

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Djilali BOUNAAMA KHEMIS MILIANA



Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Technologie

Mémoire du Projet de Fin d'Etudes

Pour l'obtention du diplôme

Master

En

« Génie des procédés »

Option :

« Génie pharmaceutique »

Thème :

**Etude comparative de l'activité biologique de la caféine et
de la théobromine**

Réalisé par :

M^{me}: BENALI Khadidja

M^{me} : FIZIR Radhia

M^r : MEKHANEG.B

M^{lle} : DOUBA.H

M^r : HAMIDI.M

M^r : BOUDJELLAL F.

Président

Examinatrice

Encadreur

Co-Encadreur

Année Universitaire 2015/2016

REMERCIEMENTS

Louange et Gloire à Dieu, Le Tout Puissant, qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail. Nombreux sont qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail.

*Nous commençons par exprimer notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements au **Mr HAMIDI MOUSSA** notre promoteur, docteur A à l'Université Djilali Bounaama Khemis Miliana qui nous a honorés en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. Merci de nous avoir guidés avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit, que nous la remercions vivement pour son soutien, ses conseils et aussi **Mr BOUDJLLAL FAYSSAL** notre Co-promoteur que nous la remercions aussi pour ses conseils précieux et ses critiques qui nous ont aidés au sein du laboratoire.*

*Nos remerciements vont également à l'ensemble du personnel du laboratoire de chimie, génie des procédés et microbiologie de l'université de Khemis Miliana en particulièrement : **Mr : chaouchi .M, Mlle : wassila, Fatiha, nadjiba, et Mm nadjia.***

Nous adressons encore nos remerciements à :

*L'ensemble des membres du département de science et technologie en particulièrement **Mr : Hellal.***

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici nos sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie. Très cordialement.

Dédicace

Avec l'aide de dieu, j'ai pu faire se modeste travail que je dédie :

A mes très chers parents, ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.

Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit, Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

A mon très cher Mari : Mr Oussama reçois à travers ce travail tout mon respect ma gratitude et ma profonde reconnaissance et sa famille.

A mes sœurs : Maria, khaoula, Anfel et surtout ma petite sœur Oumaima. et aussi à mes cousines romaïssa et Imane.

A mon frère : Mohamed.

A ma chère camarade, mon binôme : Radhia et sa famille.

A mes amies : Rima, fifi, Saïda et Kenza.

Sans oublier tous les professeurs que ce soit de primaire, du moyen, du secondaire, ou de l'enseignement supérieure.

Khadija

DEDICACE

A la source de tendresse, de générosité, de bonheur, à celle qui a consacré ses vie pour Que je réussisse dans tout ce que j'entretiens,

À vous mes très chères parents, ma mère qu'elle a beaucoup sacrifié pour moi et quelle n'a jamais cessée de m'encourager,

Mon Père qui fait beaucoup pour nous, et toute la famille.

A mon très cher Mari : Mr Bilal reçois à travers ce travail tout mon respect ma gratitude et ma profonde reconnaissance et sa famille.

A mon très chers frères : Salim et Karim

A mes sœurs : Hanane, Meriem, Leïla, Souad, Iman, fella.

A mes chères tantes mes oncles. Ainsi qu'à toute ma grande famille.

A ma chère camarade, mon binôme : Khadidja et sa famille

A mes amies : A.Soumia, A. Hayat, Meriem, Samira, Manal.

A ma promotion du génie des procédés pharmaceutique et Co-promoteur Mr Boudjllal fayssal

A mon chef de travail Mr Belahecen et Mr Mohamed et Sofiane et Hichem et à tout l'équipe qui travaille avec moi.

A mes enseignants, surtout Mr Hellal, A celle qui a partagé le bon et le pire dans la réalisation de ce travail,

Radhia

Résumé

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique. La caféine et la théobromine sont des alcaloïdes les plus consommés. Ils se caractérisent par leurs diverses propriétés biologiques et de leur diversité structurale. La synthèse de ces deux alcaloïdes constitue l'objet fondamental de notre mémoire et ce en vue de comparer leur activité biologique.

A cette fin, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'extraction de la caféine à base de café et de la théobromine à base de chocolat noir à 86% de cacao. Dans un second temps et afin de déterminer la présence et la quantité de ces deux alcaloïdes (caféine et théobromine) en solution, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de différentes techniques d'analyse et d'identification, à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed Infra Red spectroscopy) et la méthode de diffusion ou de dilution en gélose (la gélose Mueller–Hinton).

Les résultats obtenus ont montré l'existence de bandes principales de longueur d'onde λ de 298 nm et 290 nm, caractérisant respectivement la caféine et la théobromine, en outre l'activité antibactérienne de la caféine est inférieure à celle de la théobromine, ceci est lié probablement aux groupements CH_3 .

Mots clés : Alcaloïde, Théobromine, Caféine, Extraction, Activité antimicrobienne.

Abstract

Alkaloids are natural and organic substances extracted essentially from plants, which contain at least one nitrogen atom in their chemical structure. Caffeine and theobromin are the most consumed alkaloids. They are characterized by their various biological properties and their structural diversity. Synthesis of these two alkaloids and compare their biological activity is the fundamental purpose of our topic.

To reach our objective, caffeine and theobromin was firstly extracted from coffee and dark chocolate with 86% cocoa, respectively. The identification and quantification of the alkaloids obtained (caffeine and theobromin) was evaluated by UV-visible spectrophotometry, Fourier Transform Infrared Spectroscopy and the method of dissemination or agar dilution (Mueller-Hinton agar). The presence of main bands of wavelength at 298 nm and 290 nm demonstrated the successful extraction of caffeine and theobromine. Further, the antibacterial activity of caffeine was less than that of theobromine; this is probably related to the CH₃.

Keywords: Alkaloids, Theobromine, Caffeine, Extraction, Antimicrobial Activity.

المخلص

القلويدات هي مواد طبيعية و عضوية تتواجد اساسا في النباتات و التي تحتوي على ذرة نيتروجين واحد على الاقل من حيث التركيب الكيميائي لها . الكافيين و التيوبرومين هي القلويدات الاكثر إستهلاكا. فهي تتميز بمختلف خصائصها البيولوجية و تنوعها الهيكلي. تركيب هذه القلويدات يشكل الغرض الأساسي لمذكرتنا و هذا بالنظر لمقارنة نشاطهما البيولوجي . تحقيقا لهذه الغاية، نحن مهتمون في البداية في استخراج الكافيين من القهوة و التيوبرومين من الشوكولاتة السوداء التي تحتوي على 86 % من الكاكاو.

في المرحلة الثانية تحديد وجود و كمية هاتين القلويدتين (التيوبرومين و الكافيين) في المحلول و نحن مهتمون باستخدام تقنيات مختلفة لتحليل وتحديد الهوية، ألا وهي أطياف الأشعة فوق البنفسجية-المرئية، واطياف الأشعة تحت الحمراء أي FTIR (تحويل فورييه الطيفي بالأشعة تحت الحمراء)، و أسلوب الانتشار و التخفيف في الجيلوز(جيلوز مولر هينتون). كما أظهرت النتائج المتحصل عليها إثبات وجود نطاقات رئيسية طولها الموجي λ في 298 نانومتر و 290 نانومتر، تميز على التوالي الكافيين و التيوبرومين، بالإضافة إلى أن النشاط المضاد البكتيري للكافيين أقل من التيوبرومين من المحتمل أن هذا يرجع إلى جذر CH3

الكلمات المفتاحية : قلوية، تيوبرومين، كافيين، استخلاص ، نشاط مضاد للبكتيري.

Sommaire

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

Chapitre I : Les techniques d'extraction et analytiques

I.1. Techniques d'extraction.....	3
I.1.1. Extraction solide – liquide.....	3
I.1.2. Extraction Liquide-Liquide.....	4
I.1.2.1. Présentation.....	4
I.1.2.2. Propriétés de l'extractant.....	6
I.1.2.3. Propriétés du Diluant.....	7
I.1.2.4. Classification des extractants.....	8
I.2. Techniques analytiques	8
I.2.1. Spectrophotométrie d'absorption dans UV-Visible.....	8
I.2.1.1 Principe de la spectrométrie ultra-violet	8
I.2.1.2. Aspect qualitatif.....	10
I.2.1.3. Spectre UV-visible d'une molécule.....	10
I.2.1.4. Intérêt analytique des spectres d'absorption UV-visible.....	11
I.2.1.5. Aspect quantitatif.....	11
I.2.1.6. Méthodes de quantification.....	11
I.2.1.7. Choix de la longueur d'onde.....	13
I.2.1.8. Appareillage.....	13

I.2.2.Spectrométrie infrarouge (IR).....	14
I.2.2.1 Principe de la spectroscopie infrarouge	14
I.2.2.2. Appareillage.....	16
I.2.2.3. Intérêt analytique du spectre IR.....	16

Chapitre II : Synthèse bibliographique sur les alcaloïdes

II.1. Historique	17
II .2.Les Alcaloïdes.....	17
II.2.1.Origine et répartition naturelle.....	17
II.2.2. Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes.....	18
II.2.3. Réactifs généraux des alcaloïdes.....	19
II.3. Classification chimique des alcaloïdes	19
II.4. Structure et activités biologiques de quelques alcaloïdes.....	22
II.4.1. Alcaloïdes dérivés de l'ornithine.....	23
II.4.2. Alcaloïdes dérivés de la lysine.....	24
II.4.3. Alcaloïdes dérivés de la tyrosine et de la phénylalanine.....	26
II.4.4. Alcaloïdes dérivés du tryptophane.....	27
II.4.5. Alcaloïdes dérivés de l'acide anthranilique.....	29
II.4.6. Alcaloïdes dérivés de l'acide nicotinique.....	30
II.4.7. Alcaloïdes dérivés de l'histidine.....	30
II.4.8. Alcaloïdes produits à partir de réactions d'amination.....	31
II.5. Conclusion.....	31

Chapitre III : Etude bibliographique sur la caféine et théobromine

III.1. La caféine.....	32
III.1.1. Historique.....	32
III.1.2. Description de caféine.....	32

III.1.3. Caractéristiques physico-chimiques de la caféine	34
III.1.4. Répartition de la caféine dans le monde végétal	34
III.1.5. Teneurs en caféine de certains produits	38
III.1.6. Mode d'Action	38
III.1.7. Pharmacocinétique.....	39
III.1.8. La caféine en milieu pharmaceutique	40
III.1.8.1 La caféine dans les médicaments.....	40
III.1.9. Effets de la caféine.....	40
III.1.9.1. Effets négatifs.....	40
III.1.9.2. Effets positifs	41
III.2. La théobromine	41
III.2.1. Historique.....	41
III.2.2. Théobromine et chocolat.....	42
III.2.3. Description de la théobromine.....	42
III.2.4. Les propriétés chimiques essentielles de la molécule de théobromine.....	43
III.2.5. Teneurs en caféine de certains chocolats.....	43
III.2.6. Mode d'action.....	44
III.2.6.1. Système nerveux central.....	44
III.2.6.2. Neurones.....	44
III.2.7. Pharmacocinétique.....	45
III.2.8. Action de la théobromine.....	46
III.2.8.1. Adénosine et théobromine.....	46
III.2.9. Effets de la théobromine.....	47
III.2.9.1. Effets négatifs.....	47
III.2.9.2. Effets Positifs.....	47

III.2.10. Utilisation pharmaceutique.....	48
---	----

Chapitre IV : Matériels et méthodes

IV.1.Synthèse expérimental des essais.....	49
IV.2.Extraction de la théobromine.....	51
IV.2.1.Expérience	51
IV.3.L'extraction de la caféine.....	52
IV.3.1 Expérience.....	52
IV.4. Mesure de point de fusion.....	54
IV.5. Analyse spectrale du composé obtenu après purification.....	57
IV.5.1. L'analyse Spectroscopie par ultra-violet.....	57
IV.5.1.1.Echantillon de mesure.....	55
IV.5.2. Caractérisation par spectrophotométrie IR.....	55
IV.6.Analyse Microbiologique.....	55
IV.6.1.Test de la solubilité	55
IV.6.2.Préparation des solutions mères et diluées.....	56
IV.6.2.1. Protocole	56
IV.6.3.Détermination de DO de différentes dilutions de caféine et théobromine.....	57
IV.6.4. Tests de l'activité antibactérienne.....	58
IV.6.4.1. Essais préliminaires.....	58
IV.6.4.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des disques.....	58
IV.6.4.3. Incubation et Lecture.....	59
IV.6.4.4. Détermination de l'activité antimicrobienne.....	60
IV.6.4.4.1. Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides.....	60
IV.6.4.4.2. Pourcentage d'inhibition.....	60

Chapitre V : Discussion et résultats

V. Résultats et Discussions.....	61
V.1 Extraction de la théobromine et la caféine.....	61
V.2. Point de fusion de théobromine et caféine.....	61
V.3 Analyse spectrale (UV-visible).....	62
V.3.1 Variation de l'absorbance en fonction de longueur d'onde.....	62
V.3.2 Courbe d'étalonnage de la solution utilisée.....	63
V.3.4. Courbe d'étalonnage de la solution utilisé.....	65
V.4. Analyse spectrale par FTIR.....	67
V.4.1 Variation de la transmission en fonction de longueur d'onde (cm ⁻¹).....	67
V.5. Etude de l'activité antibactérienne.....	70
V.5.1. Evaluation qualitative.....	70
V. 4.2. Discussion.....	72

Conclusion générale

Références bibliographiques

Liste des tableaux

Tableau I. 1 : Application de l'Extraction Liquide-Liquide	6
Tableau. II. 1 : Description de quelques alcaloïdes selon leur précurseur acide aminé.....	21
Tableau III. 1 : Teneurs de Caféine dans certains produits.....	38
Tableau III. 2 : Teneurs de Théobromine dans certains chocolats.....	44
Tableau.IV.1 : Solubilité de la caféine et de la théobromine dans certains solvants.....	57
Tableau. IV.2: Variation de la DO de la caféine en fonction de la concentration.....	58
Tableau. IV.3: Variation de la DO de la théobromine en fonction de la concentration.....	58
Tableau V.1 : Les rendements d'extraction pour la caféine et la théobromine.....	62
Tableau V.2 : point de fusion des matières.....	62
Tableau V.3 : Valeurs d'absorbance de la caféine et les longueurs d'onde associées.....	63
Tableau V.4 : Absorbances à différentes concentrations.....	64
Tableau. V.5 : le tableau ci-dessous représente les valeurs d'absorbance de théobromine en fonction de la longueur d'onde (spectrométrie UV).....	65
Tableau V.6 : Absorbances à différentes concentrations	67
Tableau. V.7 : Détermination de la zone d'inhibition de la caféine.....	71
Tableau. V.8 : Détermination de la zone d'inhibition théobromine.....	72

Liste des figures

Fig. I.1 : Montage chauffage à reflux.....	4
Fig. I.2 : Schéma de Principe de l'Extraction Liquide-Liquide (Etage théorique).....	5
Fig. I.3 : Spectre électromagnétique de la lumière et domaine UV visible.....	9
Fig. I.4 : Principe de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire.....	9
Fig. I.5 : Principe d'une gamme d'étalonnage.....	12
Fig. I.6 : Spectrophotomètre mono-faisceau-multi-canal ou à barrette de diodes.....	13
Fig. I.7 : Spectre électromagnétique de la lumière et domaine IR.....	14
Fig. II.1 : Les alcaloïdes de pomme de terre et le tabac.....	22
Fig. II.2 : les alcaloïdes des pyrrolizidines et les tropanes.....	23
Fig. II.3 : Les alcaloïdes présent Atropa belladonna, Hyoscyamusniger et Mandragoraofficinarum.....	24
Fig. II.4 :Les alcaloïdes de l'asthme et de la bronchite.....	25
Fig. II.5 : Les alcaloïdes des composés monocycliques.....	26
Fig. II.6 : les alcaloïdes indoliques.....	27
Fig. II.7 : Camptothécine de structure pyrroloquinoléinique.....	28
Fig. II.8 : les alcaloïdes de l'ergot.....	29
Fig. II.9 : les alcaloïdes de tumeurs humaines du poumon, du colon et des ovaires.....	29
Fig. II.10 : Les alcaloïdes de tabac.....	30

Fig. II.11: alcaloïde dans domaine médical et de traitement glaucome.....	30
Fig. II.12: Les alcaloïdes terpéniques et les alcaloïdes stéroïdiens.....	31
Fig. III.1 : les grains de café.....	32
Fig.III.2 : structure de caféine.....	33
Fig.III.3 : Structure de différentes molécules: Xanthine (A), caféine(B), Théophylline(C), théobromine(D).....	33
Fig. III.4: Planche d’herbier représentant <i>coffea arabica et canephora</i> (robusta).....	35
Fig. III.5 : Planche d’herbier représentant <i>Camellia sinensis</i>	35
Fig.III.6 : Planche d’herbier représentant <i>Theobroma cacao</i>	36
Fig. III.7: Planche d’herbier représentant le Guarana, <i>Paullinia cupana</i>	36
Fig. III.8 : Planche d’herbier représentant <i>ilex paraguariensis</i>	37
Fig. III.9 : Planche d’herbier représentant <i>cola acuminata</i>	37
Fig. III.10 : Métabolisation de caféine.....	39
Fig. III.11 : Les médicaments.....	40
Fig. III.12: Les grains de la théobromine.....	42
Fig. III.13: structure de théobromine.....	43
Fig. III.14 : Adénosine et théobromine.....	46
Figure IV.1. Plan de la synthèse expérimental.....	51
Fig. IV.2 : Filtration par tamis et par Buchner.....	52
Fig. IV.3 : Récupération de la théobromine.....	53
Fig. IV.4 : Structure de caféine.....	53
Fig. IV.5 : les traces de caféine.....	55
Fig. IV.6 : fusiomètre Analogique SMP11 Stuart.....	55
Fig. IV.7 : Test de solubilité.....	57
FigIV. 8 : Préparation les dilutions.....	58

Fig. IV.9 : Ensemencement sur les boites et déposition des disques.....	60
Fig. V.1 : Rendements d'extraction de la caféine la théobromine.....	62
Fig. V.2 : Le spectre de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde de caféine... ..	64
Fig. V.3 : Courbe d'étalonnage de la solution utilisée ($\lambda= 298$ nm).....	65
Fig. V.4 : Le spectre de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde, cas de la théobromine.....	66
Fig. V.5 : Courbe d'étalonnage de la solution utilisée ($\lambda= 290$ nm).....	67
Fig. V.6 : Spectre d'absorption d'infra rouge de la théobromine.....	68
Fig. V.7 : Spectre d'absorption d'infra rouge de la Caféine.....	69
Fig. V.8 : Le spectre d'absorption d'infra rouge de la caféine et de la théobromine.....	70
Fig. V.9 : Les groupements fonctionnels présents dans les deux spectres.....	70
Fig. V.10 : Test d'activité antimicrobienne de caféine sur la souche E coli.....	72
Fig. V.11 : Test d'activité antimicrobienne de théobromine sur la souche S. aureus.....	72
Fig. V.12 : test d'activité antimicrobienne de théobromine sur la souche E coli.....	73
Fig. V.13 : test d'activité antimicrobienne de théobromine sur la souche S.aureus.....	73

Abréviations

UV : ultraviolet visible.

IR : infra rouge

Abs : absorbance

ATCC : American type culture collection

Cm : Centimètre.

Do : Densité optique

FTIR : spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier

g : gramme

mg : milligramme

mm : millimètre

l : litre

m.Pa.s : mètre. Pascal .seconde

°C : Celsius

nm : Nano mètre

S.aureus : *staphylococcus aureus*.

E.coli : *Escherichia Coli*.

PH : potentiel d'hydrogène.

λ : longueur d'onde.

ml : millilitre.

HIV : *human immunodeficiency virus*.

ARN : Acide ribonucléique.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

SNC : le système nerveux central

DMSO : Diméthyle sulfoxide

LED : Light-Emitting Diode.

Th_P : produit pur de théobromine.

Th_M : solution mère de théobromine.

C_P : produit pur de caféine.

C_M : solution mère de caféine.

D : diamètre.

[C] : concentration

CMI : concentration minimale inhibitrice.

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry.

Introduction

Introduction

Depuis quelques années les hommes et les femmes se soucient de plus en plus de leur bien-être et de leur santé. Que ce soit pour leur alimentation ou pour leurs cosmétiques d'hygiène et de soin, les consommateurs recherchent des produits qui ne présentent aucun danger pour leur santé. En effet, les récentes polémiques concernant le danger potentiel lié à l'utilisation de certains ingrédients dans les formules comme par exemple de certains alcaloïdes. Les alcaloïdes sont parmi les plus importants groupes de produits naturels, en raison de leurs propriétés biologiques et de leur diversité structurale. Ils sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. La caféine et la théobromine sont des alcaloïdes les plus consommés [1].

La synthèse de ces deux alcaloïdes constitue l'objet fondamental dans notre mémoire et ce en vue de comparer leur activité biologique. Le café est, après l'eau, la deuxième boisson la plus consommée au monde. La principale substance active dans la tasse de café est la caféine. Découverte en 1819, la caféine est une molécule de la famille des méthylxanthines, que l'on retrouve dans un grand nombre de produits de consommation. Elle se trouve dans les feuilles, les semences et les fruits de près de 63 plantes. La caféine est un stimulant métabolique. Elle est utilisée en cosmétologie en tant qu'ingrédient actif, interagissant avec le métabolisme adipocytaire, au niveau des lieux d'accumulation des graisses sous forme de triglycérides (à partir des lipides et glucides consommés) [1].

La théobromine est un alcaloïde organique qui fait partie de la famille des méthylxanthines dans laquelle on retrouve aussi la caféine et la théophylline. La molécule de la théobromine demeura longtemps méconnue par la science jusqu'à sa première extraction dans les graines de cacao qui eut lieu en 1878. Peu de temps après, les scientifiques parviennent à procéder à sa synthèse en laboratoire. Les composés de ce groupe se caractérisent par la présence d'une base xanthinique et sont parfois utilisés dans certains traitements médicaux tels que les bronchodilatateurs pour l'asthme, les médicaments diurétiques –pour augmenter la sécrétion urinaire– et les cardio-stimulants. De plus, la théobromine a un effet sur l'humeur puisqu'elle augmente la production de noradrénaline et qu'elle inhibe sa recapture tout comme le font certains antidépresseurs [2]. Le manuscrit de cette étude est composé de cinq chapitres. Le premier chapitre dresse un état de connaissances sur certaines techniques d'extraction ainsi que les techniques d'analyse (UV, IR) utilisées dans le secteur industriel. Le deuxième chapitre expose une synthèse bibliographique sur les alcaloïdes. Le troisième chapitre décrira une étude bibliographique sur la caféine et la

théobromine, En présentant des notions générales sur ces deux matériaux ainsi que leurs domaines d'utilisation et leurs effets. Le quatrième chapitre est consacré à la présentation, du programme expérimental adopté, de différentes méthodes de caractérisation, des produits, du matériel, utilisés. Enfin, dans le cinquième chapitre nous avons présenté les résultats et leur discussion. La conclusion générale débouchera sur des recommandations et des perspectives d'études possibles restant à mener et développer dans le futur.

*I. Technique d'analyse
et d'extraction*

Ce premier chapitre bibliographique dresse un état de connaissances sur certaines techniques d'extraction ainsi que les techniques d'analyse (UV, IR) utilisées dans le secteur industriel. L'extraction est un phénomène physique très important, est utilisée pour séparer des constituants à partir d'un mélange complexe ou bien pour la purification d'un mélange. Elle se partage de deux types [3]:

- Extraction (Solide – liquide) : séparation un constituant à partir d'un solide vers liquide
- Extraction (Liquide – liquide) : séparation un constituant à partir d'un liquide.

I.1. Techniques d'extraction

I.1.1. Extraction solide – liquide

L'extraction solide - liquide est une technique de séparation en génie chimique. Cette technique utilise un moyen d'extraction pour séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de propriétés chimiques ou physiques. Le moyen d'extraction est pas ou peu miscible avec les composants principaux du mélange alors que le composé à extraire possède plus d'affinité avec le moyen d'extraction qu'avec les composants principaux du mélange. L'opération d'extraction se compose dès lors de 2 parties: une première phase d'extraction proprement dite où on assiste à un transfert du composé à extraire entre le mélange initial et le moyen d'extraction. Pour améliorer le transfert, on mélange de manière vigoureuse le moyen d'extraction avec le mélange initial. Puis la deuxième phase qui consiste en la séparation du moyen d'extraction du mélange principal [4]. Ce type d'extraction se réalise à l'aide d'un montage chauffage à reflux (Fig. I.1).

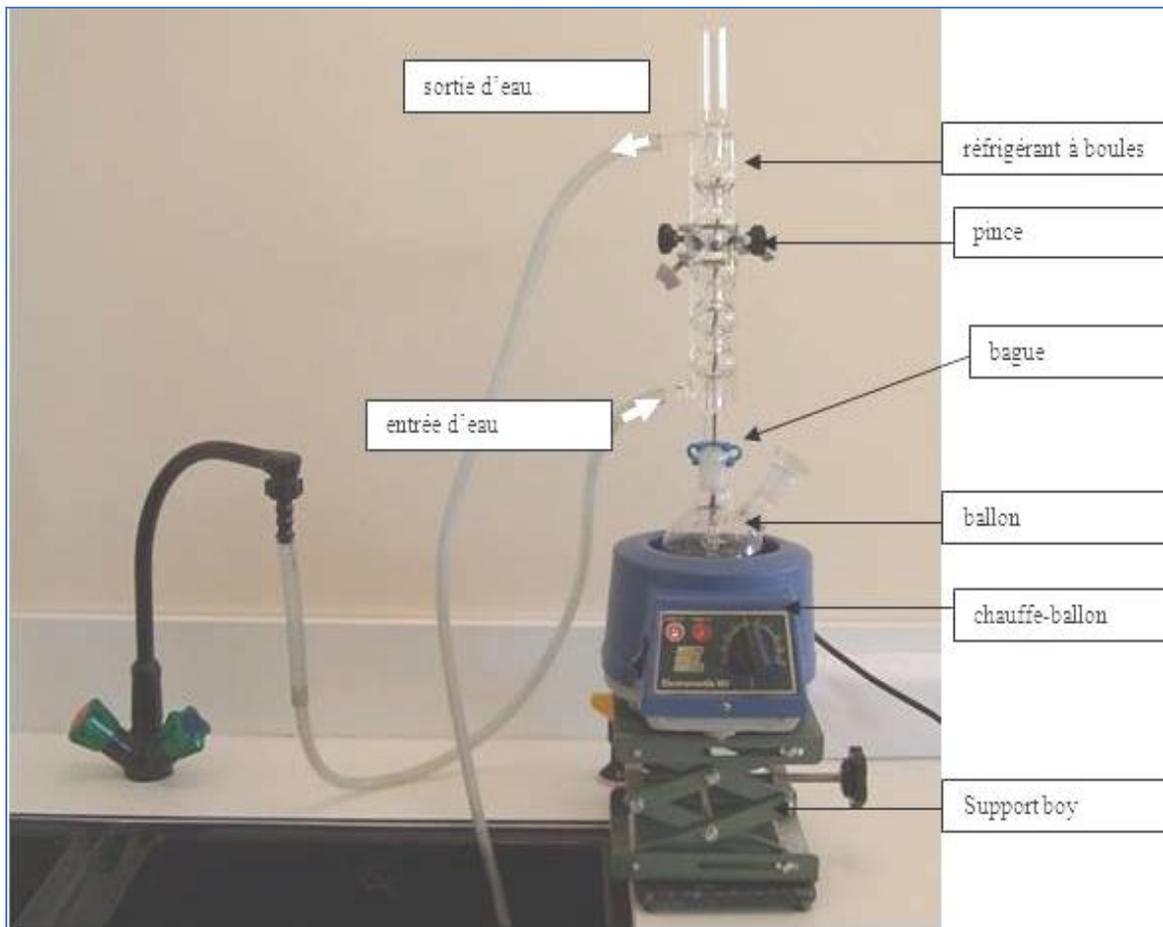


Fig. I.1 : Montage chauffage à reflux

I.1.2. Extraction Liquide-Liquide

I.1.2.1. Présentation

L'extraction liquide-liquide constitue une opération fondamentale en génie chimique. C'est un procédé qui permet la séparation de un ou plusieurs constituants d'un mélange en mettant à profit leur distribution inégale entre deux liquides pratiquement non miscibles. Les méthodes d'extraction se basent essentiellement sur le suivi d'équilibre, et donc le transfert de masse ne peut être ignoré. Dans l'industrie, l'extraction liquide-liquide concurrence les autres procédés, tels que la distillation, la cristallisation, l'adsorption...etc. Dans certains cas elle s'impose de manière indiscutable, notamment lorsque les conditions technologiques ou physico-chimiques lui sont favorables, comme c'est le cas pour [5]:

- La séparation de constituants à points d'ébullition voisins (séparation de certains hydrocarbures aromatiques et aliphatiques) ;
- La séparation de composés thermosensibles ou instables (antibiotiques) ;
- La concentration et la purification de solutions diluées, opération souvent plus économique que la distillation ;

En pratique, l'utilisation d'un procédé d'extraction liquide-liquide requiert deux opérations successives (Fig. I. 2):

- La mise en contact intime des deux phases liquides durant un temps suffisant à l'obtention de l'équilibre ou d'un état proche de l'équilibre et pendant lequel le ou les solutés sont transférés de la phase d'alimentation vers le solvant.
- Après leur contact, une séparation ultérieure des deux liquides (extrait et raffinat) sous l'effet de la gravité naturelle à laquelle peut s'ajouter, dans certains cas, la mise en œuvre d'autres forces : force centrifuge, champs électrique...etc.

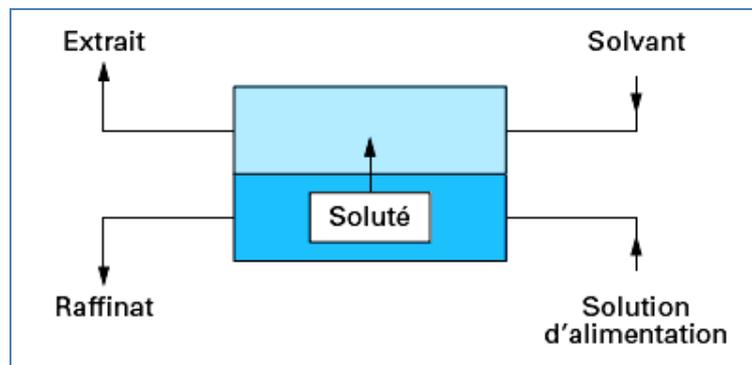


Fig. I.2 : Schéma de Principe de l'Extraction Liquide-Liquide (Etage théorique).

Les applications industrielles de l'extraction liquide-liquide se sont accrues rapidement depuis 25 ans. Le premier procédé utilisé dans l'industrie du pétrole fut le procédé EDLENU en 1907, il était destiné à éliminer les composés aromatiques des huiles de pétrole par traitement au dioxyde de soufre liquide [5].

Actuellement, l'extraction liquide-liquide joue un rôle très important dans divers secteurs industriels et ses applications couvrent les champs des industries de chimie organique, minérale, pétrochimique, nucléaire...etc.

Le Tableau 1 donne une vue schématique des différentes applications dans les industries mentionnées ainsi que l'état d'avancement en matière d'incorporation de cette technique.

Tableau I. 1 : Application de l'Extraction Liquide-Liquide [6].

Applications et Etat d'Activités de l'Extraction Liquide –Liquide						
Industrie	Pétrochimique	Chimique	Alimentaire et pharmaceutique	Métallurgique	Nucléaire	Environnementale
Applications	-production d'aromatiques –purification de pétrole – Alkylation	-synthèses de polymères, fibres, pesticides, herbicides	-Récupération des antibiotiques et vitamines – purification des produits génétiques	-Récupération et purification des métaux	-Traitement des déchets	Traitement des eaux polluées Récupération et recyclage de sous-produits
Activités	Optimisation des procédés	Optimisation et développement des procédés	Optimisation et développement des procédés	Recherche de solvants plus efficaces	Développement des procédés	Optimisation et développement des procédés

I.1.2.2. Propriétés de l'extractant

Le choix de l'extractant pour un procédé d'extraction liquide-liquide constitue une étape cruciale pour réaliser une extraction efficace. Généralement il est déterminé suite à un compromis entre des considérations technico-économiques et propriétés physico-chimiques, cependant il est impératif que l'extractant présente un certain nombre de caractéristiques, parmi lesquels on peut citer :

- Avoir un fort coefficient de distribution vis-à-vis du soluté à extraire
- Une faible solubilité ou pratiquement une insolubilité avec l'eau (si celle-ci représente la solution d'alimentation), ceci dans le but de minimiser la perte en solvant dans la phase raffiné et éviter que l'opération se transforme en un simple transfert de pollution.
- Une différence de masses volumiques de l'ordre de 10% entre les phases en présence (Organique et aqueuse) est requise [6]. Ceci dans le but d'assurer une décantation aisée. Souvent, un 2^{ème} élément est introduit dans la phase organique (diluant) afin d'en modifier la masse volumique de l'extractant (en l'augmentant ou en l'abaissant suivant son rapport à la masse volumique de l'eau).
- Une viscosité faible (moins que 3 mPa.s) [6]. la valeur de cette dernière conditionne la quantité d'énergie qu'il faudra fournir au système (agitation, pompes...) pour assurer une dispersion des phases favorable au transfert de matière.

- La tension inter-faciale joue un rôle important puisque elle aussi détermine l'efficacité de la dispersion, une tension inter-faciale trop élevée est défavorable à la dispersion réciproque des phases et par conséquent à un contact efficace. Par contre une valeur trop basse de la tension inter-faciale conduit à la formation d'émulsion stable : la décantation devient alors quasiment impossible.
- Une stabilité physico-chimique, l'extractant ne devra pas se dégrader sous l'effet d'une oxydation, d'une augmentation de la température ou du pH, il ne devra pas non plus participer à des réactions non réversibles avec les solutés.
- Pour la mise en œuvre du procédé, la toxicité, l'inflammabilité et la volatilité doivent être pris en considération. L'extractant utilisé doit être non toxique et non corrosif et pour éviter des pertes importantes, seuls extractants peu volatil peuvent intervenir dans un appareillage ouvert.
- Un extractant de point de congélation assez bas, afin qu'il ne cristallise ni ne précipite au cours de l'extraction, est aussi préférable.

Théoriquement, un extractant efficace devrait posséder pratiquement toutes les propriétés énoncées ci-dessus. Cependant il est rare qu'un seul composé recouvre à la fois toutes ces propriétés, raison pour laquelle il est souvent préférable de cibler juste une ou deux propriétés les plus importantes au regard du rendement de l'extraction (extractant présentant de fort coefficient de distribution par rapport à un soluté donné par exemple). Il est alors possible de remédier à la déficience des autres paramètres par ajout dans le système d'un second extractant ou de diluant [6-8].

I.1.2.3. Propriétés du Diluant

Souvent les extractants purs ne peuvent être utilisés seuls dans un procédé d'extraction liquide-liquide car leurs propriétés ne correspondent pas totalement ou en partie aux critères mentionnés précédemment. Dans ce cas l'ajout de diluant dans le système s'avère primordial. Deux types de diluant peuvent être utilisés :

- **les diluants inertes** qui sont utilisés essentiellement pour modifier les propriétés physiques de la phase organique. Ils n'interviennent pas au niveau chimique pour influencer l'équilibre liquide-liquide [9, 10].

- **Les diluants actifs** qui jouent un rôle au niveau du transfert du soluté entre les phases en modifiant la capacité de l'extractant et en empêchant la formation d'une 2ème phase organique en solubilisant le produit de l'interaction extractant-soluté.

- ❖ Les caractéristiques suivantes sont nécessaires pour le choix du diluant [11]:
 - insolubilité avec l'eau.
 - Faible viscosité.

- Masse volumique différente de celle de la phase aqueuse d'au moins 120 Kg m^{-3} .
- Une tension inter-faciale avec l'eau inférieure à 10 N m^{-1} .
- Une stabilité chimique et une absence de toxicité.
- Une température d'ébullition supérieure à 170°C dans le cas d'une élimination de l'eau par distillation.

Le mélange (extractant + diluant) constitue le solvant.

I.1.2.4. Classification des extractants

Les interactions rencontrées lors de l'extraction liquide-liquide sont diverses. Cette diversité est le fruit de types de réactions gouvernant le transfert du soluté. Classifient les phénomènes d'extraction en quatre catégories principales :

- Les extractants solvatants
- Les extractants échangeurs de cations
- Les extractants chélatants
- Les extractants échangeurs d'anions [12].

I.2. Techniques analytiques

I.2.1. Spectrophotométrie d'absorption dans UV-Visible

I.2.1.1 Principe de la spectrométrie ultra-violet

Parmi les nombreuses méthodes instrumentales utilisées pour déterminer la concentration d'une espèce chimique en solution, les méthodes les plus courantes sont celles basées sur la mesure de l'intensité d'absorption ou d'émission (spectrophotométrie) d'un rayonnement électromagnétique par les espèces à doser. Les rayonnements les plus souvent utilisés sont l'ultraviolet (UV), la lumière visible et l'infrarouge (IR). La

Spectrophotométrie est une méthode technique analytique qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Le domaine de longueur d'onde de l'UV se situe entre 10 nm à 400 nm , celui du visible se situe entre 400 nm à 800 nm (Fig. I. 3) [13].

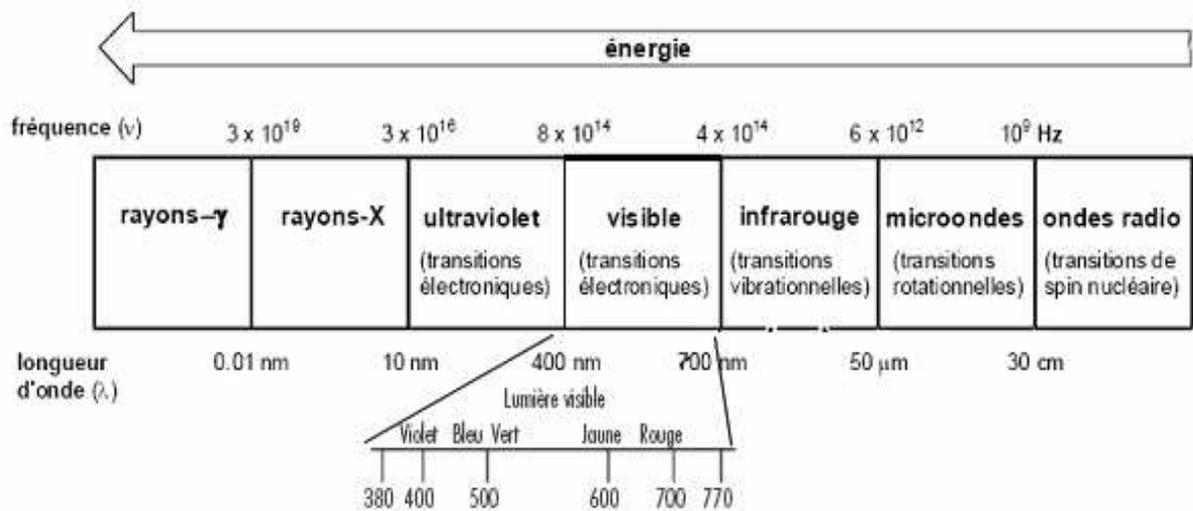


Fig. I.3 : Spectre électromagnétique de la lumière et domaine UV-visible (d'après [14]).

Le terme photométrie signifie que l'on mesure une densité de photons. En spectrophotométrie d'absorption moléculaire, on sélectionne des photons de fréquence ν_0 absorbables par la molécule à étudier. Ainsi, lorsqu'un faisceau d'intensité I_0 traverse une solution de molécule absorbante, le faisceau transmis présente une intensité I ($I < I_0$).

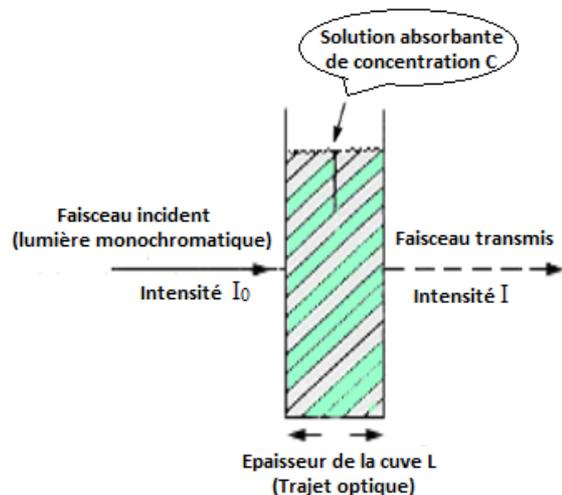


Fig. I.4 : Principe de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire [15].

Les applications analytiques de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible concernent les molécules en solution; elles peuvent être qualitatives ou (et) quantitatives. D'après la loi de Beer-Lambert, la relation existante entre l'intensité transmise I et l'intensité incidente I_0 dans la même direction est donnée par : $A = \log_{10} (I_0/I) = \epsilon \cdot C \cdot L$

A : Absorbance (densité optique)

I_0 : Intensité incidente de la lumière traversée.

I : Intensité de la lumière transmise.

ϵ : Coefficient d'extinction (d'absorption moléculaire $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

C : Concentration de la solution en soluté absorbable (mol/l)

L : Epaisseur de la solution traversée par le flux lumineux (cm)

La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique.

I.2.1.2. Aspect qualitatif

Les modifications, au niveau moléculaire, mises en jeu dans le domaine UV-visible correspondent à des transitions électroniques des électrons de liaison, permettant ainsi la caractérisation de la molécule elle-même et non des atomes qui la constituent. Il s'agit de transition d'électrons entre orbitales moléculaires [15].

Les groupements responsables de l'absorption UV-visible (chromophores) sont des groupements fonctionnels dans lesquels les électrons sont délocalisés (doubles liaisons conjuguées, noyaux aromatiques...).

I.2.1.3. Spectre UV-visible d'une molécule

Le spectre UV-visible d'une molécule en solution se définit comme la variation de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde (λ) de la lumière incidente. Un spectre est enregistré à partir d'une solution de concentration connue dans un solvant déterminé, dispose dans une cuve d'épaisseur calibrée. Une molécule pourra être caractérisée en spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible par la description de son spectre $A = f(\lambda)$, en précisant les maxima et minima d'absorption, et le coefficient d'extinction moléculaire aux longueurs d'ondes correspondantes, ainsi que le solvant [13-17].

Les principaux groupes chimiques actifs dans l'UV proche correspondent aux chromophores fondamentaux :

- Ethylénique, acétylénique
- Carbonyle, carboxylique et dérivés de ces acides (chlorure d'acide, anhydride, amide, ester)
- Dérivés nitres et azodérivés.

La présence de plusieurs chromophores isolés absorbants à la même longueur d'onde, augmente proportionnellement l'intensité d'absorption par simple effet d'additivité.

Par contre les modifications importantes des caractéristiques spectrales (ϵ et λ) résultent des effets de conjugaison, d'addition de solvant.

I.2.1.4. Intérêt analytique des spectres d'absorption UV-visible

Le spectre d'absorption UV-visible permet de caractériser une molécule. Il est, par conséquent, un des critères d'identification de la molécule. Toutefois, l'absorption dans l'UV-visible permet plutôt de caractériser des groupements fonctionnels, et non une molécule dans son ensemble. Ainsi, la spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV visible ne permet pas d'identifier de façon absolue une molécule, et les spectres des molécules d'une même famille chimique sont très proches donc difficiles à différencier.

I.2.1.5. Aspect quantitatif

La loi de Beer Lambert se prête à l'analyse quantitative dans la mesure où le signal mesure l'absorbance (A) est proportionnel à la concentration en soluté absorbant de la solution. La validité de la loi de Beer Lambert n'est vraie que dans certaines conditions [14-15] :

- Lumière monochromatique
- Concentration pas trop élevée
- Absence de fluorescence et diffusion négligeables (hétérogénéité)
- La substance ne doit pas donner lieu à des réactions chimiques sous l'effet du rayonnement incident
- La substance ne doit pas donner lieu à des associations variables avec le solvant

Par ailleurs, lorsque plusieurs substances absorbantes sont présentes en solution, on observe une additivité des phénomènes.

I.2.1.6. Méthodes de quantification

Pour tout dosage, le procédé d'étalonnage choisi doit essentiellement tenir compte d'un «effet de matrice» potentiel du milieu à doser. En effet, le milieu peut modifier le signal mesuré, ou contenir des substances absorbantes parasites, qui compte tenu de l'additivité de la loi de Beer Lambert, sont mesurés simultanément. Si le milieu à doser ne modifie pas le signal mesuré, un étalonnage simple peut être réalisé.

La gamme d'étalonnage :

- Elle consiste à préparer une série de dilutions d'une solution étalon "mère", à mesurer l'absorbance de chacune de ces solutions étalons "filles", puis à tracer la courbe d'étalonnage $A = f(c)$. L'absorbance de la solution à doser est mesurée dans les mêmes conditions, puis reportée sur la courbe d'étalonnage; on fait ainsi une

Détermination graphique de la concentration de la solution à doser (la gamme doit encadrer la valeur probable de la solution à doser) (Fig. I. 3).

- Elle permet de vérifier la linéarité, et tient compte des éventuelles erreurs de manipulation (tracé d'une droite statistique).

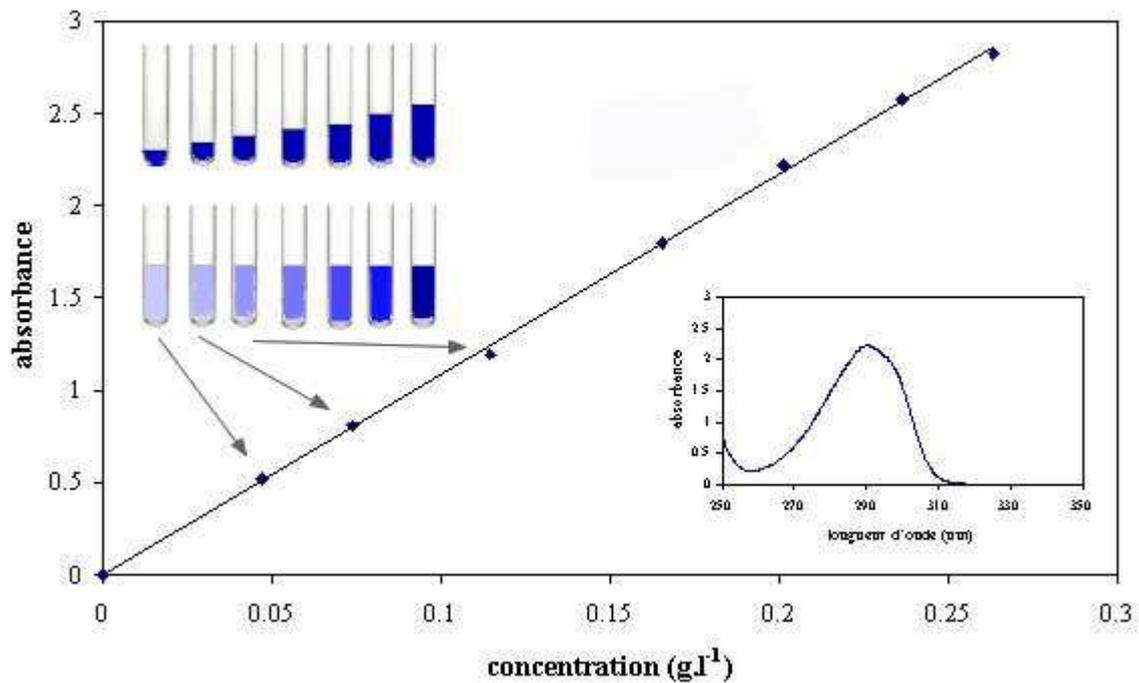


Fig. I. 5 : Principe d'une gamme d'étalonnage [17-18].

Si le milieu à doser modifie le signal mesuré, deux cas différents peuvent se présenter, aux quels correspondront deux procédés d'étalonnage différents.

- Les éléments du milieu modifiant le signal sont connus, leur concentration est connue et suffisamment constante. On prépare alors des solutions étalons artificielles comportant les dits éléments aux concentrations attendues.
- Les éléments du milieu modifiant le signal sont inconnus, on a recours à la méthode des «ajouts dosés ». Dans ce cas, on introduit un volume constant de la solution à doser dans tous les tubes, puis des quantités croissantes d'un étalon connu de l'élément à doser, de façon telle que le milieu soit homogène, et que le volume final soit constant dans tous les tubes.

I.2.1.7. Choix de la longueur d'onde

La longueur d'onde choisie pour les mesures quantitatives est théoriquement celle pour laquelle l'absorbance (A) est maximum c'est-à-dire aussi ϵ est maximum, ce qui correspond au maximum de sensibilité (à cette longueur d'onde, A varie beaucoup plus en fonction de la concentration). D'autre part, autour de cette longueur d'onde, ϵ varie peu ; ainsi, bien qu'on n'ait pas un faisceau rigoureusement monochromatique en pratique, la loi de Beer Lambert s'applique quand même.

I.2.1.8. Appareillage

Un appareillage classique comporte 5 éléments principaux :

- Une source de rayonnement continu
- Un système de sélection en longueur d'onde ou en fréquence (filtres absorbants, prismes en verre ou en quartz, réseaux plans ou concaves comportant une série de traits rectilignes parallèles équidistants gravés à la surface)
- Un compartiment pour l'échantillon (cuve en verre ou en quartz)
- Un récepteur (transforme la radiation en courant électrique)
- Un appareil de mesure éventuellement précédé d'un amplificateur

La figure I.6 montre le schéma simplifié et les constituants du spectromètre UV/Visible à barrettes de diodes (mono-faisceau-multi-canal).

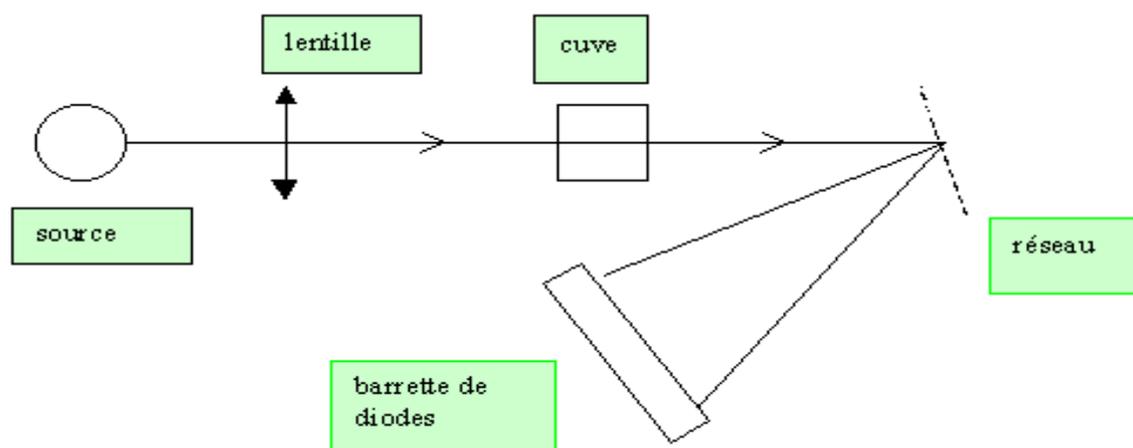


Fig. I. 6 : Spectrophotomètre mono-faisceau-multi-canal ou à barrette de diodes ([14-15]).

Ce type d'appareil ne comporte pas de monochromateur. La lumière poly-chromatique (blanche) de la source est envoyée sur la cuve qui en transmet une partie vers un réseau. Le réseau disperse cette lumière en différentes longueurs d'onde.

I.2.2. Spectrométrie infrarouge (IR)

I.2.2.1 Principe de la spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge (IR) est basée sur l'interaction de la lumière avec le nuage électronique des liaisons chimiques. Le principe repose sur le fait que les liaisons chimiques O-H, N-H, C-H, etc. se comportent comme des oscillateurs vibrant en permanence à des fréquences spécifiques. Ces liaisons peuvent absorber une radiation proche infrarouge dont la fréquence est égale à sa fréquence de vibration et ainsi passer d'un état fondamental à un état excité. Les transitions énergétiques se font entre les niveaux d'énergie de rotation des

molécules ou entre leurs niveaux d'énergie de vibration. La figure. I.7 présente la région du spectre infrarouge (IR).

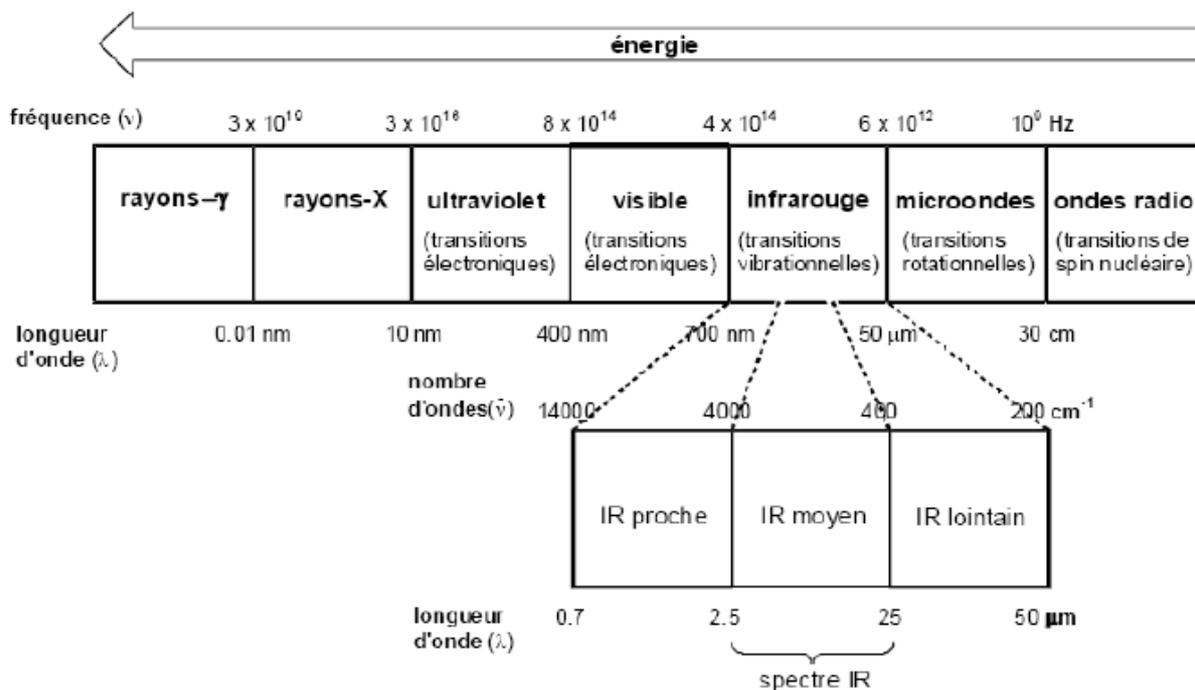


Fig. I.7 : Spectre électromagnétique de la lumière et domaine IR [14-16].

On se situe dans le domaine des grandes longueurs d'onde donc l'énergie individuelle des photons (hc/λ) est petite. Dans l'IR lointain (hc/λ très petite) : un photon incident sur une molécule n'aura qu'un effet très faible sur celle-ci : on aura des modifications des énergies de rotation de la molécule qui sont quantifiées. Dans l'IR moyen et proche (hc/λ un peu

Plus élevée) : un photon incident modifiera les énergies de rotation et en plus de vibration. Ces énergies de vibration sont également quantifiées. En effet, lorsque la molécule absorbe de l'énergie sous la forme d'un rayonnement IR, l'amplitude de ces vibrations est augmentée, le retour à l'état normal libère de la chaleur. Plusieurs modes de vibrations sont possibles pour un groupe d'atomes donnés. A chacun correspond une fréquence caractéristique, mais seuls les mouvements qui entraînent une variation du moment dipolaire électrique, donnent lieu à des bandes d'absorption IR. L'absorption du rayonnement IR par les composés organiques correspond à deux types principaux de vibrations atomiques :

- Modification des énergies d'oscillations des longueurs de liaisons = interactions de valence Elles se trouvent dans la zone du spectre IR de 4000 cm^{-1} à 1000 cm^{-1} .
- Modification des énergies d'oscillations des angles entre les liaisons = interactions de déformation.

I.2.2.2. Appareillage

Il existe 2 sortes de spectromètre IR:

- Le spectromètre à balayage
- Le spectromètre à transformée de Fourier.

Un spectromètre IR à balayage est composé des éléments suivants : une source, l'échantillon, un système dispersif, un détecteur.

Un spectromètre IR à transformée de Fourier (IRTF) est composé des éléments suivants : une source, un interféromètre de Michelson, l'échantillon, un détecteur

I.2.2.3. Intérêt analytique du spectre IR

La spectrométrie infrarouge (IR) s'utilise principalement pour l'analyse qualitative d'une molécule. L'intérêt du couplage de la spectrophotométrie UV-visible et IR permet d'améliorer la spécificité de l'identification des molécules par le spectre IR. Même si la majeure partie des analyses quantitatives sont réalisées dans l'UV-visible, la loi de Beer-Lambert est également applicable en quantification dans l'IR [14,16].

Synthèse
Bibliographique
Sur les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote hétérocyclique dans leur structure chimique. Les alcaloïdes sont principalement extraits des plantes fleurissantes, mais on les trouve également chez quelques animaux comme les fourmis, les grenouilles et les coccinelles [19]. Actuellement, la structure chimique d'environ 16 000 alcaloïdes, est connue. Ce sont des composés qui se caractérisent un degré variable de caractère basique, relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques [19].

II.1. Historique

Le terme alcaloïde (dérivé d'alcalin), l'origine de ce nom avait été donnée par W. Meissner, en 1819, aux substances végétales à caractère basique contenant un atome d'azote. La plupart des alcaloïdes possèdent une action biologique, le plus souvent sur le système nerveux. L'histoire des alcaloïdes débute en 1804 lorsque le chimiste allemand Paderborn découvre l'activité somnifère de l'opium. En 1817 la communauté scientifique s'intéresse à la question avec l'isolement de la morphine contenue dans l'opium par Sertürner. Par la suite, la strychnine puis la caféine furent découvertes respectivement en 1818 et 1819. A partir de l'année 1837, le chimiste suédois Jöns Jacob Berzelius, dans son dictionnaire de chimie, accorde une partie aux "sels des bases végétales" [20].

II .2.Les Alcaloïdes

II.2.1.Origine et répartition naturelle

Les alcaloïdes entrent dans le groupe dit des « métabolites secondaires », substances très variées qui ne sont pas impliquées dans les activités fondamentales des organismes. Certaines sont riches en alcaloïdes, comme les apocynacées, alors que d'autres ne comportent que quelques espèces alcaloïdifères (crucifères). Des familles importantes paraissent même en être dépourvues comme les primulacées ou les oléacées. Par ailleurs, les espèces tropicales sont particulièrement favorisées. Chez les monocotylédones, ce sont les liliacées et les amaryllidacées qui sont les mieux pourvues. Les gymnospermes recèlent les genres Ephedra (gnétacées) et Taxus (taxacées) et les cryptogames vasculaires quelques équisétacées (prêles) et lycopodiées, mais les fougères en sont dépourvues. Au total, de 10 à 15 % des plantes vasculaires sont alcaloïdifères. Les champignons, dont l'inventaire chimique est encore loin d'être complet, contiennent des alcaloïdes intéressants par leur activité biologique. C'est notamment le cas des ergots comme l'ergot de seigle (*Claviceps purpurea*), source de dérivés

d'une remarquable variété d'effets physiologiques. On citera également les amanites toxiques et divers champignons basidiomycètes (psilocybes, strophaires) hallucinogènes.

Des alcaloïdes, dont certains sont parmi les plus puissants poisons connus, sont élaborés occasionnellement par des animaux, notamment les amphibiens (batraciens), les insectes (fourmis, coccinelles, papillons) et les animaux marins (poissons, tuniciers, spongiaires, cnidaires). En fait, certaines espèces les accumulent aux dépens de leur alimentation. Des substances de nature alcaloïdique se retrouvent également chez quelques bactéries (*Proteus*, *Pseudomonas*), des actinomycètes et des algues monocellulaires (dinoflagellés) [21].

II.2.2. Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes

La masse moléculaire des alcaloïdes est généralement faible et dépasse rarement 1 000g/mol. La plupart sont des solides cristallisés. Quelques-uns se présentent sous forme de liquides volatils à la température ordinaire (nicotine, coniine, mescaline). L'amertume est un caractère quasi constant qu'il n'est cependant pas recommandé de vérifier en raison de la toxicité des produits. Les alcaloïdes sont, en général, insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants dits « organiques » (alcools, acétone, chloroforme, oxyde d'éthyle, etc.) tandis que leurs sels ont des caractères de solubilité inverses.

La couleur dépend du spectre d'absorption de la lumière, lié à la structure moléculaire : beaucoup absorbent les rayonnements dans le proche ultraviolet (U.V.) et, dans certains cas, cette absorption déborde sur le spectre visible, d'où une coloration jaune à orangé (berbérine, ellipticine), voire rouge (sanguinarine). Simultanément peut apparaître une fluorescence par absorption de rayons U.V. et réémission de lumière visible (quinine). L'existence d'atomes de carbone asymétriques dans leur structure confère à la plupart des alcaloïdes un pouvoir rotatoire, parfois élevé et caractéristique, par déviation du plan de la lumière polarisée. La plupart des alcaloïdes sont basiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent fixer un proton (ion H⁺) sur un atome d'azote. Les ammoniums quaternaires à azote tétra substitué (berbérine) possèdent d'emblée cette charge. Cette propriété est à l'origine de la formation des sels avec les acides. Elle est mesurée par la constante de dissociation

apparente (pKa) dans un solvant approprié (eau, méthyle cellosolve), caractéristique intéressante à connaître pour l'extraction et le fractionnement des alcaloïdes d'une plante.

En outre, les alcaloïdes possèdent, comme toute molécule organique, des spectres d'absorption dans l'infrarouge (I.R.), mis à contribution pour l'établissement de celle-ci. Ils servent également à des fins d'identification [22].

II.2.3. Réactifs généraux des alcaloïdes

Les réactifs généraux des alcaloïdes sont des solutions de complexes à base d'iode ou de métaux « lourds » qui donnent des produits d'addition insolubles avec les sels d'alcaloïdes (réactif iodo-ioduré de Bouchardat, réactifs iodomercurique de Mayer-Valser et iodobismuthique de Dragendorff, acides phosphomolybdique, phosphotungstique, silicotungstique, etc.). Ces réactions peuvent être très sensibles (la quinine est détectée à une concentration de 1/100 000) et sont couramment utilisées pour la mise en évidence des alcaloïdes pendant leur extraction ou pour en effectuer la recherche rapide dans des échantillons botaniques lors de la prospection de nouvelles plantes d'origine tropicale. Les réactifs généraux permettent également d'établir une frontière empirique entre les alcaloïdes stricto sensu et des molécules azotées voisines que l'on est tenté de leur rattacher mais qui donnent une réponse négative. Il existe également des réactions colorées spécifiques d'un groupe particulier d'alcaloïdes, comme celle de Vitali-Morin (atropine) [22].

II.3. Classification chimique des alcaloïdes

Les alcaloïdes ne constituent pas une catégorie définie de composés chimiques en raison de la variété de leurs structures moléculaires. Toutefois, d'une façon constante, ils possèdent un squelette hétérocyclique azoté, si l'on excepte quelques substances où l'azote est extra cyclique (colchicine, éphédrine). La classification la plus accessible est donc fondée sur la nature du système cyclique fondamental de la molécule, mais elle est purement descriptive. Les deux groupes de loin les plus importants sont représentés par les alcaloïdes isoquinoléiques (plus de 1 500) et indoliques (plus de 700) [23-25].

L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Une façon

Raisonné est alors de classer les alcaloïdes en groupes, selon leur précurseur biosynthétique.

Selon leur composition chimique et leur structure moléculaire, les alcaloïdes peuvent être regroupés en cinq classes [19] :

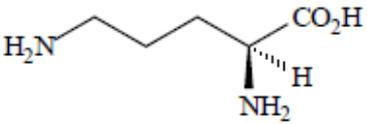
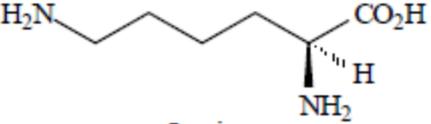
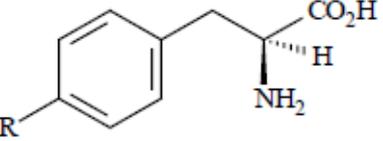
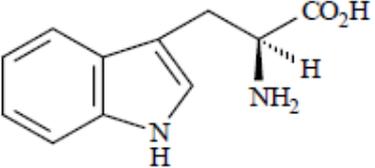
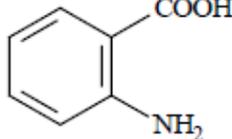
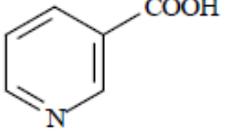
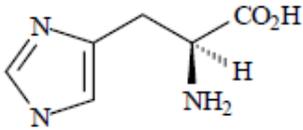
- Des phénylalanines: capsaïcine du piment, colchicine du colchique;

- Des alcaloïdes iso-quinoléiques : morphine, éthylmorphine, codéine et papavérine contenues dans l'opium du pavot; et des alcaloïdes indoliques: ergométrine, ergotamine, ergo-toxine de l'ergot des céréales se divisé en plusieurs groupes.
- Des alcaloïdes quinoléiques : tige feuillée de la rue commune.
- Des alcaloïdes pyridiques et pipéridiques : ricinine du ricin, trigonelline du fenugrec, conine (poison violent) de la ciguë.
- Des alcaloïdes dérivés du tropane : scopolamine et atropine de la belladone.
- Des alcaloïdes stéroïdes: racine de vétrate, douce-amère ou aconite (aconitine).

Le tableau 1, donne la classification de quelques types d'alcaloïdes selon leur précurseur acide aminé.

Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon l'espèce de la plante, ils s'accumulent uniquement dans les écorces, dans les racines, dans les feuilles ou dans les fruits. Dans la pomme de terre, les tubercules comestibles ne contiennent pas d'alcaloïdes, tandis que les parties vertes contiennent la solanine toxique (Fig. II.1 (a)). La partie dans laquelle les alcaloïdes s'accumulent n'est pas forcément celle où ils sont synthétisés. Dans le tabac par exemple, la nicotine (Fig. II.1 (b)) est produite dans les racines mais transférée ensuite vers les feuilles où elle est stockée [26].

Tableau. II. 1 : Description de quelques alcaloïdes selon leur précurseur acide aminé.

Acide aminé	Type d'alcaloïde
 <p style="text-align: center;">Ornithine</p>	<p style="text-align: center;">Pyrrolidines, pyrrolizidines, tropanes</p>
 <p style="text-align: center;">Lysine</p>	<p style="text-align: center;">Pipéridines, quinolizidines, indolizidines</p>
 <p style="text-align: center;">R = H , Phénylalanine R = OH , Tyrosine</p>	<p style="text-align: center;">Alcaloïdes du type éphédrine, iso-quinoléines</p>
 <p style="text-align: center;">Tryptophane</p>	<p style="text-align: center;">Indoles</p>
 <p style="text-align: center;">Acide anthranilique</p>	<p style="text-align: center;">Quinoléines, quinazolines, acridines</p>
 <p style="text-align: center;">Acide nicotinique</p>	<p style="text-align: center;">Pyridines</p>
 <p style="text-align: center;">Histidine</p>	<p style="text-align: center;">Imidazoles</p>
<p>Via animations</p>	<p>Alcaloïdes terpéniques et stéroïdiens</p>

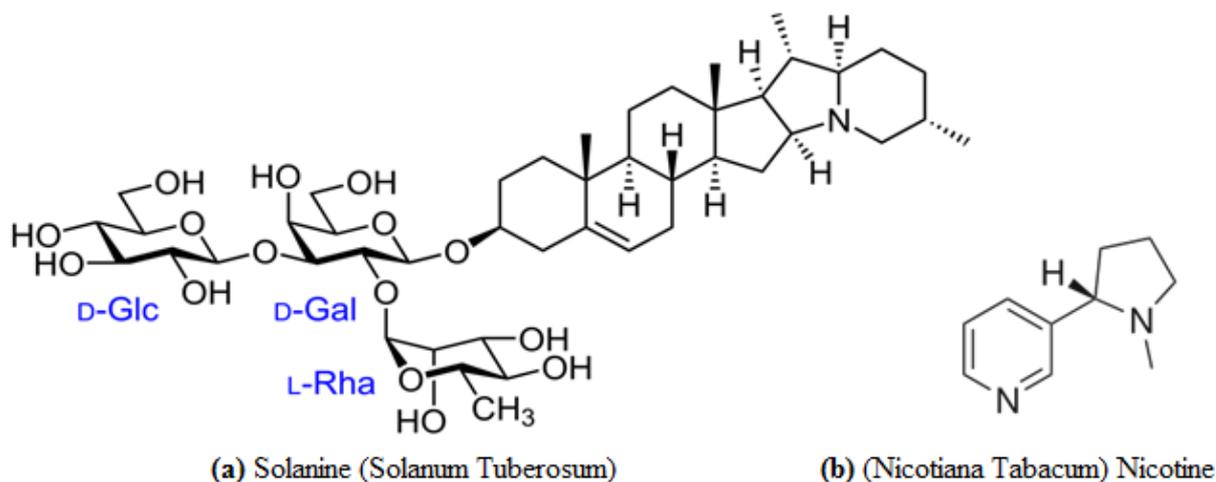


Fig. II.1 : Les alcaloïdes de pomme de terre et le tabac [26].

Le rôle des alcaloïdes dans les plantes est souvent inconnu, et leur importance dans le métabolisme de la plante n'est pas très bien définie. Une plante peut contenir plus de cent alcaloïdes différents, mais en général leur concentration ne représente pas plus de 10% du poids sec. L'existence de plantes ne contenant pas d'alcaloïdes démontre que ces composés ne sont apparemment pas essentiels à leur reproduction. Pourtant, plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent, un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes. La nicotine empêche la croissance des larves du tabac. En outre, des alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV. Ils constituent aussi une réserve de substances capables de fournir l'azote ou d'autres fragments nécessaires au développement de la plante [26,27].

II.4. Structure et activités biologiques de quelques alcaloïdes

Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité structurale. Leurs propriétés biologiques, aussi variées que leurs structures, continuent à être bénéfiques dans les traitements de différentes maladies ou des dysfonctionnements de l'organisme humain. Afin de donner un aperçu des différentes structures, nous présenterons ici un bref descriptif de quelques alcaloïdes les plus connus et cliniquement intéressants.

II.4.1. Alcaloïdes dérivés de l'ornithine

Dans ce groupe, les pyrrolizidines et les tropanes sont les plus importants. Les pyrrolizidines, très répandues dans la nature, sont présentes dans les plantes qui font partie des familles botaniques Asteracea, Boraginaceae, Fabaceae et Orchidaceae. Ils sont très

toxiques (souvent hépatotoxiques), ils ont déjà provoqué des empoisonnements de masse chez les humains et les animaux au milieu du siècle dernier [28,29].

Parmi les pyrrolizidines naturelles, la rétronécine (Fig. II.9. (a)) et la sénécionine (Fig. II.9. (b)) (Isolées de plantes de l'espèce *Senecio* et *Heliotropium*) sont les plus connues.

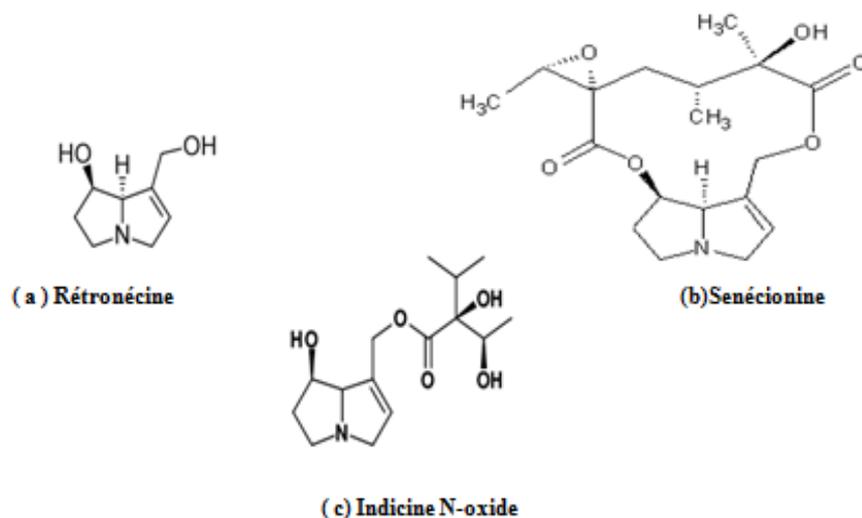


Fig. II.2: les alcaloïdes des pyrrolizidines et les tropanes [28,29].

Les pyrrolizidines peuvent être isolées sous la forme de base tertiaire ou sous la forme de N-oxide, mais c'est majoritairement sous cette seconde forme qu'elles sont présentes dans les plantes. On peut citer comme exemple l'indicine N-oxide (Fig. II.2 (c)), isolée d'*Heliotropium indicum*, qui s'est révélé être un agent antitumoral et anti-leucémique [23,25].

Dans la famille des tropanes, la (-)-hyoscyamine (Fig. II.3. (a)) et la (-)-hyoscine (ou scopolamine) (Fig. II.3 (b)) sont parmi les alcaloïdes les plus utilisés dans le domaine médical. Ils sont présents dans les plantes de l'espèce *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger* et *Mandragora officinarum*.

L'hyoscyamine n'est pas très stable, et se racémise facilement au cours de l'isolement pour conduire à l'atropine (Fig. II.3. (c)). Ces alcaloïdes ont des propriétés antispasmodiques dans le système gastro-intestinal et également des propriétés anti sécrétrices (utiles au cours des interventions chirurgicales). L'atropine est largement utilisée dans le domaine de l'ophtalmologie en tant qu'agent mydriatique (pour dilater la pupille) [23,28].

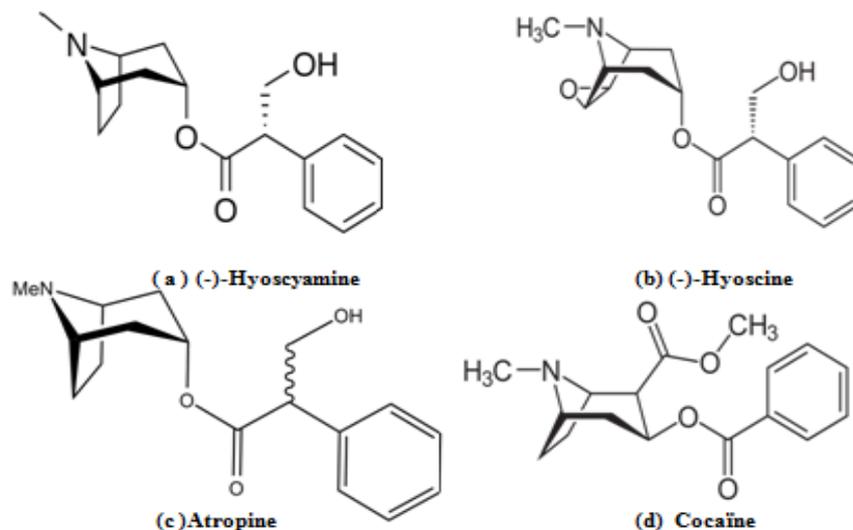


Fig. II.3: Les alcaloïdes présent *Atropa belladonna*, *Hyoscyamusniger* et *Mandragoraofficinarum* [23,25].

La cocaïne (Fig. II.3. (d)) est un alcaloïde peu abondant présent dans les plantes de l'espèce *Erythroxylum*. La source la plus importante de ce composé est l'*Erythroxylum coca*, utilisé depuis l'antiquité comme anesthésique local. Elle a été beaucoup utilisée dans le domaine de l'odontologie, mais aujourd'hui, en raison de ses propriétés neurotoxiques elle a été remplacée par d'autres drogues moins toxiques. Au cours des interventions chirurgicales des yeux, de l'appareil auditif, du nez et de la gorge, la cocaïne est encore largement utilisée. Associée à l'héroïne, elle est également efficace pour soulager la douleur chez les patients atteints d'un cancer, en phase terminale [30].

II.4.2. Alcaloïdes dérivés de la lysine

Dans ce groupe nous trouvons les composés pipéridiniques, quinolizidiniques et indolizidiniques.

La lobéline (Fig. II.11 (a)), extraite de la *Lobelia inflata*, est utilisée dans les préparations pour lutter contre le tabagisme [31]. L'extrait brut de la plante est largement employé dans le traitement de l'asthme et de la bronchite [32].

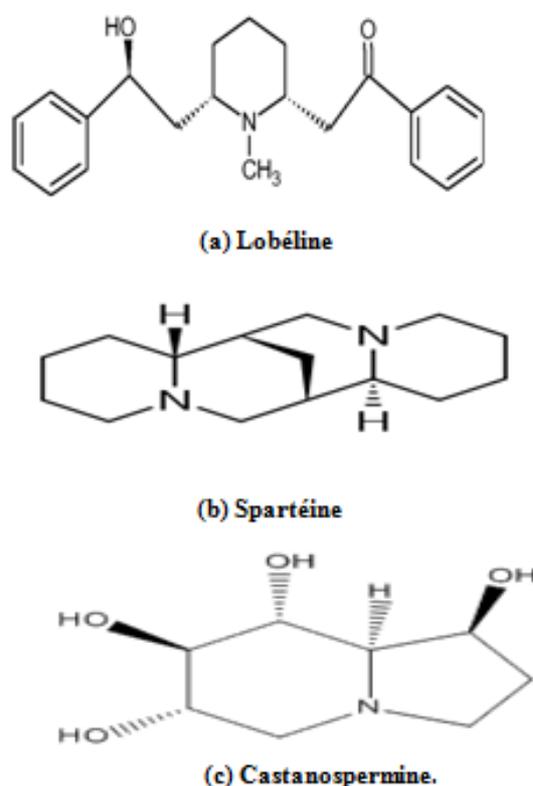


Fig. II.4: Les alcaloïdes de l'asthme et de la bronchite [32].

Les quinolizidines se rencontrent principalement dans les plantes appartenant aux familles de Leguminosae et Fabaceae. Ces alcaloïdes ont une action répulsive contre les herbivores et ils sont également connus pour provoquer des problèmes d'empoisonnement chez l'homme.

La spartéine (Fig. II.4 (b)), isolée de *Cytisus scoparius*, est très toxique mais le sel de sulfate correspondant est utilisé en médecine comme agent stimulant du rythme cardiaque [31]. Elle est également utilisée pour provoquer la contraction de l'utérus au cours de l'accouchement [32,33].

Les alcaloïdes indolizidiniques sont également présents dans les plantes de la famille des Leguminosae et Fabaceae. Parmi ces composés, les indolizidines poly-hydroxylées sont dotées de propriétés biologiques intéressantes. La castanospermine (Fig. II.4 (c)) (isolée de *Castanospermum australe*) et ses dérivés présentent un intérêt particulier en raison de leur action contre le virus du SIDA (HIV) [36].

II.4.3. Alcaloïdes dérivés de la tyrosine et de la phénylalanine

Les principales classes d'alcaloïdes de ce groupe sont des composés monocycliques simples comme l'éphédrine (Fig. II.5 (a)), les iso-quinoléines telles que la papavérine (Fig. II.5 (b)) et la berbérine Fig. II.5 (c)), les benzyl-tétra-hydro-iso-quinoléines modifiées telles que la morphine (Fig. II.5 (d)), et aussi les alcaloïdes de la famille des Amaryllidacées telles que la galanthamine (Fig. II.5 (e)).

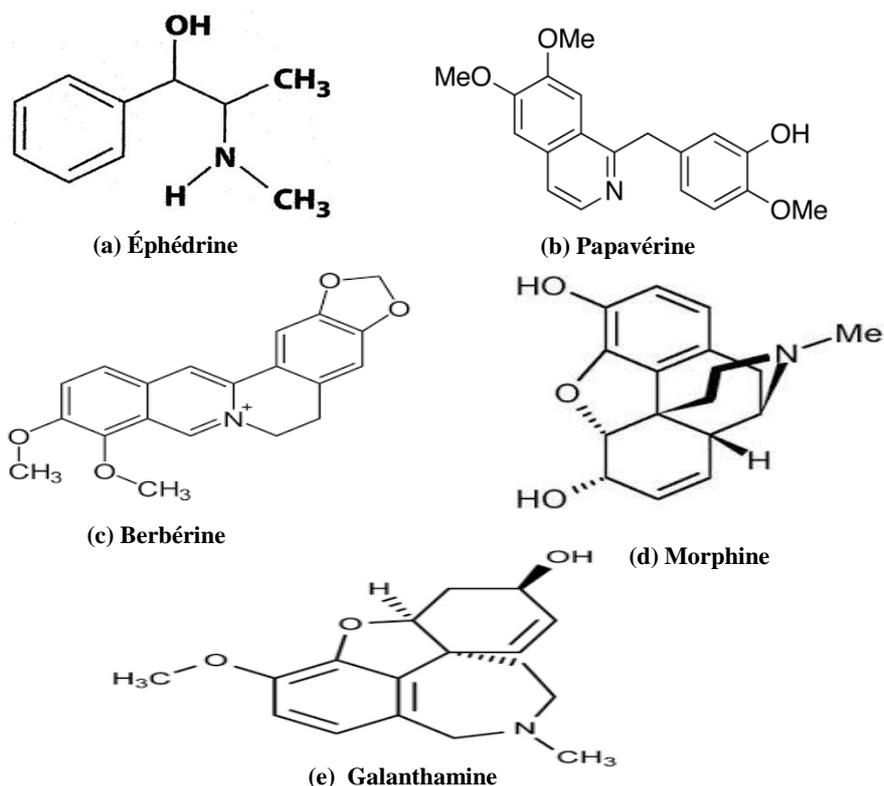


Fig. II.5 : Les alcaloïdes des composés monocycliques [25,30].

L'éphédrine (Fig. II.5 (m)), isolée d'*Ephedra sinica*, est utilisée avec succès dans le traitement de l'asthme bronchique et également comme médicament analgésique et antiallergique [25,30].

La papavérine (Fig. II.5(n)), isolée de *Papaver somniferum*, a une activité vasodilatatrice et des propriétés hypnotiques et analgésiques [25]. La berbérine (Fig. II.5 (o)), isolée de *Berberis vulgaris*, a des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes [37].

La très renommée morphine (Fig. II.5(p)), isolée de la plante de la famille des opiacées, le *Papaversomniferum*, reste encore à ce jour un des analgésiques les plus efficaces utilisés en médecine [23].

Et enfin, la galanthamine (Fig. II.5(q)) agit en tant qu'inhibiteur compétitif de la cholinestérase, et de ce fait utile dans le traitement de la maladie d'Alzheimer [25].

II.4.4. Alcaloïdes dérivés du tryptophane

Nous retrouvons ici les alcaloïdes indoliques, quelques structures quinoléiniques, les pyrrol-indoles et les alcaloïdes de l'ergot.

Parmi les indoles, ceux qui présentent une structure terpénoïde sont les plus répandus et également les plus complexes d'un point de vue structural. Les plantes des familles

botaniques Rubiaceae, Apocynaceae et Logoniaceae sont des sources riches en alcaloïdes de ce type.

La réserpine (Fig. II.6(a)), et l'ajmalicine (Fig. II.6 (b)), rencontrées dans les plantes de l'espèce *Rauwolfia*, sont toutes les deux efficaces dans le traitement de l'hypertension [25,30].

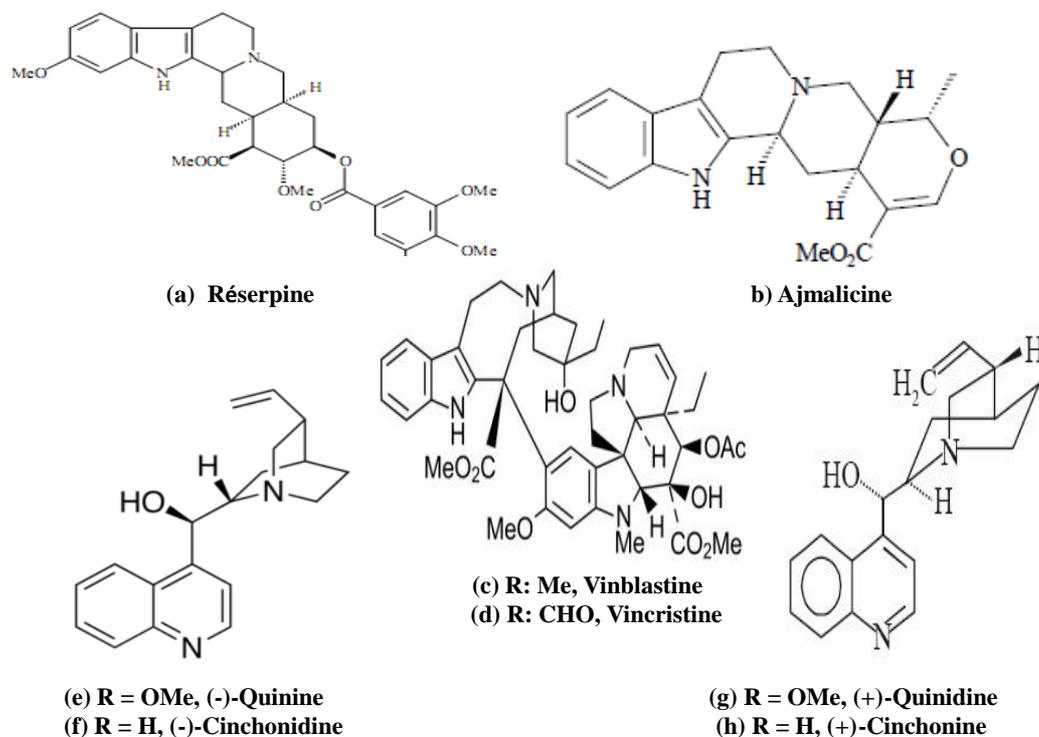


Fig. II.6: les alcaloïdes indoliques [25,30].

La vinblastine (Fig. II.6 (c)) et la vincristine (Fig. II.6 (d)), isolées de *Catharanthus roseus*, sont très populaires dans le domaine de la chimiothérapie anticancéreuse [25]. La première est particulièrement active dans le traitement de la maladie de Hodgkin, tandis que la deuxième est active dans les leucémies aiguës de l'enfant, avec un taux de rémission très élevé. Certains alcaloïdes quinoléiniques proviennent du réarrangement d'une structure indolique initiale. La quinine (Fig. II.6 (e)) la cinchonidine (Fig. II.6 (f)) la quinidine (Fig. II.6 (g)) et la cinchonine (Fig. II.6 (h)), isolées des plantes de la famille des Rubiacées, sont les exemples les plus classiques. Elles sont toutes actives contre le *Plasmodium falciparum*, l'agent responsable de la malaria, mais la quinine (Fig. II.6 (e)) reste la plus efficace. Cette dernière est également utile dans la prévention et dans les traitements de la crampe nocturne de la jambe.

La camptothécine (Fig. II.7), présentant une structure pyrroloquinoléinique, est également issue du réarrangement d'un motif pyridoindole. Ce composé penta-cyclique est également très populaire en chimiothérapie anticancéreuse [25, 38,39].

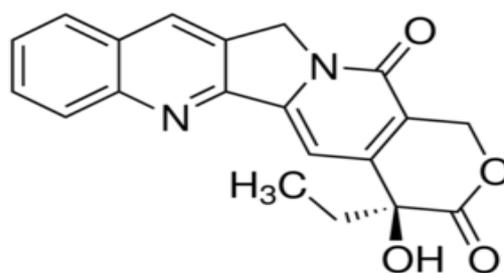


Fig. II.7 : Camptothécine de structure pyrroloquinoléinique [25].

Nous devons mentionner ici les alcaloïdes de l'ergot, produits principalement par des champignons parasites (*Claviceps*) et qui possèdent un large spectre d'activité pharmacologique. Toutefois, leurs nombreuses vertus médicales s'accompagnent souvent d'effets secondaires dangereux. L'acide lysergique (Fig. II.8(a)) est inactif, mais ses dérivés comme l'ergométrine (Fig. II.8 (b)) et l'ergotamine (Fig. II.8 (c)), sont très renommés. En obstétrique, ils sont employés depuis fort longtemps pour leur action sur le muscle utérin. Par leur action vasoconstrictrice, ils agissent sur le rythme cardiaque, la circulation sanguine (traitement de l'hypertension), le système nerveux et le cerveau [25,30].

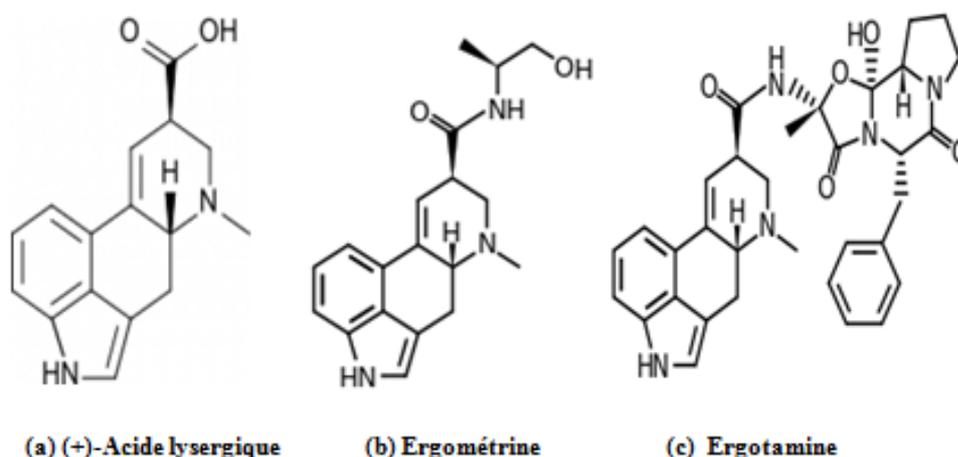


Fig. II.8: les alcaloïdes de l'ergot [25,30].

Le diéthylamide de l'acide lysergique (Fig. II.8 (a)) (le LSD), connu pour ses propriétés hallucinogènes, est utilisée en médecine psychiatrique [25].

II.4.5. Alcaloïdes dérivés de l'acide anthranilique

L'acide anthranilique contribue à l'élaboration de quinazolines, de quinoléines et également d'acridines. Pour donner quelques exemples dans ce groupe, nous pouvons citer la

fébrifugine (Fig. II.9 (a)) isolée de *Dichroa febrifuga*, et l'acronycine (Fig. II.9 (b)) isolée d'*Acronychia baueri*. La première présente d'excellentes propriétés antipyrétiques et antiparasitaires [38,39] tandis que la deuxième présente une activité antitumorale remarquable sur différents modèles de tumeurs humaines du poumon, du colon et des ovaires [42,43].

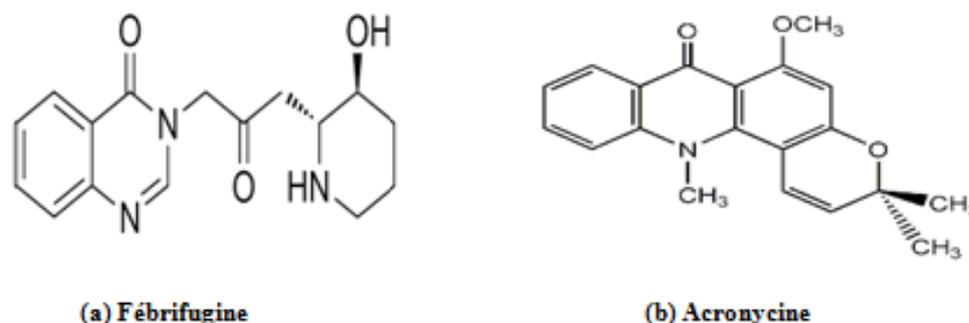


Fig. II.9: les alcaloïdes de tumeurs humaines du poumon, du colon et des ovaires [42,43].

II.4.6. Alcaloïdes dérivés de l'acide nicotinique

Les composés de cette série comportent une structure pyridine centrale et se trouvent principalement dans les feuilles du tabac. Les représentants majeurs sont la nicotine (Fig. II.10 (a)) qui présente un motif Pyrrolidines, et l'anabasine (Fig. II.10 (b)) qui présente un motif pipéridine. On trouve quelques utilisations bénéfiques de la nicotine en tant que stimulant respiratoire ou encore comme agent aidant le processus de sevrage tabagique. Des études plus récentes ont montré que la nicotine pouvait améliorer la mémoire, en stimulant la transmission d'impulsions nerveuses. Cela peut d'ailleurs expliquer la faible incidence de la maladie d'Alzheimer chez les fumeurs [25,34].

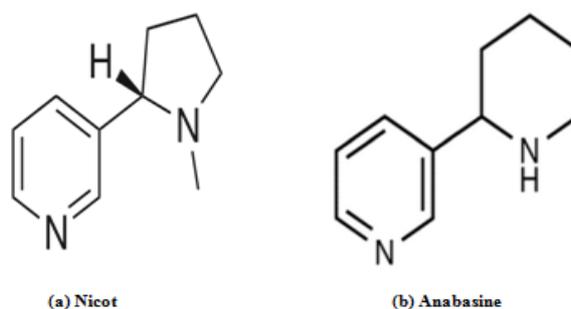
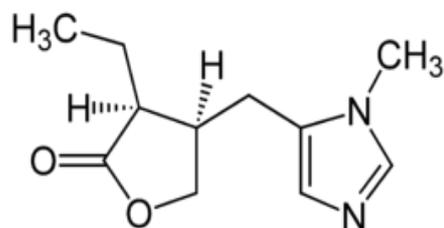


Fig. II.10: Les alcaloïdes de tabac [25,34].

II.4.7. Alcaloïdes dérivés de l'histidine

L'histidine comporte un motif imidazole et il est donc probable que cet acide aminé soit le précurseur des imidazoles naturels. Mais peu d'évidences confirment de façon

définitive cette hypothèse. Un composé de ce groupe, important dans le domaine médical, est la pilocarpine (Fig. II.11(a)), utilisée en ophtalmologie dans le traitement du glaucome [33].



(a) Pilocarpine

Fig. II.11:alcaloïde dans domaine médical et de traitement glaucome [33].

II.4.8. Alcaloïdes produits à partir de réactions d'amination

Les alcaloïdes terpéniques et les alcaloïdes stéroïdiens entrent dans cette catégorie. La Solasodine (Fig. II.12(a)) isolée de *Solanum laciniatum*, et la Bufaline (Fig. II.12 (b)) isolée d'une grenouille, sont intéressants d'un point de vue pharmacologique, en raison de leurs propriétés anticancéreuses. Tandis que la Solasodine est utilisée dans le traitement de certains cancers de la peau [44], la Bufaline est active contre la leucémie, les tumeurs hépatiques et le cancer de la prostate [45].

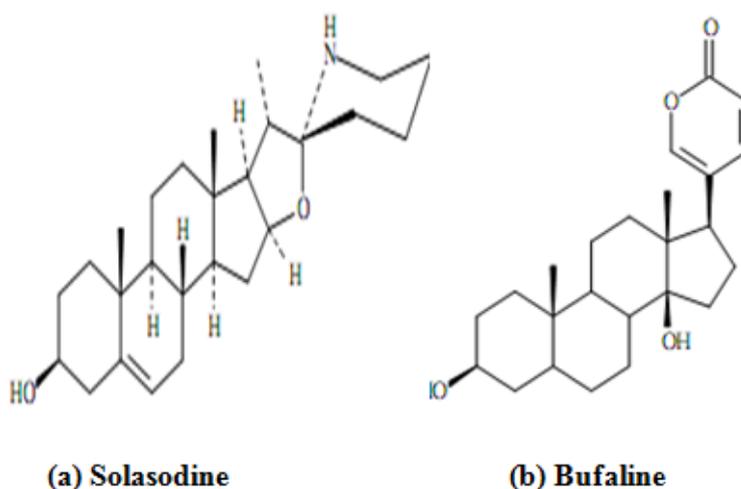


Fig. II.12: Les alcaloïdes terpéniques et les alcaloïdes stéroïdiens [45].

II.5. Conclusion

Ce deuxième chapitre a montré d'une manière générale la grande diversité d'alcaloïdes que nous pouvons trouver dans la nature, mais surtout les propriétés pharmacologiques de quelques alcaloïdes utilisés en médecine au bénéfice des humains.

III. Etude
bibliographique sur la
caféine et la théobromine

Ce chapitre concerne l'étude bibliographique de la caféine et de la théobromine. Dans un premier temps des notions générales sur ces deux matériaux sont présentées, et ce en abordant leur description, leurs caractéristiques physico-chimiques, leurs répartition dans le monde végétal, leurs teneurs dans certains produits. Le deuxième volet dans ce chapitre a été consacré à la présentation des domaines de leurs utilisations et leurs effets.

III.1. La caféine

III.1.1. Historique

La caféine a été isolée pour la première fois en 1819 par un physicien allemand, du nom de Friedlieb Ferdinand Runge. C'est la découverte de la caféine.

- En 1821, la caféine est décrite par Pierre Joseph Pelletier et Pierre Jean Robiquet.
- En 1827 Oudry isole la théine du thé.
- Et en 1838, il est démontré que la théine est la même substance que la caféine.
- Vers la fin du XIXème siècle, Hermann Emil Fischer élucide la structure de la caféine [46].



Fig. III.1 : les grains de café [46].

III.1.2. Description de caféine

La caféine est un alcaloïde (substance organique d'origine végétale comme la morphine, la nicotine) de la famille des méthylxanthines (inhibiteurs) qui agit comme stimulant psychotrope (substance qui agit principalement sur le système nerveux central en y modifiant certains processus). Elle est présente dans un grand nombre de produits tels que le thé, le café, le chocolat etc..., Ainsi que dans certains sodas (Coca Cola, etc...).

Elle agit principalement au niveau du système nerveux central : c'est un stimulant cortical (qui agit sur les hémisphères du cortex cérébral). La caféine stimule l'état d'éveil, facilite

L'idéation (processus de création d'une idée) et diminue la sensation de fatigue. Elle stimule le centre respiratoire bulbaire (contrôle la ventilation) en augmentant sa sensibilité.

Sa formule brute est $C_8H_{10}N_4O_2$ et sa formule topologique est la suivante :

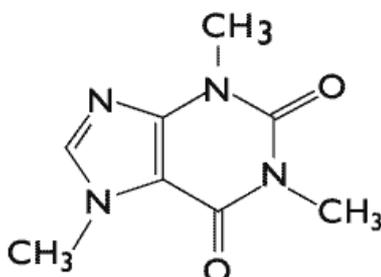


Fig. III.2 : structure de caféine [46].

De son vrai nom IUPAC 3,7-di-hydro-1, 3,7-trimethyl-1H-purine-2,6-dione, la structure de la caféine a été découverte par Emil Fischer. Il réalisa la synthèse à la fin du XIXe siècle.

Ainsi, trois groupes méthyle $-CH_3$ remplacent les atomes d'hydrogène placés au niveau de l'atome d'azote de la xanthine.

Cette molécule est proche de la théophylline et de la théobromine. Ces trois molécules (caféine, théophylline, théobromine) appartiennent au groupe des méthylxanthines et possèdent ainsi de grandes parentés chimiques [46].

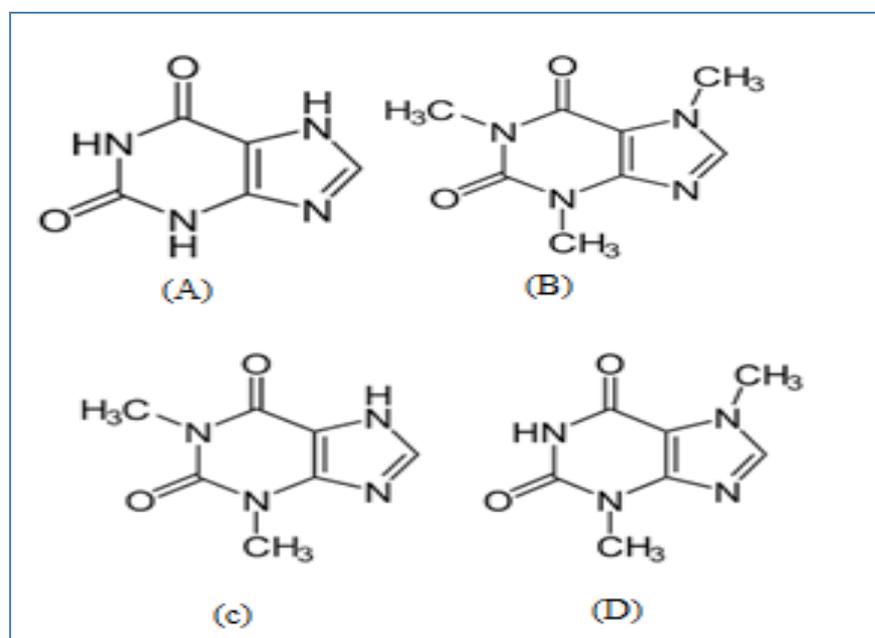


Fig. III.3 : Structure de différentes molécules: Xanthine (A), caféine(B), Théophylline(C), théobromine(D) [46].

Comme beaucoup d'alcaloïdes produits par les plantes, la caféine serait à la fois un pesticide naturel détruisant les insectes s'attaquant à la plante et un inhibiteur de la germination des

graines autres que celles produites par la plante, lui offrant ainsi une meilleure chance de survie [46].

III.1.3. Caractéristiques physico-chimiques de la caféine

La caféine est une poudre blanche ayant un goût extrêmement amer. Elle peut être extraite des plantes ou synthétisée de manière chimique [47].

Les principales caractéristiques physico-chimiques de la caféine sont les suivantes [48] :

- Poids moléculaire : $194,2 \text{ g.mol}^{-1}$.
- Point de sublimation (pression atmosphérique) : 178°C .
- PH d'une solution aqueuse à 1 % massique [48] : 6.9.
- Base très faible formant des sels instables avec les acides, assez stable dans les

Solutions acides diluées et les solutions basiques.

- Moyennement soluble dans l'eau et les solvants organiques.
- Solubilité accrue dans les solvants organiques : benzoate, cinnamates, citrates,...
- Inodore, incolore (en solution), goût amer caractéristique [48].

III.1.4. Répartition de la caféine dans le monde végétal

La caféine est retrouvée dans plusieurs espèces végétales de différentes familles originaires d'Amérique du Sud principalement mais aussi d'Asie et d'Afrique.

La caféine est souvent accompagnée d'autres alcaloïdes, notamment des méthylxanthines comme la théobromine et théophylline [49].

- **Le caféier, *coffea sp. arabica et canephora (robusta)*** : grain de café séché (la torréfaction diminue la teneur en caféine) 0.6-2% pour l'arabica, et 3 - 4,5% pour le robusta.



Fig. III.4: Planche d'herbier représentant *coffea arabica et canephora* (robusta) [49].

- **Le théier, *Camellia sinensis*:** Feuilles thé séchées ; on distingue thé vert et thé noir car la fermentation influe de manière importante sur leur composition : environ 2.2% de caféine pour le thé vert, et jusqu'à 4% dans le thé noir.



Fig.III.5 : Planche d'herbier représentant *Camellia sinensis* [49].

- **Le Cacaotier, *Theobroma cacao* :** fève de cacao (le **cacao** est la poudre obtenue après torréfaction et broyage de l'amande des fèves de cacao fermentées) : de 0.05-0.30% de caféine [49].



Fig. III.6 : Planche d'herbier représentant *Theobroma cacao* [49].

- **Le Guarana, *Paullinia cupana*:** Amande du grain séché, et c'est la drogue la plus riche en caféine, de 2,0-5,8%.



Fig. III.7: Planche d'herbier représentant le Guarana, *Paullinia cupana* [49].

- **Le Maté, *ilex paraguariensis*:** Feuilles séchées, de 0,3-2,4% de caféine.



Fig. III.8 : Planche d’herbier représentant *ilex paraguariensis* [49].

- **Noix de Kola, *cola acuminata***: Graines séchées, environ 1,5-3% de caféine.



Fig. III.9 : Planche d’herbier représentant *cola acuminata* [49].

III.1.5.Teneurs en caféine de certains produits

Le tableau 1 regroupe des teneurs en caféine de certains produits (boissons et aliments)

Tableau III. 1 : Teneurs de Caféine dans certains produits [50].

Type de boisson	Quantité de caféine pour 100 ml de boisson	Remarques
Café filtre	50-120 mg	L’arabica contient deux fois plus de caféine que robusta .le contenu d’une tasse peut atteindre 250 ml.
Café espresso	30-110 mg	Il est de même que pour le café filtre
Café soluble	20-80 mg	Le café soluble a une teneur plus proche de celle du thé.
Café décaféiné	1-5 mg	Le décaféiné contient tout de même de la

		caféine.
Thé	15-25 mg	Dans le thé, les effets de la caféine sont un peu atténués du fait de la présence des tanins
Boisson au cola	10-12 mg	Indice pour une boisson standard
Boisson aromatisée au thé	1.5-8 mg	/
Chocolat au lait	3-10 mg	Les tablettes de chocolat en contiennent aussi.

III.1.6. Mode d'Action

La caféine présente dans le thé et le café, à consommer avec modération, aide à combattre la fatigue et la somnolence. Son action pharmacologique passe par un antagonisme avec les récepteurs d'un neuromodulateur : l'adénosine.

L'adénosine est présente dans toutes les cellules de l'organisme. C'est un acide organique qui a la fonction d'hormone chez certains êtres vivants. Elle est à l'origine de la sensation de fatigue. Elle est formée d'un sucre (ribose ou désoxyribose) et d'adénine.

L'adénosine est un neuromodulateur c'est-à-dire une substance chimique qui permet de modifier la libération des neurotransmetteurs ou de modifier leurs récepteurs afin de changer leur sensibilité. Quand l'adénosine se fixe sur ces récepteurs, l'activité nerveuse est ralentie et nous devenons somnolents. L'action de l'adénosine se fait entre les neurones dans le système nerveux central [46].

III.1.7. Pharmacocinétique

La demi-vie de la caféine (temps pris pour que le fuselage élimine moitié de la caféine) varie considérablement entre les gens, selon des facteurs tels que l'âge, le poids corporel, le mode de grossesse, l'admission de médicament et la santé de foie. Dans les adultes sains, la demi-vie est approximativement 5 à 6 heures. Le tabac Lourd peut diminuer la demi-vie de la caféine par jusqu'à une moitié et dans la grossesse, la demi-vie peut être augmentée par pas moins de 15 heures.

La Caféine est traitée ou métabolisée dans le foie par le système d'enzymes d'oxydase du cytochrome P450 et décomposée en trois diméthylxanthine métaboliques. Ceux-ci comprennent :

- Paraxanthine (formes 84%), qui décompose des graisses et augmente des taux sanguins de glycérol et de graisses.
- Théobromine (formes 12%), qui dilate des vaisseaux sanguins et a également un effet diurétique, augmentant la miction.

- Théophylline (formes 4%), qui dilate les voies aériennes et est utilisée dans la demande de règlement de l'asthme.

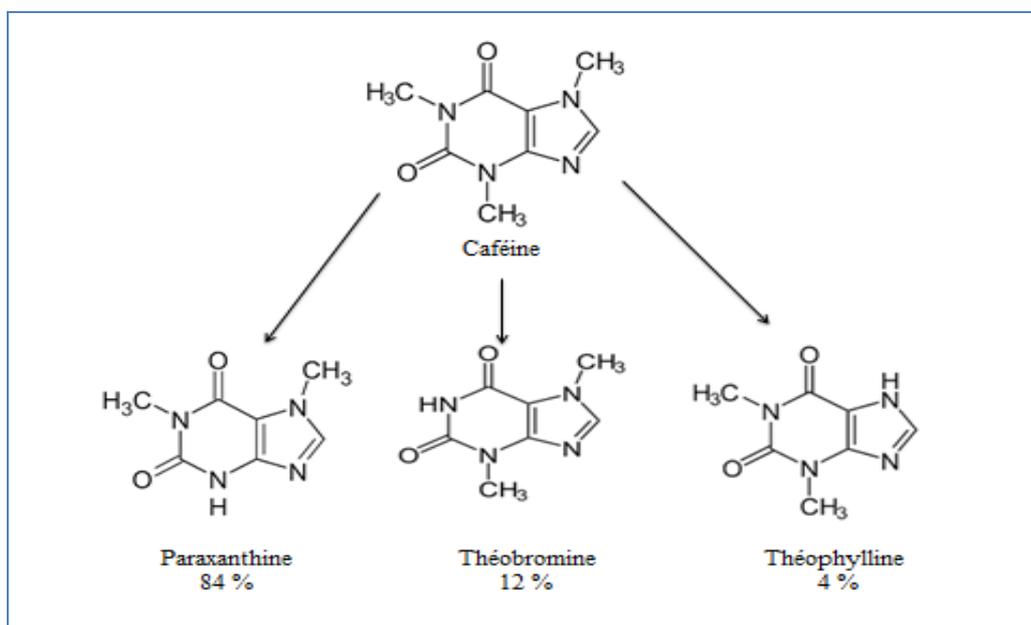


Fig. III.10 : Métabolisation de caféine [47].

Ces métabolites sont alors décomposés et excrétés encore dans l'urine. La Caféine croise la barrière hémato-encéphalique, qui est conçue pour séparer le cerveau de la circulation sanguine. Une Foix à l'intérieur du cerveau, la caféine bloque les effets de l'adénosine, qui joue une part importante dans la promotion de transfert d'énergie et de sommeil [47].

III.1.8. La caféine en milieu pharmaceutique

La caféine est moins connue pour être utilisée dans les milieux pharmaceutiques, effectivement la caféine est utilisée comme traitement contre la migraine. On en trouve également dans certains antalgiques, dans de nombreux remèdes contre le rhume et bien sûr dans les stimulants [50].

III.1.8.1 La caféine dans les médicaments

On trouve de la caféine dans une vingtaine de médicaments et compléments alimentaires : antimigraineux (100 mg dans un comprimé de Gynergène Caféiné®), antalgiques (50 mg par comprimé de Claradol Caféine®, 62,5 mg par gélule de Migralgine®), stimulants (50 mg par comprimé de Guronsan®), anti-mal de mer (10 mg par comprimé de Mercalm®), vasodilatateurs (40 mg de caféine par comprimé de Vasobral®) [50].



Fig. III.11 : Les médicaments.

III.1.9.Effets de la caféine

III.1.9.1. Effets négatifs

Certains effets communs d'une consommation excessive de caféine comprennent les maux de tête, la fatigue, l'anxiété, les sauts d'humeur, des vomissements, des nausées, des palpitations, l'agitation, des tremblements musculaires ainsi que des troubles du sommeil. Mais des autres effets négatifs graves dus à une consommation excessive de caféine existent :

- La caféine augmente la glycémie.
- La caféine augmente la pression artérielle et peut provoquer des arythmies cardiaques.
- L'insomnie est aussi un effet de la caféine sur le corps durant les périodes de sommeil.
- La caféine contient un effet diurétique (tendance à uriner plus souvent) (car elle est stimulante).
- En excès, la caféine peut donner une carence en calcium et peut même conduire à l'ostéoporose [49].

III.1.9.2. Effets positifs

Tous ces effets sont différents pour chaque individu :

La caféine qui a des effets neuroprotecteurs, La caféine a une action vasoconstrictrice sur les vaisseaux du cerveau, elle diminue l'intensité et la durée des migraines,

La caféine a aussi la propriété de stimuler la vigilance, la réactivité et l'attention.

- La caféine peut être utile dans le traitement de réactions allergiques - Améliorer la respiration des personnes souffrant d'asthme léger à modéré.
- La consommation de caféine réduit l'appétit et lutte contre la constipation.
- La caféine stimule la sécrétion de bile par la vésicule biliaire, la sécrétion de suc pancréatique ainsi que la sécrétion acide de l'estomac le suc gastrique.
- La caféine exerce une action diurétique et améliore le volume mictionnel (évacuation d'urine) sans modifier le débit urinaire de pointe [48].

III.2. La théobromine

III.2.1.Historique

Pour la petite histoire molécule de théobromine est longtemps restée méconnue des scientifiques, avant d'être extraite de graines de cacao pour la première fois en 1878, ensuite les scientifiques réussissent à la synthétiser en laboratoire. En dépit de son nom elle ne contient d'atome de brome, son nom est composé de racines grecques "Théo" signifie "Dieu", et "Broma" signifie "Nourriture", auxquelles on a ajouté le suffixe "-ine" donné aux alcaloïdes et autre composés basiques contenant l'azote.

Dans le chocolat, la quantité de théobromine dépend de la pureté du chocolat, c'est-à-dire de sa teneur en cacao. Elle reste sans danger pour l'homme car elle contient en enzyme capable de la dégrader, cependant celle-ci est absente chez les animaux comme le chien et le chat pour lesquelles l'absorption de la molécule peut être mortelle. Sa quantité trouvée dans le chocolat est suffisamment faible pour qu'il puisse être en toute sécurité consommé par les humains.

La théobromine est responsable des vertus du chocolat sur l'humeur du consommateur [51].



Fig. III.12: Les grains de cacao [51].

III.2.2. Théobromine et chocolat

Le fruit du cacaoyer, la cabosse, contient les fèves de cacao qui permettront la création du chocolat. La fève est fermentée, torréfiée, puis broyée jusqu'à former une pâte de cacao ductile dont on extrait les matières grasses, c'est-à-dire le beurre de cacao. Le chocolat est ainsi composé, dans des proportions variables, de pâte de cacao, de beurre de cacao, et de sucre [52].

III.2.3. Description de la théobromine

Comme l'indique son nom en « ine », la théobromine est un alcaloïde tout comme la morphine ou la codéine dont nous parlerons également. Ces deux molécules le montrent d'ailleurs : les alcaloïdes ont des propriétés parfois thérapeutiques, comportent des atomes d'azote, sont basiques et sont des composés dits "organiques" puisqu'ils possèdent au moins un atome de carbone lié à un atome d'hydrogène.

La théobromine est un alcaloïde organique qui se caractérise par son groupement CH et ses atomes d'azotes qui sont au nombre de quatre (4N). Elle est composée de deux séries d'atomes liés par assemblage. La molécule de théobromine peut être soit bicyclique soit hétérocyclique, qui signifie que les cycles ne sont pas simplement composés de carbone mais aussi d'autres atomes, en l'occurrence l'azote (N) [53].

III.2.4. Les propriétés chimiques essentielles de la molécule de théobromine

La théobromine est une poudre incolore microcristalline, en fines aiguilles, inodore, a saveur amère, elle est pratiquement insoluble dans l'eau mais devient soluble en présence d'hydroxydes d'alcalins, de salicylate, de benzoate de sodium. Elle est très peu soluble dans l'éthanol et le chloroforme, insoluble dans l'éther, le benzène et la plupart des solvants organiques au contraire de la caféine et la théophylline. Elle est soluble dans les acides minéraux dilués elle sublime à 220 °C.

Formule brute : $C_7H_8N_4O_2$

Formule semi-développée de la théobromine :

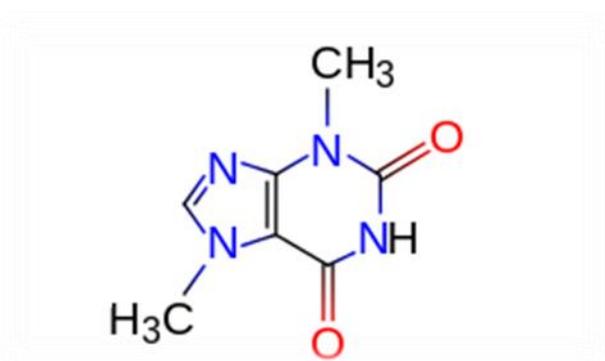


Fig. III.13: structure de théobromine [53].

- Température de fusion : 345 à 350°C
- Masse molaire : 180,16 g.mol⁻¹
- Solubilité : peu soluble dans l'eau, mais forte en pH basique et éthanol.

Cette molécule appartient au groupe des purines comme toute molécule azotée et hétérocyclique possédant un cycle-pyrimidine allié à un cycle imidazole. Ces deux cycles s'identifient d'ailleurs sur la formule semi-développée ci-dessus, de gauche à droite. Les purines sont particulièrement présentes dans les molécules biologiques ; on les trouve dans des molécules comme celles composant l'ADN et l'ARN (Adénine, Guanine) [53].

III.2.5. Teneurs en caféine de certains chocolats

La quantité de théobromine présente dans le chocolat que nous mangeons variée selon la pureté de celui-ci, la théobromine provient du cacao lui-même, un chocolat à forte teneur en cacao va contenir plus de théobromine qu'un chocolat blanc, ou qu'un chocolat dont la quantité de cacao sera à nuancer avec sa quantité en autres aliments (noisettes, orange, menthe...). Le tableau 2 regroupe des teneurs en caféine de certains chocolats.

Tableau III. 2 : Teneurs de Théobromine dans certains chocolats [54].

Type de chocolat	Quantité moyenne de théobromine en gramme pour 1 kilo de chocolat
Chocolat blanc	9 x 10 ⁻⁴ g
Chocolat en poudre (pour boisson)	0,4 g
Chocolat au lait	1,5 g
Chocolat noir	4,5 g
Chocolat extra noir (99% cacao)	16 g

III.2.6. Mode d'action

Avant de déterminer les différentes actions de la théobromine du chocolat sur le cerveau humain, il est essentiel d'étudier son mode d'action. Elle agit sur le cerveau par le biais d'une structure ultra-complexe : le système nerveux central (SNC). Il est donc nécessaire de commencer par définir celui-ci, puis d'analyser comment s'y propage un message, pour enfin comprendre la pharmacocinétique et l'action de la théobromine [55].

III.2.6.1. Système nerveux central

Le système nerveux central est constitué de l'encéphale (cerveau et tronc cérébral) et de son prolongement naturel, la moelle épinière, situé au centre de la colonne vertébrale.

Le cerveau humain est lui composé de deux types de cellules : les neurones, qui constituent le tissu nerveux ; et les cellules gliales (presque 90% des cellules du cerveau) qui forment l'environnement des neurones.

III.2.6.2. Neurones

Le neurone est une cellule arborescente [56] :

À partir du corps cellulaire contenant le noyau, le neurone étend deux types de prolongements particuliers :

- L'axone, unique et plus long que les autres branches, se termine par de nombreuses ramifications qui sont autant de connexions vers d'autres neurones. C'est par celui-ci que le neurone envoie des signaux électriques, appelés influx nerveux, vers les autres neurones.
- Les dendrites, spatialement opposées à l'axone et présentes en très grand nombre, reçoivent les signaux électriques en provenance d'autres neurones.

Lorsqu'un signal électrique en provenance d'autres cellules nerveuses fait atteindre au neurone récepteur un certain seuil d'excitation, celui-ci envoie alors le même signal à tous les autres neurones auxquels son axone est relié ; ainsi est transmise une information.

L'influx nerveux permet donc de transmettre des messages à travers le cerveau, mais aussi jusqu'aux organes périphériques du corps. Ainsi, si un individu mange un morceau de chocolat avec teneur en cacao à 99% pour la première fois, le goût capté par ses papilles gustatives sera traduit en signal et transmis jusqu'à l'aire de traitement de la mémoire concernée (ainsi que vers de nombreuses autres aires, comme celles du traitement des goûts), après quoi l'individu prendra conscience que ce goût lui est inconnu. Cette prise de conscience est quasi-immédiate [56].

III.2.7. Pharmacocinétique

Pour arriver jusqu'au cerveau, la molécule de théobromine suit le même chemin que la plupart des molécules agissantes sur ce dernier : la voie sanguine (de même pour les molécules contenus dans le café, les drogues, le tabac, l'alcool...).

En effet, lors de la consommation de chocolat, celui-ci est acheminé vers l'estomac où il est brassé puis réduit en une sorte de pâte appelée chyme qui est déversée dans l'intestin grêle.

C'est à ce niveau que se produit l'essentiel de la digestion : les parois de l'intestin sont directement liées au système sanguin. Ainsi, les nutriments issus de la digestion du chocolat s'orientent alors vers le sang et sont distribués aux organes du corps.

La théobromine arrête sa course au niveau du foie ou elle est métabolisée par des enzymes oxydases. Celles-ci retirent à la molécule son caractère toxique en coupant le(s) groupement(s) CH₃ (qui pourront être éliminés par voie rénale) : ce procédé est appelé “N-déméthylation”.

Une fois détoxifiée, la molécule de théobromine poursuit son chemin dans le sang et se propage un peu partout dans le corps.

Le processus de digestion / détoxification de la théobromine est extrêmement rapide : on estime que la molécule commence à agir cinq minutes après son ingestion.

Elle n’aura d’effet en revanche, qu’une fois arrivée dans le cerveau, par les vaisseaux sanguins qui irriguent les neurones [56].

III.2.8. Action de la théobromine

Après avoir étudié le système nerveux et commenté l’arrivée de la molécule de théobromine au cerveau, il est enfin possible d’entrer dans le vif du sujet : comment la théobromine agit sur le cerveau humain.

III.2.8.1. Adénosine et théobromine

Pour répondre à cette question, il est nécessaire de parler d’une molécule présente en grande quantité dans le cerveau humain : l’adénosine.

- Formule semi-développée de l’adénosine :

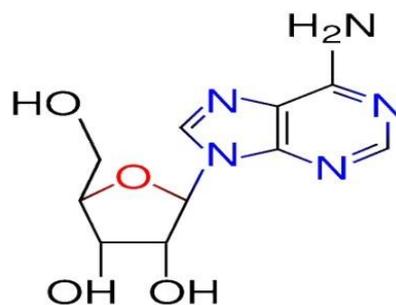


Fig. III.14 : Adénosine et théobromine [57].

L’adénosine est produite par certains neurones de manière cyclique, selon un rythme circadien bien défini. Elle est diffusée dans le liquide extracellulaire* pendant l’état de veille. Sa concentration dans le cerveau est considérablement plus élevée durant les phases d’éveil (jours) que durant les phases de sommeil (nuits). Cette molécule agit comme neuromodulateur

du système nerveux, c'est-à-dire qu'une fois fixée sur les récepteurs sensibles à son action, mais empêche à toute autre molécule de se fixer sur son récepteur. L'effet ralentisseur de l'adénosine n'a donc plus lieu d'être [57], la vitesse de propagation de l'influx nerveux dans le neurone post-synaptique est ralentie. Le cerveau est donc soumis à un régime plus lent propice aux phases de repos. Ainsi, l'adénosine favorise le sommeil [57].

III.2.9. Effets de la théobromine.

La théobromine, en médecine, est utilisée comme diurétique, vasodilatateur et cardio-stimulant.

III.2.9.1. Effets négatifs

- effet antitussif supérieur à la codéine, en diminuant l'activité du nerf vague.
- elle bloque les récepteurs de l'adénosine qui s'accumule dans le cerveau à la cour de la journée et qui accentue l'envie de dormir.
- Elle permet de maintenir l'activité nerveuse des neurones à son niveau ce qui provoque par la suite un effet de réveil,
- elle augmente la production de noradrénaline,
- elle l'inhibe et la capture. La noradrénaline est présente en faibles quantités dans le cerveau des personnes dépressives, comme la molécule est inhibée et capturée par la théobromine
- un effet euphorisant.
- augmenter les risques du cancer de la prostate. Et elle est considérée comme une drogue dans de nombreux pays.

III.2.9.2. Effets Positif

La théobromine contenue dans le chocolat a des effets positifs sur notre cerveau :

Cette substance est un stimulant doux qui améliore l'humeur. Elle joue le rôle d'antidépresseur. En médecine, elle est utilisée comme stimulant cardiaque et diurétique, c'est à dire elle augmente la sécrétion urinaire et vasodilatateur où elle a la fonction de dilater les vaisseaux sanguins. Vu la quantité minime de la théobromine dans le chocolat, elle n'a aucun effet néfaste sur la santé. Cependant, ingérée à forte quantité, elle est susceptible d'augmenter les risques du cancer de la prostate chez les hommes. Sinon, cette substance influe comme

une drogue sur le corps et peut créer une action de dépendance. Elle stimule le système nerveux et entraîne une inhibition de la fatigue. Elle joue également le rôle de stimulant sexuel avec des effets sur l'hypothalamus [58].

III.2.10. La théobromine en milieu pharmaceutique

Le cacao est utilisé en pharmacie pour ses grains qui constituent la drogue, au sens premier du mot, c'est-à-dire la partie de la plante qui est employée en droguerie et figure dans un droguier.

Ces grains au nombre d'une trentaine en moyenne sont contenues dans un fruit appelé cabosse à paroi dure et mesurant de 15 à 20 cm sur 10 à 12 cm. Elles portent dans le commerce le nom de « fèves ».Elle ont grossièrement la taille et la forme des amandes de l'amandier.

Leur composition chimique explique leur utilisation. Outre l'usage alimentaire sous forme de chocolat avec une extension dans le domaine pharmaceutique comme correcteur du goût et composant diététique des farines pour bébés, les grains de cacao sont intéressants pour leur haute teneur en matière grasse représentée par le beurre de cacao, excipient de longue date, et pour la théobromine, base xanthique à propriétés pharmacodynamiques intéressantes justifiant son inscription à la pharmacopée.

En utilisé :

Sous forme de poudre comme excipient aromatisant et correctif du goût d'un certain nombre de spécialités telles que l'Arobon Nestlé, anti-diarrhéique à base de caroube, l'Elonac Guigoz, anti-dyspeptique à base de carotte, Radiobaryx Seclo, opacifiant pour l'exploration radiologique du tube digestif, la Cal magnésie Aubert, poudre contre les troubles gastrique (spasmes et acidité) ;

- En nature dans des mélanges de plantes utilisée en tisanes à destinations thérapeutiques diverses comme,
 - Arthrita, antiarthritique et antirhumatismale,
 - Boldilia, régulateur des fonctions dans l'organisme,
 - Boldo Florine,
 - Sanflorine ;
- Pour la beurre de cacao qui est un excipient pour ovules et surtout pour suppositoires, mais également pour de nombreuses préparations de dermatopharmacie ;
- Pour la théobromine enfin, retirée des amandes mais aussi des coques et germes, et dont les propriétés diurétiques ont des utilisations thérapeutiques [59].

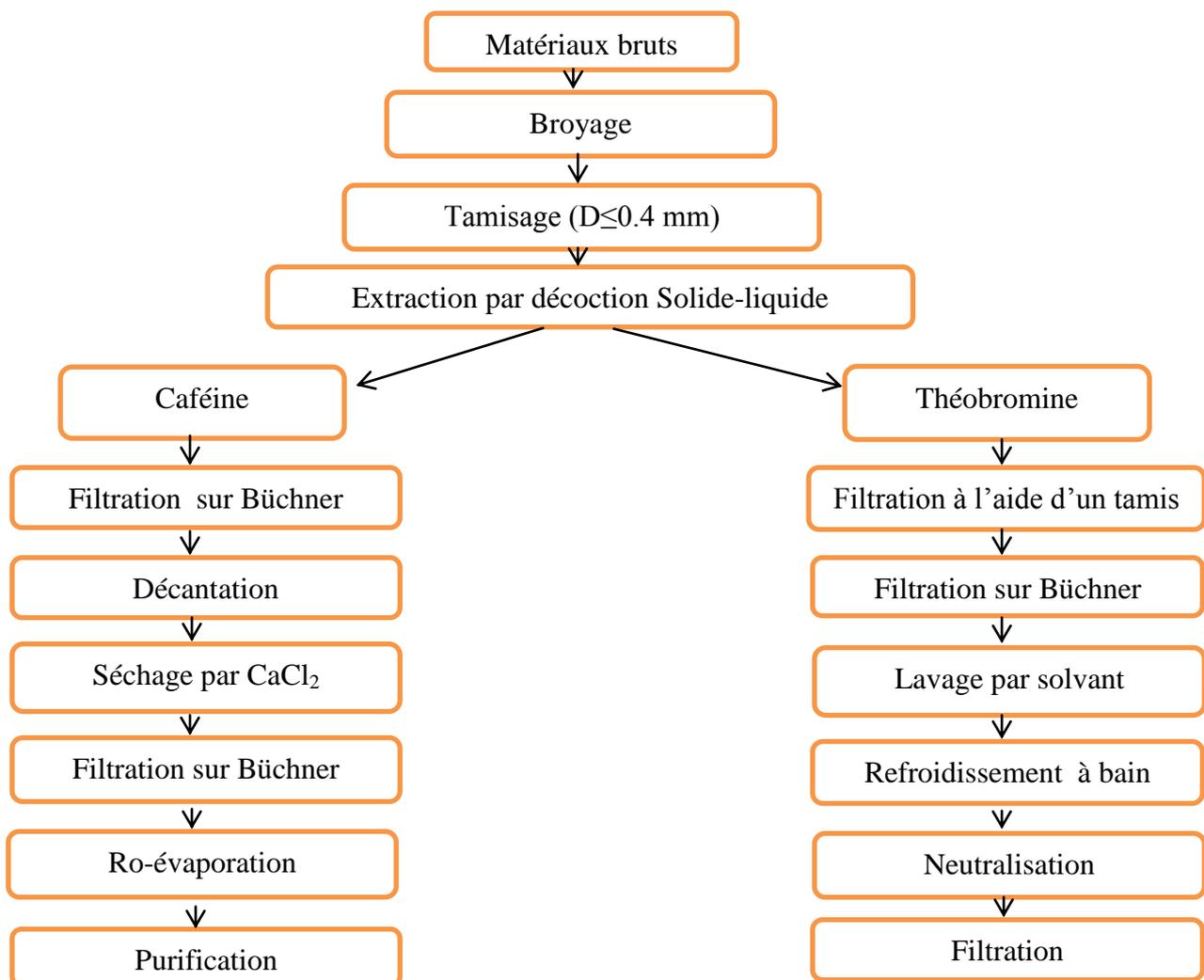
IV. Matériels et
méthodes

Ce chapitre présente les différents matériels, les différents produits et ainsi que les essais de caractérisation utilisés. Il englobera trois parties essentielles, la première partie portera sur la présentation des matières végétales utilisées, la seconde portera sur les différentes techniques d'extraction mises en œuvre et enfin dans la dernière partie les méthodes d'analyses utilisées, permettant ainsi d'accéder aux activités biologiques des extraits obtenus.

IV.1. Synthèse expérimental des essais

Dans ce paragraphe, nous précisons. Les différentes étapes de préparation des échantillons de caféine et de théobromine qui se résume comme suit : broyage, tamisage ($D \leq 0,40$ mm), extraction, filtration, décantation, identification par IR, UV,

Le schéma ci-dessous (Figure III.1) résume le programme expérimental adopté.



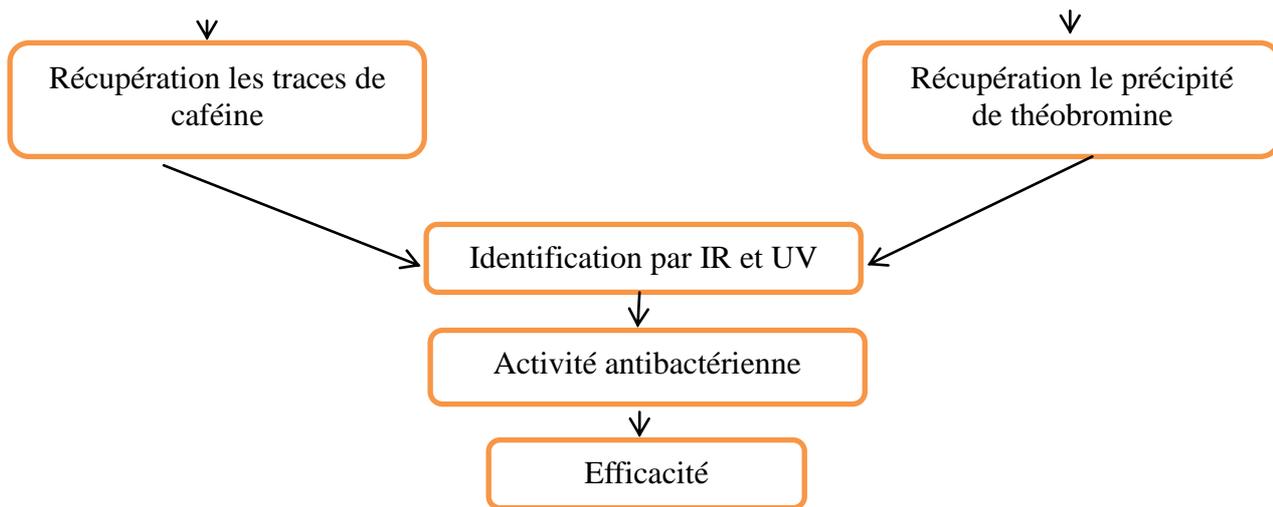


Figure IV.1. Plan de la synthèse expérimental [46].

IV.2.Extraction de la théobromine

IV. 2.1.Expérience

Dans un ballon de capacité de 500 ml, on a introduit 100 ml d'eau distillée, ensuite on ajoute une spatule de pastilles d'hydroxyde de sodium. Le ballon doit être surmonté d'un réfrigérant. Par la suite on doit vérifier si la solution est basique et cela en utilisant un papier pH.

Une fois le mélange atteint l'ébullition, on introduit des morceaux de chocolat noir peu à peu, suivi par une opération de chauffage du reflux durant une heure. Dans un premier temps la solution obtenue est filtrée à l'aide d'un tamis puis sur Büchner monté sur une fiole à vide.



Fig. IV.2 : Filtration par tamis et par Buchner.

Procéder au lavage de la solution en ajoutant 20 ml de Dichlorométhane à la solution dans une ampoule à décanter. Dans l'ampoule à décanter on observe deux phases : une phase organique contenant l'extrait et une phase aqueuse. Recueillir la phase aqueuse nettoyée.

La théobromine est insoluble dans cette solution. Cependant pour qu'elle ne puisse pas se dissoudre il faut que la solution soit maintenue à une température inférieure à 10°C [58].

C'est pourquoi, on dispose le Becher contenant la solution dans un bain de glace.

La théobromine est peu soluble dans les solutions neutres, il faut donc neutraliser la solution pour la libérer.

Ajouter peu à peu de l'acide chlorhydrique jusqu'à ce que la solution soit neutre. Un précipité blanc va alors se former. Filtrer la solution pour récupérer ce précipité formé par la théobromine.



Fig. IV.3 : Récupération de la théobromine.

IV.3.L'extraction de la caféine

IV.3.1.Expérience

La manipulation suivante consiste à extraire la caféine du café par Montage à reflux.

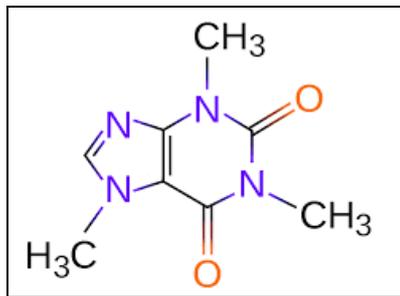


Fig. IV.4 : Structure de caféine.

- **Extraction solide/liquide par décoction**

Nous allons extraire la caféine à partir du café à l'aide du Dichlorométhane, pour cela, Nous pesons 50g de café que nous ajoutons à 300ml d'eau. Ensuite on pèse 50 g de carbonate de calcium

Puis on verse le café et l'eau dans un ballon de 500 ml. On ajoute le carbonate de Calcium au mélange café-eau et on mélange bien avec une spatule, et on place le ballon avec le réfrigérant (l'ébullition de café pendant une durée de 2 heures).

- **Filtrer sur Büchner et recueillir le jus marron**

Dans une fiole à vide reliée à un tuyau lui-même relié à une pompe à vide, et on met (au-dessus, grâce à un joint conique) un entonnoir Büchner. Dans cet entonnoir on met un filtre simple humidifié. On introduit petit à petit le mélange eau-café-carbonate de calcium et on récupère le filtrat (jus marron).

- **Décantation**

Après avoir filtré le mélange eau-café-carbonate de calcium, on fait ensuite une décantation. On ajoute 50ml de Dichlorométhane au filtrat préalablement versé dans l'ampoule à décanter. On mélange le filtrat et le Dichlorométhane, en secouant l'ampoule à

Décanter tout en dégazant régulièrement. La phase aqueuse possède une densité proche de 1 tandis que le Dichlorométhane possède une densité de 1,30 [60]. La phase supérieure est la moins dense, c'est donc la phase aqueuse. La phase aqueuse a été refroidie, la solubilité de la caféine est redevenue faible tandis que la solubilité de la caféine est importante dans le Dichlorométhane. Donc la caféine passe de la phase aqueuse à la phase organique.

Après avoir attendu quelques minutes que la décantation se fasse, on récupère la phase inférieure dans un bécher à laquelle on ajoute un peu de chlorure de calcium anhydre. Avec ce chlorure de calcium anhydre on vérifie si la solution est bien sèche (si le chlorure de calcium anhydre se dissout, alors la solution n'est pas sèche, on rajoute alors un peu de

chlorure de calcium anhydre, si le chlorure de calcium anhydre ne se dissout pas la solution est sèche). Cette étape est à répéter 3 fois.

- **Evaporation par Rotavapor**

- ✓ **L'évaporateur rotatif**

Est une technique rapide et efficace de séparation : elle permet l'extraction d'un solvant dont la température d'ébullition est abaissée en travaillant sous pression réduite [61]. Pour récupérer la caféine on fait un montage avec un chauffe-ballon, un réfrigérant et un ballon de 250 ml dans lequel on aura versé la phase inférieure récupérée lors de la décantation. On chauffe la solution à 40°C, on récupère le Dichlorométhane se retrouvant à la « sortie » du réfrigérant dans un bécher. Puis on récupère les résidus dans le ballon, ils auront un aspect jaune orangé.

Après évaporation du solvant, on obtient une poudre blanche qui contient principalement de la Caféine comme des traces.



Fig. IV.5 : les traces de caféine.

IV.4.Mesure de point de fusion

L'opération est faite au niveau de Laboratoire de biochimie de l'université de Djilali Bounaama Khemis Miliana, On mesure le point de fusion de chaque produit synthétisé. Le

fusiomètre est un Appareil facile à utiliser, les échantillons contenus dans le tube capillaire aux extrémités fermées est directement placé dans le bloc de chauffage. La vitesse de chauffage est réglée manuellement, l'appareil chauffant rapidement à une vitesse de 20°C par minute jusqu'à la température de fusion (température maximale +250°C). Une mesure précise à 1°C près de la température de fusion. Les échantillons sont éclairés par un voyant LED blanc et visualisés à l'aide d'une lentille grossissante facile à nettoyer. L'appareil Livré avec un thermomètre à alcool sans mercure et 100 tubes capillaires non scellés (code SMP1/4) [62].

▪ **Appareil à point de fusion analogique SMP11**

- Facile à utiliser.
- Jusqu'à 3 échantillons peuvent être visualisés et testés simultanément.
- Thermomètre sans mercure [62].



Fig. IV.6 : fusiomètre Analogique SMP11 Stuart [62].

IV.5. Analyse spectrale du composé obtenu après purification

IV.5.1.L'analyse Spectroscopie par ultra-violet

La spectrophotométrie d'absorption ultra-violette visible est à la fois une méthode d'analyse quantitative et qualitative. Elle est essentiellement fondée sur le phénomène d'absorption d'énergie lumineuse par une substance. Les spectres sont toujours tracés en solution diluée et la nature de solvant employé doit être précisée, car elle peut influencer les valeurs de λ_{\max} et de ϵ_{\max} . Les solvants utilisés ne doivent pas absorber dans cette zone [59].

• **Protocole**

Nous avons préparés une solution de concentration (0.0328 mg/ml) pour la caféine avec une masse de 0.0082 a été pesée et ensuite mélangée avec une solution de Dichlorométhane jusqu'à le trait de Jorge. Même expérience pour la théobromine mais la préparation d'une solution de concentration 0.0824mg/ml de masse 0.0206. Et Mesurer l'absorbance pour les deux échantillons.

IV.5.1.1. Echantillon de mesure

Les spectres UV-Vis ont été enregistrés dans Dichlorométhane à température ambiante à l'aide d'un spectrophotomètre UNICOM-UV 300 relié à un micro-ordinateur et pilote par le logiciel vision 32.

IV.5.2. Caractérisation par spectrophotométrie IR

Les analyses spectrophotomètre IR sont faites au niveau de laboratoire d'analyse physicochimique de l'LEMMC de l'université de Sétif. Les spectres IR sont enregistrés, à l'aide d'un appareil Shimadzu FTIR-8201 PC Spectrometer. Les principales bandes d'absorption sont données en cm^{-1} . Ces spectres sont réalisés à partir d'échantillon dispersé dans une poudre de KBr.

IV.6. Analyse Microbiologique

IV.6.1. Test de la solubilité

Dans notre travail nous avons étudiés la solubilité de nos produits synthétisés par rapport les solvants suivants : DMSO, Dichlorométhane, l'éthanol. Dans un tube à essai nous avons met un volume v de chaque solvant, ensuite nous avons ajoutés une quantité de chaque produit synthétisé et enfin l'agitation pendant quelques minutes sur un agitateur vortex.

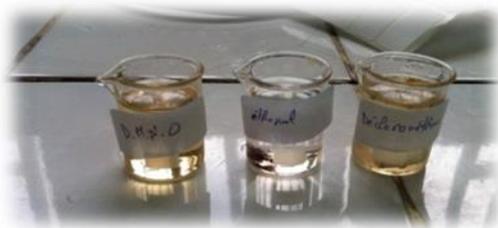


Fig. IV.7 : Test de solubilité.

Les résultats obtenus de solubilité sont regroupés dans le tableau IV.1.

Tableau.IV.1 : Solubilité de la caféine et de la théobromine dans certains solvants.

Solvant \ Solubilité	Dichlorométhane CH_2Cl_2	Ethanol	D.M.S.O (T=65°C)
Caféine	Moyenne	Faible	Totale
Théobromine	Moyenne	Faible	Totale

IV.6.2. Préparation des solutions mères et diluées

IV.6.2.1. Protocole

- Pour la caféine

Préparation d'une solution de 2.7 g de caféine et 3 ml de DMSO à température de 65 °C .

Préparation des solutions diluées par la méthode de décimale, pour voir 4 dilutions :

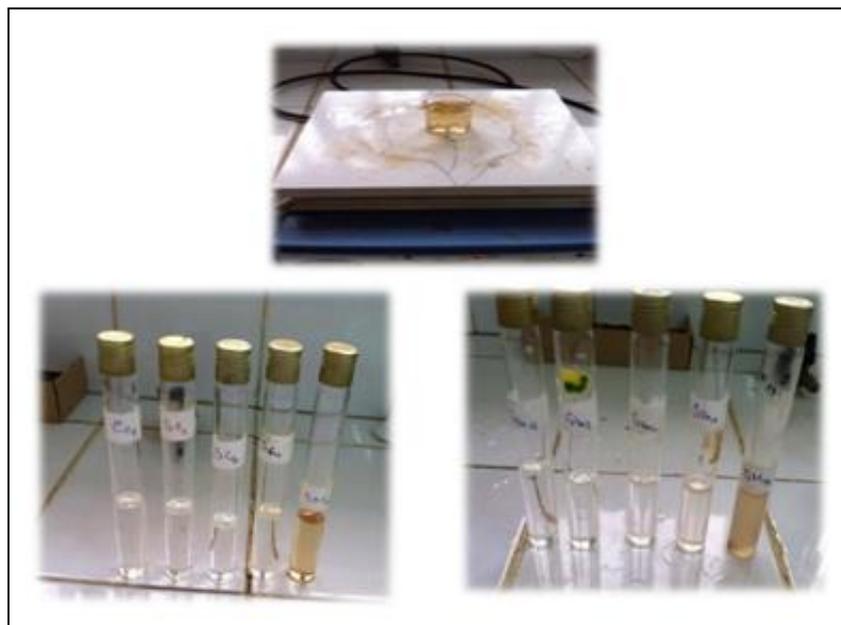
C₁, C₂, C₃, C₄ (les solutions filles)

- **Pour la théobromine**

Préparation d'une solution mère de 59.5 g de théobromine à température de 65 °C

Préparation des solutions diluées par la méthode de décimale, pour voir 4 dilutions : S_{th1}, S_{th2},

S_{th3}, S_{th4} .



FigIV. 8 :Préparation les dilutions.

IV.6.3. Détermination de DO de différentes dilutions de caféine et théobromine

Tableau. IV.2: Variation de la DO de la caféine en fonction de la concentration.

Dilution de caféine	Solution mère	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 3	Dilution 4
Concentration (mg/ml)	0.9	0.3	0.1	0.33	0.011
Absorbance	1.043	0.023	0.022	0.010	0.192

Tableau. IV.3: Variation de la DO de la théobromine en fonction de la concentration.

Dilution de théobromine	Solution mère	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 3	Dilution 4
Concentration (mg/ml)	11.9	2.38	0.476	0.0952	0.01904

Absorbance	1.807	0.306	0.209	0.147	0.138
-------------------	-------	-------	-------	-------	-------

IV.6.4. Tests de l'activité antibactérienne

Les Souches bactériennes utilisées dans ce travail sont:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- *Escherichia coli* ATCC 25912.

✓ Marquer des boîtes

- Écrire sur le fond de la boîte le nom de la souche bactérienne :
- *E. coli* et *Staphylococcus aureus*.
- Éviter les contaminations
- Les manipulations se font sur une paillasse qui été désinfectée à l'eau de javel diluée.

✓ Inonder des boîtes de milieu Mueller Hinton

- Prélever environ 1 ml de suspension bactérienne.
- Inonder la gélose, par petits mouvements circulaires agiter la boîte pour répartir la suspension sur toute la surface.
- Laisser au repos couvercle fermé pendant 1 min, puis reprendre l'excès à la coton tige.

IV.6.4.1. Essais préliminaires

L'évaluation de l'activité antibactérienne d'un extrait passe par l'étape des disques, qui est simple et pas coûteuse, et la plus utilisée en routine dans les laboratoires de bactériologie pour les tests de sensibilité aux antibiotiques [63].

Le but de ces expériences initiales est la recherche du pouvoir antibactérien de la caféine et théobromine.

Tester les produits (caféine et théobromine) seules sans dilution, vis-à-vis des bactéries.

IV.6.4.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des disques

La méthode de diffusion à partir d'un disque a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne [65]. Des disques de papier Whatman n°3 de (9 mm) de diamètre sont stérilisés dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée puis séchés à l'étuve. Ces disques sont ensuite imbibés de d'extrait à tester. Par ailleurs, la gélose de Mueller-Hinton stérile est coulée dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre jusqu'à une épaisseur de 4 mm puis laissées refroidir. Une suspension bactérienne de 18 à 24h est préparée avec le bouillon nutritif. L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage à l'aide d'un coton-tige

stérile en tournant la boîte d'environ 60°. La dernière étape consiste à déposer à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose ensemencée par la souche à tester d'une boîte de pétri des disques imbibés d'extrait à tester, Les disques sont déposés dans chaque boîte.



Fig. IV.9 : Ensemencement sur les boîtes et déposition des disques.

IV.6.4.3. Incubation et Lecture

Pendant 18 à 24 heures à 37°C, pour toutes les boîtes, et à température ambiante (température de la chambre) pour les boîtes qui contiennent des disques imbibés de la caféine et théobromine. Durant cette période, les substances diffusent dans la gélose à partir des disques selon un gradient de concentration jusqu'à une limite où sa concentration est la plus faible, déterminant ainsi des zones d'inhibition. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont observés le lendemain des expériences, en mesurant les diamètres des halos clairs tout autour des disques, ou zones d'inhibition et peut être symbolisé par des signes

d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de la caféine et théobromine. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm ;

Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm ;

Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm ;

Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm [64].

IV.6.4.4. Détermination de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est déterminée par test : « le germe-test », mesure de la dose active, porte-germe, dose minimale inhibitrice (CMI) [65].

IV.6.4.4.1. Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides

La construction des courbes de croissance in vitro en présence de concentration croissante en Agents antimicrobiens permet de définir des concentrations limites : c'est-à-dire la concentration pour laquelle on n'observe pas de croissance visible.

La concentration inhibitrice 50 % ou CMI correspond à une croissance égale à la moitié de la croissance du témoin [67].

IV.6.4.4.2. Pourcentage d'inhibition :

$$R\% = \frac{\text{diamètre d'inhibition}}{\text{diamètre de boîte de pétri}}$$

Résultats et
Discussion

V. Résultats et Discussions

V.1 Extraction de la théobromine et la caféine

Le rendement d'extraction de la théobromine et de la caféine, a été évalué par la formule suivante :

$$R\% = \frac{\text{masse de l'extrait obtenu}}{\text{masse de la poudre}} \cdot 100$$

Les résultats des rendements d'extraction obtenus sont présentés dans le tableau (V.1).

Tableau V.1 : Les rendements d'extraction pour la caféine et la théobromine

Matière première	Extrait	m(g)	Rendement
Café	Caféine	0.06	0.12
Chocolat noir	Théobromine	0.8	0.8

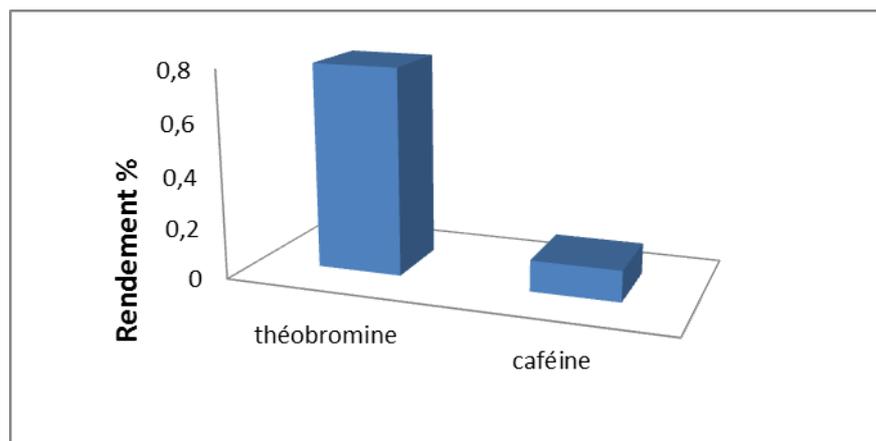


Fig. V.1 : Rendements d'extraction de la caféine la théobromine.

La figure (V.1) montre que l'extraction de la théobromine est plus importante que celle de la caféine avec des rendements d'extraction d'environ 0.80% et 0.12% respectivement.

V.2. Point de fusion de théobromine et caféine

Tableau.V.2 : point de fusion des matières.

Matières	Caféine	Théobromine
Point de fusion (°C)	235.8	350

Les valeurs expérimentales montrées dans le tableau.V.2 sont proches aux valeurs théoriques.

V.3 Analyse spectrale (UV-visible)

V.3.1 Variation de l'absorbance en fonction de longueur d'onde

La spectroscopie est une technique d'analyse chimique qui utilise les propriétés d'absorption des solutions liquides (pour différents types de rayonnements lumineux). Dans cette étude, les valeurs d'absorbance de la caféine ainsi que les longueurs d'onde associées obtenues par la spectrométrie UV sont regroupées dans le tableau (V.2).

Tableau V.3 : Valeurs d'absorbance de la caféine et les longueurs d'onde associées.

Longueur d'onde λ (nm)	Absorbance	Longueur d'onde λ (nm)	Absorbance
220	0.0784	293	0.7726
240	0.0909	294	0.8315
260	0.1161	298	0.9876
270	0.1374	300	0.9027
271	0.0869	305	0.7055
272	0.1131	310	0.5693
273	0.0578	315	0.4845
274	0.0725	320	0.4274
275	0.0933	325	0.3907
276	0.0416	330	0.3554
278	0.1531	335	0.3152
279	0.1094	340	0.2746
280	0.1337	345	0.2283
285	0.1115	350	0.1892
290	0.3560	360	0.1207
291	0.4904	380	0.0632
292	0.5527		

En se basant sur les résultats du tableau V.2, La représentation graphique de l'absorbance (A) en fonction de la longueur d'onde λ , donne l'allure indiquée dans la figure (V.2).

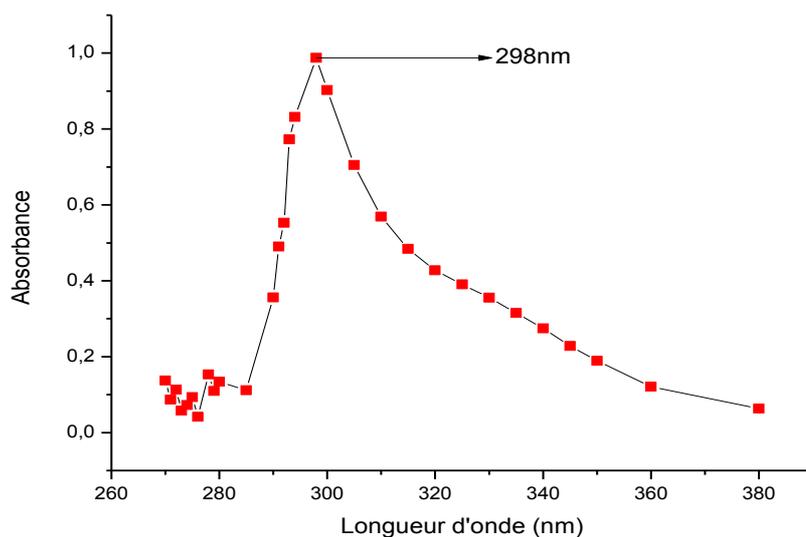


Fig. V.2 : Le spectre de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde, cas de la caféine.

La figure V.2 montre que l'allure du spectre d'absorption présente une bande d'absorption caractérisée par leur longueur d'onde maximale $\lambda_{\text{max}} = 298 \text{ nm}$. D'après la littérature, ce spectre correspond au ligand caractérisant la molécule de la caféine.

V.3.2 Courbe d'étalonnage de la solution utilisée

La courbe d'étalonnage est obtenue, en fixant la longueur $\lambda = 298 \text{ nm}$ et en utilisant l'étalon, une solution Dichlorométhane. A différentes concentrations C en caféine, on lut l'absorbance. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau (V.3).

Tableau V.4 : Absorbances à différentes concentrations

[c](mg/ml)	0.9	0.3	0.1	0.033	0.011
Abs	1,043	0,053	0,022	0,010	0,092

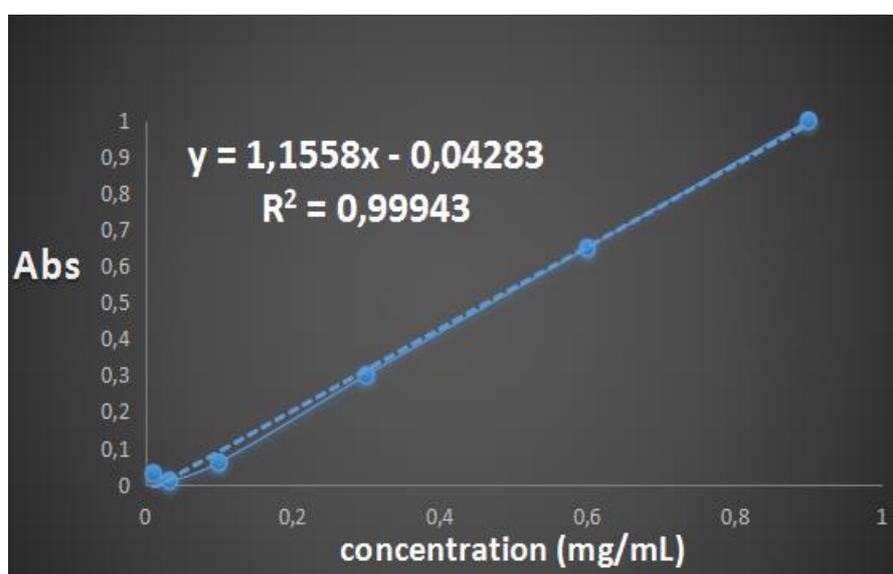


Fig.V.3 : Courbe d'étalonnage de la solution de caféine utilisée ($\lambda = 298$ nm).

La figure V.3 montre que la variation de l'absorbance (A) en fonction de la concentration (C) est linéaire. Elle est du type $Y = 1.15X$ ($A = k C$), c'est-à-dire la corrélation entre l'absorbance et la concentration, est positive linéaire.

Le coefficient d'extinction égale à $\epsilon = 1.15 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{ml}$

Tableau.V.5 : le tableau ci-dessous représente les valeurs d'absorbance de théobromine en fonction de la longueur d'onde (spectrométrie UV).

Longueur d'onde λ (nm)	Absorbance	Longueur d'onde λ (nm)	Absorbance
220	0.0569	293	0.6706
240	0.0762	294	0.7086
260	0.0724	298	0.6509
270	0.0563	300	0.5592
271	0.784	305	0.3606
272	0.0708	310	0.2262
273	0.0595	315	0.1350
274	0.0541	320	0.0821
275	0.0265	325	0.0495
276	0.0680	330	0.0317
278	0.0353	335	0.0190
279	0.0776	340	0.0101

280	0.0416	345	0.0031
285	0.0896	350	0.0104
290	0.7881	360	0.0249
291	0.4425	380	0.0351
292	0.5569		

En se basant sur les résultats du tableau V.4, La représentation graphique de l'absorbance (A) en fonction de la longueur d'onde λ , donne l'allure indiquée dans la figure (V.4).

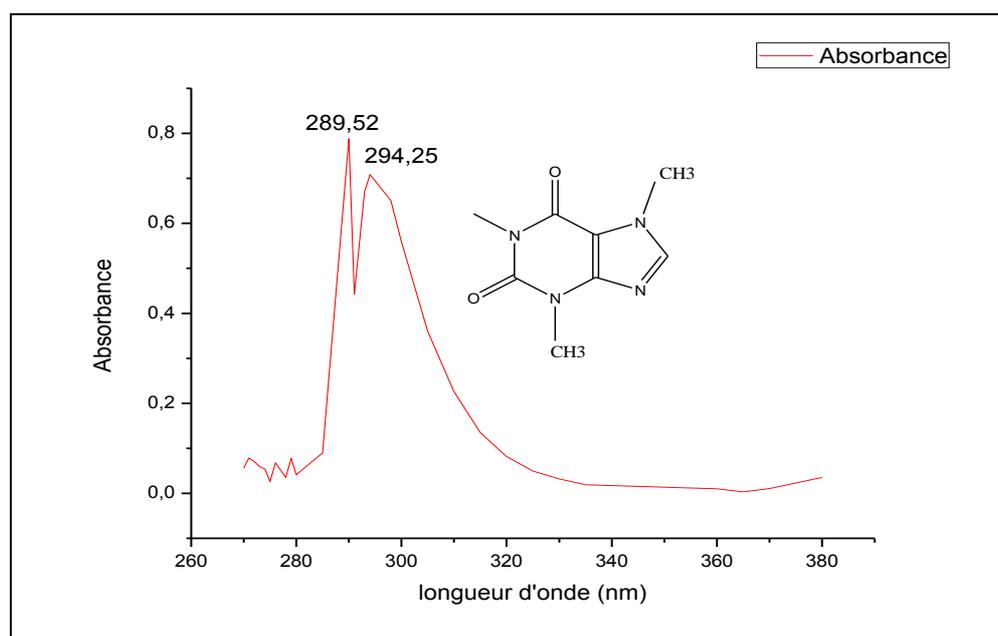


Fig. V.4 : Le spectre de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde, cas de la théobromine.

La figure V.5 montre que l'allure du spectre d'absorption présente deux pics. Une bande d'absorption caractérisée par une longueur d'onde maximale $\lambda_1=290$ nm et une autre bande d'absorption $\lambda_2=294$ nm. D'après la littérature, ce spectre correspond au ligand caractérisant la molécule de la théobromine.

V.3.3. Courbe d'étalonnage de la solution utilisé

La courbe d'étalonnage est obtenue, en fixant la longueur $\lambda = 290$ nm et en utilisant l'étalon, une solution Dichlorométhane. A différentes concentrations C en théobromine, on lut l'absorbance. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau (V.5)

Tableau V.6 : Absorbances à différentes concentrations

[C](mg/ml)	11.9	2.38	0.476	0.0952	0.01904
------------	------	------	-------	--------	---------

Abs	1.807	0.306	0.209	0.14	0.138
-----	-------	-------	-------	------	-------

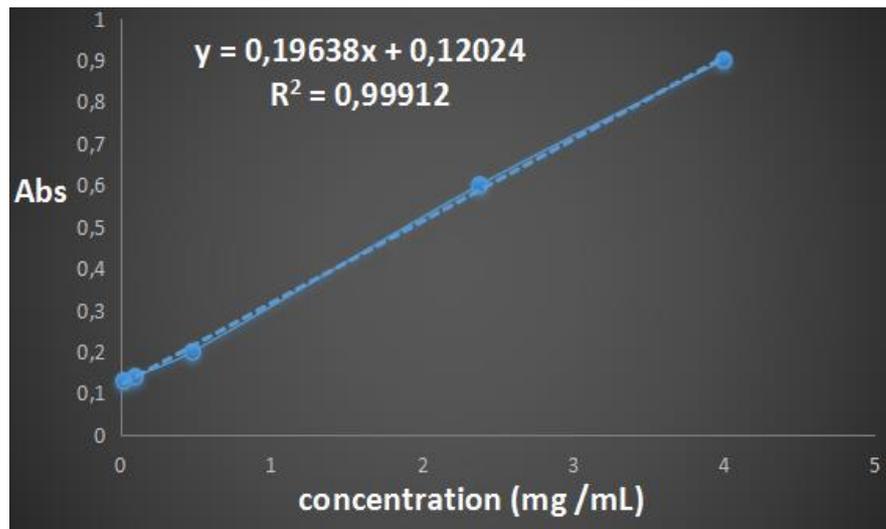


Fig.V.5 : Courbe d'étalonnage de la solution utilisée ($\lambda = 290$ nm).

D'après la figure V.5, l'absorbance varie d'une manière positive et linéairement en fonction de la concentration, sous la forme $Y = a \cdot X$ ($Y = 0.19 X$), en confirmant la relation de Beer-Lambert $A = \epsilon \cdot L \cdot C$.

Le coefficient d'extinction égale à $\epsilon = 0.19 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{ml}$.

V.4. Analyse spectrale par FTIR

V.4.1 Variation de la transmission en fonction de longueur d'onde (cm^{-1})

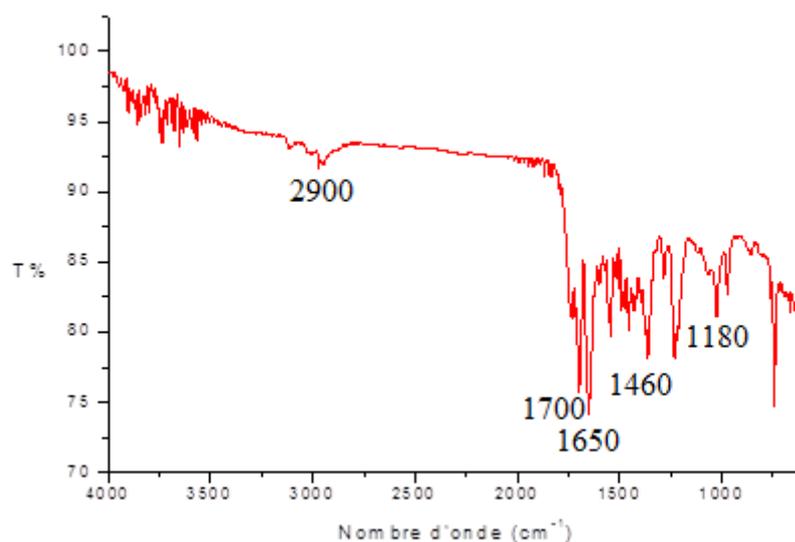


Fig.V.6: Spectre d'absorption d'infrarouge de la théobromine.

Lorsqu'une molécule est mise en présence d'infrarouge, les atomes qui la composent se mettent à vibrer. Chaque vibration est caractéristique d'une liaison atomique selon sa fréquence et son intensité. On peut se servir de tables afin d'interpréter les spectres obtenus pour identifier les atomes d'une molécule et la caractériser. Le spectre ci-dessus est dominé par une bande vers 1700 cm^{-1} caractéristique du groupe C=O, et bande moyenne vers 1650 correspond C=C et 1180 pour C-N. Le groupement CH_3 donne la petite bande vers 2900 cm^{-1} .

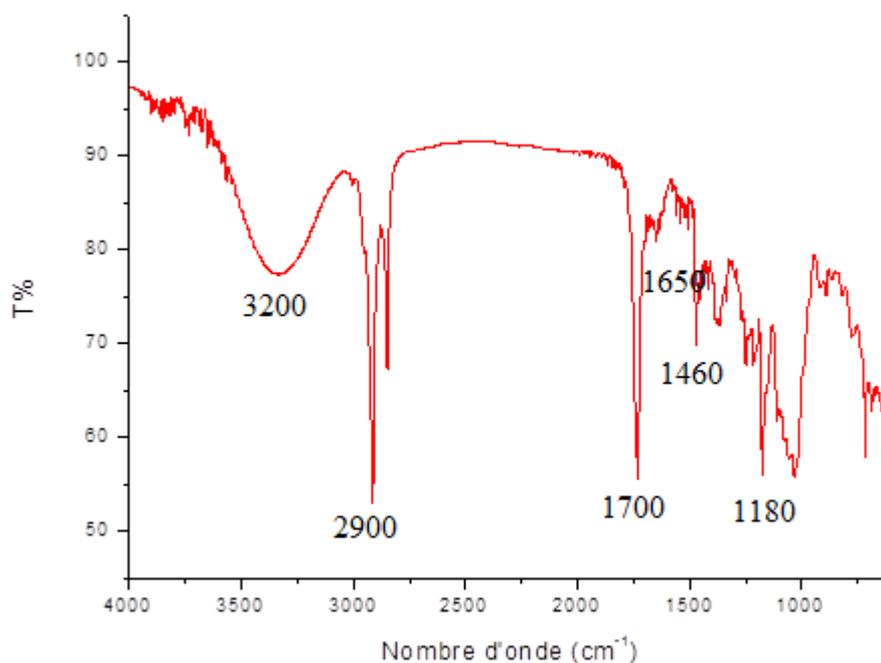


Fig. V.7 : Spectre d'absorption d'infrarouge de la Caféine.

La figure V.6 montre le spectre d'absorption d'infrarouge de la caféine, l'analyse de ce dernier confirme la présence de différentes fonctions. Parmi ces fonctions nous citons :

- une bande vers $3\ 200\ \text{cm}^{-1}$ qui correspond à CH_3 et une bande vers $1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ pour $\text{C}=\text{O}$.
- Amine, on recense une bande vers $1\ 180\ \text{cm}^{-1}$ caractéristique de $\text{C}-\text{N}$. On note également la présence de bandes à $2\ 900$ et $1\ 460\ \text{cm}^{-1}$, identifiées comme des alcanes et une autre bande à $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ correspondant à $\text{C}=\text{C}$.

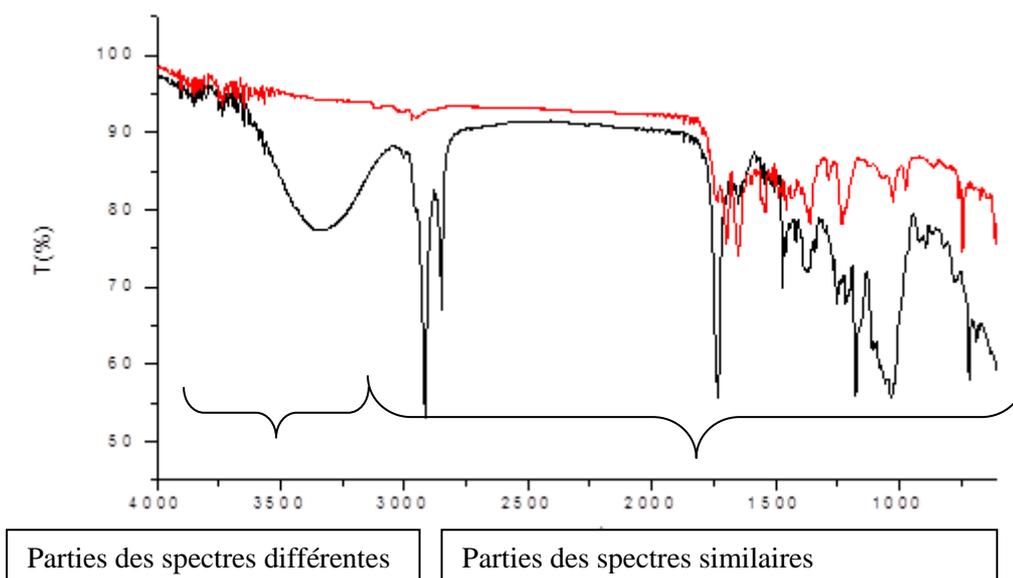


Fig. V.8 : Le spectre d'absorption d'infrarouge de la caféine et de la théobromine.

La comparaison de spectres des deux alcaloïdes, de la caféine et de la théobromine, présentés dans la figure V.8, nous a conduits de signaler les faits suivants :

- L'intensité des pics pour les différentes bandes est nettement différente.
- Les deux spectres sont semblables notamment pour les bandes d'absorption dont les longueurs sont inférieures à environ 2800 cm^{-1} .
- Une distinction remarquable entre les deux spectres pour les bandes dont les longueurs d'onde sont supérieures à 2800 cm^{-1} , nous remarquons, dans le cas de la Caféine, l'existence de pics d'intensité plus importantes et la disparition de ces bandes dans le cas de la théobromine.

Cette distinction de pics, probablement est liée à la présence de groupement CH_3 .

Les groupements fonctionnels dans l'intervalle présent comme suivant :

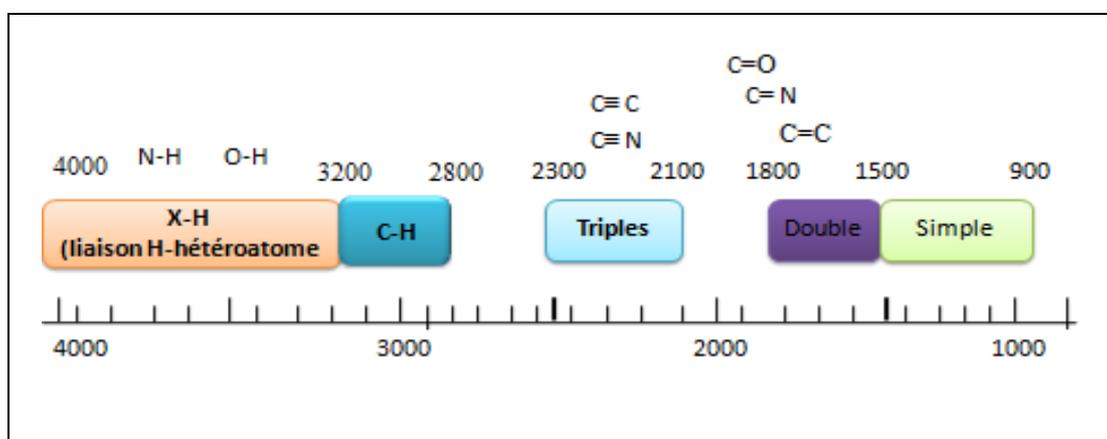


Fig. V.9 : Les groupements fonctionnels présents dans les deux spectres.

V.5. Etude de l'activité antibactérienne

V.5.1. Evaluation qualitative

L'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de nos extraits caféine et théobromine a été faite sur deux souches bactériennes provenant de la collection du laboratoire d'université de Djilali Bounaama a été faite par la méthode d'antibiogramme. Le pouvoir antimicrobien est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition.

L'échelle d'estimation de l'activité antibactérienne est donnés par mutai(2009)

Ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne en **4 classes :**

Non sensible (-) ou résistante : diamètre $< 8\text{mm}$;

Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm ;

Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm ;

Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm [66].

Tableau. V.7 : Détermination de la zone d'inhibition de la caféine

Bactérie [C](mg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)			
	<i>E. coli</i>	Sensibilité	<i>S.aureus</i>	Sensibilité
C _P (produit pur)	13.5	+	12	+
C _M =0.9	13	+	12	+
C ₁ =0.3	12.5	+	11.5	+
C ₂ =0.1	12.2	+	11	+
C ₃ =0.033	12	+	11	+
C ₄ =0.011	11	+	10	+

D'après le tableau V.7 la CMI égale **CMI =0.011mg/ml** pour *E. coli* et *S.aureus*.



Fig. V.10 : Test d'activité antimicrobienne de caféine sur la souche *E.coli*.



Fig. V.11 : Test d'activité antimicrobienne de caféine sur la souche *Staphylococcus aureus*.

Tableau. V.8 : Détermination de la zone d'inhibition théobromine.

Bactérie [C](mg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)			
	<i>E. coli</i>	Sensibilité	<i>S.aureus</i>	Sensibilité
Th _P	18	++	14	+
Th _M =11.9	12	+	12.5	+
Th ₁ =2.38	/	+	12	+
Th ₂ =0.47	12	+	12	+
Th ₃ =0.095	11.5	+	11.5	+
Th ₄ = 0.019	11	+	11	+

D'après le tableau V.8 la CMI égale CMI =0.019 mg/ml pour *E. coli* et *S.aureus*.



Fig. V.12 : test d'activité antimicrobienne de théobromine sur la souche *E.coli*.



Fig. V.13 : test d'activité antimicrobienne de théobromine sur la souche *Staphylococcus aureus*.

V. 4.2. Discussion

Nous observons que le test d'activité anti microbienne de caféine et la théobromine réalisée sur la souche *S.aureus* et *E. coli* donnent des zones d'inhibition claires. Les résultats consignés dans le tableau V.7 ont montré que l'extrait de caféine a eu une bonne activité inhibitrice aux différentes concentrations testés sur la souche bactérienne *E. coli*, on peut avoir un diamètre d'inhibition important de 13.5 mm à la concentration Cp sur la souche *E. coli*, Cependant, une faible sensibilité a été observée avec la souche *S. aureus* avec un bon diamètre d'inhibition est de 12 mm à concentration Cp. Les résultats consignés dans le

tableau V.8 ont montré que l'extrait de théobromine a eu une bonne activité inhibitrice aux différentes concentrations testées sur la souche bactérienne *E. coli* et *S. aureus*. Avec le diamètre d'inhibition très sensible (18 mm) sur *E. coli* à la concentration de Th_p et de diamètre sensible (14 mm) sur la souche *S.aureus* à la concentration Th_p. Cependant, une absence de sensibilité a été observée la souche *E coli* avec la concentration de Th₁ (2.38 mg/ml). La comparaison des diamètres d'inhibition montre que la théobromine présente une activité antimicrobienne importante sur *E. coli* et *s. aureus* par rapport la caféine. Les tableaux V.7 et V.8 montrent clairement que la diminution des diamètres d'inhibition correspondant à une diminution de la concentration des deux extraits appliquée (la caféine et théobromine). Nous n'avons observés que la différence entre ces molécules seulement sur le groupement CH₃ au niveau de leurs structures, la théobromine présente un effet antibactérien plus élevé par rapport la caféine qui contient 3 méthyles au niveau de leur structure.

Conclusion

Conclusion

Notre étude pratique nous a permis de comprendre les phénomènes d'extraction ainsi que les techniques d'analyse de caractérisation utilisées dans le domaine des sciences des matériaux à titre d'exemple (UV-Visible et IR). Les principaux résultats expérimentaux menés à travers cette étude permettent de dégager les conclusions générales et les perspectives pour des futurs travaux de recherche suivantes :

1. La caféine et de la théobromine sont des alcaloïdes, d'origine naturelle, renfermant du carbone, de l'hydrogène et, plus spécialement, de l'azote.
2. L'extraction de la caféine et de la théobromine par montage à reflux, a donné un rendement de 0.12% et 0.8 % respectivement. Donc le rendement d'extraction de la théobromine est nettement supérieur à celui de la caféine.

3. L'analyse des produits extraits par la technique d'analyse UV-visible, a montré l'existence d'une bande d'absorption caractérisée par une longueur d'onde maximale $\lambda_{\max}= 298$ nm, identifiant la caféine et une deuxième famille de bande dont les longueurs d'onde sont $\lambda_1=290$ nm et $\lambda_2=294$, caractérisant la théobromine.
4. La technique d'analyse d'absorption d'infrarouge, confirme les résultats obtenus par l'UV-Visible, en montrant pour la caféine et la théobromine, les bandes associées aux longueurs d'onde suivantes : $3\ 200\text{ cm}^{-1}$ qui correspond à la liaison CH, $1\ 700\text{ cm}^{-1}$ pour le groupement C=O, $1\ 180\text{ cm}^{-1}$ pour la liaison C-N, $2\ 900$ et $1\ 460\text{ cm}^{-1}$ pour des composés identifiés comme des alcanes et enfin $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ correspondant à la famille C=C.
5. L'activité biologique de la caféine sur les bactéries est plus active sur *Escherichia coli* (15.69%) que sur *Staphylococcus aureus* (13.95%). Elle présente un coefficient de variation d'environ + 1,74%.
6. La théobromine est active sur les deux bactéries, avec un taux d'activité élevé pour le cas *Escherichia coli* de 20.93 % par rapport à celui de *Staphylococcus aureus* qui de 16.27 %.
7. Les bactéries étudiées sont plus sensibles à la caféine que la théobromine avec une concentration minimale d'inhibition respectivement de l'ordre de 12.79 % et de 13.95 %.

A la lumière des conclusions rapportées précédemment, nous recommandons quelques perspectives et axes de recherches suivantes :

1. Utilisation d'autres méthodes d'extraction afin d'augmenter le rapport d'extraction de ces produits.
2. Afin de confirmer nos résultats, l'utilisation d'autres techniques de caractérisation et d'identification telles MEB, DRX, EDS, est indispensable.
3. Réalisation d'une étude sur l'activité antioxydante des alcaloïdes et sur d'autres activités biologiques.

Annexes

Préparation de milieu de culture

Milieu Mueller Hinton

✓ Composition

- infusion de viande de bœuf.....300,0 ml
- peptone de caséine17,5

g

- amidon de maïs.....1,5

g

- agar.....17,0 g
- pH = 7,4.

✓ Préparation

38 g par litre. Stérilisation à l'autoclave. Pour préparer ce milieu il faut peser 38g de poudre et la mélanger dans 1L d'eau. Il faut homogénéiser puis chauffer en agitant. Il faut porter à ébullition pendant environ une minute. Ensuite il faut stériliser la gélose à l'autoclave durant 15 minutes à 121,1°C.

Matériels et produits

Matériels

Les principaux matériels utilisés dans ce travail sont :

- Ballon de 500 ml ;
- Chauffe-ballon surmonté d'un réfrigérant ;
- Système de filtration sur Büchner ;
- Cristalliseur pour bain de glace ;
- Glaçons ;
- Filtre ;
- Ampoule à décanter ;
- Becher de 100 et 250 ml
- Entonnoir Büchner ;
- fiole à vide ;
- tuyau à air ;
- trompe à eau ;
- ampoule à décanter de 250 ml ;
- bécher de 200ml ;
- éprouvette graduée de 150ml ;
- erlenmeyers ;
- papier pH ;
- support droit ;
- pince avec noix ;
- support à crémaillère ;
- Thermomètre ;
- Rotavapor;
- Pince ;

- disques stériles ;
- milieu de culture en boîtes de pétri (Milieu de Mueller Hinton) ;
- Disques en papier imprégnés d'ATB ;
- Ecouvillon stérile ;
- Fiole jugé de 250 ml.

Produits utilisés

Dans la présente étude, la liste de produits utilisés, est :

- Pastille d'hydroxyde de sodium (NaOH) ;
- Acide chlorhydrique (HCl) ;
- Dichlorométhane ;
- Chocolat noir (Côte d'or 86% de cacao) ;
- 50g de café réduit en poudre ;
- 300 ml d'eau ;
- 50g de carbonate de calcium ;
- 50ml de Dichlorométhane ;
- chlorure de calcium anhydre ;
- DMSO ;

Propriétés de solvant utilisé

✓ Dichlorométhane

Dichlorométhane	
Densité	1,3
Température d'ébullition (°C)	40
Température de fusion (°C)	- 95

Solubilité de la caféine à 25 °C (g. l ⁻¹)	142
Solubilité de la caféine à 65 °C (g. l ⁻¹)	Très élevée
Solubilité de la caféine à 100 °C (g. l ⁻¹)	Très élevée
Informations diverses	<ul style="list-style-type: none"> • Produit cancérogène  • Le Dichlorométhane n'est pas miscible à l'eau

Table d'absorption d'infra rouge

✓ Les bandes d'absorptions caractéristiques

Certaines liaisons possèdent des bandes d'absorption caractéristiques pour des valeurs de nombre d'onde définies. Ces valeurs dépendent de la famille chimique de la molécule. Elles sont répertoriées dans des tables de cette forme :

Liaison	Famille chimique	Nombre d'onde (cm ⁻¹)
C-H	Alcane	2800–3000 et 1350–1450
	Alcène	1650
	Aldéhyde	2650–2850
C=C	Alcène	1700–1725
C=O	Aldéhyde	1725–1750
	Cétone	1700–1725
	Ester	1730–1750
	Acide carboxylique	1740–1800
	Amide	1600–1700
C-O	Alcool	1000–1200
	Ester	1050–1300
	Acide carboxylique	1100–1200
C-N	Amine	1000–1200
N-H	Amine	1550–1650
	Amide	3300–3500
OH	Alcool	3200-3500 (bande large)

Souches microbiennes utilisées

✓ Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus est une cocci à Gram positif appartenant à la famille des Micrococcaceae, aérobie - anaérobie facultatif, catalase positive, fermentant le glucose, halophile, cultivant sur milieux ordinaires, possédant une coagulase qui le distingue des autres espèces de staphylocoques et est responsable de sa pathogénicité. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales et est très répandu chez l'homme et les animaux à sang chaud. Chez l'homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses et des zones cutanées humides [63].

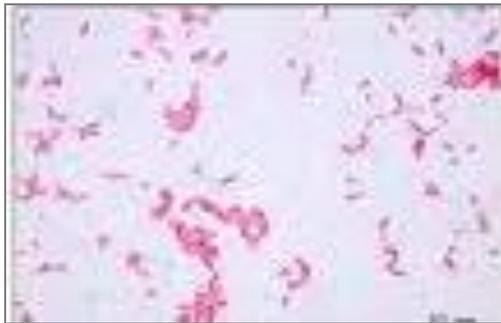


Fig. IV.15 : *Staphylococcus aureus* Gram positive [63].

✓ **Escherichia coli**

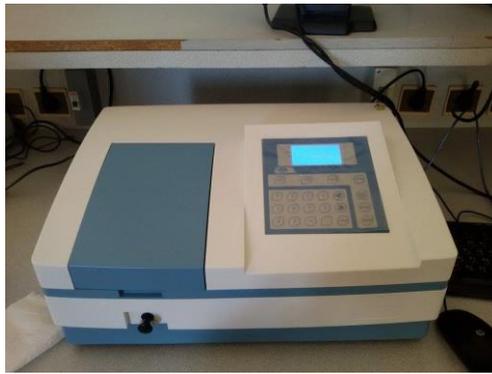
Escherichia coli est un coccobacille à gram négatif, aéro-anaérofacultatif, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, catalase positive, cultivant sur milieux ordinaires. C'est l'espèce dominante de la flore normale du tube digestif. Habituellement commensal mais pouvant devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers [64].



Fig. IV.16: *Escherichia coli* bacille a Gram negative [64].

Les Appareils spectrophotomètre

✓ **Appareil spectromètre UV**



Appareil d'un spectromètre UV

✓

Appareil spectromètre FT-IR



Appareil d'un spectromètre FT-I

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

[1]: Les limites de la lutte contre l'obésité, la science N°357, juillet 2007.

[2]: Marc Ju1bault-Bregler, la théobromine dans le chocolat, 2012.

[3]: Gérard, Cote, Extraction liquide-liquide - Bases physico-chimiques des procédés, Journal 2761, 10 déc. 1998.

[4] : L. Boyadzhiev and V. Dimitrova, Extraction and Liquid Membrane Pre concentration of Rosmarinic Acid from Lemon Balm (*Melissa Officinalis* L.), Separation Sciene and

Technology, 2006.

[5]: COTE. G Extraction liquide-liquide Techniques de l'Ingénieur, fascicules J 2760,2003.

[6]: CUSACK RW, GLATZ DJ. Apply liquid-liquid Extraction to today's Problems. Chem Eng 1996.

[7]: CUSACK RW. Solve Waste Water Problems with Liquid/Liquid Extraction. Chem Eng Prog 1996.

[8]: AIRES BARROS MR, CARBAL JMS. Liquid-Liquid Extraction. Recovery Process for Biological Materials. Ed John Wiley & Sons, 1993.

[9]: KIRSCH T and MAURER G. Distribution of Citric, Acetic and Oxalic Acid between Water and Organic Solutions of Tri-n-Octylamine. Fluid Phase Equilibria 1998.

[10]: SABOLOVA E, SCHLOSSER S, MARTAK J. Liquid-Liquid Equilibria of Butyric acid in Water + Solvent Systems with Trioctylamine as Extractant. J Chem Eng Data 2001.

[11]: SENOL A. Extraction Equilibria of Nicotinic Acid Using Alamine 336 and Conventional Solvents: Effect of Diluent. Chem Eng Journal 2001.

- [12]: LO TC, BAIRD MH, HANSON C. Handbook of Solvent Extraction. Ed. Wiley Interscience, New York ,1983.
- [13]: M. Le moniteur de l'internat. Tome 1. Toxicologie Sciences Mathématiques, Physiques et chimiques. Ed : Wolters Kluwer, 2005.
- [14]: Richard Giasson, Cours de chimie de l'université de Montréal. Spectroscopie infrarouge, 2009.
- [15]: La fond R. Université Pierre et Marie Curie - UFR de Biologie. Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules C-Techniques spectroscopiques, 2016.
- [16] : F. GUEDIRA, Université Mohammed V-Agdal / FSR/ Master de sciences analytiques/ M9/ cours de Spectroscopie Ultraviolette/, 2016.
- [17]: VAN DROOGHENBROECK, J.-F., BALOT, F. et WILLEMS, G., *Leçons de méthodologie juridique*, Bruxelles, Larcier, 2009.
- [18]: VANHEULE, D., KEMPEN, M. et OVERBEEKE, A., *Hoe vind ik recht ?*, Antwerpen, Maklu, 2003.
- [19]: Harborne, J.B. and Williams, C.A. *Phytochemistry*, (2000).
- [20]: Hesse M. ; *Alkaloids – Nature's Curse or Blessing*, Wiley – VCH, 2002.
- [21]: Mauro Neves Muniz, Synthèse d'alcaloïdes biologiquement, thèse de doctorat Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006.
- [22]: Jacques E. POISSON, « ALCALOÏDES », *Encyclopædia Universalis*, le 26 mars 2016.
- [23]: Bhat, S. V, Nagasampagi, B. A, Sivakumar, M. *Chemistry of Natural Products*. Narosa, New Delhi, India. 2005.
- [24]: Dvoskin, L. P. ; Crooks, P. A. *Biochem. Pharmacol*, 2002.

- [25]: Raj, H. ; Bakshi, G. S. ; Tiwari, R. R. ; Anand, A. ; Paintal, A. S. *Respir. Physiol. Neurobiol*, 2005.
- [26] : Harborne, J. B., and Herbert B. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Bristol: Taylor & Francis. 1995.
- [27]: Hartmann, T. ; Witte, L. *Alkaloids : Chemical and biological perspectives*, Ed. S. W. Pelletier 1995.
- [28]: Dewick, P. M.; *Medicinal Natural Products*. Wiley. 2001.
- [29]: De Clercq, E. *Med. Res. Rev.* 2000.
- [30]: Pugsley, M. K. ; Saint, D. A. ; Hayes, E. ; Berlin, K. D. ; Walker, M. J. A. *Eur. J. Pharmacol*, 1995.
- [31]: Kupeli, E. ; Kosar, M. ; Yesilada, E. ; Husnu, K. ; Baser, C. *Life Sci.* 2002.
- [32]: Rabbani, G. H. ; Butler, T. ; Knight, J. J. *Infectious Dis.* 1987.
- [33] : Wani, M. C. ; Ronman, P. E. ; Lindley, J. T. L. ; Wall, M. E. *J. Med. Chem.* 1980.
- [34]: Hsiang, Y. H. ; Herzberg, R. ; Hecht, S. ; Liu, L. F. *J. Biol. Chem.* 1985.
- [35]: Ardizzoni, A. *Lung Cancer.* 1995.
- [36]: Esteves-Souza, A., Silva, T. M. S.; Alves, C. C. F.; Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R.; Echevarria, A. J. *Braz. Chem. Soc.*, 2002.
- [37] : Jiang, S. ; Zeng, Q. ; Gettayacamin, M. ; Tungtaeng, A. ; Wannaying S. ; Lim, A. ; Hansukjariya, P. ; Okunji, C. O. ; Zhu, S. ; Fang, D. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005.
- [38]: Guilbaud, N. ; Kraus-Berthier, L. ; Meyer-Losic, F. ; Malivet, V. ; Chacun, C. ; Jan,

M. ; Tillequin, F. ; Michel, S. ; Koch, M. ; Pfeiffer, B. ; Atassi, G. ; Hickman, J. ; Pierre, A. Clinical Cancer Research, 2001.

[39]: Ye, M. ; Qu, G. ; Guo, H. ; Guo, D. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, 2004.

[40]: Jiang, S. ; Zeng, Q. ; Gettayacamin, M. ; Tungtaeng, A. ; Wannaying S. ; Lim, A. ; Hansukjariya, P. ; Okunji, C. O. ; Zhu, S. ; Fang, D. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005.

[42]: Katoh, M. ; Matsune, R. ; Nagase, H. ; Honda, T. *Tetrahedron Lett.* 2004.

[43]: Muggia, F. M. ; Dimery, I. ; Arbuck, S. G. *Ann N Y Acad. Sci.* 1996.

[44]: Esteves-Souza, A., Silva, T. M. S.; Alves, C. C. F.; Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R.; Echevarria, A. J. *Braz. Chem. Soc.*, 2002.

[45]: Katoh, M. ; Matsune, R. ; Nagase, H. ; Honda, T. *Tetrahedron Lett.* 2004.

[46]: Thepe de la caféine du the-et-du-café, Origine et nature, 2016.

[47]: EU Register on nutrition and health claims, EFSA, 2014.

[48]: Adeline HUYGHE, Bienfaits et limites de la consommation de caféine thèse de doctorat en pharmacie, Université de Lille 2,2014.

[49]: Robert Bruneton, Max Wichtl, *Plantes thérapeutiques* 2ème édition, 2012.

[50]: Rogers PJ, Hohoff C, Heatherley SV, Mullings EL, Maxfield PJ, Evershed RP, Deckert J, Nutt DJ, Association of the anxiogenic and alerting effects of caffeine with ADORA2A and ADORA1 polymorphisms and habitual level of caffeine consumption. *Neuropsychopharmacology* 2010.

[51]: Helmenstine, Anne Marie, Ph.D. "Theobromine Chemistry- Theobromine Is Chocolate's Caffeine Relative, 22 Feb 2014.

[52]: S., Boulanger, R., & Cros, E. *The Hershey Company Chocolate and caffeine*, 2012.

[53]: Smit, H. J., and Blackburn, R. J. Rein forcing effects of caffeine and theobromine as found in chocolate, 2005.

- [54]: Smit HJ, Blackburn RJ, Reinforcing effects of caffeine and theobromine as found in chocolate. *Psychopharmacology* 2005.
- [55]: Smit, H. J., Gaffan, E. A., and Rogers, P. J. Methylxanthines are the psychopharmacologically active constituents of chocolate 2004.
- [56]: Davrieux, F., Assemat, Improved analysis of theobromine and caffeine in chocolate food products formulated with cocoa powder. *Food Research International*, 2004.
- [57]: Sugimoto, N., Miwa, S., Hitomi, Y., Nakamura, H., Tsuchiya, H., and Yachie, A. Theobromine, the primary methylxanthine found in *Theobroma cacao*, prevent smalignant glioblastoma proliferation by negatively regulating phosphodiesterase-4, extracellular signal-regulated kinase, Akt/mammalian target of rapamycin kinase, and nuclear factor-kappa B , 2014.
- [58]: Lebeau, Courtois-Traité de pharmacie chimique. Paris, Masson, 1980.
- [59]: Carvalho, M. G, Braz-Filho, R, *Agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, journal, Volume 26 Année 1979 Numéro 3 pp. 233-246.
- [60]: Lambropoulou DA, Albanis TA. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. *J Biochem Biophys Methods*, 2007.
- [61]: Yanful E.K. et Mousavi S.M. Estimating falling rate evaporation from finite soil columns, *The Science of the Total Environment*, 2003.
- [62]: N. Cheymol, ENCPB / RN Chimie Point de Fusion Stuart Analogique Numrique Technologie 2009.
- [63]: Ahamet S., *Etudes phytochimiques et des activités biologiques de Balanites aegyptica (Balanitaceae)*. Thèse de pharmacie, Bamako, 2003.
- [64]: Guillaume, [Www. Second euro-bioweb.com/microbiologie/](http://www.Second-euro-bioweb.com/microbiologie/) microbiologie cours, 2000.
- [65]: Prescott., Harley & Klein, *Microbiologi*. Bruxelles. De Boeck Université, 1995.