moyen IR, reste la plus adaptée pour l'élucidation de la composition moléculaire d'un composé (Figure).



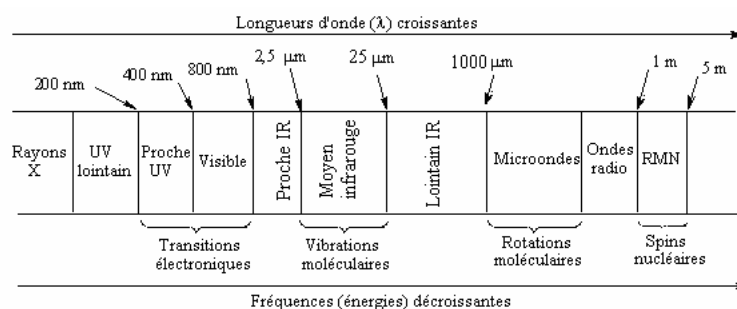


Figure 1 : Domaines de l'IR dans le spectre électromagnétique

### 3.3.1.1. Principe

Les mouvements des atomes d'une molécule peuvent être classés en trois catégories:

- ✚ les translations
- ✚ les rotations
- ✚ les vibrations

La spectroscopie infrarouge (IR) étudie **les vibrations** des molécules lorsqu'elles sont irradiées par une onde électromagnétique comprise dans le domaine de l'infrarouge, dont la fréquence correspond à sa fréquence propre. Ce faisant, **elle absorbe la radiation**. Chaque type de liaison (C-C, C-H, C-O, ...) possède une **fréquence de résonance qui lui est spécifique**.

Quel que soit l'état (solide, liquide ou gazeux), les mouvements de vibrations modifient légèrement et périodiquement la longueur et l'orientation des liaisons. Il existe différents types de déformation des liaisons. Par exemple, pour les molécules possédant minimum 3 atomes, voici les principaux :

- **Étirement symétrique** : les deux atomes "extérieurs" s'éloignent et se rapprochent simultanément de l'atome central.
- **Étirement asymétrique** : quand l'un des atomes "extérieurs" se rapproche, l'autre s'éloigne de l'atome central.
- **Cisaillement** : les atomes "extérieurs" se rapprochent et s'éloignent l'un de l'autre dans le plan de la molécule.
- **Torsion** : un des atomes "extérieurs" se déplace d'avant en arrière du plan de la molécule, tandis que l'autre effectue le chemin inverse.

**Le principe** d'une spectroscopie IR est d'envoyer des radiations IR sur un échantillon à tester. Certaines longueurs d'onde sont alors absorbées par les liaisons chimiques des molécules se trouvant dans l'échantillon. On génère alors un spectre IR, qui permet de déterminer ces liaisons chimiques. Une spectroscopie infrarouge peut ainsi avoir différentes finalités:

- Identifier et caractériser une molécule inconnue, en référençant ses liaisons.
- Tester la présence ou l'absence d'une molécule dans un échantillon

**2.3.1.3. Les groupes fonctionnels** : Les groupements d'atomes (appelés aussi groupes fonctionnels) les plus courants et détectables par spectre IR sont :

- Les alcools, Les acides carboxyliques, Les aldéhydes, Les cétones, Les esters, Les amines, Les amides

**3.3.1.4. Applications** : L'utilisation de spectrophotométrie infrarouge est largement répandue dans un grand nombre d'industries donnant lieu à des applications analytiques très diverses :

- ✚ Industrie agro-alimentaire ;
- ✚ Industrie pharmaceutique ;
- ✚ Domaines des matériaux (polymères,)

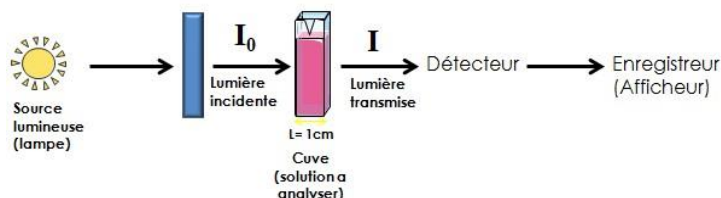
### 3.3.2. SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE DANS L'UV-VISIBLE

La spectrométrie se base sur l'absorption de la radiation électromagnétique dans la longueur qui correspond à une gamme entre l'Ultra-violet (UV) et l'infrarouge (IR) dans le spectre de la radiation électromagnétique. La Spectrophotométrie UV-Vis utilise la radiation électromagnétique entre l'UV (200-400 nm) et le visible (400-750 nm) comme source de lumière pour promouvoir énergétiquement les électrons dans une molécule en solution à un niveau énergétique plus élevé. Le spectrophotomètre UV-Vis mesure la quantité d'énergie absorbée.

### 2.3.2.1. Principe

L'absorption d'un rayonnement ultraviolet ou visible correspond à une interaction des photons avec les électrons des couches externes des atomes ou des molécules. La position du maximum d'absorption correspond à la longueur d'onde de la radiation qui provoque la transition électronique. Les molécules qui possèdent des doubles liaisons, des triples liaisons, des cycles aromatiques ou des cycles hétérocycles absorbent dans l'UV.

✚ **La loi de Beer-Lambert.** : Un faisceau lumineux monochromatique (une longueur d'onde fixe) de longueur  $l$  et intensité  $I_0$  traverse une cuve à base carrée contenant une solution d'une substance de concentration  $C$ , à une distance  $L$  ( $L$ =longueur de la cuve).



- Si  $I_0 = I$ , milieu transparent
- Si  $I_0 > I$ , milieu partiellement absorbant
- Si  $I = 0$ , milieu opaque (absorption totale)

On définit :

- ✓ La transmittance ( $T$ ): qui est le pourcentage de transmission  $T\% = I/I_0 \cdot 100$
- ✓ Absorbance ( $A$ ) ou densité optique ( $DO$ ) qui représente la valeur du logarithme décimal de l'inverse de  $T$
- ✓  $A = \log(1/T) = \epsilon \cdot L \cdot C$

**La loi de Beer Lambert :**  $A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot L \cdot C$

- $A_\lambda$  = l'absorbance à une longueur  $\lambda$
- $\epsilon_\lambda$  = coefficient d'absorption molaire ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
- $L$  = trajet optique (cm)
- $C$  = concentration de la solution (M)

✚ D'après **Beer Lambert**, l'absorbance  $A_\lambda$  est fonction de la concentration  $C$  de la solution, du coefficient d'absorption molaire et de la longueur de solution à traverser  $L$

✚ Condition de validité de la loi de Beer Lambert : cette loi n'est pas valable que dans certaines conditions:

1. le monochromatisme (une seule longueur d'onde  $\lambda_{max}$ )
2. Les faibles concentrations (diluées)
3. température stable (e dépend de la Température)
4. pH stable
5. Clarté du milieu

### 2.3.2.3. PRINCIPES DES DOSAGES

**a- Méthode de dosage directe :** Si la substance à doser possède un pic d'absorption caractéristique, on mesure l'absorbance à  $\lambda_{max}$  et on calcule directement la concentration par la loi de Beer Lambert (e doit être connue). Exp: dosage des protéines à une longueur de 280nm

**b- Méthode de dosage indirecte**

Ces méthodes sont utilisées dans le cas où la substance à doser ne possède pas un pic d'absorbance caractéristique ( $\lambda_{max}$ ):

- Utilisation d'un réactif coloré
- Utilisation d'une gamme d'étalonnage

**Remarque :** La lecture est effectuée contre une solution appelée le blanc, qui contient tout les constituants du milieu sauf la substance à doser (échantillon), pour que l'absorbance soit pour la substance à doser.

### 2.3.2.4. APPLICATION :

- La Détermination de la concentration en acides nucléiques – ADN et ARN
- ✚ Détermination de la concentration en protéines par mesure directe ou par essais colorimétriques, étude des réactions enzymatiques et suivi des courbes de croissance des suspensions de cellules bactériennes