



**Année Universitaire : 2020 – 2021**

**Licence Sciences et Techniques : Génie chimique**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

Pour l'Obtention du Diplôme de Licence Sciences et Techniques

**Extraction et analyse de la 4-Hydroxyisoleucine :  
Revue bibliographique**

Présenté par :

**ETTALAKI Hajar**

Encadré par :

**Mr. GRECHE Hassane**

Soutenu le : 08 juillet 2021 devant le jury composé de :

- |                      |         |
|----------------------|---------|
| - Pr. GRECHE Hassane | FST-Fès |
| - Pr. MISBAHI Khalid | FST-Fès |
| - Pr. CHTIOUI Hicham | FST-Fès |

جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس  
+080044 0484 634408 01 408800 1 300  
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES



كلية العلوم والتقنيات فاس  
+340044 1 1600041 8 0144441 - 300  
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FÈS

---

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

✉ B.P. 2202 – Route d’Imouzer – FES

☎ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – Fax : 212 (35) 60 82 14

## **Dédicaces**

Avec une inéluctable joie, je tiens à adresser mes dédicaces :

### ***A mes chers parents***

Aucun mot, aussi signifiant soit-il, ne saurait exprimer le degré d'amour, d'affection, de respect et de reconnaissance que j'éprouve envers vous. Votre présence à mes côtés m'a toujours apporté confiance et réconfort. Puisse cet humble travail être le fruit de votre dévouement et un témoignage de ma gratitude, mon éternel respect et ma reconnaissance pour votre sacrifice continue. Que Dieu vous procure longue vie, avec bonheur et santé, vous protège, afin que vous demeuriez le soleil qui illumine notre vie.

### ***A mes chères sœurs et mes chers frères***

Pour le soutien, la patience et les sentiments d'amour aux moments les plus difficiles. Que Dieu vous garde et illumine vos chemins.

### ***A mes chères amies, ma seconde famille***

En souvenir des plus beaux instants qu'on a passés ensemble, des moments de joie et de peine, de l'amitié merveilleuse qui nous a réunis pendant des années. Que ce travail si modeste soit pour vous le témoignage de ma grande considération, mon respect et mon amour.

### ***A toute ma famille***

Je vous dédie ce projet en forme de gratitude pour votre aide, votre soutien et vos encouragements, veuillez accepter l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect.

**A tous** ceux qui ont une relation de proche ou de loin avec la réalisation du présent travail.

**ETTALAKI Hajar**

## Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force, le courage et la patience pour réaliser ce travail.

Nombreuses sont les personnes que je souhaite remercier pour m'avoir aidée et soutenue durant cette année.

J'exprime ma profonde gratitude au professeur **GRECHE Hassane**, pour les conseils, l'encadrement et la liberté qu'il m'a laissée dans mon travail et ces encouragements. Je tiens également à le remercier de toute la patience dont il a su faire preuve au cours de la rédaction de mon mémoire.

Mes remerciements vont aux membres du jury professeurs, **MISBAHI Khalid** et **CHTIOUI Hicham** Pour avoir accepté de juger ce travail.

Je n'oublierais pas d'adresser mes sincères remerciements au **Mr. HARRACH Ahmed**, responsable de la licence sciences et techniques en Génie chimique, pour ses conseils gravés dans mon esprit.

*Merci à tous.*

## Résumé

Les plantes sont toujours une source inépuisable de nouvelles substances à potentialité thérapeutique. Les nombreux laboratoires qui aujourd'hui se consacrent à cette thématique font le choix de plantes modèles objectivées par des données ethnopharmacologiques.

La richesse moléculaire des végétaux constitue une source importante de molécules bioactives d'origine naturelle. La mise en évidence de ces molécules nécessite de nombreuses étapes d'extractions, de séparations et d'analyses pour obtenir le produit requis.

Le fenugrec *Trigonella foenum graecum*, compte parmi les plus anciennes plantes médicinales, aromatiques et culinaires. Ses graines, grâce à leurs composés chimiques, se révèlent être d'une grande valeur alimentaire et présentent de multiples vertus phytothérapeutiques.

Les graines de fenugrec contiennent un acide aminé bioactif très important, c'est la 4-hydroxyisoleucine. Cet acide aminé est largement utilisé dans l'industrie nutraceutique comme composé antidiabétique, c'est un traitement bien toléré de la résistance à l'insuline, comme agent hypoglycémiant et également comme agent protecteur du foie.

Un procédé qui commence par le moulage des graines séchées de fenugrec et qui se termine par l'analyse en utilisant la technique HPLC, est capable d'identifier et déterminer la 4-hydroxyisoleucine dont les résultats obtenus par cette détermination quantitative ont montré la présence de 0,4% de cet acide aminé dans les graines séchées, plus que la majorité des acides aminés présent dans le fenugrec sont sous forme de la 4-Hydroxyisoleucine.

A ce titre, notre travail consiste à développer une étude bibliographique sur les plantes aromatiques et médicinales en générale et le fenugrec en particulier, puis les méthodes d'extractions et de séparations des plantes, ensuite les activités de 4-Hydroxyisoleucine extrait à partir les graines de fenugrec et analysé par HPLC.

**Mots clés :** PAM, fenugrec, 4-Hydroxyisoleucine, méthodes, extraction, séparation, analyse, chromatographie, *Trigonella foenum-graecum*, HPLC.

## Abstract

Plants are always an inexhaustible source of new substances with therapeutic potential. The many laboratories that are currently working on this theme choose model plants that are objectified by ethnopharmacological data.

The molecular richness of plants constitutes an important source of bioactive molecules of natural origin. The identification of these molecules requires numerous steps of extractions, separations and analyses to obtain the required product.

Fenugreek *Trigonella foenum graecum* is one of the oldest medicinal, aromatic and culinary plants. Its seeds, thanks to their chemical compound, are of great food value and have multiple phytotherapeutic virtues.

Fenugreek seeds contain a very important bioactive amino acid, 4-hydroxyisoleucine. This amino acid is widely used in the nutraceutical industry as an anti-diabetic compound, it is a well-tolerated treatment for insulin resistance, as a hypoglycemic agent and also as a protective agent for the liver.

A process which begins with the molding of the dried seeds of fenugreek and which ends with the analysis using the HPLC technique, is able to identify and determine the 4-hydroxyisoleucine whose results obtained by this quantitative determination have shown the presence of 0.4% of this amino acid in dried seeds, more than the majority of amino acids present in fenugreek are in the form of 4-Hydroxyisoleucine.

Our work consists of developing a bibliographic study on aromatic and medicinal plants in general and fenugreek in particular, then the methods of plant extracts and separations, then the activities of 4-Hydroxyisoleucine extracted from the seeds. fenugreek and analyzed by HPLC.

**Keywords:** MAP, fenugreek, 4-Hydroxyisoleucine, methods, extraction, separation, analysis, chromatography, *Trigonella foenum-graecum*, HPLC.

## ملخص

تعتبر النباتات دائماً مصدراً لا ينضب للمواد الجديدة ذات الإمكانيات العلاجية. تختار المعامل العديدة المخصصة اليوم لهذا الموضوع نباتات نموذجية موضحة ببيانات علم الأدوية الإثنية.

يشكل الثراء الجزيئي للنباتات مصدراً مهماً للجزيئات النشطة بيولوجياً ذات الأصل الطبيعي. يتطلب اكتشاف هذه الجزيئات العديد من خطوات الاستخراج والفصل والتحليل للحصول على المنتج المطلوب.

الحلبة، *Trigonella foenum graecum*، هي واحدة من أقدم النباتات الطبية والعطرية و المستعملة في الطهي. أثبتت بذورها بفضل مركباتها الكيميائية، أنها ذات قيمة غذائية كبيرة ولها مزايا متعددة في العلاج بالنباتات.

تحتوي بذور الحلبة على حمض أميني حيوي مهم للغاية، 4-هيدروكسي إيزولوسين. يستخدم هذا الحمض الأميني على نطاق واسع في صناعة المغذيات كمركب مضاد لمرض السكري، وهو علاج لمقاومة الأنسولين، كعامل سكر الدم وأيضاً كعامل وقائي للكبد.

عملية تبدأ بقلوبة بذور الحلبة المجففة وتنتهي بالتحليل باستخدام تقنية HPLC، قادرة على تحديد 4-هيدروكسي إيزولوسين الذي أظهرت نتائجه وجود 0.4% من هذه الأحماض الأمينية في البذور المجففة، أكثر من غالبية الأحماض الأمينية الموجودة في الحلبة تكون على شكل 4-هيدروكسي إيزولوسين.

على هذا النحو، فإن عملنا يتكون من تطوير دراسة ببيولوجرافية للنباتات العطرية والطبية بشكل عام والحلبة بشكل خاص، ثم طرق المستخلصات النباتية وفصلها، ثم أنشطة 4-هيدروكسي إيزولوسين المستخرج من بذور الحلبة وتحليلها بواسطة HPLC.

**الكلمات المفتاحية:** PAM، الحلبة، 4-هيدروكسي إيزولوسين، الطرق، الاستخراج، الفصل، التحليل،

*Trigonella foenum-graecum*

# Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : LES PAM AU MAROC .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>4</b>
<b>I. LES PLANTS AROMATIQUES ET MEDICINALES AU MAROC .....</b>	<b>4</b>
1. GENERALITES .....	4
2. LA PRODUCTION DES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES AU MAROC .....	5
3. LES EXPORTATIONS DES PAM AU MAROC.....	5
4. LES IMPORTATIONS DES PAM AU MAROC .....	6
5. LE MARCHE MONDIAL ET NATIONAL DES PAM.....	6
6. DEVELOPPEMENT DES PAM AU MAROC .....	6
<b>II. FENUGREC (TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM).....</b>	<b>7</b>
1. DESCRIPTION GENERALE DE LA TRIGONELLE FOENUM-GRAECUM .....	7
2. COMPOSITION DE FENUGREC .....	8
3. LES PROPRIETES DE FENUGREC .....	8
4. LES BIENFAITS DU FENUGREC .....	9
5. PRECAUTIONS D'EMPLOI DU FENUGREC.....	10
6. PRINCIPAUX PAYS PRODUCTEURS DU FENUGREC .....	10
7. MARCHE COMMERCIAL INTERNATIONAL DE FENUGREC.....	11
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>11</b>
<b>CHAPITRE 2 : .....</b>	<b>12</b>
<b>METHODES D'EXTRACTIONS, SEPARATIONS ET ANALYSES .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>I. METHODES D'EXTRACTION.....</b>	<b>13</b>
1. METHODES D'EXTRACTION TRADITIONNELLES .....	13
1.1. L'infusion .....	13
1.2. La décoction.....	14
1.3. La macération.....	14
2. METHODES D'EXTRACTION MODERNES .....	15
2.1. Le CO <sub>2</sub> supercritique .....	16
2.2. La lixiviation ou percolation .....	17
2.3. La distillation .....	17
2.4. Extraction par solvant (S).....	18
<b>II. METHODES DE SEPARATION OU PURIFICATION.....</b>	<b>18</b>
1. LA CHROMATOGRAPHIE .....	19
1.1. Définition .....	19
1.2. Types de chromatographie .....	19
2. L'ELECTROPHORESE .....	20



3. LA FILTRATION .....	20
4. LA CENTRIFUGATION .....	20
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE 3 : EXTRACTION ET ANALYSE DE LA 4-HYDROXYISOLEUCINE .....</b>	<b>22</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>23</b>
<b>I. DESCRIPTION ET PROPRIETES DE LA 4-HYDROXYISOLEUCINE.....</b>	<b>23</b>
1. DESCRIPTION GENERAL DE MOLECULE 4-HYDROXYISOLEUCINE .....	23
2. PROPRIETES DE LA 4-HYDROXYISOLEUCINE .....	24
<b>II. EXTRACTION ET SEPARATION DE LA 4-HYDROXYISOLEUCINE PAR HPLC.....</b>	<b>25</b>
1. GENERALITE .....	25
2. EXTRACTION ET ISOLEMENT DES ACIDES AMINES .....	25
3. IDENTIFICATION ET DETERMINATION QUANTITATIVE DE LA 4-HYDROXYISOLEUCINE .....	25
4. RESULTATS .....	26
5. DISCUSSION .....	27
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>28</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>29</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE &amp; WEBOGRAPHIE.....</b>	<b>30</b>

## Liste des abréviations

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone.

CPC : Chromatographie de partage centrifuge.

CPG : Chromatographie en phase gazeuse.

CPL : Chromatographie en phase liquide.

DT2 : Diabète de type 2.

HCEFLCD : Haut-commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification.

HCL : acide chlorhydrique.

HIL : Hydroxyisoleucine.

HPLC : Chromatographie liquide haute pression (ou performance).

LC : Chromatographie liquide.

MDH : Million de dirhams marocain.

mmHg : millimètre de mercure.

OPA : *o*-phtalaldéhyde ou *orthophtalaldéhyde*.

PAM : Plantes aromatiques et médicinales.

PI3: Phosphoinositide 3.

SBU: Strategic Business Unit.

T : Tonne.

UAE : United Arab Emirates.

UE : Union européenne.

YAE : la République arabe du Yémen.

4-OH-Ile : 4-Hydroxyisoleucine.

## Liste des figures

Figure 1 : les épices et les herbes dans le marché marocain .....	5
Figure 2 : image des feuilles et graines du fenugrec .....	8
Figure 3 : infusion du thé .....	14
Figure 4 : exemple de décoction .....	14
Figure 5 : macération huileuse de Romarin .....	15
Figure 6 : exemple des médicaments phytothérapeutiques.....	15
Figure 7 : schéma du principe de l'extraction au CO2 supercritique .....	16
Figure 9 : schéma du principe de lixiviation à froid .....	17
Figure 8 : l'appareil de SOXHLET .....	17
Figure 10 :schéma du principe de la distillation .....	18
Figure 11 : schéma d'une filtration par gravité .....	20
Figure 12 : la centrifugation .....	21
Figure 13 : structure 2D de 4Hydroxyisoleucine .....	24
Figure 14 : chromatogramme HPLC de la 4-hydroxyisoleucine .....	26
Figure 15 : chromatogramme HPLC de l'extrait de graines de fenugrec .....	27

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau descriptif de quelques caractéristiques de molécule 4-Hydroxyisoleucine..	23
Tableau 2 : Pourcentage d'isomères majeurs et mineurs dans les solutions standard et les solutions d'échantillon.....	27

## Introduction générale

Ces dernières années, les plantes aromatiques et médicinales (PAM) ont créé un grand intérêt dans le domaine thérapeutique [3], car entre 20 000 et 25 000 espèces de plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine, 75 % des médicaments sont d'origine végétale et 25 % d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale [1]. En effet, la préparation de nombreux produits dans les domaines de la nutrition, de la médecine, de la cosmétique et de la parfumerie nécessite la présence des substances naturelles extraites de ces plantes. Les enjeux politiques, économiques, sociaux et environnementaux encouragent également les industriels à innover et à améliorer l'efficacité énergétique et environnementale de leurs procédés, grâce au développement de la chimie dite verte en remplacement des procédés chimiques traditionnels [3].

Par sa situation géographique particulière, le Maroc bénéficie d'un bioclimat permettant une végétation riche et diverse. Plus de 4 000 espèces et sous espèces y ont été répertoriées, dont une centaine endémique. Les PAM représentent une catégorie importante des produits forestiers non ligneux. Ces produits englobent une large gamme de produits qui existent à l'état spontané, en forêts et hors forêts, ou sous forme de cultures. Après avoir été longtemps considérés comme produits secondaires ou menus produits, les PAM ont pris un essor considérable eu égard à la demande sans cesse accrue du marché international [2].

Les techniques de transformation utilisées par les professionnels marocains sont souvent simples et artisanales en raison du faible niveau d'encadrement et d'investissement. Le séchage de plantes directement au soleil est la technique la plus utilisée par les herboristes. Elles sont ensuite ramenées dans des ateliers pour être dépoussiérées, nettoyées et puis conditionnées, pour être exportées en vrac, dans des cartons, sacs en jute ou en plastique. Cette technique peut être améliorée pour obtenir des produits finis de qualité comme les infusions dont la valeur ajoutée est très importante. Ainsi, la technique de production de plantes séchées, reste encore très traditionnelle et des efforts scientifiques, techniques et financiers, sont nécessaires pour ériger ce segment de la profession en une véritable industrie, capable de répondre aux exigences du marché local et international [2].

Parmi les épices qui sont des adjuvants alimentaires ésoériques utilisés pour renforcer la saveur et la couleur, le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*). C'est une plante annuelle d'origine

orientale mais qui est très cultivée au Maroc et dans les régions nord de l'Algérie [33]. Cette épice est également utilisée à des fins médicinales dans de nombreux systèmes traditionnels comme antibactérien, stimulant gastrique, agent antidiabétique. Au cours des dernières décennies, plusieurs attributs physiologiques bénéfiques pour la santé des graines de fenugrec ont été observés dans des études animales ainsi que dans des essais humains [34].

Il a été démontré qu'un composant du fenugrec, la 4-hydroxyisoleucine est l'un des composés bioactifs qui est responsable de son activité antidiabétique [4], elle augmente la sécrétion d'insuline pancréatique et inhibe l'activité de la glucosidase [21].

La 4-hydroxyisoleucine est un acide aminé non protéinogène inhabituel qui améliore significativement le profil lipidique [4], et des études ont signalé des effets sur la satiété, la vidange gastrique et la fonction des récepteurs de l'insuline [21]. C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail et qui se présente comme suit :

Le premier chapitre sera consacré à une étude bibliographique sur les PAM en générale et le fenugrec en particulier.

Le deuxième chapitre aborde les méthodes d'extraction et de séparations des plantes.

Et en fin, le dernier chapitre développe l'étude, l'extraction et l'analyse de la 4-Hydroxyisoleucine.

---

# **CHAPITRE 1 : Les PAM au Maroc**

---

## **Introduction**

Le Maroc occupe une place non négligeable sur le marché international des PAM avec une production qui se distingue par sa richesse et sa diversité. A noter que la production nationale des PAM est destinée pratiquement à 100% à l'exportation. Les plantes exploitées au Maroc concernent aussi bien celles soumises à l'extraction des huiles essentielles et des extraits aromatiques via la distillation ou l'extraction par solvants, que celles utilisées en l'état « frais » ou après « séchage » en herboristerie, aromates, alimentaires, etc [3].

Le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*), plante largement répandue dans le monde entier, qui appartient à la famille des fabacées. Cette plante contient des constituants actifs tels que des alcaloïdes, des stéroïdes, des saponines, des lipides, des glucides, des vitamines, etc. C'est une plante médicinale ancienne. Elle a été utilisée comme aliment et médicament traditionnel.

Le fenugrec est connu par ses effets hypoglycémiants, anti-inflammatoires, Stimulateur des fonctions digestives, stimulateur d'appétit...

Mais il existe des précautions d'emploi à respecter pour éviter de créer des problèmes à l'organisme en utilisant cette substance.

## **I. Les plants aromatiques et médicinales au Maroc**

### **1. Généralités**

La filière des plantes aromatiques et médicinales (PAM) au Maroc regorge de potentiel grâce à la diversité de ses espèces. Plus de 4.200 espèces ont été identifiées dont 800 endémiques et 400 classées comme produits à usage médicinal et/ou aromatique. Les recettes moyennes annuelles des ventes de plantes aromatiques et médicinales sont de 5,3 M de dirhams pour une quantité annuelle de 33.000 tonnes. Il est important de préciser que les PAM procurent des revenus alternatifs aux communautés locales. De plus, selon le HCEFLCD (2016), elles génèrent en moyenne quelque 500.000 journées de travail/an. Focus sur cette filière en pleine expansion [31].





**Figure 1 : les épices et les herbes dans le marché marocain**

## **2. La production des plantes aromatiques et médicinales au Maroc**

La production des PAM utilise des plantes spontanées et des plantes cultivées, fraîches ou sèches. La production est généralement assurée par les plantes aromatiques et médicinales spontanée, et la part des PAM cultivée est encore faible (2%). La collecte des plantes spontanées représente plus de 98% de la production nationale. Cette catégorie couvre un large éventail de plantes dont les plus importantes sont le thym, le romarin, la caroube, la menthe, l'origan, l'arganier et le laurier. Parmi les principales PAM cultivées au Maroc, on peut citer : le géranium, la lavande, la rose, le jasmin, la verveine, la menthe et le safran. La culture des plantes aromatiques et médicinales est courante dans plusieurs régions du pays, avec une trentaine d'espèces [31].

## **3. Les exportations des PAM au Maroc**

En 2016, le Maroc se classe au 12ème rang mondial parmi les pays exportateurs des PAM. La principale destination des exportations marocaines des plantes aromatiques et médicinales est le marché de l'UE. Cependant, l'ouverture à d'autres destinations, comme le Japon, Canada, Suisse, Espagne et Allemagne. Plus de 50% des exportations concernent le secteur alimentaire (caroube, épices, etc.), 35% sont destinées aux parfums et cosmétiques, et 5% sont utilisés pour leurs propriétés médicinales. Depuis 2005, les exportations marocaines des PAM ont connu une croissance significative. Par conséquent, la valeur des exportations de PAM est passée de 67 millions de dirhams marocain en 2002 à 233 MDH en 2014 [31].

#### **4. Les importations des PAM au Maroc**

Selon le HCEFLCD, concernant les condiments, les principaux produits importés sont le poivre qui est en haut de la liste avec 43% des quantités globales importées, suivi du gingembre (16%), puis du cumin (12%), du curcuma (9%), de la cannelle (9%) et du girofle (5%). A part le cumin, avec lequel l'importation ne peut être remplacée par des productions locales. [31].

#### **5. Le marché mondial et national des PAM**

En outre, le marché mondial des PAM est estimé à 64 milliards de dollars américains et la demande mondiale des consommateurs pour ces produits augmente (environ 15 à 25 % par an). Cependant, pour diverses raisons, l'industrie a encore des faiblesses, notamment le manque de maîtrise de la technologie et de la qualité, manque d'encadrement et absence de stratégies de développement socio-économique et commercial [32].

La filière des PAM au Maroc est l'une des plus riches au monde du fait de sa diversité (4 200 espèces, dont 800 espèces endémiques), dont près de 400 sont reconnues pour leurs usages médicinaux ou aromatiques et leur potentiel de développement, et sont particulièrement adaptées à l'exploitation [32].

En 2016, le Maroc est le 12ème exportateur mondial de plantes aromatiques et médicinales. Le potentiel d'expansion sur le marché mondial estimé à 15 milliards de dollars américains est à étrangler [32].

Il y a près de 130 exportateurs de PAM au Maroc, et ce nombre est en croissance, mais étant donné que le potentiel du marché est encore relativement faible. Avec le développement continu de ce secteur, l'agence gouvernementale chargée de la protection des forêts et des pâturages nationaux est confrontée à un défi de taille : comment protéger la biodiversité et protéger les ressources naturelles du Maroc, tout en créant un environnement où la population rurale peut participer. Regroupement spontané d'activités de croissance économique en milieu naturel pour améliorer leurs moyens de subsistance, tout en augmentant la valeur ajoutée du développement de la PAM au niveau national [32].

#### **6. Développement des PAM au Maroc**

Pour comprendre les raisons du succès de l'entreprise, il est nécessaire de préciser sa mission et son modèle d'organisation [33].

- Historique : Les Arômes du Maroc est un fournisseur de longue date de la parfumerie fine dans le monde et jouit d'une réputation internationale depuis plus de 70 ans, grâce à une étroite collaboration avec des maîtres professionnels [33].
- Mission : Par le contrôle qualité de l'intégration verticale, réunir en permanence les meilleures conditions pour répondre au mieux aux exigences des clients [33].
- Organisation : Les Arômes du Maroc sont divisés en 3 SBU (Strategic Business Units) :
  - ✓ Production agricole : plantation, culture et récolte de matières premières agricoles.
  - ✓ Production industrielle : transformation des matériaux de production.
  - ✓ Commercialisation.

## II. FENUGREC (*Trigonella foenum-graecum*)

### 1. Description générale de la *Trigonelle foenum-graecum*

Nom scientifique : *Trigonella foenum-graecum*.

Noms communs : Fenugrec, sénégrain, trigonelle.

Nom vernaculaire arabe : Halba.

Nom anglais : Fenugreek.

Famille : Fabaceae/Fabacées.

Genre : *Trigonella*.

Ingrédients actifs : Saponines de furostanol, 4-Hydroxyisoleucine, Trigonelline [15].

Spécifications : 4-Hydroxyisoleucine (5-98%), Saponines de furostanol (50%), Trigonelline (60-98%) [15].

Origine : Afrique du Nord, Moyen-Orient et Inde.

Répartition géographique : Europe méridionale, Afrique du nord, Asie.

Type : plante herbacée.



**Figure 2 :** image des feuilles et graines du fenugrec

## **2. Composition de fenugrec**

La graine de fenugrec est une épice très riche d'une grande quantité de protéines (plus de 30% selon la qualité de la graine), mais aussi en antioxydants, en vitamines et en minéraux facilement bio-assimilables. Très nourrissant, le fenugrec contient de bonnes quantités de phosphore, fer, soufre, magnésium, calcium, mais aussi des vitamines A, B1, C, de l'acide nicotinique, des alcaloïdes, des lipides (20%), des glucides (10%). De plus les graines de fenugrec contiennent des saponines dont des saponines stéroïdiennes, qui participent très efficacement au bon fonctionnement des hormones sexuelles, de plusieurs glandes endocrines, à la synthèse du cholestérol, à la réduction du diabète, et qui sont entre autre, à l'origine de ses grandes propriétés stimulantes de l'appétit [5].

## **3. Les propriétés de fenugrec**

En usage interne et due à la richesse glucidique et protidique de sa graine, le fenugrec possède une valeur alimentaire évidente, favorise la prise de poids, il est indiqué dans :

- Le manque d'appétit.
- La maigreur.
- L'amaigrissement.
- L'anorexie.
- La dénutrition chez les personnes âgées, les malades ou chez les convalescents.

La graine de fenugrec est :

- Stimulante neuromusculaire et du métabolisme général.

- Stimulante des fonctions digestives.
- Apaisante en cas de fièvre.
- Régulatrice des sécrétions pancréatiques, notamment celle de l'insuline.
- Tonifiante.
- Anti-inflammatoire.

Grâce à la présence de fer dans sa composition, il combat l'anémie. Il joue le rôle d'un stimulant du métabolisme qui aide à réguler le diabète et l'hypotension artérielle. On le prescrit principalement dans les cas d'anorexie ou bien de maigreur nerveuse ou métabolique, car il favorise la reprise de poids. Il est efficace pour les troubles nutritifs.

Le fenugrec permet une prise de masse plus rapide chez le sportif, associé à une alimentation conséquente et à un entraînement approprié, tout en limitant l'excès de gras [7].

Il est utile à la production du lait maternel, outil de maintien de l'équilibre du taux de sucre et du taux de cholestérol [24].

En usage externe, le fenugrec est utilisé dans le traitement des inflammations locales, des furoncles, abcès, durillons et eczéma [7].

#### **4. Les bienfaits du fenugrec**

Au regard de ses propriétés, le fenugrec peut être assimilé à un adaptogène. Il va être garant du maintien de la vitalité, grâce notamment à son action antioxydant. C'est une plante prisée des sportifs, pour la récupération ou pour les problèmes de croissance [6]. Par exemple, en Chine, le fenugrec est donné régulièrement aux chevaux pour augmenter leurs performances sportives et leur endurance et leur donner une bonne vitalité [5].

Grâce à la richesse des graines de fenugrec en substances mucilagineuses en fait également un précieux allié pour calmer les inflammations digestives et apaiser celles des voies respiratoires [8].

Le fenugrec a été fortement étudié dans les problématiques de diabète. Dans une étude menée chez des patients présentant un diabète de type 1, prise de poudre de fenugrec est suivie d'une diminution du taux de sucre dans les urines [8].

Chez des diabétiques de type 2, il a été démontré que la glycémie diminuait après la prise de poudre de fenugrec [6].

Pour stimuler l'appétit, il y a différentes solutions chimiques qui peuvent être proposées aux personnes qui souhaitent prendre du poids et retrouver un appétit normal. Le fenugrec peut tout à fait tenir ce rôle. On les utilise dans le cadre des traitements de l'anémie, de l'anorexie et des troubles digestifs. En agissant sur certaines hormones, il peut stimuler l'appétit et aider les personnes qui ont besoin de reprendre du poids [9].

## **5. Précautions d'emploi du fenugrec**

Il existe des précautions d'emploi à respecter pour éviter de créer des problèmes à l'organisme en utilisant cette substance.

Les graines de fenugrec sont utilisées dans certains cas pour provoquer des contractions utérines et permettre à une femme enceinte d'accoucher facilement. De ce fait, par précaution, il est recommandé aux femmes enceintes d'éviter de consommer du fenugrec dans les quantités qui dépasseraient les doses alimentaires habituelles. Cela permet d'éviter tout risque éventuel de « fausse couche » [10] ...

Une surconsommation de fenugrec engendre généralement des pulsions sexuelles parfois trop fortes, mais qui peuvent rester contrôlées si l'alimentation en parallèle est basée en grande partie sur des fruits, des légumes et des plantes médicinales [11].

Un surdosage peut par ailleurs engendrer des réactions allergiques qui se traduisent par un encombrement nasal, de la toux ou le visage qui enfle [9].

Pour les diabètes, il est préférable de prendre conseil auprès de leurs médecins au préalable. L'automédication en cas de diabète peut causer des graves problèmes [10].

## **6. Principaux pays producteurs du fenugrec**

Les principaux pays producteurs de fenugrec sont l'Inde, le Maroc, l'Égypte, l'Éthiopie et la Turquie. Il est difficile d'enregistrer la date de production du fenugrec car dans la plupart des données de production, le fenugrec est associé à d'autres épices à graines.

Ces dernières années, l'Éthiopie est en train de devenir le deuxième plus grand producteur de fenugrec.

L'Inde est le plus grand producteur des graines de fenugrec dans le monde.



## **7. Marché commercial international de fenugrec**

Il est très difficile de calculer le commerce international du fenugrec, car la plupart des statistiques/données publiées par les différentes agences commerciales, le fenugrec avec d'autres épices à graines comme le cumin, le fenouil et la coriandre [35].

Cependant, sur la base des estimations commerciales et des exportations de l'Inde qui est le premier exportateur de fenugrec dans le monde, le commerce mondial de fenugrec est estimé à environ 35 000 T. avec environ 63 % de l'approvisionnement provenant de l'Inde. Les principaux importateurs de fenugrec dans le monde en termes de quantité sont UAE, la République arabe du Yémen (YAE), le Japon, l'Afrique du Sud, le Royaume-Uni, les États-Unis, l'Égypte, Bangladesh, Arabie Saoudite, France et Allemagne, Malaisie, Pays-Bas et Népal [35].

Ainsi, l'Inde continue d'être non seulement le plus grand producteur mais aussi le plus grand exportateur de fenugrec. En 2011-12, l'Inde a exporté 21800 T de fenugrec vers tous les principaux pays [35].

Les principaux marchés du fenugrec exporté par l'Inde sont le Japon, UAE, Égypte, Bangladesh et l'Afrique du Sud [35].

### **Conclusion**

Les PAM au Maroc deviennent une thématique très répandue dans plusieurs domaines, grâce à la diversité de ces espèces dans notre pays, les recherches scientifiques dans le secteur et l'intérêt des PAM dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire. Cependant, malgré les efforts, l'industrie est toujours confrontée à une série de restrictions, notamment celles liées à la valorisation et à la commercialisation.

Alors, comment peut-on extraire les composants actifs contenus dans une matière première alimentaire ?

---

# **CHAPITRE 2 :**

## **Méthodes d'extractions, séparations et analyses**

---



## **Introduction**

L'extraction est un procédé de séparation en génie chimique et en chimie de laboratoire qui consiste à extraire une espèce chimique, c'est-à-dire prélever une ou plusieurs espèces chimiques d'un mélange solide ou liquide [28].

L'extraction solide-liquide est une opération de transfert de matière entre une phase qui contient la matière à extraire «solide», et un solvant d'extraction «liquide». Le but de cette opération est d'extraire et de séparer un ou plusieurs composants mélangés à un solide dans un solvant. L'extraction est une étape nécessaire et présente dans de nombreux procédés de fabrication dans les différents domaines industriels relevant de la pharmacie, de la cosmétique, de la parfumerie et de l'agroalimentaire [25].

### **I. Méthodes d'extraction**

L'extraction est une opération qui consiste à récupérer une substance d'intérêt contenue dans une matière première alimentaire, soit parce qu'elle est recherchée (arôme végétal comme le saffron dans la cannelle), soit parce qu'elle est indésirable (alcaloïde comme la caféine dans le café) [27].

#### **1. Méthodes d'extraction traditionnelles**

On compte plusieurs méthodes d'extraction traditionnelles des plantes on peut trouver : l'infusion, la décoction, la macération.

##### **1.1. L'infusion**

Cette technique est notamment nécessaire si l'on utilise les parties fragiles, nobles de la plante (telles que les fleurs, sommités fleuries) [22].

Elle consiste à verser de l'eau chaude sur les fleurs, les feuilles ou les herbes (tiges) des plantes choisies. Ensuite il faut laisser reposer quelques minutes, par exemple : infusion du thé (Fig.3)[23].



**Figure 3 : infusion du thé**

### **1.2. La décoction**

Elle est utile lorsque l'on utilise les parties compactes, dures, ligneuses de la plante, qui cèdent difficilement leurs principes actifs (racines, rhizomes, écorces) [22].

La décoction consiste à faire bouillir pendant quinze minutes les tiges ou les racines de la plante, dans de l'eau afin de les ramollir et d'extraire les principes actifs [23].



**Figure 4 : exemple de décoction**

### **1.3. La macération**

Ce procédé est utilisé pour les composés très solubles à froid ou altérables à la chaleur. La substance dont on veut extraire le principe actif est mis en contact avec un solvant pendant un temps variable (plusieurs heures à plusieurs jours) suivant la nature de la drogue, à la température ambiante. Le solvant peut être différent suivant le but recherché (huile, alcool, eau...) [22].

On laisse tremper des fleurs, écorces ou racines de plantes dans de l'huile, de l'alcool ou de l'eau à température ambiante pendant plusieurs heures (Fig.5) [23].



**Figure 5 :** macération huileuse de Romarin

## 2. Méthodes d'extraction modernes

De nos jours, il existe aussi des méthodes d'extraction plus modernes, mais qui servent principalement à la création de médicaments phytothérapeutiques (gélules, sirop, cachet,..) et qui s'utilisent en partie dans les pays développés (Fig.6), parmi elles on compte: le CO<sub>2</sub> supercritique, la lixiviation, la distillation et l'extraction par solvant [22].



**Figure 6 :** exemple des médicaments phytothérapeutiques

## 2.1. Le CO<sub>2</sub> supercritique

L'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique est une méthode industrielle permettant d'extraire des principes actifs en utilisant CO<sub>2</sub> à une température et une pression qui lui permettent d'atteindre un état intermédiaire entre la phase liquide et la phase gazeuse [22].

La substance dont on veut extraire les principes actifs est placée dans un extracteur traversé par un flux de CO<sub>2</sub> qui lui se trouve à l'état supercritique (entre gaz et liquide). Le fluide 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 [22].

L'utilisation du CO<sub>2</sub> supercritique présente de nombreux avantages : le CO<sub>2</sub> est chimiquement inerte, naturel et non toxique, il remplace ainsi avantageusement de nombreux solvants soumis à des réglementations de plus en plus sévères, les extraits et raffinats obtenus n'ont pas des solvants résiduels, il a à la fois le pouvoir de pénétration d'un gaz et le pouvoir d'extraction d'un liquide, enfin le CO<sub>2</sub> ne laisse pas de trace résiduelle sur les matériaux traités.

Mais, il existe tout de même des inconvénients à cette technique. Le coût des équipements qu'elle nécessite est élevé ce qui constitue un frein au développement industriel de cette technologie [22].

L'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique est un procédé ultra-moderne, permettant d'obtenir des extraits d'une grande qualité (absence de solvant), et le caractère naturel (aucune altération des principes actifs de la plante) en font une technologie d'avant garde par rapport aux procédés traditionnels d'extraction (Fig.7) [22].

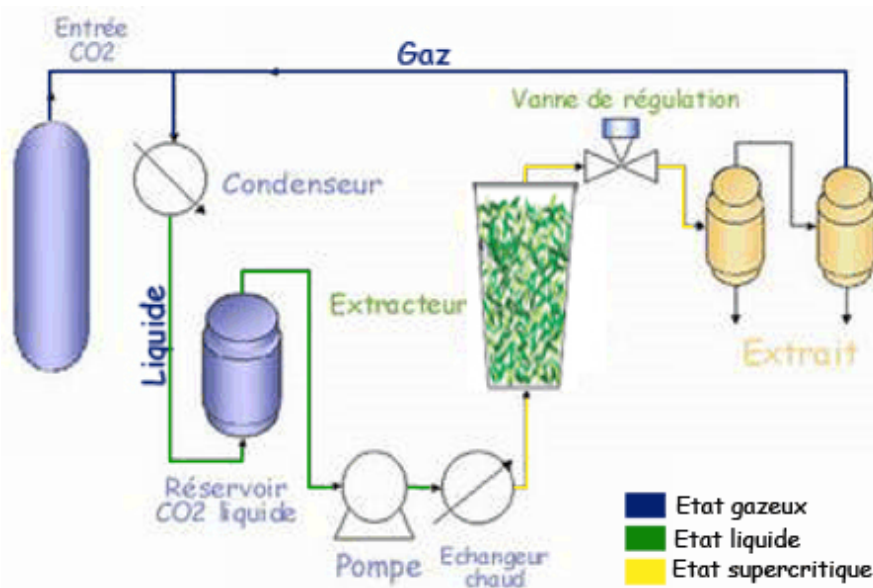


Figure 7 : schéma du principe de l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique

## 2.2. La lixiviation ou percolation

La substance dont on veut extraire le principe actif est pulvérisée, réduit en poudre, et placée dans un appareil appelé lixivateur. Elle est ensuite traversée lentement par un solvant (eau ou alcool en général). La macération dure environ un à quatre jours. La lixiviation proprement dite consiste à laisser s'écouler le solvant chargé en principes actifs selon une vitesse précisée par la pharmacopée selon les substances utilisées. On continue de laisser s'écouler le solvant à travers la poudre jusqu'à ce que l'extractif (solvant chargé en principes actifs) ne contienne que du solvant pur [22].

Cette méthode respecte la totalité des principes actifs mais dure assez longtemps et nécessite d'être minutieux sur la taille de la poudre utilisée, elle ne doit être ni trop grossière (temps d'extraction rallongé) ni trop fine (colmatage avec le coton) (Fig.9) [22].

Il existe aussi la lixiviation à chaud, effectuée avec un appareil de SOXHLET, qui permet de réduire le temps de contact nécessaire (Fig.8) [22].

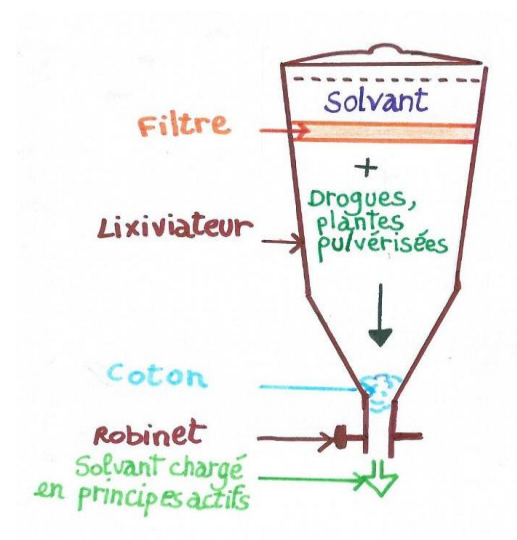


Figure 9 : schéma du principe de lixiviation à froid



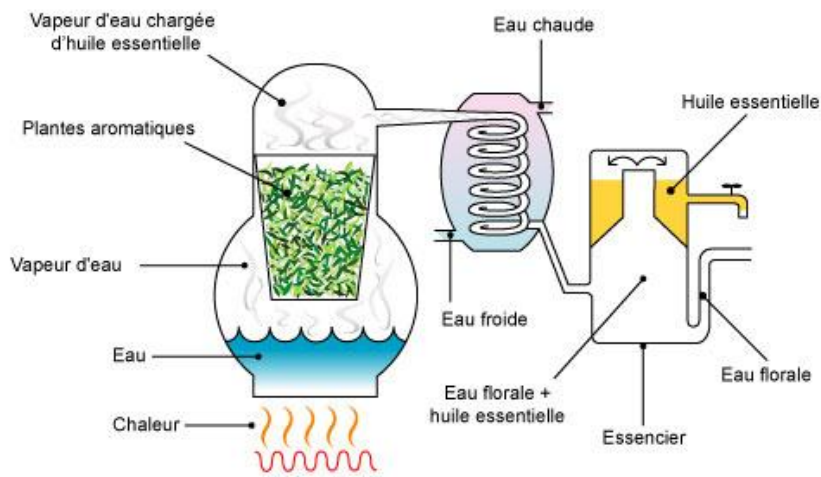
Figure 8 : l'appareil de SOXHLET

## 2.3. La distillation

Pour extraire les différents principes actifs volatils des plantes, on peut utiliser aussi la distillation à la vapeur. Cette dernière peut être employée pour des corps dont les températures d'ébullition sont basses, et qui s'altèrent facilement sous l'action de la chaleur [22].

La substance dont on veut extraire les principes actifs est placée dans un alambic. De la vapeur est injectée sous pression dans cet alambic ; qui lui est composé d'une chaudière, dans laquelle l'eau est chauffée et vaporisée ; d'un condenseur, dans lequel la vapeur se refroidit et se condense ; et d'un récepteur (réservoir) qui réceptionne les gouttes de liquide qui se forment sur les parois du condenseur. La chaleur dégagée vaporise l'eau qui quant à elle distille les plantes. A la fin de la condensation, dans le condensateur, la vapeur d'eau est devenue de l'eau et au-dessus surnage l'huile essentielle qui contient les principes actifs de la plante [22].

On peut dire que l'utilisation de produit phytothérapique et l'utilisation d'huiles essentielles sont liées ensemble. En effet, une partie des médicaments phytothérapiques contiennent aussi des huiles essentielles (Fig.10) [22].



**Figure 10:** schéma du principe de la distillation

#### 2.4. Extraction par solvant (S)

L'extraction par des solvants volatils consiste à dissoudre la matière odorante de la plante dans un solvant que l'on fait ensuite évaporer. Cette technique pratiquée dès le 18ème siècle avec de l'éther, produit coûteux et fortement inflammable, utilise de nos jours des solvants plus adaptés comme l'hexane ou l'éthanol. Cette méthode est utilisée pour les plantes dont les substances aromatiques risqueraient d'être dégradées par la distillation [26].

## II. Méthodes de séparation ou purification

En chimie, la purification est la séparation de substances chimiques dans le but de décontaminer des substances.

Il existe plusieurs moyens de purification :

- ✓ La chromatographie
- ✓ L'électrophorèse
- ✓ La filtration
- ✓ La centrifugation

## **1. La chromatographie**

### **1.1. Définition**

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour purifier, identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles, l'une dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation [16].

### **1.2. Types de chromatographie**

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées [16]:

- ✓ Selon le support de la phase stationnaire en :
  - Chromatographie sur colonne (HPLC, CPG, et les colonnes de silice).
  - Chromatographie sur surface (chromatographie sur couches minces ou CCM, Chromatographie sur papier).
- ✓ Selon la nature de la phase mobile en :
  - Chromatographie en phase gazeuse (CPG).
  - Chromatographie en phase liquide (CPL).
    - Chromatographie sur couche mince (CCM).
    - Chromatographie de partage centrifuge (CPC).
    - Chromatographie liquide haute pression (ou performance) (HPLC).

Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques dépend de la nature des composés à séparer et en fonction de celle-ci, le choix de l'adsorbant utilisé [16].



## 2. L'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique de séparation permettant de déplacer des ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective: Les anions migrent vers l'anode et les cations migrent vers la cathode. Pour les molécules non chargées, il n'existe pas de migration. Du fait de leurs caractéristiques propres et des conditions de l'électrophorèse, la vitesse de migration et la distance parcourue dans la matrice par ces ions diffèrent, ce qui permet leur séparation [16].

## 3. La filtration

La filtration est une méthode mécanique utilisée pour séparer un solide d'un liquide ou d'un gaz en faisant passer le mélange par une membrane ou un chiffon fin, par l'aide d'un entonnoir. La filtration est un procédé de séparation permettant de séparer les constituants d'un mélange qui possède une phase liquide et une phase solide au travers d'un milieu poreux. C'est une technique très utilisée que ce soit dans le domaine de l'agro-alimentaire ou de la pharmacie ou par de nombreuses espèces animales, principalement aquatique. L'utilisation d'un filtre permet de retenir les particules du mélange hétérogène qui sont plus grosses que les trous du filtre (porosité). Le liquide ayant subi la filtration se nomme filtrat, et ce que le filtre retient se nomme un résidu [16].

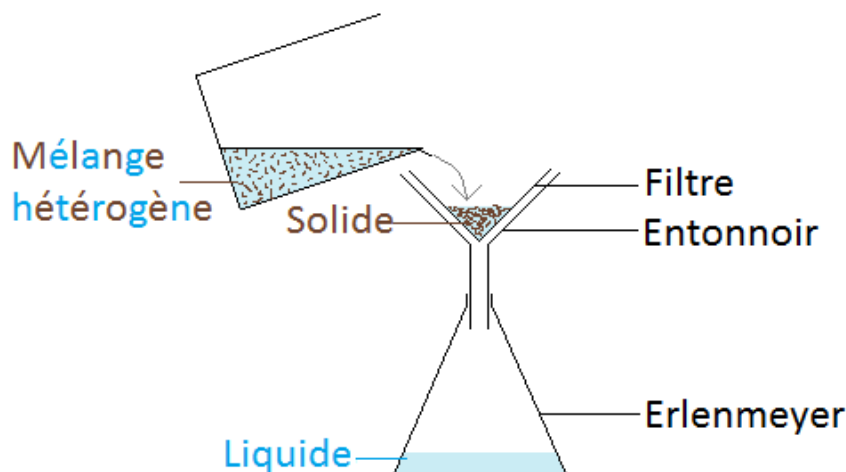


Figure 11 : schéma d'une filtration par gravité

## 4. La centrifugation

La centrifugation est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur densité sous l'action d'une force centrifuge. Elle permet de récupérer un



précipité (culot) et un surnageant. Le mélange à séparer peut être constitué de deux phases liquides ou de particules solides en suspension dans un liquide [16].



**Figure 12** : la centrifugation

## **Conclusion**

Les besoins de l'industrie de produit qui répond à des spécifications données, nécessite une extraction suivie d'une séparation préalable en différents constituants ou différentes fractions, pour cela il existe des méthodes d'extraction et de séparations, décrit comme un ensemble des procédés mécaniques et physique chimique permettent d'extraire et séparer les divers corps purs formant un mélange.

---

# **Chapitre 3 : Extraction et analyse de la 4- Hydroxyisoleucine**

---

## Introduction

La 4-Hydroxyisoleucine est un nouveau dérivé d'acide aminé à chaîne ramifiée dont la présence a été démontrée dans les graines de fenugrec et qui pourrait expliquer les effets antidiabétiques du fenugrec. La 4-OH-Ile n'est présent que dans les plantes et est particulièrement abondant dans les graines de fenugrec, où il représente environ 80 % du contenu total des acides aminés libres [29].

De nombreuses études animales et des essais préliminaires chez l'homme ont montré que l'extrait de graines de fenugrec la 4-Hydroxyisoleucine peut aider à maintenir des niveaux sains de sucre dans le sang et de cholestérol dans le sérum chez les personnes atteintes de diabète [30].

La 4-Hydroxyisoleucine est maintenant largement utilisée dans les industries nutraceutiques comme un composé insulinothérapeutique et anti diabétique [30].

### I. Description et propriétés de la 4-Hydroxyisoleucine

#### 1. Description général de molécule 4-Hydroxyisoleucine

**Tableau 1 :** Tableau descriptif de quelques caractéristiques de molécule 4-Hydroxyisoleucine.

<b>Description de molécule</b>	
<b>Formule chimique de molécule</b>	$C_6H_{13}NO_3$
<b>Synonymes</b>	4-HYDROXY-L-ISOLEUCINE. L-4-Hydroxyisoleucine. Acide (2S, 3R, 4S)-2-amino-4-hydroxy-3-methylpentanoïque.
<b>Densité</b>	1.2±0.1 g/cm <sup>3</sup>
<b>Poids moléculaire</b>	147.172
<b>Température d'ébullition</b>	331.6±32.0 °C à P=760 mm Hg
<b>Température de fusion</b>	223-224 °C

Structure 2D :

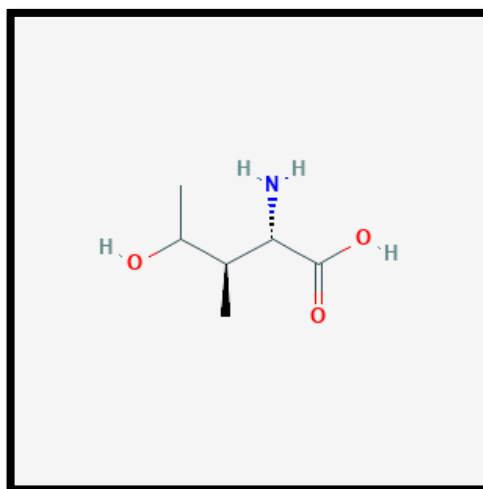


Figure 13 : structure 2D de la 4-Hydroxyisoleucine

## 2. Propriétés de la 4-Hydroxyisoleucine

La 4-hydroxyisoleucine est un acide aminé naturel non protéinogène qui a été isolé pour la première fois à partir des graines de *Trigonella foenum-graecum*. Il a été prouvé qu'elle présente une activité insulinothrompe dépendante du glucose par les cellules pancréatiques dans des modèles des diabètes de type 2. De plus, la 4-HIL n'induit pas d'effets secondaires tels que l'hypoglycémie, qui survient pendant le traitement du DT2 [12].

La 4-HIL est un traitement utile et bien toléré de la résistance à l'insuline, à la fois directement comme hypoglycémiant et également comme agent protecteur du foie [19].

La 4-HIL n'a pas interagi avec d'autres agonistes de la sécrétion d'insuline (leucine, arginine, tolbutamide, glycéraldéhyde) [20].

La 4-HIL a au moins 8 configurations stéréo, mais seul le (2S, 3R, 4S)-4-HIL présente une activité biologique [20].

La (2S, 3R, 4S)-HIL est signalée comme un composé bioactif responsable de l'activité antidiabétique des graines de fenugrec, cet acide aminé n'est pas présente dans les tissus des mammifères mais seulement dans les plantes, en particulier dans l'espèce *Trigonella* [13].

La 4-HIL active l'activité phosphoinositide 3 (PI3) kinase associée au substrat du récepteur de l'insuline. La 4-HIL réduit les taux plasmatiques de triglycérides, d'acide gras libres et de cholestérol [14].

## **II. Extraction et séparation de la 4-Hydroxyisoleucine par HPLC**

### **1. Généralité**

Selon les dernières recherches, la propriété hypoglycémique est liée aux acides aminés de la plante de fenugrec, en particulier la 4-Hydroxyisoleucine [17].

Une étude a été faite sur l'enzyme du fenugrec impliquée dans la biosynthèse de la 4-Hydroxyisoleucine, qui est un acide aminé inhabituel connu pour son effet stimulant sur l'insuline. La 4-Hydroxyisoleucine a été détectée par HPLC après incubation de l'isoleucine avec un extrait acellulaire de plantules de fenugrec [18].

Cela nous amène à un certain nombre d'étapes du processus :

### **2. Extraction et isolement des acides aminés**

Les graines de la plante moulues et réduites en poudre (800 g) ont été macérées à l'éther de pétrole (2 l, 24 h, 4 fois) et de l'éthanol 50% (1 l, 24 h, 4 fois), respectivement. Afin de déterminer les acides aminés libres dans chaque extrait, un test ponctuel a été effectué en utilisant papier de cellulose et de la ninhydrine comme réactif [36].

La présence d'acides aminés a été confirmée par des taches violettes sur le papier. Les résultats obtenus à partir du spot test ont montré la présence des acides aminés uniquement dans l'extrait d'éthanol. Afin de séparer les acides aminés de l'extrait d'éthanol, la méthode d'échange d'ions a été utilisée. Dans un premier temps, la colonne (2,5 × 40 cm) a été lavée avec l'eau distillée (0,5 L) et le HCl 2 N (1 L), respectivement pendant 3 jours. Après avoir acidifié la résine, de l'eau distillée a été évacuée de la colonne jusqu'à ce que le pH de l'éluât devient neutre. Ensuite, 100ml d'extrait éthanolique ont été soumis à la colonne d'échange cationique et élué avec de l'eau distillée (1 L) et de l'hydroxyde d'ammonium 1N (1 L), respectivement. Les fractions ont été recueillies (100 ml chacune) lorsque le pH de l'éluât est devenu alcalin. Un test ponctuel a été effectué sur chaque fraction et les fractions contenant des acides aminés ont été mélangées ensemble (fraction A) [36].

### **3. Identification et détermination quantitative de la 4-Hydroxyisoleucine**

Afin d'identifier et de déterminer quantitativement de la 4-hydroxyisoleucine dans la fraction A, la fraction (hydroxyde d'ammonium extrait) a été concentrée sous pression réduite [36].

Les acides aminés dans l'extrait séché ont été analysés en utilisant la dérivation OPA et la technique HPLC.

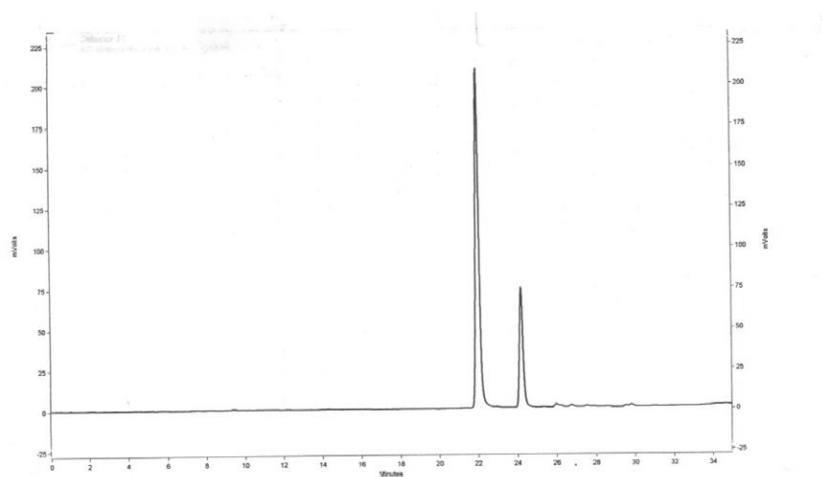
Dans un premier temps, différentes concentrations de la 4-hydroxyisoleucine dans de l'eau distillée ont été préparées et 2 $\mu$ L de chaque solution ont été dérivée avec de l'OPA et ensuite 10 $\mu$ l de la solution finale injectée dans l'instrument HPLC (temps= 55 min, débit= 0.8 ml/min). Après l'injection des solutions standards, 2  $\mu$ l de solution d'échantillon (5 mg/ml) a été dérivée avec OPA et injecté à HPLC de la même manière que les solutions standards. Trois répétitions de chaque échantillon ont été injectées. La 4-hydroxyisoleucine dans l'échantillon a été identifié en comparant le temps de rétention avec celui de l'étalon de référence et déterminée quantitativement par courbe d'étalonnage de la 4-hydroxyisoleucine [36].

#### 4. Résultats

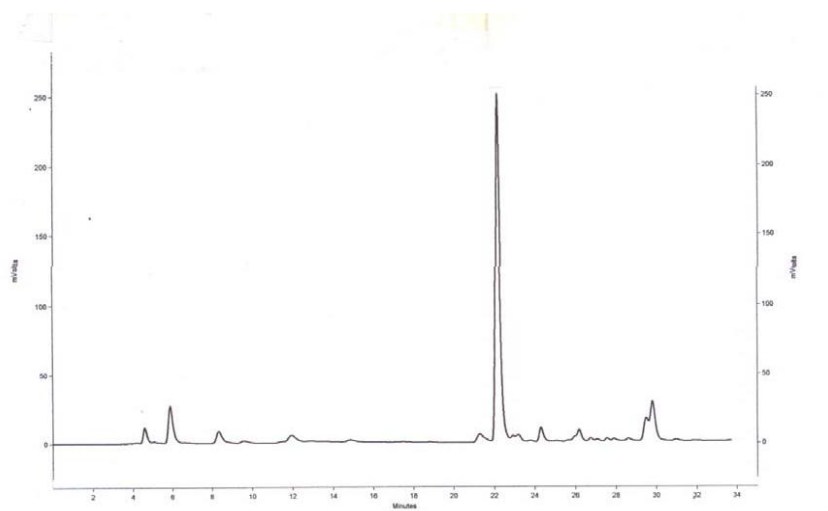
Les chromatogrammes de la 4-hydroxyisoleucine et de l'extrait de fenugrec sont présentés dans les figures 14 et 15. Comme il est observé dans la figure 14, il y a deux pics dans le chromatogramme standard à des temps de rétention de 22,0 et 24,2 minutes qui sont liés aux isomères majeurs et mineurs de la 4-hydroxyisoleucine, respectivement [36].

Ces deux pics sont également observés dans le chromatogramme de l'échantillon. Dans différentes concentrations des solutions standards [36].

Le pourcentage de deux isomères dans les solutions standards et dans les solutions étalons et les solutions d'échantillon est indiqué dans le tableau 2.



**Figure 14** : chromatogramme HPLC de la 4-hydroxyisoleucine



**Figure 15 :** chromatogramme HPLC de l'extrait de graines de fenugrec

**Tableau 2 :** Pourcentage d'isomères majeurs et mineurs dans les solutions standard et les solutions d'échantillon.

<b>Concentration standard (mg/ml)</b>	<b>Isomère majeur (%)</b>	<b>Isomère mineur (%)</b>
0.07	81.8	18.2
0.10	82.3	17.7
0.20	74.0	26.0
0.33	66.0	34.0
0.50	70.6	29.4
1.00	64.1	35.9
1.50	62.0	38.0
<b>Echantillon</b>	96.0	4

## 5. Discussion

Les résultats obtenus à partir du chromatogramme HPLC des solutions standard montrent que le pourcentage des isomères majeurs et mineurs de la 4-hydroxyisoleucine est différent dans chaque solution. Comme il est observé dans le tableau 2, dans les solutions standards, les deux isomères de la 4-hydroxyisoleucine sont convertis l'un en l'autre plus que dans la solution échantillon. Cela peut être dû à la présence d'autres composés dans l'extrait végétal qui

empêchent le changement de l'isomère principal en isomère secondaire. Par conséquent, dans la détermination quantitative de la 4-hydroxyisoleucine par la technique HPLC, il n'est pas possible de doser l'isomère majeur seul [36].

Le chromatogramme de l'échantillon montre qu'environ 61% des acides aminés acides présents dans les graines de fenugrec sont de la 4-hydroxyisoleucine. D'autre part, la 4-hydroxyisoleucine est le principal acide aminé acide dans les graines de la plante. De plus, les résultats obtenus par la détermination quantitative de la 4-hydroxyisoleucine ont montré la présence de 0,4% de cet acide aminé dans les graines séchées [36].

## **Conclusion**

Selon les effets de la 4-hydroxyisoleucine tels que les propriétés antihyperglycémiques et antihyperlipidémiques, le fenugrec peut être considéré comme un remède à base de plantes dans le traitement de soutien de ces troubles. Cependant, pour obtenir les effets thérapeutiques de la graine de la plante, une grande quantité des graines est généralement nécessaire, ce qui peut entraîner des difficultés telles que des troubles gastro-intestinaux. Par conséquent, il est préférable de dégraisser et de désamériser les graines et d'utiliser un extrait contenant des acides aminés, en particulier la 4-hydroxyisoleucine.



## Conclusion générale

L'objectif de ce travail visait la mise au point d'une revue bibliographique sur l'extraction de la 4-hydroxyisoleucine à partir de la plante *Trigonella foenum-graecum*.

Nous avons effectué une recherche bibliographique qui porte sur quelques axes principaux :

Le secteur des PAM au Maroc s'agit d'une industrie vaste et diversifiée. Le nombre d'espèces végétales qu'il peut couvrir et ses destinations de production sont très larges. Par rapport aux autres grandes productions agricoles, le poids économique de la filière PAM est relativement faible. C'est donc un département particulièrement sensible à l'imprévisibilité des débuts internationaux.

Parmi les PAM on trouve le fenugrec (*trigonelle foenum-graecum*), qui est connue par ses propriétés médicinales, thérapeutiques et nutritionnelles très importantes vu les utilisations traditionnelles et les activités pharmacologiques des composés phytochimiques présents dans les extraits des graines de cette plante.

Et pour extraire les substances actives et importantes à partir des plantes aromatiques et médicinales en générale, et la 4-hydroxyisoleucine à partir des graines de fenugrec en particulier, il est nécessaire de suivre un ensemble d'opérations d'extractions, de séparations et d'analyses qui évoluent avec les années afin de satisfaire les besoins du marché national et international.

La 4-hydroxyisoleucine est un acide aminé naturel non protéinogène isolé à partir du fenugrec, après macération avec l'éthanol et puis l'identification et la détermination quantitative de la 4-hydroxyisoleucine en utilisant la technique HPLC, les résultats obtenus ont montré la présence de 0,4% de cet acide aminé dans les graines séchées, et la majorité des acides aminés présent dans le fenugrec sont sous forme de la 4-hydroxyisoleucine.

## Bibliographie & Webographie

[1] **Jean-Christophe Tardivon ., Chadouli Si-Mohamed. (2012)** : Les plantes aromatiques et médicinales : Un exemple de développement humain au Maroc la coopérative féminine de Ben Karrich – Tétouan. 5p.

[2] **Aafi A., Ghanmi M., Satrani B., Aberchane M., Ismaili My.R., EL Abid A** : Diversité et valorisation des principales plantes aromatiques et médicinales (PAM) de l'écosystème cédraie au Maroc.

[3] **Mission USAID/Maroc. (2008)** : STRATEGIE NATIONALE DE DEVELOPPEMENT DU SECTEUR DES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES : AGRICULTURE & AGROBUSINESS INTEGRES.

[4] **Vinod D., Rangari MPharm., Prachi Shukla MPharm., Sachin L., Badole. (2015)** : Glucose Intake and Utilization in pre-Diabetes and Diabetes : Chapter 15 - 4-Hydroxyisoleucine: A Potential Antidiabetic Agent from *Trigonella foenum-graecum*. 191-198p.

[5] **Site web** : [www.mr-ginseng.com/fenugrec/](http://www.mr-ginseng.com/fenugrec/). (Dernière consultation le 03/07/2021).

[6] **Site web** : [WWW.LABORATOIRE-LESCUYER.COM](http://WWW.LABORATOIRE-LESCUYER.COM). (Dernière consultation le 03/07/2021).

[7] **Site web** : [www.guide-phytosante.org/minceur-nutrition/fenugrec/](http://www.guide-phytosante.org/minceur-nutrition/fenugrec/). (Dernière consultation le 03/07/2021).

[8] **Sophie Helouard. (Mis à jour 2021)** : Fenugrec : bienfaits, huile, pour grossir, danger. Le journal des femmes, santé.

[9] **Site web**: [www.naturaforce.com/bienfaits-fenugrec/](http://www.naturaforce.com/bienfaits-fenugrec/). (Dernière consultation le 03/07/2021).

[10] **Site web** : [www.nutripure.fr/fr/blog/bienfaits-fenugrec-n33](http://www.nutripure.fr/fr/blog/bienfaits-fenugrec-n33). (Dernière consultation le 03/07/2021).

[11] **Site web**: [www.borderwastewise.org/fenugrec/](http://www.borderwastewise.org/fenugrec/). (Dernière consultation le 03/07/2021).

[12] **Chenglin Zhang., Jie Ma., Zhixiang Li., Yunlong Liang., Qingyang Xu., Xixian Xie., Ning Chen.(2017)** : A strategy for L-isoleucine dioxygenase screening and 4-hydroxyisoleucine production by resting cells. *Journal Bioengineered*; volume 9(1): 72–79p.

[13] Syeda Rana Nikhat., Prof A.Ravinder Nath., V.Rajesh Babu. (2017): EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF 4- HYDROXYISOLEUCINE FROM TRIGONELLA FOENUM GRAECUM SEEDS, Indo Am. J. P. Sci; 4(06). 1711-1716 p.

[14] Jun Ogawa., Tomohiro Kodera, Sergey V Smirnov, Makoto Hibi, Natalia N Samsonova, Ryoukichi Koyama, Hiroyuki Yamanaka, Junichi Mano, Takashi Kawashima, Kenzo Yokozeki, Sakayu Shimizu. (2010): Applied microbiology and biotechnology: A novel L-isoleucine metabolism in *Bacillus thuringiensis* generating (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine, a potential insulinotropic and anti-obesity amino acid. Volume 89(6), 1929-1938.

[15] Site web: [www.imaherb.com](http://www.imaherb.com). (Dernière consultation le 03/07/2021).

[16] Site web: [www.fsnv.univ-setif.dz](http://www.fsnv.univ-setif.dz). (Dernière consultation le 03/07/2021).

[17] H. Haji mehdi poor., S. Sadat-Ebrahimi., Y. Amanzadeh., M. Izaddoost., E. Givi. (2010) : Journal of Medicinal Plants : Identification and quantitative determination of 4-hydroxyisoleucine in *Trigonella foenum-graecum L.* from Iran. Volume 9, Supplement No. 6, Winter 2010.

[18] Catherine Haefelé., Claude Bonfils., Yves Sauvaire. (1997): Phytochemistry : Characterization of a dioxygenase from *Trigonella foenum-graecum* involved in 4-hydroxyisoleucine biosynthesis. Volume 44, Issue 4, Pages 563-566.

[19] Mohammad Reza Haeri., Mohammad Izaddoost, Mohammad Reza Shams Ardekani, Mohammad Rahbani Nobar, Kenneth N White. (2008): The effect of fenugreek 4-hydroxyisoleucine on liver function biomarkers and glucose in diabetic and fructose-fed rats.

[20] Y Sauvaire., P Petit, C Broca, M Manteghetti, Y Baissac, J Fernandez-Alvarez, R Gross, M Roye, A Leconte, R Gomis, G Ribes. (1998): 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion.

[21] K. Dev., R. Maurya. (2017): Discovery and Development of Antidiabetic Agents from Natural Products: Glucose Transporter 4 Translocation Activators From Nature. 490 p.

[22] Site web: [www.e-monsite.com/phytotherapieptpe](http://www.e-monsite.com/phytotherapieptpe). (Dernière consultation le 03/07/2021).

[23] Site web: [www.actusantefenua.com](http://www.actusantefenua.com). (Dernière consultation le 03/07/2021)

[24] Dr Jesus Cardenas. (2017) : FENUGREC. La rédaction de [www.Doctissimo.fr](http://www.Doctissimo.fr).

[25] thèse de **HERZI Nejia. (2013)** : Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique et des techniques conventionnelles.

[26] **Site web**: [www.zayataroma.com/fr](http://www.zayataroma.com/fr). (Dernière consultation le 03/07/2021).

[27] **Clarisse MARIET., Laurent VIO, Christine DALMAZZONE, Marie MARSIGLIA, Axel VANSTEENE, Emmanuel MIGNARD. (2019)** : Laboratoires sur puce dédiés à la chimie – Conception : Ressources documentaires.

[28]**Site web**: <https://fr.wikipedia.org/wiki/>. (Dernière consultation le 03/07/2021).

[29]**Scott Fuller., Jacqueline M Stephen. (2015)**: Advances in Nutrition: Diosgenin, 4-Hydroxyisoleucine, and Fiber from Fenugreek: Mechanisms of Actions and Potential Effects on Metabolic Syndrome. Volume 6, Issue 2, Pages 189–197.

[30]**Tinggal kanebuah Komentor.(2010)** : Fenugreek, Fenugreek Extract(4-Hydroxyisoleucine): Fenugreek Natural Fibers.

[31] **Sophia Maazouz. (2016)** : LA FILIÈRE DES PLANTES AROMATIQUES ET MÉDICINALES AU MAROC. Journal AgriMaroc.

[32] **Agri Maroc.ma. (2016)** : LE MAROC DANS LE TOP 10 DES PRODUCTEURS DE PLANTES AROMATIQUES ET MÉDICINALES.

[33] **NEFFATI M. et SGHAIER M. (2014)** : DEVELOPPEMENT ET VALORISATION DES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES (PAM) AU NIVEAU DES ZONES DESERTIQUES de la région MENA (Algérie, Egypte, Jordanie, Maroc et Tunisie).

[34]**K.Srinivasan.(2007)**: Food Reviews International : Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A Review of Health Beneficial Physiological Effects.203-224p. Volume 22, 2006 - Issue 2.

[35] **Site web**: [www.citeseerx.ist.psu.edu/](http://www.citeseerx.ist.psu.edu/). (Dernière consultation le 03/07/2021).

[36] **H. Haji mehdi poor., S. Sadat-Ebrahimi., Y. Amanzadeh., M. Izaddoost., E. Givi. (2010)** : Journal of Medicinal Plants : Identification and quantitative determination of 4-hydroxyisoleucine in *Trigonella foenum-graecum L.* from Iran. Volume 9, Supplement No. 6, Winter 2010.