Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma

Année Universitaire : 2014-2015

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Etude chimique et activité antioxydante de Stevia rebaudiana

Présenté par:

BENFARES Aziza

Encadré par:

- ✓ **Pr. Kh. MOUGHAMIR**
- ✓ **Pr. H. GRECHE**

Soutenu Le 24 juin 2015 devant le jury composé de:

- **Pr. N. IDRISSI KANDRI**
- **Pr. Kh. MISBAHI**
- **Pr. H. GRECHE**
- **Pr. Kh. MOUGHAMIR**

Stage effectué à : laboratoire du contrôle de qualité de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom : BENFARES Aziza

Année Universitaire : 2014 / 2015

Titre:

Résumé

Grâce à son pouvoir sucrant élevé du aux glycosides de steviol contenus dans les feuilles, la stévia peut résoudre tant de problèmes de santé et remplacer les édulcorants artificiels.

Ce travail fait un rappel des données botaniques, phytochimiques , biologiques des feuilles de stévia , en effet durant le stage effectué au sein de l'institut national des plantes médicinales et aromatiques (INPMA), on a extrait les stéviosides à partir des feuilles de stévia tout en comparant avec deux méthodes d'extraction : ultrasons et macération à chaud, cette dernière a présenté la meilleure rentabilité . Ensuite on a procédé à une décoloration du sirop de stévia pour l'obtention d'une masse solide blanchâtre .

L'étude de l'activité antioxydante par le test du DPPH a révélé un pouvoir antioxydant maximal (74 %) obtenu à la concentration de 50 µg/ml de l'extrait éthanolique de stevia. L'analyse qualitative (criblage phytochimique) de l'extrait aqueux a montré la présence des flavonoïdes et tannins et l'absence totale des saponosides .

Mots clés : **stévia , stéviosides, extraction ,activité antioxydante , criblage**

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Remerciement

Le travail présenté a été effectué au sein du laboratoire du contrôle de qualité de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate, sous l'encadrement des professeurs : Pr. Hassane GRECHE , Kh. MOGHAMIR. Je tiens à leur exprimer ma profonde gratitude et mes vifs remerciements d'avoir accepté de m'encadrer durant ce travail. Leur soutien scientifique, leurs remarques et critiques, leur modestie m'ont aidé à mener à bien ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également à Laila EL HANAFl doctorante pour son aide et leur disponibilité durant ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur Pr. **OUAZZANI CHAHDI Fouad**, responsable du master « Chimie des molécules bioactives » pour m'avoir autorisé à m'inscrire dans ce master afin de suivre mes études. Je tiens aussi à remercier tous les enseignants de la formation pour les efforts précieux et considérables qu'ils ont accomplis pour assurer notre formation universitaire.

Mes remerciements vont aussi, à Pr **N. IDRISSI KANDRI**, à Pr **Kh. MISBAHI** qui ont bien voulu accepter de juger ce mémoire et d'examiner ce travail de recherche. Je leur exprime mes très vifs remerciements et mon profond respect.

J'adresse mes remerciements à tous ceux qui m'ont apporté leurs savoirs faire, leurs aides techniques, leurs expériences, nécessaires pour la réalisation et le développement de ce travail. Enfin je tiens à remercier toutes les personnes intéressées par mon travail et tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de prés.

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Liste des figures

Figure 2 : Figure réacteur de soxhlet 15
Figure 3 : Principe de la chromatographie d'adsorption 16
Figure 4 : Principe de la chromatographie échangeuse d'ion 18
Figure 5 : Structure du béta carotène 20
Figure 6 : structure du radicale-cation $ABTS^{+\circ}$ 21
Figure 7 : Génération de radicaux peroxyde à partir d'AAPH 22
Figure 8 : La réaction de réduction du DPPH par un antioxydant 23
Figure 9 : Stevia rebaudiana 24
Figure 10 : glycosides de steviolde de S. rebaudiana. [17] 26
Figure 11 : Localisation des étapes de la biosynthèse dans la plante 27
Figure 12 : Voie du mévalonate (MEP) : synthèse des terpènes 28
Figure 13 : Etape des terpènes cyclases 29
Figure 14 : Etape des glycosylations 30
Figure 14 : Résine utilisée : Gel de type Tulsion T -42 H^+ 35
Figure 15 : glycosides de steviolde S. rebaudiana obtenu 40
Figure 16 : Comparaison entre les rendements organiques et aqueux des deux méthodes d'extraction : macération et sonication 42
Figure 17 : la variation de l'effet antioxydant en fonction de la concentration 44

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de Dérivés diterpéniquesglycosylés[20] 27
Tableau 2 : Rendement de l'extrait aqueux 40
Tableau 3 : Rendement de l'extrait organique avant cristallisation:..... 40
Tableau 4 : Les rendements obtenus après la concentration 42
Tableau 5 : Les fractions solides obtenues après concentrations 43
Tableau 6: Activité Antioxydante de l'extrait de stevia à différentes concentration 43
Tableau 7 : Résultats de criblage phytochimique..... 45

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Liste des abréviations

AAPH : 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochlorure

ABTS$^{+\circ}$ **:** acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

CDPS : cyclodipeptide synthases

CPS :copalyldiphosphatesynthase

DPPH : 1,1-dipheny1-2-picrylhydrazyle

DXR: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase

DXS : Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase

GGDP : géranylgéranyldiphosphate

GGDPS : géranylgéranyldiphosphate transférase

HMG-CoA: (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA)

KAH : 'acide kaurénoïque 13-hydroxylase

KO : kaurène oxydase

KS : kaurène synthase

m/z : masse/charge

MEP : méthylerythritol 4-phosphate

OMS : *Organisation mondiale de la santé*

SM : La spectrométrie de masse

TEAC : Capacité Antioxydante Equivalente Trolox

TRAP: total radical trapping antioxidant potential

UGT : Glucuronosyltransferase

U.V : Le rayonnement ultraviolet

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Sommaire

Remerciement

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale

Etude bibliographique

I. Plantes médicinales : 12

I.1. Définition 12

I.2. Historique : 12

I.3. Domaine d'application des plantes médicinales : 12

II. Généralités Méthodes d'extraction des plantes 13

II.1. Les percolations 13

II.2. Les infusions 13

II.3. Les décoctions 13

II.4. Les macérations 14

II.5. Soxhlet 14

II.6. Le CO_2 su*percritique* 15

III. Techniques de séparation : 16

III.1. La chromatographie d'adsorption 16

III.2. Chromatographie de partage 17

III.3. Chromatographie en phase gazeuse : 19

III.4. La spectrométrie de masse (SM) 19

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

IV. Activité antioxydante : 20
IV.1. Généralités sur l'effet antioxydant 20
IV.2. Méthode d'étude d'activité des antioxydants des plantes médicinale 20
IV.2.1. Le β-carotène comme indicateur d'oxydation 20
IV.2.2. Test de réduction du radical-cation $ABTS^{+\circ}$ ou TEAC 21
IV.2.3. Test de capture des radicaux peroxyles :TRAP et ORAC 21
IV.2.4. Test de réduction du DPPH 22
V. plante sélectionnée: Stevia rebaudiana Bertoni 23
V.1. Description botanique du Stevia rebaudiana Bertoni : 23
V.2. Classification botanique : [14] 24
V.3. Étude phytochimique des feuilles de Stevia rebaudiana : 24
VI. Les activités biologiques de steviarebaudiana : 31
VI.1. Activité hypoglycémique 31
VI.1. Activité antibactérienne et antifongique [26] : 31
VI.2. Activité antivirale [27] 31

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal : 33
II. Extraction des stéviol glycosides 33
II.1. Extraction des stviol glycosides par macération à chaud : 33
II.1.1. Préparation de l'extrait aqueux : solide -liquide 33
II.1.2. Préparation de l'extrait organique : liquide -liquide 33
II.2. Extraction assistée par Ultrasons: 34
II.2.1. Préparation de l'extrait aqueux : solide –liquide 34
II.2.2. Préparation de l'extrait organique : liquide –liquide 34
III. Purification des stéviosides par colonne 34

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

III.1. Décoloration de l'extrait de stevia : 35
IV. Test d'effet antioxydant: 36
IV.1. La préparation de la solution de DPPH : 36
IV.2. La préparation de l'extrait : 36
IV.3. Protocol expérimentale : 36
IV.4. Expression des résultats : 37
V. Criblage phytochimique 37
V.1. Tanins 38
V.2. Flavonoïdes 38
V.3. Saponosides 38

Résultats et discussion

I. Extraction par macération à chaud : 40
I.1. L'extraction solide –liquide : 40
I.2. Extraction liquide –liquide : 40
II. Extraction assistée par Ultrasons 41
III. Décoloration de l'extrait de stevia 42
IV. effet antioxydant par test DPPH 43
V. Criblage phytochimique : 44
Conclusion et perspective
Réferences

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Introduction générale

L'histoire des plantes aromatiques est associée à l'évolution des civilisations. Ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires.

La Stévia a subi une évolution très importante dans le monde actuel. En effet, elle n'était, auparavant, qu'une plante sauvage traditionnelle qui, peu à peu a suscité de l'intérêt et s'est retrouvée mise en culture, avant même d'obtenir un statut dans notre société et une valeur économique.

De nos jours l'alimentation est trop riche en glucides, cette suralimentation est la cause de beaucoup de pathologies importantes. Dans le but de réduire ce problème majeur, les industries agroalimentaires tentent de développer des produits à teneur réduite en édulcorés par des molécules au goût sucré, molécules chimiques pour la plupart. Ce sont les édulcorants artificiels ou chimiques comme l'aspartame, la saccharine ou encore le cyclamate. Malgré leur utilisation courante, ces produits sont soupçonnés d'avoir des effets néfastes sur la santé après plusieurs années de consommation. C'est une des raisons pour lesquelles la découverte de cet édulcorant naturel, à base de Stévia, pourrait révolutionner le marché des édulcorants.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail dont le but principal est de chercher à connaître un peu plus cette plante, donc après avoir traité les aspects botanique, et chimique de la plante ainsi que ses activités biologiques et les méthodes d'extractions et de purification nous avons visé, pratiquement ,les objectifs suivants :

- Extraction des stéviosides en comparant avec deux méthodes d'extraction : macération à chaud et ultrasons.
- Purification des stéviosides par colonne.
- Réalisation du test d'effet anti oxydant.
- Réalisation d'un criblage phytochimique pour connaitre les familles qui se trouvent dans l'extrait aqueux.

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Etude bibliographique

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

I. Plantes médicinales :

I.1. Définition

Les plantes médicinales peuvent être définies comme toute plante ou partie employée à des fins thérapeutiques ou contenant des substances pouvant fournir des médicaments par voie de synthèse ou d'hémi-synthèse [1].

I.2. Historique :

Chaque civilisation a tissé avec les plantes des rapports bien spécifiques. Les plantes ont occupé une place primordiale et ont été, pour les hommes, un point de contact privilégié avec la nature et la santé. En effet, pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours de la médecine de nos grands-parents.

Les arabes avaient leurs spécialistes en médecine et en pharmacie : Ibn Albaytar rédigea le très complet Somme des Simples: ce livre contenait une liste de 1400 plantes médicinales et leurs préparations [1].

Au XIX° siècle, les progrès de la chimie mettent en évidence les « principes actifs » des végétaux et les premiers médicaments de synthèse sont réalisés industriellement vers 1890.

De nos jours entre 20.000 et 25.000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine.

I.3. Domaine d'application des plantes médicinales :

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie.

- En ***pharmacie :*** on utilise une forte proportion de médicaments d'origine végétale selon l'OMS 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale Parmi les composés utilisés dans la médecine on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires.
- ***En alimentation*** : les épices et les herbes sont trop utilisées dans l'alimentation. La notion de flaveur des épices et aromates recouvre l'ensemble des perceptions olfacto-gustatives. Ces perceptions résultent de stimulations générées par un multiple des composés organiques dont certains sont volatils : les huiles essentielles; les autres non volatils sont plus particulièrement responsables de la saveur et de la couleur [2].

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

- ***En agriculture :*** les huiles de certaines plantes ont des utilisations dans le contrôle de certains insectes et nématodes [3].
- ***En cosmétiques*** : beaucoup de plantes médicinales sont à l'origine des produits de beauté parfums et articles de toilettes, produits d'hygiène .

II. Généralités Méthodes d'extraction des plantes

L'extraction est une technique de séparation en génie chimique, elle utilise un moyen d'extraction pour séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de ces propriétés chimiques et/ou physiques. Le moyen d'extraction doit être non ou peu miscible avec les composants principaux du mélange alors que le composé à extraire doit posséder plus d'affinité avec le moyen d'extraction qu'avec les composants principaux du mélange. Suivant la manière et le moyen utilisé, on a plusieurs techniques

Parmi les techniques d'extractions classiques, on retrouve les extractions cités sous-dessous :

II.1. Les percolations

Encore nommé lixiviation, ce principe est le même que celui des cafetières portant le même nom. La poudre de plante finement broyée est recouverte par un solvant pendant une journée. Le ruissellement du solvant va s'effectuer très lentement, de l'ordre de quelques gouttes par minute, et le marc sera ensuite pressé. Même si ce procédé est une méthode d'extraction efficace, il est de moins en moins employé de nos jours.

II.2. Les infusions

Ce type de procédé est utilisé quand les principes actifs de la plante sont hydrosolubles et peuvent facilement être obtenus à partir du tissu de la plante. L'infusion convient donc parfaitement pour les feuilles (artichaut, vigne rouge, thé vert), les fleurs (millepertuis), les sommités fleuries (aubépine, reines des prés) et les tiges non ligneuses. De l'eau très chaude (80°C) est donc ajoutée à la plante moulue ou écrasée et ce mélange repose de quelques minutes à une demi-heure, en le remuant de temps en temps. Le mélange final est tamisé et le liquide obtenu est souvent clair.

II.3. Les décoctions

Ce procédé d'extraction est recommandé pour les racines (bardane, valériane.), les écorces

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

(cannelle) et les tiges ligneuses (prêle). En effet, on l'utilise quand les substances actives sont hydrosolubles mais pas facilement accessibles. De l'eau froide est donc versée sur les parties de plantes coupées, moulues ou écrasées et le tout est mis à bouillir (100°C) de plusieurs minutes (5 à 15 minutes) à quelques heures. Et ce n'est qu'après refroidissement que le mélange est tamisé.

Les infusions et les décoctions utilisent donc la chaleur et sont susceptibles de détériorer certaines substances actives particulièrement thermosensibles. D'autre part, elles ne permettent d'extraire que les composés hydrosolubles et pas les substances liposolubles.

Comme tous les constituants actifs ne peuvent être présents dans ces préparations liquides, on utilise souvent le principe de macération.

II.4. Les macérations

Ce procédé est surtout préconisé pour les racines et les graines. La plante est laissée à tremper à température ambiante, en vase clos, dans un endroit sombre et frais. Dans la plupart des cas, le solvant utilisé est un mélange d'eau et d'alcool pour prévenir la fermentation et/ou la détérioration. A la fin de la période de macération qui est propre à chaque plante, le liquide est égoutté, le marc humide pressé, filtré et mis en flacon ou bouteille. Le produit ainsi obtenu est couramment appelé teinture.

L'alcool améliore l'absorption au niveau de la bouche et des parois de l'oesophage.

Les principes actifs passent alors rapidement dans le système sanguin et sont distribués à tous les organes, sans subir de potentielles transformations par les enzymes digestives et sans passer directement par le foie.

Il est cependant important que la quantité d'alcool soit optimale : en trop faible quantité il peut se produire des fermentations et en quantité trop importante il peut y avoir des effets indésirables au niveau de la force et de **l'efficacité du produit final.**

II.5. Soxhlet

C'est une méthode simple et convenable qui permet de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

[4].

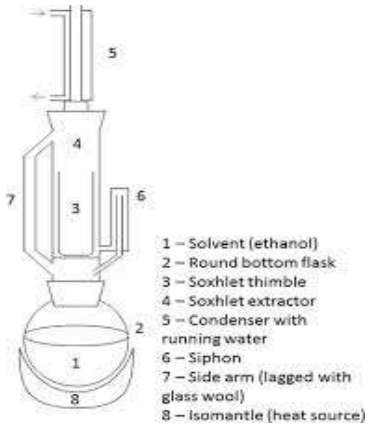


Figure 1 : Figure réacteur de soxhlet

L'extracteur de Soxhlet est un appareil spécialement conçu pour l'extraction continue solide liquide.

Le solvant (5 à 10 fois la quantité de l'échantillon solide à extraire) est porté à ébullition et la fraction condensée au niveau du condenseur se met en contact, par simple effet de gravitation, avec le matériel solide à extraire. Ce dernier se trouve dans une cartouche de papier épais dans le réservoir à siphon. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure toute la période de remplissage du réservoir, puis quand le solvant atteint le niveau maximal, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant les substances dissoutes. Le cycle se répète jusqu'à la décoloration du solvant au niveau du réservoir à siphon

II.6. Le CO_2 *supercritique*

L'extraction par fluide supercritique constitue le secteur d'application le plus ancien. L'extraction par fluide supercritique est utilisée également dans le domaine agroalimentaire pour l'extraction de colorants naturels, d'antioxydants, d'acides gras polyinsaturés, pour la production de boissons sans alcool, de denrées alimentaires avec moins de lipides, de bouchons en liège traités. L'état supercritique est un état qui n'est ni liquide ni gaz. La pression est alors supérieure à 74 bars et la température supérieure à 31°C. A cet état, le CO_2 a des propriétés particulières. En effet, il possède un bon pouvoir extractant, Le procédé d'extraction par CO_2 supercritique fonctionne en circuit fermé. Ce circuit comporte des organes de mise en pression (pompes), et en température (échangeurs) afin d'amener le CO_2 au-dessus du point critique. Le produit à traiter en extraction est placé dans un extracteur traversé par le flux de CO_2. Le fluide

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

se charge en composé extrait, puis il est détendu, passe en phase gazeuse et se sépare du composé extrait. Ce dernier est recueilli à l'état liquide (ou pâteux) dans un séparateur [5].

III. Techniques de séparation :

III.1. La chromatographie d'adsorption

La chromatographie d'adsorption est la plus ancienne méthode de chromatographie (1906) , elle est basée sur le partage des solutés entre l'adsorbant solide fixe et la phase mobile. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

Les séparations sont basées sur le principe de polarité, c'est-à-dire l'existence de dipôles dans une structure moléculaire :

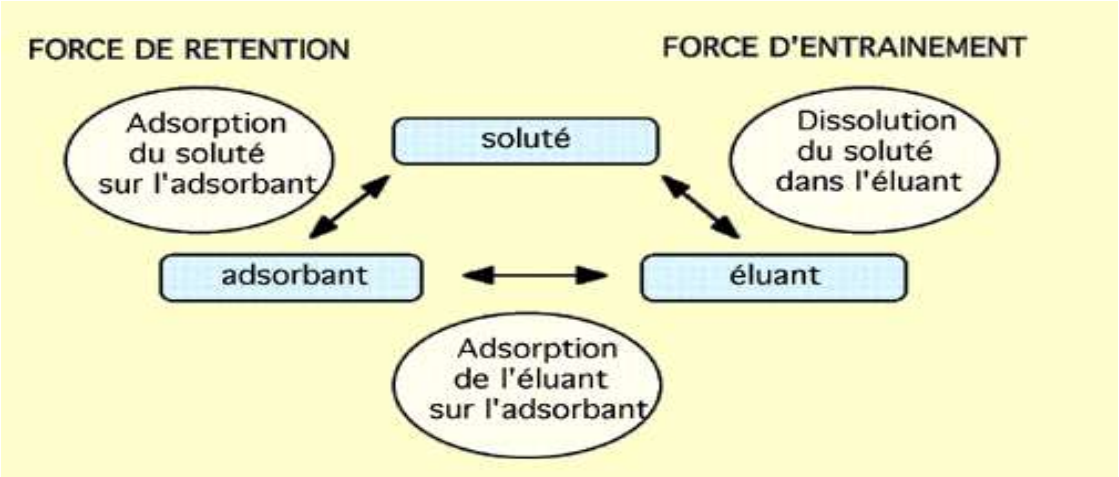


Figure 2 : Principe de la chromatographie d'adsorption

Les adsorbants possibles sont (du moins polaire au plus polaire): papier, cellulose, amidon, carbonate de sodium, gel de silice, alumine, charbon activé

Une phase mobile liquide appelée éluant, fait migrer les composés, son choix est donc important.

Choix de l'éluant.

Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre l'éluant et le soluté (mélange de composés à séparer):

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

• la solubilité: on doit être en mesure de dissoudre le soluté dans l'éluant pour que la migration se fasse.

• la polarité de l'éluant va déterminer à quelle vitesse le composé migre. Moins un composé est polaire, moins il s'accroche à l'adsorbant, plus il migre avec l'éluant. Choix d'un éluant peu polaire Plus un composé est polaire, plus il s'accroche à l'adsorbant, , moins il migre avec l'éluant. Choix d'un éluant polaire.

III.2. Chromatographie de partage

Cette chromatographie liquide-liquide est fondée sur la répartition différentielle de chacun des solutés entre deux liquides non miscibles, l'un constituant la phase stationnaire, l'autre la phase mobile. C'est une technique essentiellement qualitative.

Les facteurs la régissant sont ceux intéressant aussi bien la chromatographie par adsorption que la séparation par extraction liquide-liquide, soit :

- la nature du support.
- la nature de la phase liquide stationnaire.
- la nature de l'éluant (phase mobile).
- la vitesse de passage du solvant
- la température.

La phase stationnaire : En chromatographie liquide classique, les phases stationnaires sont des solvants polaires dans lesquels vont pouvoir se solubiliser les composés polaires à séparer

La phase mobile : le solvant doit être pré-saturé avec la phase stationnaire avant de pénétrer dans la colonne. En d'autres termes, le solvant et la phase stationnaire doivent être en équilibre thermodynamique avant leur rencontre dans la colonne. On doit aussi tenir compte de la compatibilité des solvants avec les détecteurs utilisés.

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

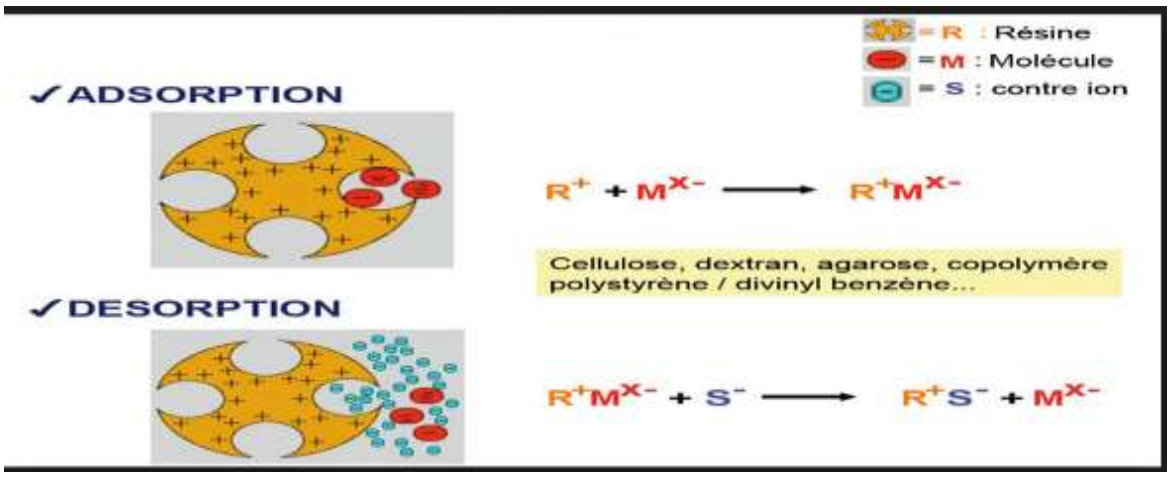


Figure 3 : Principe de la chromatographie échangeuse d'ion

Cette chromatographie sera utilisée pour la séparation de molécules ionisées, c'est-à-dire des molécules qui vont s'ioniser en fonction du pH et qui porteront des charges nettes différentes.

La phase solide est constituée de molécules chargées attachées à une matrice, les groupements chargés définissent la nature et la force de l'échangeur d'ions.

La phase stationnaire :

Elle doit être insoluble et chimiquement stable; la structure doit être stable et ses particules de préférence sphériques et uniformes. On connaît divers types de supports; des produits minéraux et des produits synthétiques (tels que des polymères et des dérivés de la cellulose) qui sont les échangeurs d'ions les plus utilisés

Pratiquement, la capacité d'un échangeur d'ions va dépendre de divers facteurs :

- taux de pontage de la résine (soit dimension des pores),

- pH de la solution,

- dimension des grains,

- diffusion des ions à travers le film de liquide au contact du grain,

- diffusion des ions à l'intérieur des pores de la résine (cinétique),

- équilibre de Donnan (diffusion de molécules ou de paires d'ions de la solution à l'intérieur des pores).

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

La phase mobile : La plupart des séparations utilisant les résines échangeuses d'ions s'effectuent avec une solution aqueuse en raison des propriétés de solubilisation et d'ionisation de l'eau. L'élution est assurée par déplacement des équilibres : soit par la présence d'un ion ayant plus d'affinité pour la résine, soit par l'élévation des concentrations en ions H^+ ou OH^-, soit, dans le cas des échangeurs faibles, par modification du pH qui agit ainsi sur l'ionisation aussi bien des groupements échangeables de la résine que de ceux des solutés.

III.3. Chromatographie en phase gazeuse :

Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans le four et un détecteur. Le mode d'injection le plus répandu est l'injection en ''*split*'' ou injection avec ''division de flux'', il est utilisé pour l'analyse de solutions concentrées. L'injection se fait à haute température. L'échantillon est rapidement introduit dans l'injecteur où il est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur (hélium, azote, argon, ou hydrogène). Une électrovanne permet de régler le débit de fuite. Ce procédé permet de faire en sorte qu'une fraction importante du flux gazeux soit évacuée, diminuant ainsi la quantité d'échantillon qui pénètre dans la colonne et évitant de saturer la phase stationnaire.

Le four contient l'élément clé de la séparation chromatographique la colonne analytique. Cette colonne peut être de deux types : colonne remplie ou colonne capillaire. Dans le cas des huiles essentielles, les colonnes capillaires semblent plus adaptées ; elles sont en métal, en verre ou plus souvent en silice fondue. Les substances de l'échantillon traversent la totalité de la colonne où est placée la phase stationnaire.

Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire, de leur volatilité si cette dernière est apolaire. Leurs différences de propriétés physicochimiques leur confèrent des vitesses d'élution et ils sont donc séparés en fonction du temps. Ils arrivent à l'extrémité de la colonne, ils sont alors détectés et enregistrés. La chromatographie en phase gazeuse permet donc de séparer un mélange gazeux complexe par succession continue d'équilibre entre phase mobile gazeuse et phase stationnaire.

III.4. La spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse chimique permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse monoisotopique.

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

De plus, la spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (*m/z*). La spectrométrie de masse est utilisée dans pratiquement tous les domaines scientifiques : physique, astrophysique, chimie en phase gazeuse, chimie organique, dosages, biologie, médecine...

IV. Activité antioxydante :

Un antioxydant est une substance qui en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable qui, de manière significative retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat.

IV.1. Généralités sur l'effet antioxydant

L'effet antioxydant d'un produit est son pouvoir d'éliminer toute source d'agression pour l'organisme provoquée par des dérivés d'oxygène.

En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène comme l'oxygène singulet O, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, le radical superoxyde O_2, les peroxydes alkyles ROOH, et les radicaux hydroxyles HO, peroxydes ROO et alkoxyle RO; peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition; et provoquent avant d'être neutralisés des liassions sur tous les éléments qu'ils côtoient [6].

IV.2. Méthode d'étude d'activité des antioxydants des plantes médicinale

IV.2.1. Le β-carotène comme indicateur d'oxydation

Le β-carotène (figure 4) est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation; l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation. L'absorbance du β-carotène est mesurée à 470 nm avec et sans antioxydant.

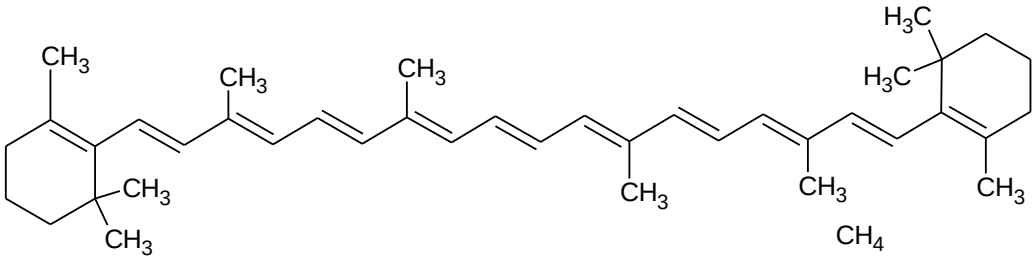


Figure 4 : Structure du béta carotène

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

IV.2.2. Test de réduction du radical-cation ABTS$^{+\circ}$ ou TEAC

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical-cation ABTS$^{\pm\circ}$, acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (figure 4), qui présente une bande d'absorption dans le visible avec trois maxima à 645, 734 et 815 nm. Le radical est formé par oxydation de l'ABTS incolore avec différents composés, comme le dioxyde de manganèse (**MnO_2**), le peroxyde d'oxygène (**H_2O_2**) ou le persulfate de potassium. Le composé à tester est ajouté au radical pré-formé et 1 minute après, l'absorbance résiduelle du radical ABTS$^{\pm\circ}$ est mesurée à 734 nm. L'activité des composés est alors exprimée par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) donnant la même capacité antioxydante qu'une concentration de 1 mM du composé testé. Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace [7].

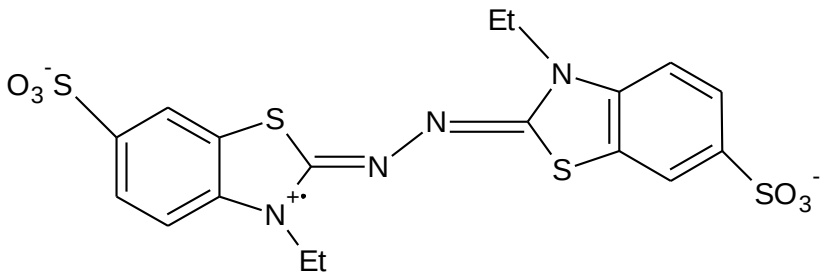


Figure 5 : structure du radicale-cation ABTS$^{+\circ}$

IV.2.3. Test de capture des radicaux peroxyles :TRAP et ORAC

L'AAPH, 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochlorure, est un générateur hydrophile de radicaux libres (figure 6). Deux tests utilisent l'AAPH : TRAP et ORAC.

- le test **TRAP**(**total radical trapping antioxidant potential**), l'AAPH est solubilisé en milieu aqueux avec l'antioxydant et un indicateur qui devient luminescent lorsqu'il est oxydé à 37°C, comme le luminol. La capacité des antioxydants à bloquer l'oxydation de l'indicateur est comparée à celle du Trolox donnant une valeur TRAP. Ce test est utilisé pour déterminer la capacité antioxydante du plasma et du sérum sanguin [8] .

-Le test **ORAC** (Oxygen Radical Absorbance Capacity) est applicable aux solutions biologiques comme le plasma sanguin et des extraits de fruits et légumes [9] .

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Il permet de mesurer séparément, à partir d'une même solution biologique, la capacité antioxydante des composés hydrophiles et lipophiles qui la composent, après séparation par une extraction à l'hexane.

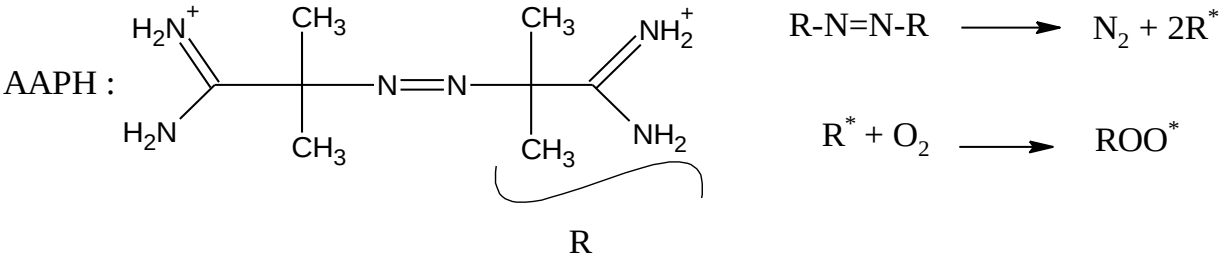


Figure 6 : Génération de radicaux peroxyde à partir d'AAPH

Le pouvoir antioxydant d'une solution comme le plasma est déterminé par le test **FRAP** ou Ferricreducingability of plasma. A faible pH et à 37°C, le complexe tripyridyltriazineferrique (TPTZ-Fe^{3+}) est ajouté à l'échantillon. Les antioxydants présents réduisent le complexe en sa forme Fe^{2+} et son absorbance est lue à 593 nm toutes les 15 s durant une période n'excédant pas 10 minutes. Ce test est rapide et donne des résultats répétables pour des solutions biologiques ou pour des solutions pures d'antioxydants. La réaction est indépendante de la concentration car la réponse est linéaire [10] .

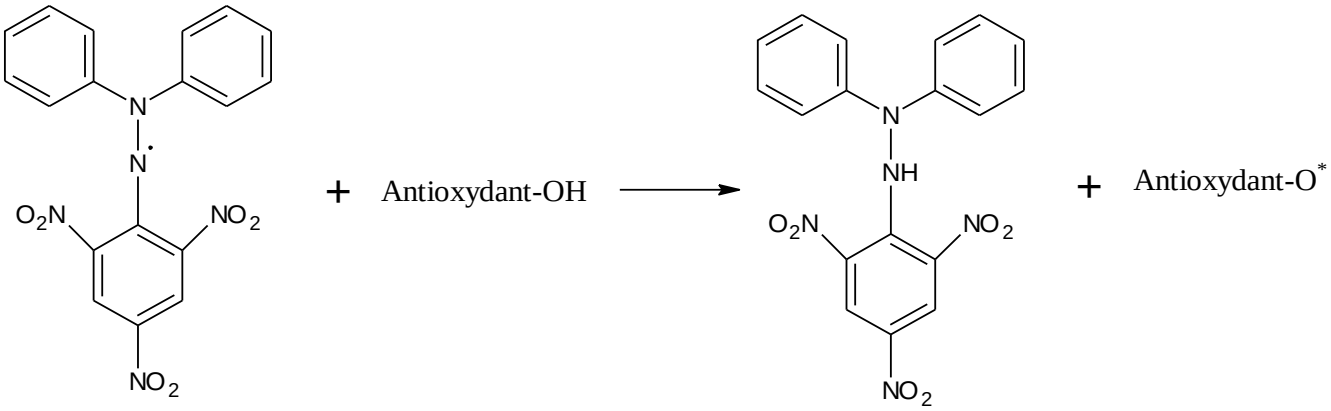
IV.2.4. Test de réduction du DPPH

- Le DPPH ou 1,1-dipheny1-2-picrylhydrazyle agit en tant qu'un radical libre stable efficace réduit par un antioxydant, montrant un spectre d'absorption a 517 nm avec une couleur violette, la réduction de ce radical nous donne la coloration jaune.
- La méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH**.** Un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulier au radical synthétique DPPH de coloration violette pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune-verte.
- Le DPPH est un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Benzie et al, (1996) [11]. Dans ce test les antioxydants réduisent le diphénylpicryl-hydrayl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

protons [12].

- La révélation de l'activité antioxydant pour l'extrait éthanolique de plante étudiées et faite grâce à un spectromètre suivant la réaction de la réduction de **diphénylpicryl-hydrayl.**



DPPH (violet) DPPHH (jaune)

Figure 7 : La réaction de réduction du DPPH par un antioxydant

V. Plante sélectionnée: Stevia rebaudiana Bertoni

V.1. Description botanique du Stevia rebaudiana Bertoni :

Stevia rebaudiana Bertoni est une plante herbacée vivace, dont la taille peut atteindre 80 cm. Les tiges, peu rigides, sont de section circulaire. Les feuilles placées par paire au niveau de chaque noeud en face l'une de l'autre D'une longueur de 3 à 5 centimètres, et d'une largeur comprise entre 1 et 2 centimètre et de forme ovoïde. Elle exige un climat de type subtropical semi-humide, et des températures moyennes de 21-24°C.Le sol est localement assez pauvre, acide et sablonneux[13].

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Figure 8 : Stevia rebaudiana

V.2. Classification botanique : [14]

Regne	*Plantae*
Sous-regne	*Tracheobionta*
Embranchement	Spermatophytes.
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédone.
Sous –Classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	Stevia
Espéce	Reboudiana

V.3. Étude phytochimique des feuilles de Stevia rebaudiana :

Les feuilles de stevia contiennent des protéines végétales (polypeptides), des lipides et des mono- et polysaccharides, dont des fibres, qui correspondent aux métabolites primaires. Elles contiennent aussi des vitamines, des minéraux des flavonoïdes et des di terpènes, ainsi que des

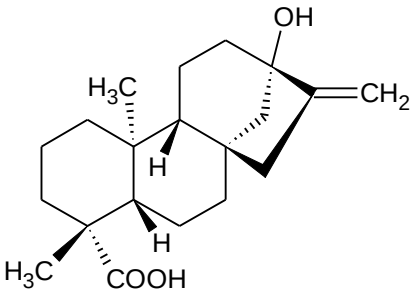
Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

triterpènes, comprenant des stérols. Les dérivés diterpéniques sont les plus nombreux et sont sous forme glycosylée. [15]

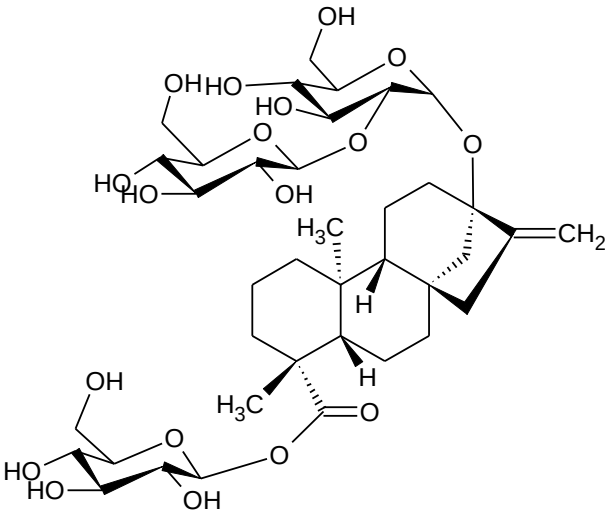
- Les diterpènes glycosylés :

Le goût sucré de stévia est du à la présence dans ses feuilles de stéviols glycosides qui sont des glycosides di-terpéniques solubles dans l'eau. En tout, au moins une dizaine de stéviols glycosides ont été identifiés, mais les quatre principaux présents dans les feuilles de stévia sont:

le Stévioside, le Rebaudioside A, le Rebaudioside C et le Dulcoside A avec des proportions dans le poids sec des feuilles respectivement de 5-10%, 2-4%, 1-2% et 0,5-1%. [16]

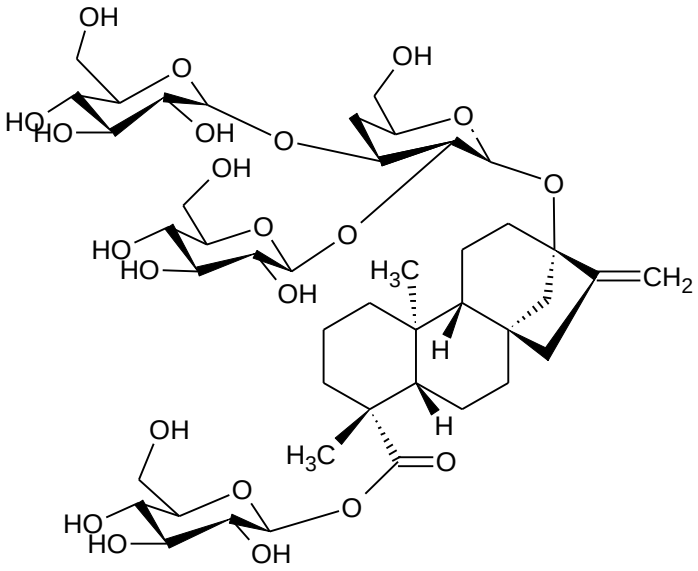


1.stéviol

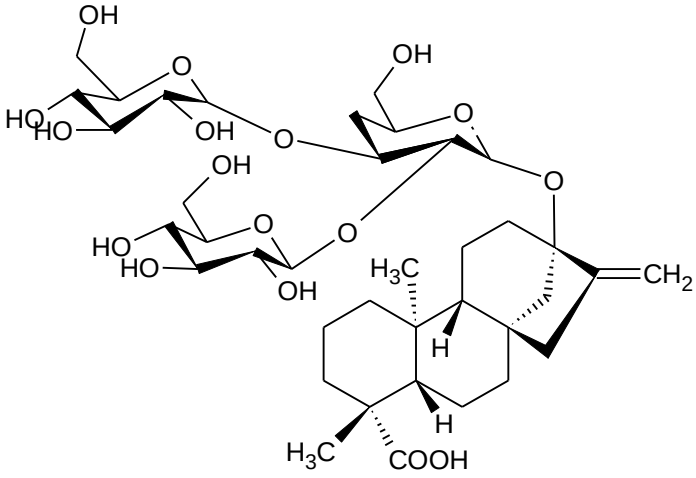


2.Stevioside

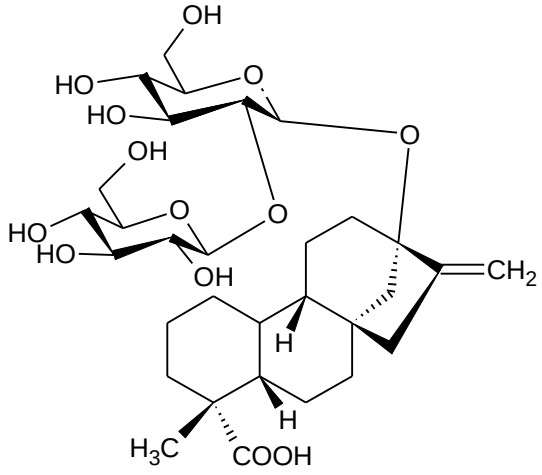
Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14



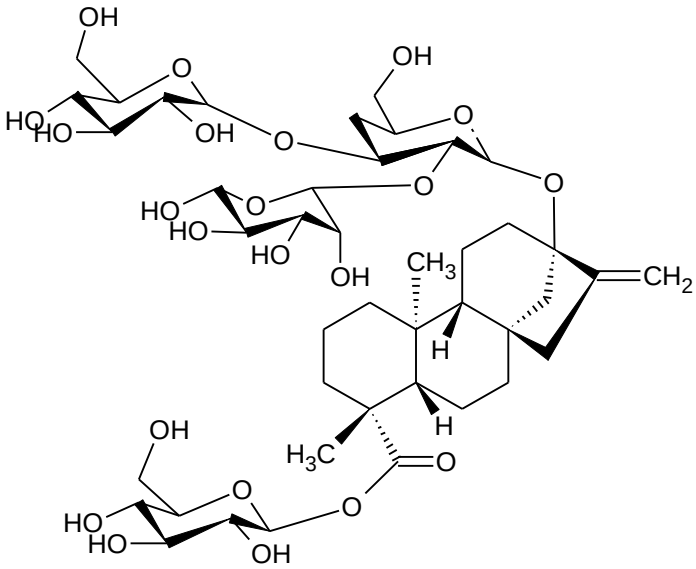
3.Rebaudioside A



4.Rebaudioside B



5.Steviolbioside



6.Rebaudioside C

Figure 9 : glycosides de steviolde de S. rebaudiana. [17]

Les glycosides de stéviol possèdent une structure composée d'une partie non sucrée et d'une partiesucrée. La partie non sucrée est aussi appelée aglycone ou génine, alors que la partie sucrée estexprimée par le suffixe –osidique.

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

La présence de rébaudioside B et de stéviolbioside pourrait être liée à des artéfacts dans la procédure d'extraction [18].Lors de l'extraction des glycosides, il peut se produire une hydrolyse préférentielle du groupement glucose qui transformerait le rébaudioside A en rébaudioside B et le stévioside en stéviolbioside [19]

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de Dérivés diterpéniquesglycosylés[20]

composants	substances	Point de fusion	Pouvoir sucrant
Stévioside	$C_{38}H_{60}O_{18}$	196-198°C	150-250
Rebaudioside A	$C_{44}H_{70}O_{23}$	Compris entre 242 et 244°C	300 à équivalence avec une solution de 0,4% de saccharose
Rebaudioside B	$C_{38}H_{60}O_{18}$	193et195°C	150
Rebaudioside C	$C_{38}H_{60}O_{18}$	315 et 217°C	30
RebaudiosideD	$C_{38}H_{60}O_{18}$	283 et 286 °C	221
dulcoside	$C_{38}H_{60}O_{17}$	205 et 207 °C	30

- la biosynthèse des glycosides de steviol : [21]

Les glycosides de stéviol sont synthétisés lors du métabolisme secondaire de Stevia rebaudianala synthèse commence dans les chloroplastes. Une fois le stéviol est formé, il sera ensuite glucosylé dans le cytosol.

Cette glycosylation est la dernière étape qui permet d'obtenir les glycosides eux-mêmes. Les glycosides ainsi formés se retrouvent concentrés dans la vacuole de la cellule, ce qui explique que les feuilles soient aussi riches en édulcorants.

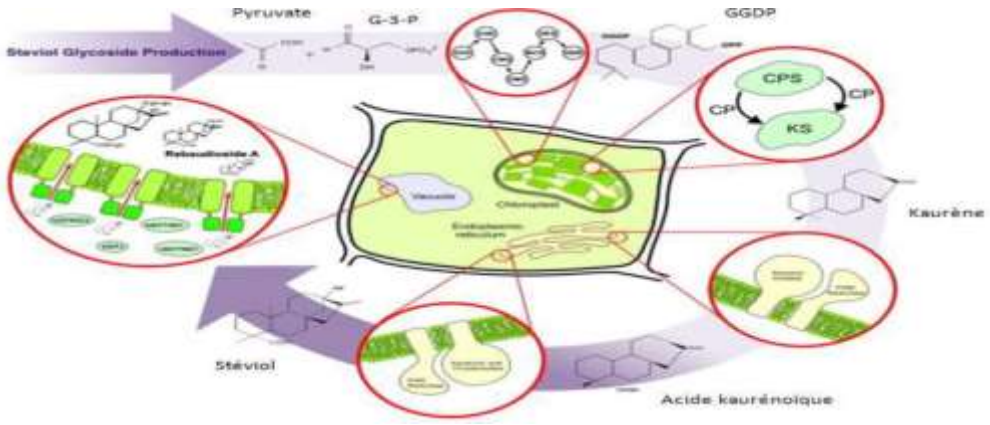


Figure 10 : Localisation des étapes de la biosynthèse dans la plante

On a trois grandes étapes dans la biosynthèse des glycosides de steviols :

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

1) La voie du méthylerythritol 4-phosphate (MEP) ou voie du mévalonate [22]

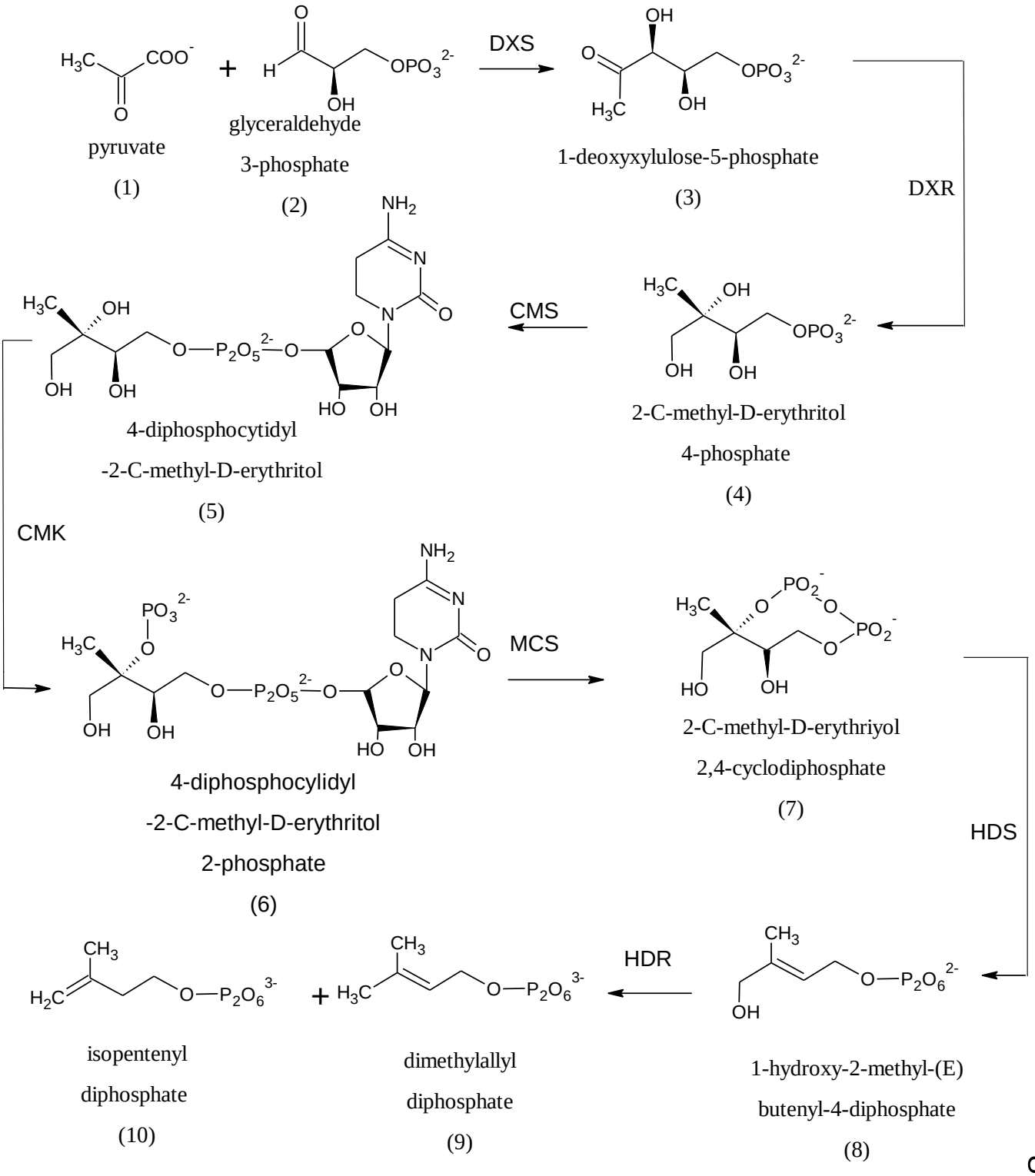


Figure 11 : Voie du mévalonate (MEP) : synthèse des terpènes

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

- La voie du MEP débute avec la formation du 1-deoxyxylulose-5-phosphate (3) :

À partir d'une molécule de pyruvate (1) et d'une molécule de glyceraldehyde-3-phosphate (2).

Dans les chloroplastes des feuilles de stevia, une grande activité de HMG-CoA réductase, qui est l'enzyme clef de la synthèse du mévalonate,[22] a été découverte et il a été conclu que le squelette ent-kaurène était formé par cette voie. Le 1-deoxyxylulose-5-phosphate (3) est un précurseur du diméthylallyldiphosphate (9) et de l'isopentenyl diphosphate (10). Ces derniers permettent la formation du géranylgéranyldiphosphate (GGDP) (11). Tous les diterpènes sont dérivés du GGDP (11).

1) L'étape des terpènes cyclases [23] :

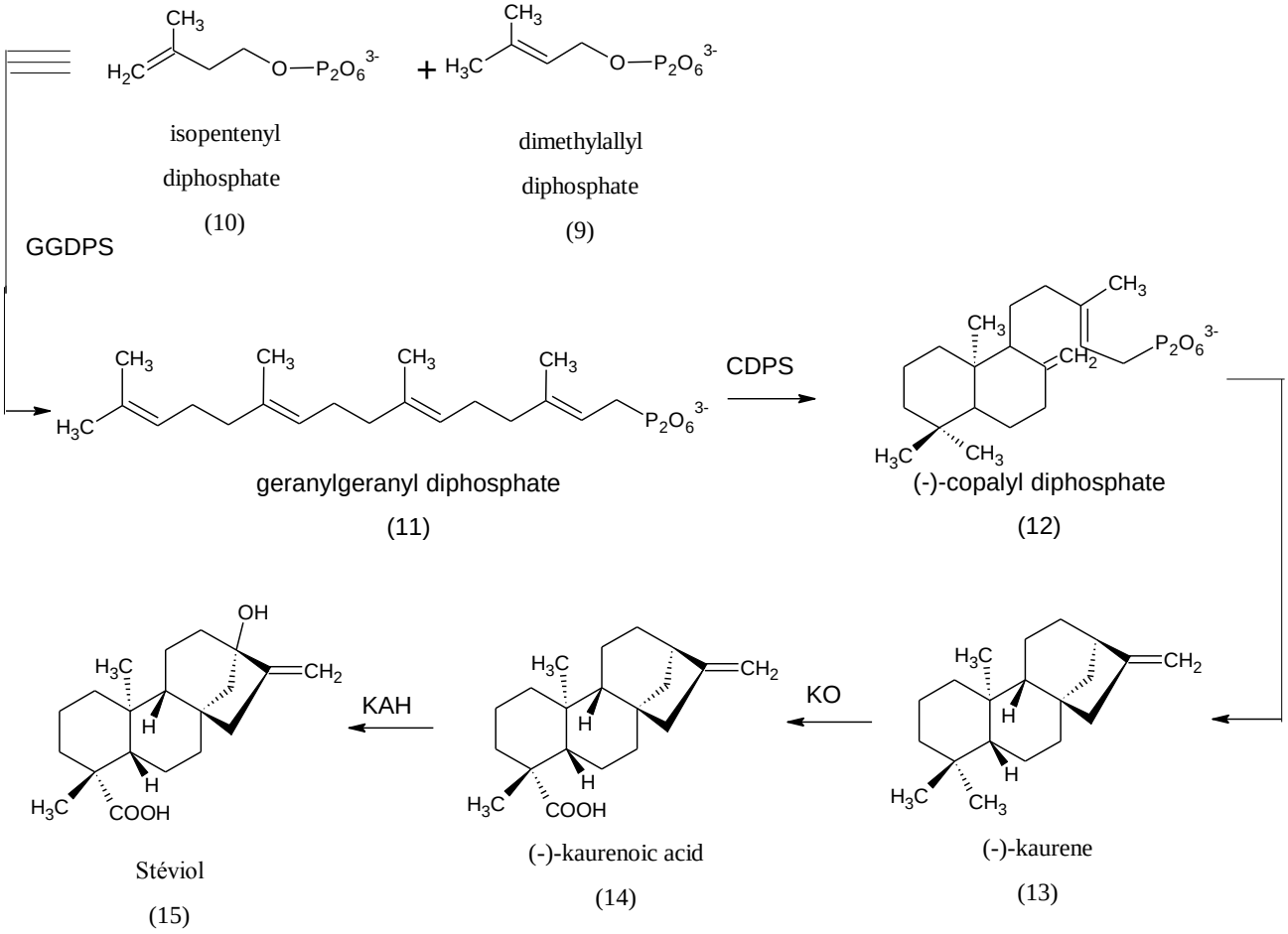


Figure 12 : Etape des terpènes cyclases

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Grâce à l'action de deux terpènes cyclases, la copalyldiphosphatesynthase (CPS) et la kaurènesynthase (KS), on obtient le squelette kaurène (13), qui est transformé en acide kaurénoïque (14) par oxydation grâce à la kaurène oxydase (KO). L'acide kaurénoïque (14) possède un squelette cyclopentanohydrophenanthrène [24] et est le précurseur du steviol (15).

Le steviol (15) est produit par une hydroxylation de l'acide kaurénoïque (14) en C-13, par l'acide kaurénoïque 13-hydroxylase (KAH), alors que l'hydroxylation se fait en C-7 concernant la formation de l'acide gibérellique [23-24].

1) Les glycosylations :[25]

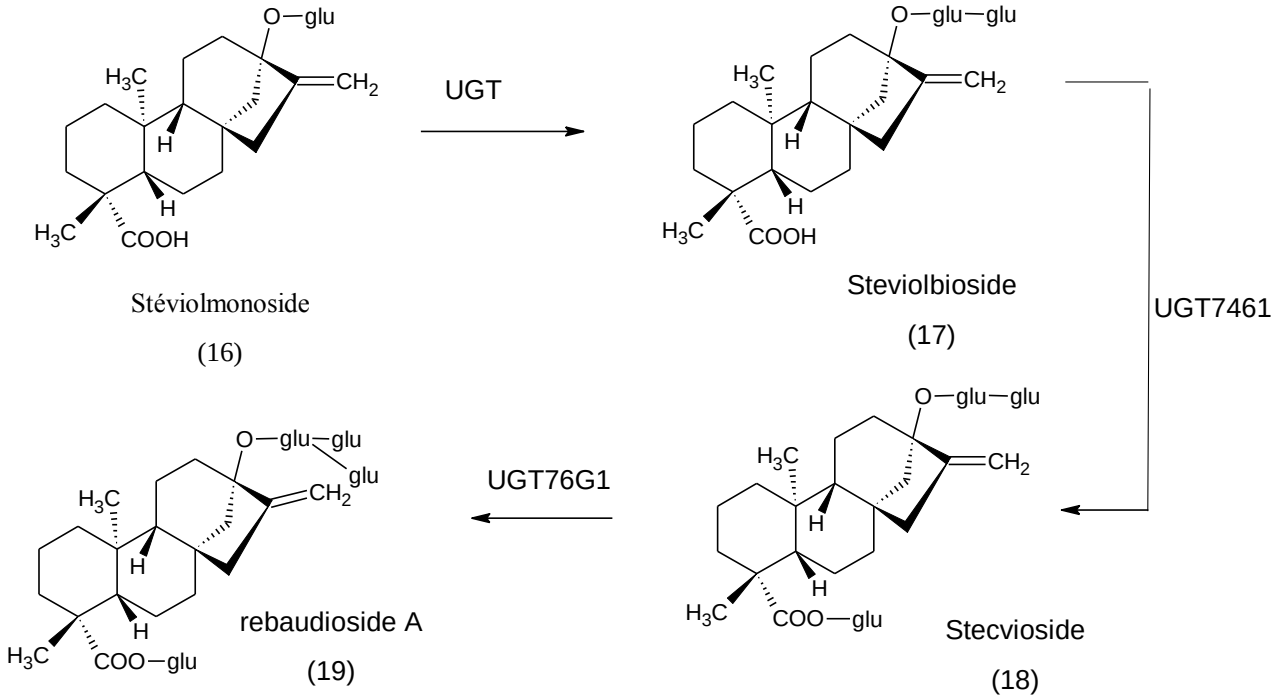


Figure 13 : Etape des glycosylations

Le steviol (15) est rapidement glycosylé en C-13 et en C-19 [25] grâce à trois glycosyltransférases qui ont été étudiées et clonées . Le groupe 13-hydroxyle est glycosylé en premier pour produire du steviol-13-O-glucopyranoside qui permet la formation de steviolbioside (17).

Ensuite, le groupement carboxylique est glycosylé en C-19 pour obtenir du stevioside (18).

La glycosylation du stevioside (18) forme à son tour du rebaudioside A (19).

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

VI. Les activités biologiques de steviarebaudiana :

VI.1. Activité hypoglycémique

Dans une étude clinique menée sur des volontaires humains sains, les chercheurs montrent que le taux de glucose plasmatique après un traitement par un extrait aqueux de stevia est significativement abaissé.

Ces auteurs ont réalisé des tests de tolérance au glucose chez des sujets adultes avant et après l'ingestion, soit d'extraits aqueux de feuilles de *Stevia rebaudiana* (20g/jour, en prises de 5g à intervalles réguliers de 6 heures) durant une période de 3 jours, soit de 250 mg d'une solution d'arabinose. Ils ont pu ainsi montrer que la glycémie, mesurée après le traitement à base de stevia, était significativement plus basse dans le groupe de personnes ayant ingéré l'extrait que dans le groupe témoin et ceci à chaque moment du test.

VI.1. Activité antibactérienne et antifongique [26] :

Quatre extraits de solvant différents (acétate d'éthyle, l'acétone, le chloroforme et l'eau) des feuilles de Stevia rebaudiana ont été étudiés contre Staphylococcus aureus, Salmonella typhi, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Aeromonashydrophila et Vibriocholerae. Candida albicans, Cryptococcusneoformans, Trichophyton mentagrophytes et Epidermophyton espèces ont été utilisés pour tester l'activité anti-fongique.

L'extrait à l'acétone avait un potentiel antibactérien plus efficace que les autres extraits qui étaient actifs contre les espèces Epidermophyton et Candida albicans

VI.2. Activité antivirale [27]

L'activité antivirale (rotavirus) de l'extrait aqueux chaud de Stevia rebaudiana a été validée in vitro par (TAKAHASHI et al), en effet la réplication du virus est inhibée par le mécanisme de blocages de toute liaison virus-cellule

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Matériel et méthodes

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

I. Matériel végétal :

1. La récolte : Stévia a été récolté à partir de la région de (Taounate)

2. La conservation : Les feuilles ont été triées, séchées à l'air ambiant.

3. le broyage : les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur.

II. Extraction des stéviol glycosides

Dans le but de déterminer la meilleure méthode d'extraction on a utilisé :

- Une méthode conventionnelle : Macération à chaud
- Une méthode moderne : Sonication

II.1. Extraction des stviol glycosides par macération à chaud :

Pour indiquer le meilleur rendement en stéviol glycosides, on a comparé des feuilles entières et des feuilles broyées, pour cela deux étapes d'extraction ont été effectué:

II.1.1. Préparation de l'extrait aqueux : solide -liquide

- 100g du matériel végétal sec (feuilles broyées) a été mélangé avec un volume (1L) d'eau chaude (solvant), sous agitation pendant 4h à température (80°C _ 100°C).
- La solution obtenue est ensuite filtrée à l'aide d'un papier filtre.

Le processus d'extraction est répété avec le résidu obtenu 5 fois jusqu'à épuisement total du matériel végétal.

- Le volume total du filtrat est concentré sous vide avec un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide abaissant le point d'évaporation du solvant (50°C).

II.1.2. Préparation de l'extrait organique : liquide -liquide

- Le volume concentré obtenu de l'extrait aqueux est lavé, à l'aide d'une ampoule à décanter, avec un mélange du solvant composé d'acétate d'éthyles et n- butanol de pourcentage différent.

Les stéviol glycosides sont soluble dans la phase organique qui dans ce cas le mélange de d'acétate d'éthyles et n- butanol.

- La phase organique est séparée et concentrée jusqu'a à la formation d'une masse

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

solide.

Ainsi le rendement peut être calculé avec :

Rendement = masse de l'extrait obtenu (après concentration) en gramme / masse du matière végétale initiale en gramme

- Cristallisation :

Pour une purification maximale de stéviol glycosides et élimination des produits pouvant migrer vers la phase organique, une étape de cristallisation semble très importante, la masse solide est alors dissoute dans le méthanol chaud, puis laissée refroidir à 4°C jusqu'à précipitation totale des cristaux : **stéviol glycosides**

Ainsi le rendement en stéviol glycosides est déterminé

Le protocole d'extraction des stéviol glycosides décrit ci-dessus est répété avec des feuilles non broyées, et on a comparé les résultats des rendements.

II.2. Extraction assistée par Ultrasons:

II.2.1. Préparation de l'extrait aqueux : solide –liquide

- 100g de matière végétale, immergé dans 1l de l'eau distillée chaude, est exposée aux ultrasons pendant 30min.

Ce processus est répété avec le résidu obtenu 5 fois jusqu'à épuisement total du matériel végétal.

- Ensuite, une évaporation est effectuée sous pression dans un rota-vapeur (BÜCHI) sous une température de 40°c, pour éviter toute dégradation de composés existants dans l'extrait

II.2.2. Préparation de l'extrait organique : liquide –liquide

Pour l'extraction des cristaux de stéviol glycosides, on procède de la même manière que la macération chaude détaillée ci-dessus.

III. Purification des stéviosides par colonne

- 1kg du stévia broyé a été macéré à chaud dans 5l d'eau distillée le résidu obtenu après filtration a été extrait de la même procédure 5 fois, pour une élimination totale des stéviosides.

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Le filtrat obtenu (25l) est concentré sous pression à l'aide d'un rota vapeur pour avoir un volume final de 11L.

- Dans le but d'atténuer la couleur du filtrat concentré on fait une clarification réalisée par précipitation de l'extrait avec 100g de l'hydroxyde de calcium$Ca(HO)_2$.
- le mélange a été filtré par la suite pour élimination du précipité formé par $Ca(HO)_2$.

III.1. Décoloration de l'extrait de stevia :

On fait Une décoloration par absorption des pigments sur une résine échangeuse de cation fortement acide macroporeux.

L'éluât est placé sur une seconde résine échangeuse de d'anion fortement basique qui va retenir spécifiquement les steviol glycosides qui sont alors élués de la résine par eau.

- cette technique d'extraction ne fait intervenir aucun solvant ou produit chimique pouvant présenter un risque au niveau alimentaire.
  - Préparation des colonnes :

1-Première Colonne : Échangeurs de cation : (résine fortement acide).

Après avoir rempli la colonne la phase stationnaire, qui est dans notre cas (Gel de type Tulsion T-42 H^+).

- On place ensuite un morceau du coton en tête de colonne, puis on s'assure que la colonne est bien tassée.
- on ajoute 600 ml de HCl de façon que la colonne soit bien régénérée (3 fois).
- On dépose ensuite délicatement la solution filtrée de stévia en haut de colonne avec une pipette Pasteur afin de ne pas perturber la surface du la phase stationnaire.

On ouvre le robinet et on le laisse couler doucement, goutte à goutte

Figure 14 : Résine utilisée : Gel de type Tulsion T -42 H^+

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

2- Deuxième Colonne : Échangeurs de l'anion

De la même manière on se sert d'une colonne où la phase stationnaire est le Tulsion A_2 XMP, on lave avec NaOH de concentration 50g/L (3 fois), et on fait éluer soigneusement la solution obtenue de la 1ére séparation.

IV. Test d'effet antioxydant:

IV.1. La préparation de la solution de DPPH :

Le DPPH 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$; Mr : 394.33), est solubilisé dans l'éthanol absolu pour en avoir une solution de 0.3 mM. On procède comme suivant :

On solubilise une quantité de 4 mg de DPPH dans 100ml de l'éthanol. Le mélange est laissé en agitation pendant 1h 30min dans un flacon brun et à température ambiante pour éviter la dégradation de ce radical.

La solution de DPPH est conservée au réfrigérateur à une température de 4C°.

IV.2. La préparation de l'extrait :

Pour évaluer l'activité antioxydante par le test de DPPH, on dissoudre l'échantillon dans l'éthanol.

Une solution mère est préparée avec une concentration de 12mg/ml. Différent concentration de

50µl ,20µl ,10µl, 5µl, 2µl et de 1µl ont été faite afin de déterminer l'IC50 de l'extrait (la concentration correspondant à 50% de la réduction du radicale libre de DPPH).

IV.3. Protocol expérimentale :

Pour chaque extrait on a fait deux essais:

- Test de blanc :

Dans un tube sec et stérile, on introduit 3ml de la solution de l'extrait, puis on ajoute 3 ml du éthanol (on doit avoir 6ml de la solution expérimentale), on utilise le vortex pour homogénéiser le mélange, la solutionest mise dans un cuve de quartz pour mesurer son absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 517nm (domaine visible).

- Test contrôle :

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Le control négatif correspond à l'absorbance de DPPH avec l'éthanol, il consiste à mettre dans un tube stérile 0,4ml de DPPH et 1,60ml de l'éthanol.

- Test de l'extrait:

Dans des tube secs et stériles, on ajoute 1 ml du méthanol, ensuite on introduit les différentes concentrations 50µl 20µl, 10µl, 5µl, 2µl et 1µl de la solution des extraits éthanoliques préparés, ensuite le volume correspondant de l'éthanol pour avoir le 1.6ml de solution et pour terminer le 6 ml on ajoute 3ml de DPPH.

On utilise le vortex pour homogénéiser le mélange, les mélanges sont laissés à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm.

IV.4. Expression des résultats :

La valeur IC_{50} pour chaque échantillon, définie comme la concentration de l'échantillon conduit à une réduction de 50% de la concentration initiale DPPH, a été calculée à partir de la courbe de régression non linéaire de la concentration des extraits (µg/ml) en fonction du pourcentage de l'activité antioxydant. L'activité antioxydant des extraits est donnée par la relation :

$$\%L'activité\ antiradicalaire = [Acontrole - (Atest - Ablanc)] / Acontrole \times 100$$

Avec : $A_{contrôle}$ = Absorbance du contrôle

A_{test} = Absorbance de l'échantillon

A_{blanc}= Absorbance du blanc

V. Criblage phytochimique

Il s'agit des tests phytochimques qui consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par desréactifs spécifiques à chaque famille de composé.

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

V.1. Tanins

Dans un tube à essai contenant 1 ml de l'extrait, on ajouter 1 ml d'une solution aqueuse diluée de $FeCl_3$ à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noirâtre ou précipité.

V.2. Flavonoïdes

On Introduit dans un tube à essai 5 ml de l'infusé, 5 ml d'alcool chlorhydrique; puis quelques copeaux de magnésium et 1 ml d'alcool isoamylique.

L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose violacée (flavonones) ou rouge (flavonols, flavanonols) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool isoamylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génine).

Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques. La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les aurones, les catéchines et les isoflavones.

V.3. Saponosides

Par agitation, une mousse persistante dont la hauteur est mesurable apparait dans les extraits à saponines, la teneur en saponines est quantifiée par le calcul de l'indice de mousse :

Deux grammes de matériel végétal sec broyé à tester sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau. On porte à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100 ml. À partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1,3 cm de diamètre interne) avec 1, 2, … 10 ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de 1 cm dans le x tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante :

I = hauteur de mousse (en cm) dans le x tube x 5 / 0,0x.

I : indice de mousse

X : position de tube

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Résultats et discussion

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

I. Extraction par macération à chaud :

I.1. L'extraction solide –liquide :

L'extrait aqueux de stevia rebaudianaest de couleur brune avec un pH = 6.8 et une odeur piquante. Les rendements d'extraction par macération chaude des feuilles broyées et non broyées en utilisant l'eau comme solvant sont figurés sur le tableau ci-dessous.

Les feuilles broyées ont présenté un meilleur rendement cela peut être expliqué par l'augmentation de la surface d'échange entre la matière solide et le solvant d'extraction

Tableau 2 : Rendement de l'extrait aqueux

Les feuilles	Le rendement (%)
broyées	20.57
Non broyées	24.26

I.2. Extraction liquide –liquide :

Comme montré sur le tableau ci-dessous, dans l'extraction organique liquide –liquide , les feuilles broyées ont un rendement (34.89 %) supérieur aux non broyées (29.21 %).

Tableau 3 : Rendement de l'extrait organique avant cristallisation:

Les feuilles	Le rendement (%)
broyée	34.89
Non broyée	29.21

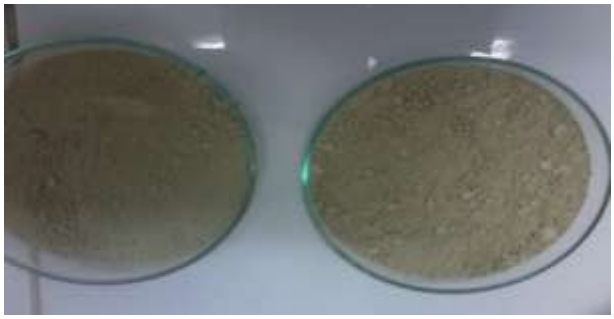


Figure 15 : glycosides de steviolde S. rebaudiana obtenu

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Après avoir éliminé les impuretés par la cristallisation (lavage 2 fois par le méthanol), le rendement alors chute pour arriver à 9.27 % et 6.06 % pour l'extrait des feuilles broyées et non broyées respectivement.

II. Extraction assistée par Ultrasons

D'après les résultats obtenus de la première expérimentation (macération à chaude) , les feuilles broyées ont présenté une meilleure extraction que les non broyées , c'est pour cela , qu'on a restreint le travail sur la poudre du stévia pour la deuxième méthode d'extraction : Sonication .

Le calcul du rendement de cette méthode, par rapport au poids total de la poudre des feuilles montre que le stevia a donné une masse en extrait sec de15.6 g / 100 g pour la phase organique et de 18.63g/100g pour la phase aqueuse.

Après avoir cristallisé l'extrait organique, on a obtenu un rendement total en stéviol glycosides de 1.27%.

- Comparaison entre les rendements d'extraction par macération à chaud et sonication :

En récapitulant et d'après la figure ci-dessous, on remarque que la macération présente les meilleurs résultats, en effet que ce soit pour l'extrait aqueux ou organique, le rendement est toujours supérieur à celui obtenu après sonication.

D'autre part, Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, en fait les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée reste l'un des facteurs qui influence les résultats

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

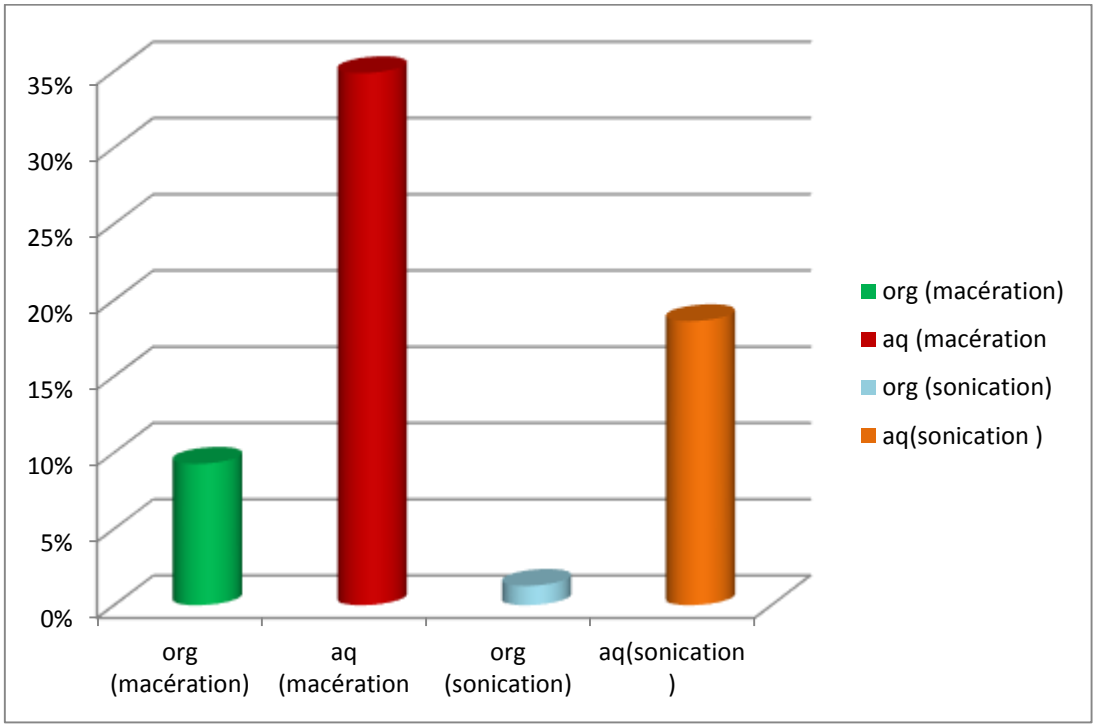


Figure 16 : Comparaison entre les rendements organiques et aqueux des deux méthodes d'extraction : macération et sonication

III. Décoloration de l'extrait de stevia

Deux fractions de volume 5l ont été obtenus après avoir passé toute la solution (…) dans la première colonne.la solution obtenue est repassée dans la 2éme colonne, et pour s'assurer que toute trace de solution est bien éluée, on lave la colonne deux fois avec 5l d'eau.

4 fraction, chacune de 5L, ont été obtenu dont les rendements après concentration en rotavapeur est montré sur le tableau ci-dessous

Tableau 4 : Les rendements obtenus après la concentration

Les fractions	Le rendement %
1	14.24
2	59.58
3	4.63
4	2.78

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

L'aspect et la coloration des différentes fractions obtenues après avoir concentré le filtrat sont mentionnés ci-dessous, on remarque que la coloration devienne plus claire en fonction des lavages effectués par l'eau

Tableau 5 : Les fractions solides obtenues après concentrations

Fraction 1	Fraction2	Fraction3	Fraction 5

IV. effet antioxydant par test DPPH

l'extrait brut a montré une activité antioxydante comme exprimé sur le tableau ci-dessous

Tableau 6: Activité Antioxydante de l'extrait de stevia à différentes concentration

Concentration µg/ml	Effet antioxydant en %
50	74
20	71
10	67
5	53
2	21
1	4

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

L'effet antioxydant maximal (74 %) est obtenu à la concentration de 50 µg/ml de l'extrait éthanolique de stevia.

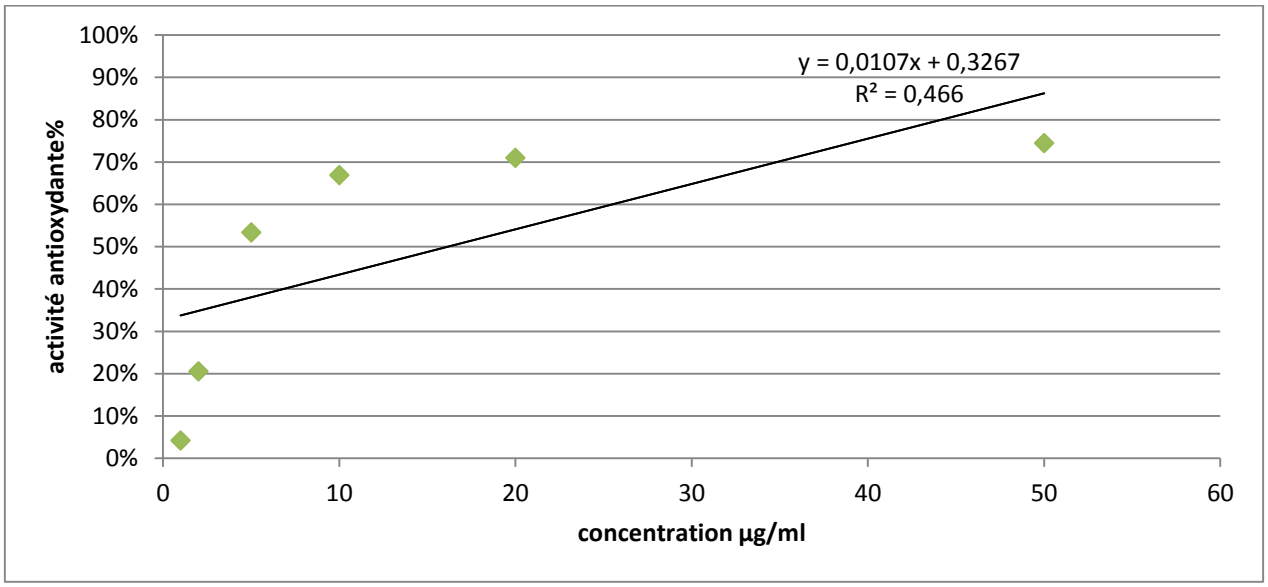


Figure 17 : la variation de l'effet antioxydant en fonction de la concentration

L'extrait éthanolique de stevia a donné un effet antioxydant qui ne dépasse pas IC_{50} = 17%.

La composition chimique de *stevia* qui renferme une diversité de polyphénols, n'était pas mise en évidence par le solvant utilisés, d'autre solvant plus polaire seront indispensable pour révéler cette activité antioxydante.

L'extrait éthanolique de stevia a donné un effet antioxydant qui ne dépasse pas IC_{50} = 17%.

La composition chimique de *stevia* qui renferme une diversité de polyphénols, n'était pas mise en évidence par le solvant utilisés, d'autre solvant plus polaire seront indispensable pour révéler cette activité antioxydante.

V. Criblage phytochimique :

Les tests phytochimiques de l'extrait ont révélés des différences de composition chimique.

Selon les résultats mentionnés dans le **tableau** ci-dessus, on constate l'absence totale

des saponosides, la présente fortement abondante des flavonoïdes et ainsi que la présence des tanins dans l'extrait aqueux de stevia.

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Tableau 7 : Résultats de criblage phytochimique.

Les composés	Tanins	Flavonoïdes	Saponosides
Aspect et couleur	Vert	Orange	Aucun changement
Expression des résultats	++	+++	–

(+++) : Test fortement positif.

(++): Test positif.

(-): Test négatif

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Conclusion et perspectives

Le présent travail s'insère dans le cadre de la valorisation du pouvoir sucrant naturel de l'extrait aqueux de stévia, ainsi que la recherche d'autres molécules biologiquement actives. Généralement on peut noter que :

- L'extraction par macération présente des meilleurs résultats, en effet que ce soit pour l'extrait aqueux ou organique, le rendement est toujours supérieur à celui obtenu après sonication.
- Faire passer l'extrait dans deux colonnes avec deux résines différentes a pu réaliser une décoloration considérable de l'extrait.
- La technique utilisée pour étudier l'activité antioxydante de l'extrait est la méthode de test de DPPH qui a révélé que l'extrait éthanolique est actif comme piégeur du radical DPPH.
- D'après le criblage phytochimique, les familles des flavonoïdes et tannins sont présentes dans l'extrait aqueux, contrairement aux Saponosides qui ne présentent aucune trace.
- En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus in-vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances et sources naturelles pouvant remplacer le gout sucré artificiel. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidences.

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Références bibliographiques

[1] : FOURNIER P. - Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Editeur Paul Lechevalier. 1948. Tome II. 504 pages. Pages 286 à 291

[2] Agence du Médicament les Cahiers de l'Agence 3-Médicaments à base de plantes,Paris 1998.

[3] : Leng P., Zhiming Z., Guangtang P., Maojun Z., 2011. Applications and development trends in biopesticides. Afr. J. biotechnol., 10(86), 19864-19873.

[4] : perto lavanov PENCHEV Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plante par couplage de technique séparatives à basses et haut pressions , 2010,Toulouse,239

[5] Zemane Ahmed, Etude de l'extraction supercritique application aux systémes agroalimantaires,2010,Alges,136

[6] : SHUKLA, S., MEHTA, A., MEHTA, P. et al. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. Experimental and Toxicologic Pathology. 2012. 64, 807-811.

[7] : Miller et al., 1996 N.J. Miller, J. Sampson, L.P. Candeias, P.M. Bramley and C.A. Rice-Evans, Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, FEBS Letters 384 (1996), pp.240–242.

[8] : Elise PORTES , Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes :Propriétés Photochimiques

[9] : Scartezzini, P et al, Review on some plants of Indian traditional medicine withantioxidant activity. Journal of Ethnopharmacology, 71, 23-43 (2000)

[10] : Prior, R et al Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radicalabsorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. Journal ofAgriculture and Food Chemistry, 51, 3273-3279 (2003)

[11] : Benzie, I et al, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of"antioxidant power": the FRAP assay. AnalyticalBiochemistry, 239, 70-76 (1996)

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

[12] : AbdelhakMansouri,et l, Institut National de Protection des Vegetaux, Avenue Pasteur,BP 80 El Harrach Alger, Algeria, Section of Pharmacognosy, Department of Pharmacy,School of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, 54006 Thessaloniki,Greece25 February 2004

[13] : Mishra, P., Singh, R., Kumar, U., &Prakash, V. (2010). Stevia rebaudiana – A magicasweetener. Global Journal of Biotecnology& Biochemistry, 5, 62–74.

[14] : WIKIMEDIA COMMONS (consulté le 27 février 2012) Stevia rebaudiana,classification APG III

[15] : WÖLWER-RIECK, U. The leaves of Stevia rebaudiana (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012. 60, 886-895.

[16] : SCIENTIFIC OPINION Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive1 EFSA Journal 2010;8(4):1537

[17] : Paola Montoro a1, Ilaria Molfetta b,1, MariateresaMaldini a, Lucia Ceccarini b, Sonia Piacente a, Cosimo Pizza a, Mario Macchia b . Determination of six steviol glycosides of Stevia rebaudiana (Bertoni) from different geographical origin by LC–ESI–MS/MS. P. Montoro et al. / Food Chemistry 141 (2013) 745–753

[18] : KENNELLY E.J.Sweet and non-sweet constituents of Stevia rebaudiana Dans : KINGHORN A.D. Stevia: The genus Stevia London, Taylor & Francis, 2002, 68-86.

[19] : KOBAYASHI M., HORIKAWA S., DEGRANDI I.H., UENO J., MITSUHASHI H. Dulcosides A and B new diterpene glucosides from Stevia rebaudiana Phytochemistry, 1977, 16 : 1405-1408.

[20] : PRAKASH, I., DUBOIS, G.E., CLOS, J.F. et al. Development of Rebiana, a natural, non-caloric sweetener. Food and chemical toxicology. 2008. 46, S75-82.

[21] : BRANDLE, J.E. et TELMER, P.G. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry. 2007. 68, 1855-1863.

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

[21] : BRANDLE, J.E. et TELMER, P.G. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry. 2007. 68, 1855-1863.

[22] : BRAHMACHARI, G., MANDAL, L.C., ROY, R. et al. Stevioside and related compounds-Molecules of pharmaceutical promise: a critical overview. Archiv Der Pharmazie. 2011. 344, 5-19.

[23] : RICHMAN, A.S., GIJZEN, M., STARATT, A.L. et al. Diterpene synthesis in Stevia rebaudiana: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. The Plant Journal. 1999. 19, 411-421.

[24] : SHIBATA, H., SONOKE, S., OCHIAI, H. et al. Glucosylation of steviol and steviol-glucosides in extracts from Stevia rebaudiana Bertoni. Plant Physiology. 1991. 95, 152-156.

[25] : FLORA OF NORTH AMERICA EDITORIAL COMMITTEE (FNA) Volume 21 : Magnoliophyta : Asteridae (in part) : Asteraceae, part 3 New York, Oxford University Press, 2006, 483-485.

[26] : TOMITA-TOSHIO, S.N., ARAI, T., SHIRAISHI, H. et al. Bactericidal activity of a fermented hot- water extract from Stevia rebaudiana Bertoni towards enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and other foodborne pathogenic bacteria. Microbiology and Immunology. 1997. 41, 1005-1019

[27] : TAKAHASHI, K., MATSUDA, M., OHASHI, K. et al. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from Stevia rebaudiana. Antiviral Research. 2001. 49, 15-24

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14