

Université Constantine 1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Département de Biochimie

Licence Biochimie

Support du cours

GENIE BIOCHIMIQUE,

VALORISATION DES SUBSTANCES D'ORIGINE VEGETALE.

Prof MERGHEM R

Chapitre 2. LES COMPOSÉS PHENOLIQUES

Acides phénols, Polyphénols, Flavonoïdes, anthocyanidines, tanins.

Introduction et généralités

1- Formation du noyau aromatique (Cyclogenèse)

1-1. Voies de l'acide shikimique « Shikimic Acid Pathway ».

1-2. Voie de l'acide malonique « Malonyl Pathway »

2- Principaux composés phénoliques

2-1. Les Composés C_6C_1 et C_6-C_2

2-2. Les composés en C_6-C_3 : Phénylpropanoïdes

2-3. Les composés mixtes $C_6-(C_1 \text{ ou } C_2)-C_6$ et les $C_6C_3C_6$

3- Les tanins

4 - Méthodes d'études des Composés phénoliques.

Introduction et généralités:

Parmi les composés aromatiques, les plus importants, citons d'abord les lignanes $(C_6-C_3)_2$ et les lignines $(C_6-C_3)_n$ - composants du bois mais aussi de nombreuses essences, les flavonoïdes $(C_6-C_3-C_6)$, les anthocyanes, et les tannins condensés $(C_6-C_3-C_6)_n$. La plupart possèdent des hydroxyles sur leurs noyaux; ils constituent ce que l'on appelle les composés phénoliques des plantes.

Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques:

Nombre de C	Classe	Exemples/origine
C_6	Phénols simples	Hydroquinine, catéchol
C_6-C_1	Acides phénols	Acide salicylique, acide p (OH) benzoïque
C_6-C_3	Acide cinnamique Coumarines	Acide caféïque, férulique (Café, pomme) Esculétine, Scopolétine
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	Pinorésinol (Pin)
$(C_6-C_3)_n$	Lignines	Bois, noyau des fruits.
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes Isoflavonoïdes Anthocyanes	Apigénine, lutéoline, quercétine. Génistéine (Soja) Pélagonidine
$(C_6-C_3-C_6)_2$	biflavonoïdes	Amentoflavone
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Proanthocyane (tanins)	Procyanidines, Prodelphinidines (Raisin rouge)

La biosynthèse du noyau aromatique est un des processus fondamentaux de la biochimie végétale. La biogenèse du noyau aromatique est apparue au cours de l'évolution de la plante puisque la protéogenèse fait appel à trois acides aminés aromatiques.

Nous allons parcourir les différentes étapes de biogenèse du noyau aromatique, appelée également cyclogenèse ou voie de l'acide shikimique.

Il existe une seconde voie de biosynthèse, plus fréquente chez les bactéries, champignons et plantes inférieures, qui consiste à réaliser un ensemble de noyaux aromatiques par cyclisation des chaînes polycétoniques, elles mêmes obtenues par condensation de groupements acétates.

Chez les végétaux supérieurs, cette voie des poly-acétates concerne un certain nombre d'entre eux. En revanche cette seconde voie intervient pour réaliser un second noyau benzénique chez les végétaux supérieurs pour de nombreux composés possédant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie de l'acide shikimique. C'est le cas des composés mixtes dont les représentants les plus importants sont les flavonoïdes.

1/ Formation du noyau aromatique (Cyclogenèse)

Le principal mode de fonction du noyau aromatique emprunte l'acide shikimique (acide en C₆-C₁) lequel donne naissance à l'acide phénylpyruvique puis à l'acide cinnamique (C₆-C₃).

1.1/ Voies de l'acide shikimique (Shikimic Acid Pathway).

a) Synthèse des acides aminés aromatiques:

Cette voie débute par la condensation de l'acide phospho-énol-pyruvique (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate, réaction comparable à celle de la phosphodihydroxy-acétone (DHAP) avec l'érythrose phosphate, lors de la photosynthèse (Cycle de Calvin).

Les réactions suivantes conduisent à la formation, en 5 étapes de l'acide shikimique, puis après condensation avec une nouvelle molécule de PEP, de l'acide préphénique (4 étapes), qui par décarboxylation et déshydratation, est à l'origine de l'acide phénylpyruvique.

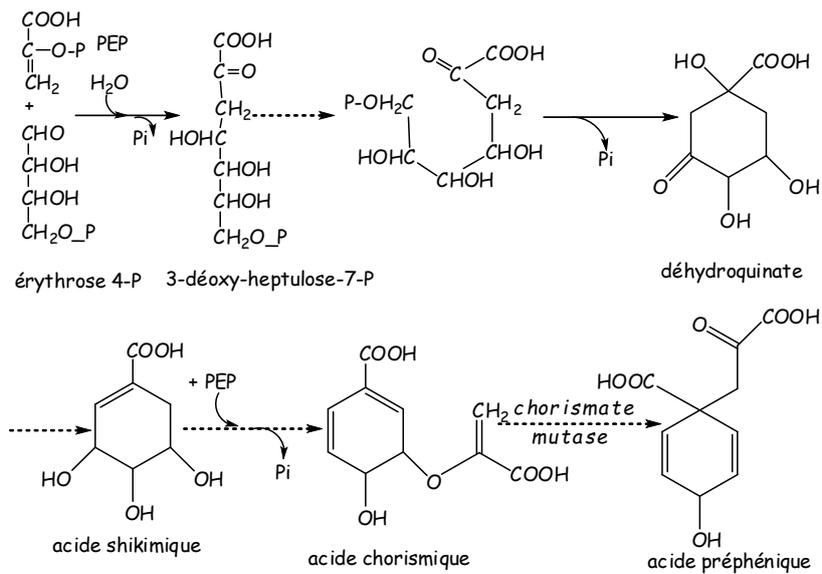


Figure 1 : synthèse de préphénate via l'acide shikimique.

L'acide préphénique par décarboxylation et déshydratation, est à l'origine de l'acide phénylpyruvique. Ainsi, il ne se forme pas uniquement un noyau aromatique, celui-ci s'accompagnant d'une chaîne latérale en C3. Le mode de formation de la tyrosine et de la phénylalanine à partir du préphénate varie en fonction des espèces et des groupes de végétaux et fait appel à la transamination.

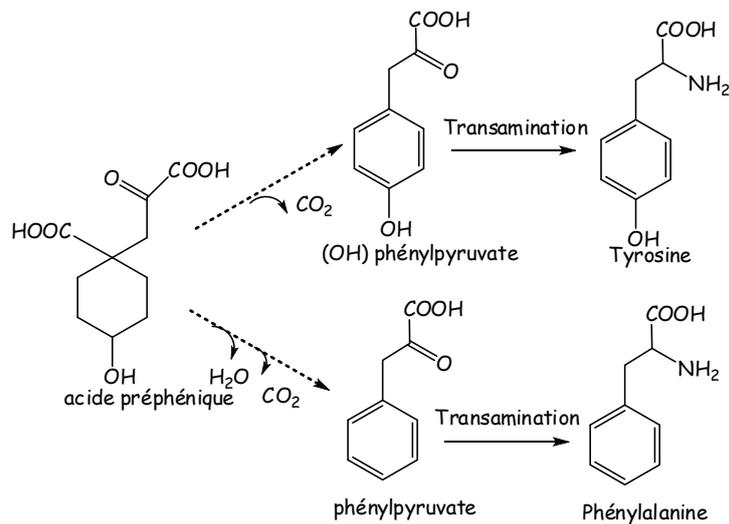


Figure 2 : Synthèse de la tyrosine et de la phénylalanine.

b) Synthèse des métabolites secondaires:

- Acide cinnamique et acide coumarique

La désamination, par une **Ammonia-lyase**, de la phénylalanine produit de l'acide cinnamique à l'origine de la majorité des composés aromatiques. Une variante permet l'obtention de la tyrosine (acide aminé différent de la phénylalanine par un OH phénolique) dont la désamination conduit à l'acide hydroxy cinnamique ou acide coumarique.

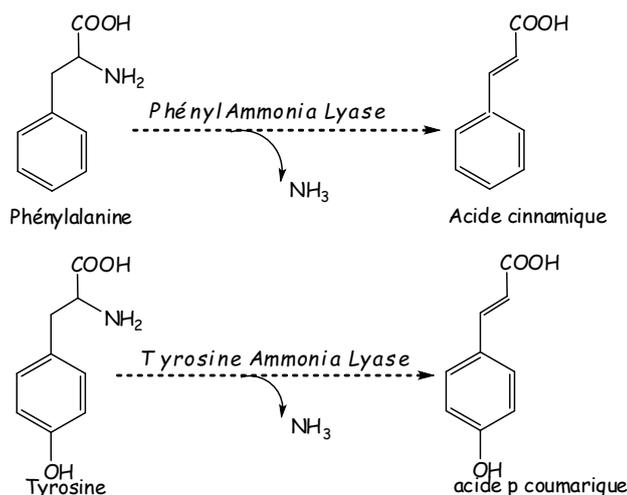


Figure 3 : synthèse de l'acide cinnamique et coumarique.

La phénylalanine ammonia-lyase (**PAL**), présent chez les plantes supérieures et les champignons, est absente des cellules animales. C'est l'enzyme clé du métabolisme des composés phénoliques, et à son niveau se jouent les facteurs de régulation de leur biosynthèse.

Le "phytochrome", pigment récepteur de la lumière intervenant dans nombreux mécanismes de l'adaptation écologique (photopériodisme) active la synthèse de la PAL.

La cyclogénèse se produit, soit au niveau des parties vertes de la plante, l'érythrose et le PEP provenant directement de la photosynthèse (ex : flavone, anthocyanes), soit dans les tissus profonds non chlorophylliens, le PEP provenant alors de la glycolyse et l'érythrose provenant du cycle des pentoses (lignines par exemple). La cyclogénèse a lieu au niveau du réticulum endoplasmique. Un complexe multi-enzyme intervient.

1.2. Voie de l'acide malonique « Malonyl Pathway »

Ce mode de formation plus secondaire consiste en la cyclisation des chaînes polycétoniques, elles mêmes obtenues par condensation de groupements acétates. La condensation des groupements acétates ne se fait qu'après carboxylation de l'acétyl CoA en malonyl-CoA.

Ce mode de formation est celui qui prédomine chez les plantes non vertes, synthèse de l'acide pénicillique par les *Penicillium*, synthèse des anthoquinines chez les Lichens et les Champignons.

Chez les flavonoïdes, les anthocyanes, le cycle benzénique latéral (A) provient de l'enchaînement de 3 acétyl-CoA.

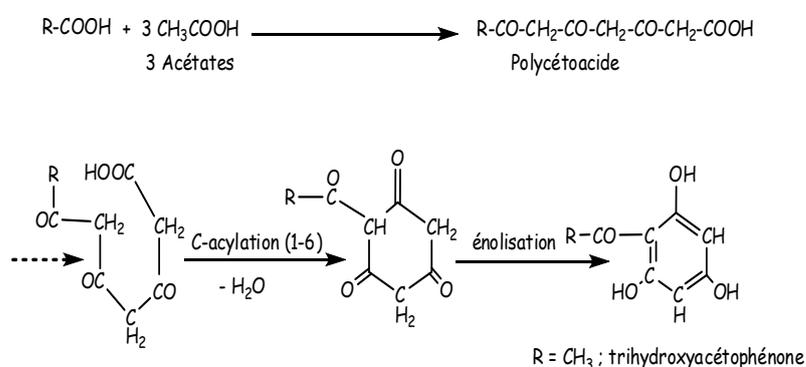


Figure 4 : synthèse des polycéto-acides

2/ Principaux composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être classés en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique. On distinguera:

- Les dérivés en C₆C₁,
- Les dérivés en C₆C₃ ou Phenylpropanoïdes,
- Les composés en C₆-C₃-C₆ sont les plus importants.

Les tannins, composés provenant de la polymérisation de ces dérivés aromatiques feront l'objet de partie séparée.

2.1/ Composés C₆C₁ et C₆-C₂

Chez les plantes supérieures, les composés dérivent directement de l'acide shikimique. La plupart proviennent de l'acide cinnamique dont la chaîne latérale perd 2 carbones (composés en C₆-C₁). Ils résultent du raccourcissement de la

chaîne latérale de composés en C₆C₃ par un mécanisme vraisemblablement proche de celui qui intervient dans la β oxydation des acides gras.

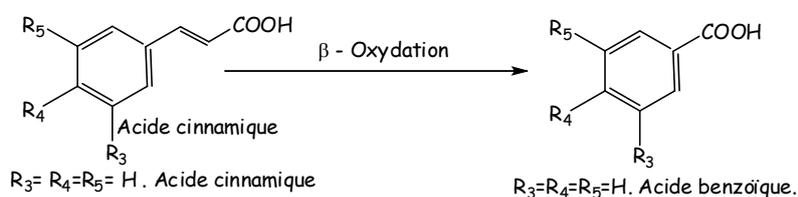


Figure 5 : acide cinnamique et acide benzoïque

Le tableau suivant précise la filiation de certains d'entre eux.

Tableau 2 : Filiation des composés provenant de l'acide cinnamique.

R ₃	R ₄	R ₅	C ₆ -C ₃	C ₆ -C ₁
H	H	H	acide cinnamique	acide benzoïque
H	OH	H	acide p. coumarique	ac.p.(OH)benzoïque
OH	OH	H	acide caféique	ac. protocatéchique
OCH ₃	OH	H	acide férulique	acide vanillique
OCH ₃	OH	OCH ₃	acide sinapique	acide syringique
OH	OH	OH	tri(OH) cinnamique	acide gallique

Les composés provenant de l'acide cinnamique, par raccourcissement de la chaîne latérale conduisent aux composés benzoïques et leurs dérivés respectifs.

La réduction du carboxyle conduit aux aldéhydes et aux alcools. Ces composés sont largement répandus sous forme d'esters (cinnamate de benzyle) ou glucosides (salicoside).

L'acide gallique est à l'origine des tannins hydrolysables. La vanilline intervient dans l'arôme de la vanille. L'aldéhyde anisique (anéthole) donne l'odeur de l'essence d'Anis *Pimpinella anisum* L. Fam. Ombellifères.

L'acide salicylique chez la reine-des-prés *Filipendula ulmaria* (Rosacées), et le saule blanc *Salix alba* (Salicacées) dérive soit par de l'hydroxylation de l'acide benzoïque soit de l'hydrolyse du salicoside suivie d'une oxydation du groupe alcool.

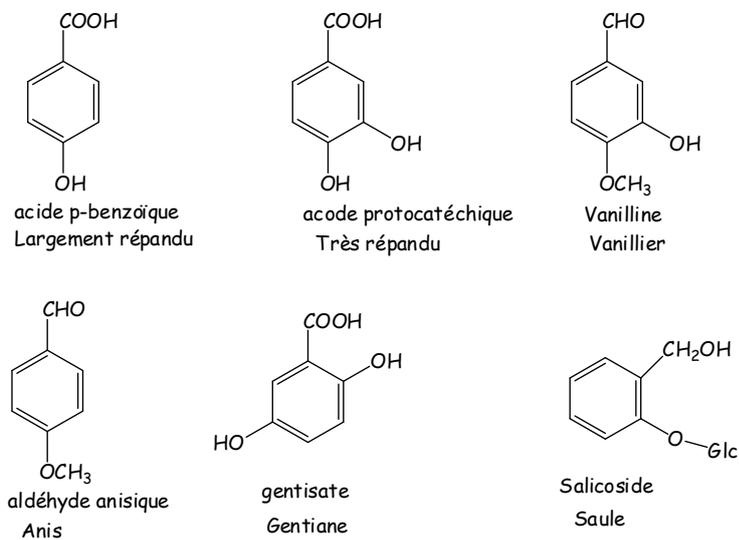


Figure 6 : exemples de composés C6-C1.

2.2/ Les composés en C₆-C₃: Phénylpropanoïdes:

Nous distinguerons:

- les dérivés directs qui sont en général des constituants des essences végétales
- les dérivés par estérification ou par cyclisation (coumarines)
- les dimères (lignanes) obtenus par dimérisation
- et enfin les lignines résultent de la polymérisation de certains phénylpropanoïdes et constituent les macromolécules de la paroi végétale.

a) Dérivés Directs

Un grand nombre de ces composés se rencontrent dans les essences, secrétées par de nombreuses espèces végétales et constituées essentiellement de terpènes et de phénylpropanoïdes.

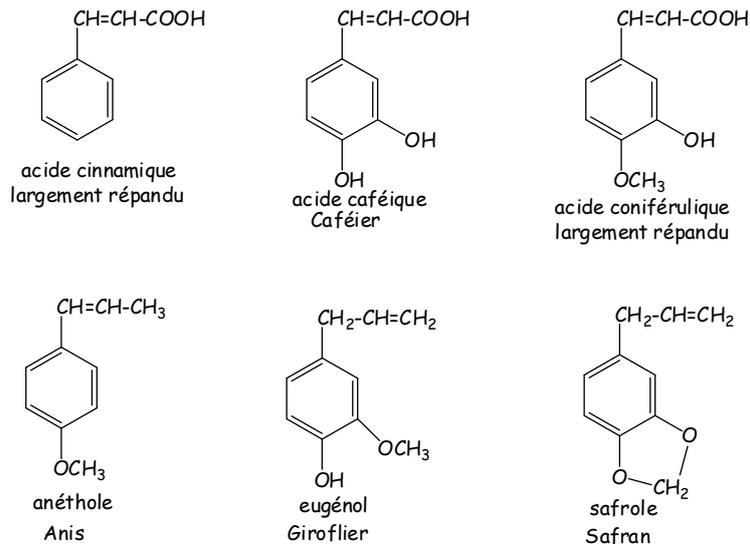


Figure 7 : Les C₆C₃ dérivés de l'acide cinnamique.

Ces composés se distinguent entre eux par :

- Le nombre et la disposition des groupements OH et OCH₃
- La position qui prend la double liaison de la chaîne latérale, allylique ou propénylique.
- Le degré d'oxydation de la chaîne aliphatique (carbure, alcool, aldéhyde, cétone, acide).

Le rôle des essences ou de ces produits est mal connu. Un climat sec et ensoleillé (régions chaudes, Sahara) favorise leur formation et leur localisation est souvent très externe (sous la cuticule des poils chez les labiées).

Par leur odeur, elles interviennent dans la pollinisation pour attirer les abeilles; inversement la teneur élevée en essences a un effet répulsif vis à vis de certains herbivores. Leur propriété antiseptique se révèle utile contre les parasites et elles peuvent avoir un rôle télétoxique sur les germinations. Ils participent, chez de nombreuses graines, aux mécanismes d'inhibition tégumentaires au moment de la germination, l'oxydation des phénols capte une partie de l'oxygène nécessaire à la reprise de l'activité respiratoire de l'embryon, ce qui retarde la sortie de la plantule. Plusieurs mono et O-diphénols (acide caféique, autres phénols) peuvent être oxydés en quinones. Cette oxydation se produit lors des blessures, elle est responsable du brunissement observé lorsqu'on sectionne une pomme ou une pomme de terre.

b) Les esters:

Les esters de l'acide cinnamique sont largement répandus chez les végétaux. L'acide chlorogénique, dont les propriétés se rapprochent des tannins, est présent

dans l'ensemble du règne végétal. L'acide rosmarinique ou "tannin des labiées", est présent chez le romarin *Rosmarinus*.

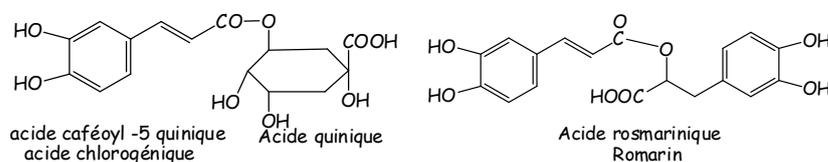


Figure 8 : acide chlorogénique et acide rosmarinique

c) Coumarines:

La première coumarine a été isolée de la fève tonka (*Coumarina odorata*). La cyclisation de l'acide hydroxy-cinnamique conduit à la formation des coumarines.

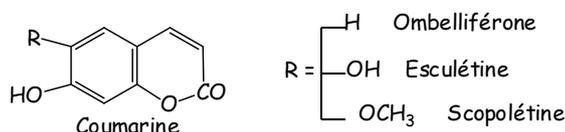


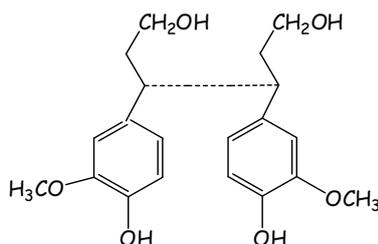
Figure 9 : Les coumarines

Les coumarines sont très répandues surtout chez les dicotylédones, notamment dans les racines et dans les écorces

Rôle des coumarines : Elles exercent une activité physiologique important: elles inhibent la germination des graines et l'élongation cellulaire. Elles peuvent stimuler l'acide indole acétique oxydase, enzyme ayant un rôle dans la dégradation de l'auxine.

d) Lignanes:

On obtient, par dimérisation des phénylpropanoïdes, des composés formés de 2 unités C₆-C₃ réunis par une liaison Carbone-Carbone ou lignanes. Citons par exemple les acides truxilliques (ou di-cinnamiques) des feuilles du Coca provenant également de la dimérisation de phénylpropanoïdes par perte de 2H ou de 2H₂O.



Exemples d'assemblage des molécules dans les lignanes

Figure 10 : une lignane

2.3 Les composés mixtes C₆-(C₁ ou C₂)-C₆ et le C₆C₃C₆

Rappels:

Les systèmes aromatiques sont formés par 3 différentes voies chez les plantes supérieures.

- **Voie shikimate:** la voie biosynthétique la plus importante, elle permet de: Fournir des acides aminés aromatiques: tryptophane, phénylalanine, tyrosine.
 - Fournir des acides cinnamiques (dérivés de la phénylalanine, tyrosine.) plaque tournante pour la biosynthèse des phénylpropanes.
 - Formation des phénols: C₆-C₁ (phénol carboxylique).
 - Formation des Benzoquinones: à l'origine de plusieurs biosynthèses compliquées (Ubiquinone, Plastoquinone).
- **Voie Malonate:** similarités avec la synthèse des acides gras. L'acétyl CoA est l'initiateur de la biosynthèse des polycéto-acides. Cette voie est utilisée pour la synthèse de noyau aromatique A des flavonoïdes.
- **Voie du Mévalonate:** cette voie sera étudiée dans le chapitre sur les terpènes.

Biosynthèse :

A l'acide cinnamique (ou ses dérivés hydroxylés) véritable "plaque tournante" de la synthèse des composés aromatiques, peuvent s'adjoindre 1, 2, ou 3 groupements acétates, (fournis à l'état de malonyl CoA) formant ainsi une chaîne polycétonique qui, très généralement, se cyclise pour donner naissance à toute une série de composés dont les principaux sont:

- Les stilbenes: possèdent des propriétés *antifongiques*. Certains se comportent comme des *phytoalexines*. L'acide *Lunarique* est un dihydrostilbène, largement répandu, joue, chez les Hépatiques (plantes vivantes dans les régions chaudes et humides), le rôle d'inhibiteur de croissance. Le resvératrol de la vigne qui apparaît lors d'une attaque fongique.
- Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux, on les trouve dans les vacuoles à l'état d'hétérosides ou constituants des plastes particuliers: les chromoplastes

2.4 Les C₆-C₃-C₆ ou polyphénols

Les plus importants composés mixtes, sont ceux ayant une structure de base C₆-C₃-C₃ qui donne naissance aux flavonoïdes appelés également composés polyphénoliques.

a) biosynthèse :

Les flavonoïdes résultent de la condensation de 3 groupements acétates (fournis sous forme d'acétyl-CoA) avec l'acide 4'(OH)cinnamoyl-CoA; Cette condensation conduit à la formation de 2 noyaux benzéniques- A et B- réunis par une chaîne de 3 atomes de carbones (hétérocycle C). La *chalcone synthase* ou *flavone synthase* (2ème enzyme clé de ce métabolisme) est un complexe multi-enzymatique comprenant trois sites, chacun d'eux assurant successivement l'addition des unités malonates, l'accepteur est l'acide p-(OH) cinnamique.

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau des chloroplastes à partir de cinnamoyl-CoA (provenant du reticulum endoplasmique). Certaines molécules flavoniques quittent les chloroplastes et s'accumulent dans les vacuoles (anthocyanes). Selon le degré d'oxydation de l'hétérocycle formé en général par condensation avec un OH phénolique du noyau A et la chaîne latérale de l'acide cinnamique, on distingue un grand nombre de variétés de flavonoïdes.

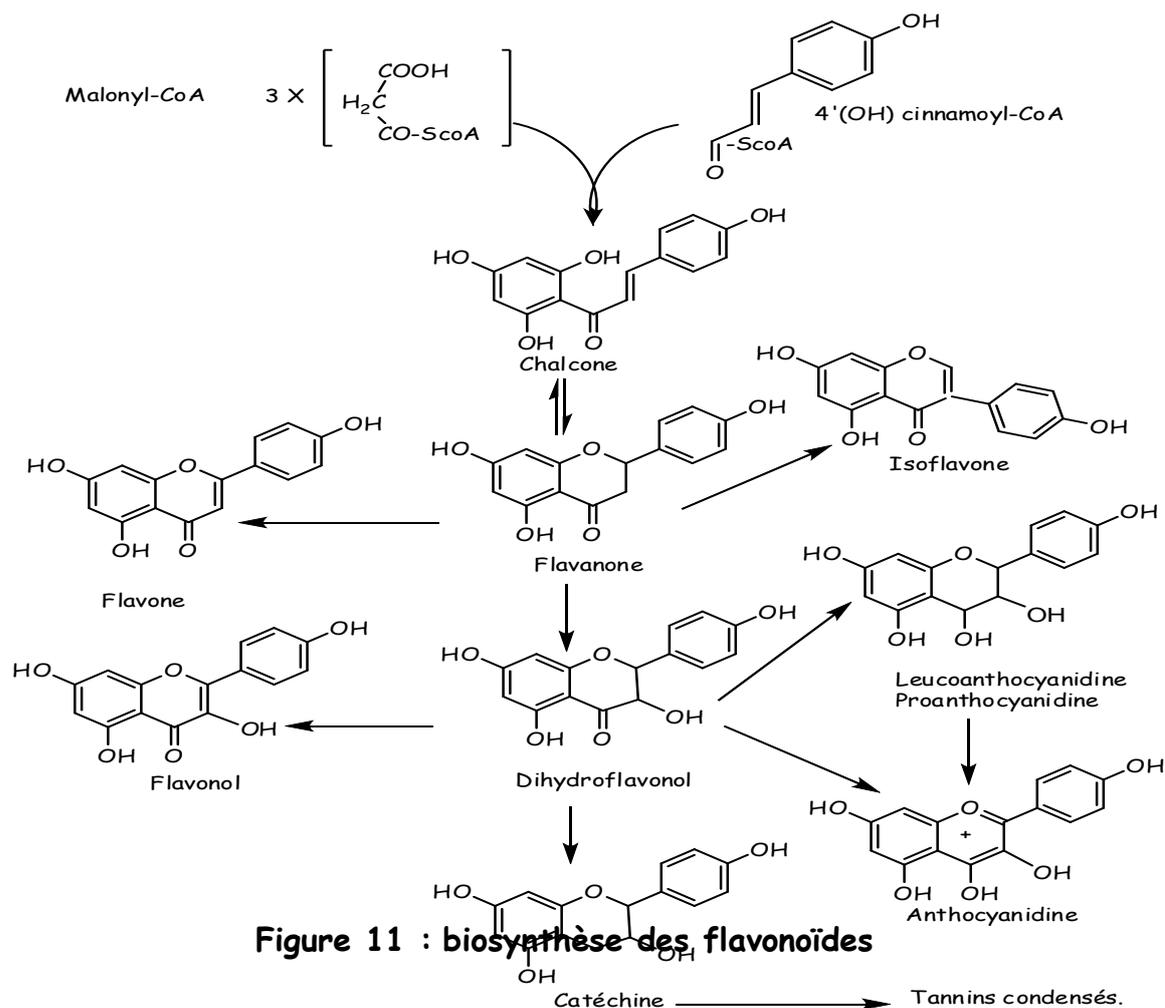


Figure 11 : biosynthèse des flavonoïdes

Leurs différentes modalités de synthèse à partir des chalcones (hydroxylation des noyaux aromatiques, méthylation, degré d'oxydation de la chaîne médiane) sont encore imparfaitement connues. La formation des isoflavonoïdes résulte d'une transposition secondaire du noyau aromatique.

Parmi les flavonoïdes présentant également un intérêt dans plusieurs domaines vitaux. Nous citerons:

Les anthocyanes, qui par suite de leur ionisation, présentent des couleurs différentes pour les divers pH: du rouge-orange en milieu acide au bleu- mauve en milieu alcalin. En réalité, la couleur dépend aussi du nombre d'OH non méthylés :

- La pélagonidine possède un (OH) est rouge-orange
- La cyanidine possède deux (OH) est rouge-magenta
- La delphinidine possède trois (OH) est bleu- mauve.

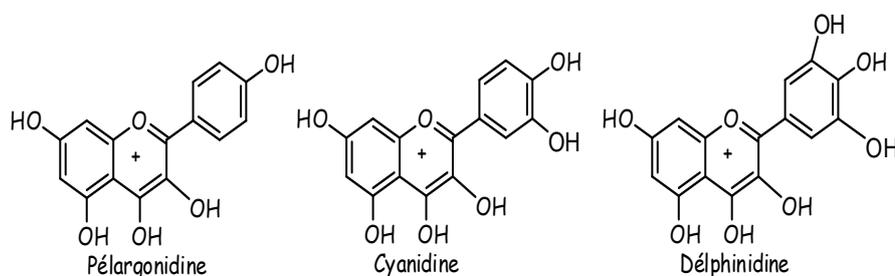


Figure 12 : Les anthocyanidines

En outre la chélation éventuelle de ces anthocyanes avec des métaux, leur combinaison avec les peptides peut modifier la couleur. De même, la présence de flavones par un phénomène de copigmentation, peut changer de façon importante la coloration et notamment, permettre une émission en UV, visible par de nombreux insectes.

b) Rôle physiologique : En raison de leur structure polyphénolique, ils pourraient jouer un rôle dans les chaînes d'oxydo-réduction et modifier certaines réactions concernant la croissance, la respiration, la morphogenèse et la lignification.

Ainsi le **Kaempferol** active l'auxine-oxydase tandis que la **quercétine** l'inhibe. De nombreux flavonoïdes, en raison de leur richesse en groupements phénols (OH), sont capables de se fixer sur certains protéines et enzymes, et de modifier ainsi les équilibres enzymatiques; ils interviennent à différents stades du développement, notamment lors de la germination.

Les flavonoïdes dont l'absorption en U.V est importante, protègent les plantes vis-à-vis des rayonnements nocifs.

c) Le rôle biologique:

Certains flavonoïdes ont des propriétés fongicides et insecticides qui protègent la plante contre l'attaque des champignons et des insectes.

Au niveau des feuilles et fleurs, les flavonoïdes ont un rôle attractif pour les abeilles ou répulsif sur les insectes herbivores entraînant ou non la consommation de feuillage

d) Autre rôle :

Les flavonoïdes constituent une part non négligeable des phytoconstituants - principes actifs- solubles dans l'eau, de nombreuses plantes médicinales ayant une grande importance en phytothérapie actuelle. Les principes actifs sont divisés en nombreux sous-groupes : flavanes, flavanols, flavanones, flavones, catéchines.

Tableau 3 : Structures de flavonoïdes importants pour l'industrie pharmaceutique.

Structure	R'3	R'4	R'5	Nom de la molécule
<p>Chalcone</p>				Butéine
<p>Flavanones</p>		OH		Naringénine
	OH	OH		Eriodictine
<p>Flavones</p>		OH		Apigénine
		OCH3		Acacétine
	OH	OH		Lutéoline
	OH	OCH3		Diosmétine
<p>Flavanols</p>	OCH3	OH	OCH3	Triticine
		OH		Kaempférol
		OCH3		Kaempféridine
	OH	OH		Quercétine
<p>Leucoanthocyanidines</p>	OH	OH	OH	Myricétine
		OH		Propelargonidine
	OH	OH		Procyanidine
	OH	OH	OH	Prodéphinidine

3/ Les tanins

a) Définition:

Les tannins naturels sont des molécules polyphénoliques hydrosolubles, de masse moléculaire comprise en 500 et 3000 et, qui outre les réactions habituelles des phénols, provoquent la précipitation des protéines (ou autres polymères). A cette définition correspondent 2 classes structurales distinctes, pouvant être présentes simultanément chez les végétaux: les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

Les tanins hydrolysables sont des hétéro polymères dont l'hydrolyse chimique ou enzymatique libère outre la molécule de glucose, de l'acide gallique (cas de gallotannins) ou ses formes dimériques: acide *m*-digallique, ac ellagique (cas des ellagitannins). **Les tanins condensés** (tanins vrais ou tannoïdes) résultent de la condensation de molécules élémentaires de type flavane 3 ol (catéchines) ou flavane 3-4 diols (leuco-anthocyanidines). Les liaisons formées sont de type carbone-carbone ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysables. Les tanins condensés sont également appelés Proanthocyanidines; en effet leur oxydation en milieu alcool-acide à chaud entraîne la formation de pigments anthocyaniques tels que cyanidine et délphinidine. C'est certainement ce type de molécules qui est dotée de propriétés remarquables chez les plantes qui en sont pourvues.

b) Biosynthèse

1. Tanins hydrolysables: Il est important de noter que l'acide gallique découle de l'oxydation de l'acide 3-déhydroshikimique et donc provient de la voie biosynthétique de l'acide shikimique.

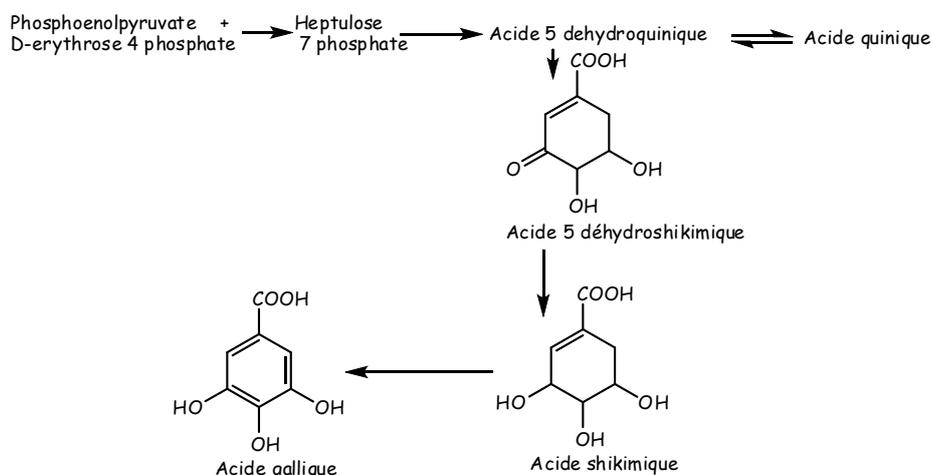


Figure 13 : Synthèse de l'acide gallique via l'acide shikimique.

Les tanins hydrolysables sont des oligo ou polyesters d'un sucre (glucose) et un nombre variable de molécules d'acide phénol. Selon la nature de l'acide phénol on distingue:

- Les tanins galliques dérivés de l'acide gallique
- Les tanins éllagiques dérivés de l'acide hexahydroxy diphéniques (HHDP) et de ses dérivés.

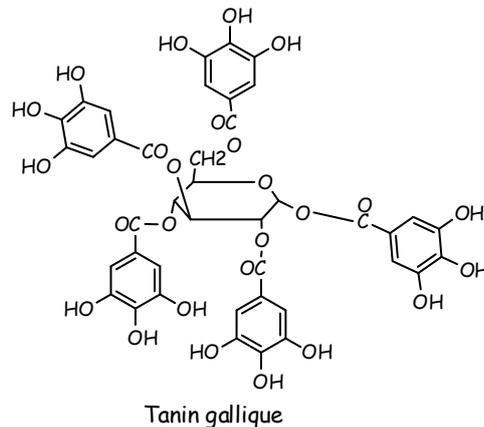


Figure 14 : tannin hydrolysable ou gallotannin

2. Tanins condensés :

La biosynthèse des proanthocyanidines découle directement de la naringénine et de ce fait de celle des flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes sont formés à partir de la naringénine par différentes réactions enzymatiques faisant intervenir des hydrolases, des réductases et des glucosyl-transférases ; La synthèse de la famille des flavan-3-ols provient de ce fait aussi de la naringénine chalcone.

Situation biogénétique du problème "tanins" par rapport aux autres flavonoïdes

L'élucidation des phénomènes concernant les relations entre la présence de tanins et certains caractères morphologiques tels que la couleur des fleurs et celle des téguments passe par la compréhension des mécanismes génétiques responsables de la biosynthèse de ces molécules. Les principales voies contribuant à l'expression de la couleur sont celles qui conduisent essentiellement à la formation des flavanols, des anthocyanidines et des tanins condensés.

Biosynthèse des flavanols

La chalcone synthase (**CHS**) assemble la première molécule de la voie et constitue le point de départ de la synthèse des composés polyphénoliques

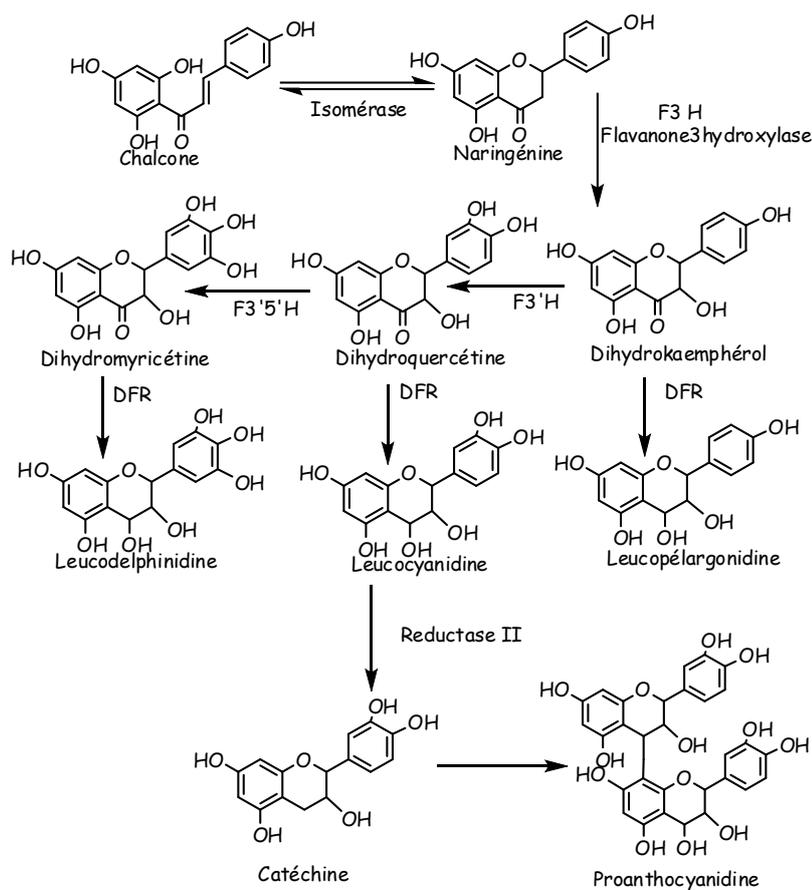


Figure 15 : Biosynthèse de la catéchine et d'une procyanidine.

La chalcone isomérase est à l'origine de la première molécule à noyau phénylchromone C-15 : la flavanone, (naringénine). Ce composé a plusieurs destinées parmi lesquelles celles conduisant aux flavanes ou aux dihydroflavonols. La flavanone 3 hydroxylase (F3H) catalyse l'hydroxylation de la position -3 de la flavanone en dihydro-flavonol: le dihydro-kaempférol. Cette molécule charnière représente un substrat accessible aux enzymes conduisant à des formes moléculaires qui ont un rôle capital dans l'expression de la couleur.

Activités biologiques et pharmacologiques des tanins

Les tanins sont utilisés principalement en tant qu'anti-inflammatoire, digestif, diurétique et dans le traitement de l'hypertension artérielle. Des études ont montré des différences pharmacologiques en fonction de différentes classes

de polyphénols. Afin de mieux comprendre leurs propriétés biologiques, il faut expliquer en premier lieu leurs propriétés chimiques.

Ces composés ont certaines particularités:

- Ils se complexent avec des ions métalliques
- Ils ont des propriétés antioxydantes
- Ils peuvent se complexer avec d'autres molécules, entre autres des protéines des polysaccharides et des acides nucléiques

Complexation métal-ion

Les polyphénols peuvent se complexer avec toutes sortes d'ions métalliques, leur activité biologique sera modifiée s'il s'agit de ions métalliques de transition (Aluminium, fer et cuivre). En effet, ceux-ci possèdent certaines particularités qui permettront de modifier certaines réactions physiologiques.

Activité antioxydante

Une attention accrue a été portée sur le rôle des radicaux libres et autres oxydants et leur implication dans la plupart des maladies chroniques (cancers, maladie de Parkinson, artériosclérose...). Une des hypothèses émises est que les mécanismes de défense diminuent avec l'âge et de ce fait la neutralisation de ces radicaux libres devient moins efficace.

Il a été démontré que les peuples utilisant une alimentation riche en **antioxydants**, sont moins exposés à des maladies cardiovasculaires ou à certaines formes de cancer. De ce fait, l'ingestion de polyphénols peut aider à la prévention de certaines maladies.

Les polyphénols ont la particularité **d'inhiber** la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto oxydation lipidique. Les composés contenant une structure *ortho*-trihydroxylée, comme les gallo tanins et les proanthocyanidines galloylées montrent une forte activité contre les anions super oxydes (O_2^-).

Il a aussi été démontré que le thé vert avait des propriétés antioxydantes. Il est riche en gallocatéchines qui ont la propriété de neutraliser les radicaux libres.

La taille des proanthocyanidines polymériques joue aussi un rôle important. Les dimères et trimères ont une activité antioxydante plus forte que les oligomères de taille supérieure.

Complexation des polyphenols avec les protéines et les polysaccharides

Les polyphénols ont la particularité de se complexer aux protéines et aux polysaccharides. Ces composés possèdent une multitude de groupement hydroxyles, capables de former des liaisons hydrogène avec plusieurs sites de la protéine (ou du polysaccharides). Ceci maintient une structure stable et rigide. Le complexe tanin-protéine précipite souvent lorsqu'il se trouve dans un milieu aqueux. Si les polyphénols sont capables de se complexer avec les protéines, il est possible qu'ils puissent bloquer les sites actifs des enzymes, inhibant ainsi leur activité.

Autres Propriétés des tannins:

Leurs propriétés astringentes expliquent les effets observés:

- Par voie interne: antidiarrhéique et antiseptique.
- Par voie externe: imperméabilisation de la peau et des muqueuses.

Ils manifestent un effet antimicrobien, ils ont un rôle vasoconstricteur sur les vaisseaux sanguins.

4/ Méthodes d'études des composés phénoliques:

Extraction, Caractérisation et dosage des composés phénoliques:

Les méthodes de séparation, de dosage et d'identification des composés phénoliques font appel systématiquement aux méthodes chromatographiques sous toutes les formes : Chromatographie sur papier Wathman, chromatographie sur couches minces, chromatographie sur colonne ouverte et à la chromatographie liquide à haute pression (HPLC).

Les dosages font appel essentiellement au spectrophotomètre UV-Visible et leur analyse au spectrophotomètre UV-Visible à défilement de longueur d'ondes (190 nm à 700 nm).

Les détecteurs à barrette de diodes (Photo Diode Array Dectector) couplés à la CLHP, permettent l'analyse des spectres d'absorption en ultraviolet-visible. Cette technique peut également être couplée avec des techniques physico-chimiques modernes (spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire...).

1/ Extraction :

La présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques (aromatiques) hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir du matériel végétal, les caractériser

chimiquement et les doser. Cependant, il faut noter que ces propriétés peuvent s'exprimer différemment selon la complexité de la molécule concernée et le nombre de groupements hydroxyles portés par chacun des cycles benzéniques.

Le schéma général des différentes étapes d'extraction, de caractérisation et de dosage est valable pour la majorité des composés phénoliques. Il devra quelquefois être modifié pour être mieux adapté à la nature chimique, à la solubilité et au degré de liaisons avec les autres constituants des végétaux. La plupart des composés phénoliques, présents dans les vacuoles, peuvent aisément après broyage du végétal, être extraits avec des mélanges d'éthanol ou méthanol/eau (70/30; v/v). Pour les tanins on utilisera un mélange d'acétone/eau (70/30; v/v). Pour éviter toute oxydation, il est recommandé d'ajouter un antioxydant (métabissulfite de sodium ou acide ascorbique aux solvants d'extraction.

L'extraction peut se faire à froid (macération), ou à chaud sous reflux et le temps d'extraction peut varier en fonction du matériel végétal et de la solubilité des composés.

Après élimination du solvant organique par évaporation sous vide (à l'aide d'un évaporateur rotatif), il est nécessaire de purifier l'extrait global ainsi obtenu, d'abord en éliminant les pigments chlorophylliens et caroténoïdes par affrontement à l'éther de pétrole.

La deuxième étape consiste en une partition ou partage des composés extraits entre solvants spécifiques. Pour cela l'extrait global purifié est mélangé, dans une ampoule à décanter, avec par exemple de l'éther diéthylique, solvant utilisé pour solubiliser les composés phénoliques simples: phénols simples et acides phénols dérivés, et les molécules élémentaires de flavonoïdes. Après séparation de la phase éther, la phase aqueuse est mélangée avec un solvant de polarité intermédiaire comme l'acétate d'éthyle ou butanone. Les composés phénoliques tels que les flavonoïdes mais aussi les proanthocyanidines dimères et trimères sont solubilisés dans cette phase. Alors que l'éther peut s'évaporer à l'air libre, les phases acétate et/ou butanone récupérées, et évaporées sous vide à sec sont solubilisées dans un petit volume de méthanol. Ce sont les différentes phases qui seront utilisées pour les analyses qualitatives et quantitatives.

2/ Le dosage global fait appel à l'utilisation d'un réactif de Folin-ciocalteu ou à la méthode au bleu de prusse. Le caractère réducteur des composés phénoliques et

leur complexation possible avec les métaux lourds conduisent dans ces cas à la formation des complexes colorés verts puis bleus que l'on peut alors doser par colorimétrie à 720 nm. Ces méthodes sont très sensibles, mais malheureusement peu spécifiques car beaucoup de composés réducteurs peuvent interférer, et l'estimation est souvent très fortement sur évaluée.

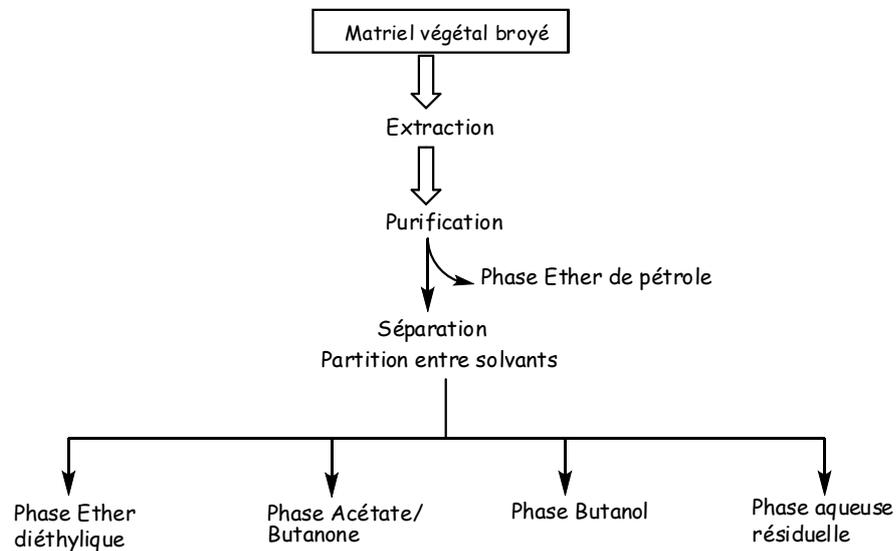
3/ Le diagnostic: pour réaliser une première approche qualitative et visualiser la richesse en composés phénoliques des différentes phases, la chromatographie couches minces (sur support polyamide, silice) est une technique largement utilisée. Les rapports frontaux (Rf) des différents composés ainsi leur fluorescence sous UV à 365 nm et 254 nm, en chambre noire, permettent de donner des indications pouvant aider à l'identification structurale.

4/ Isolement et purification: La chromatographie sur colonne couverte et la chromatographie semi préparative sont utilisées pour isoler les composés phénoliques purs en vue de leur identification.

5/ Identification: l'identification des composés phénoliques est basée sur l'étude spectres d'absorption des composés purs à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.

Une autre technique faisant appel à la CLHP couplée à un détecteur à barrettes de diodes permet également de fournir les spectres d'absorption caractéristiques de chaque type de molécule.

Cette étude est complétée par l'utilisation de la spectrométrie de masse (masse moléculaire du produit pur) et pour les nouveaux composés, la résonance magnétique nucléaire sous ses différentes formes.



Les phases sont évaporées à sec et reprises dans un faible volume de méthanol pour :

- Analyses

Dosages Spectrophotométrie UV-Visible

Diagnostic Chromatographie papier ou couches minces

- Isolement et purification

Chromatographie semi préparative sur couches minces
Chromatographie sur colonne ouverte
Chromatographie liquide haute performance CLHP
Electrophorèse capillaire EC

- Identification

Spectrophotométrie UV-Visible
Chromatographie liquide haute performance CLHP
couplée au détecteur à barrettes de diodes.
Spectrométrie de masse SM
Résonance magnétique nucléaire RMN

Figure 15 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'extraction et de l'analyse des composés phénoliques.