



THESE



N° d'ordre 004 - 06/FDCA/FAST/UAC

Présentée devant

Université d'Abomey-Calavi
Formation Doctorale,
Chimie et Applications (UAC), Bénin

et

Université Montpellier II
Sciences et Technique du Languedoc,
Ecole Doctorale, Science et Procédés
Biologiques et Industriels (UMII), France

Pour l'obtention du grade de **Docteur des deux Universités**
Mention : Chimie Physique et Théorique
Spécialités : Chimie Physique, Génie Chimique – Procédés

Par **DJENONTIN Tindo Sébastien**

Etude de graines oléagineuses du Bénin

Caractérisation chimique

Fractionnement et activité biocide

Soutenue le 15 Décembre 2006 devant le Jury composé de :

M. Bernard BATAILLE	Professeur, Université Montpellier I, UMR CIRAD 016 GPEB,	Président
M. Honoré Kossi KOUMAGLO	Professeur, Université de Lomé,	Rapporteur
M. Paul-Henri DUCROT	Dr HDR, Directeur de Recherche INRA,	Rapporteur
M. Dominique C.K. SOHOUNHLOUE	Maître de Conférences/CAMES, Université d'Ab-Calavi,	Directeur de thèse
M. Daniel Auguste PIOCH	Dr HDR, UMR CIRAD 016 GPEB,	Directeur de thèse
M. Jean Cossi HOUNGBOSSA	Maître de Conférences/CAMES, Université d'Ab-Calavi,	Examineur
M. Patrick PRUDENT	Dr, CIRAD-Bénin,	Invité

Année académique 2005-2006

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été effectuée sous la co-tutelle de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin) et de l'Université Montpellier II (France). Je remercie les responsables des deux Ecoles Doctorales impliquées respectivement le Professeur Mansourou MOUDACHIROU et le Professeur Jean-Marie NAVARRO pour m'y avoir accepté.

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin) et à l'UMR CIRAD 016 UMI-UMII. Je remercie tous les chercheurs dont les compétences ont été mobilisées lors de la réalisation de ce travail et en particulier le Professeur Alain GRASMICK, Directeur de la Formation Doctorale Génie des Procédés et Directeur de l'UMR CIRAD 016.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude au Professeur Dominique C.K. SOHOUNHLOUE (Directeur du LERCA/EPAC/UAC), Directeur de Thèse, qui a inspiré ce travail et l'a dirigé avec bienveillance et attention. Je lui suis également reconnaissant pour ses suggestions et conseils ainsi que la confiance et l'estime qu'il m'a témoignés tout au long de ce travail.

Je voudrais particulièrement adresser mes sincères reconnaissances au Dr HDR Daniel Auguste PIOCH (UMR CIRAD 016), Directeur de thèse pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour ses précieuses suggestions et utiles conseils tout au long de cette thèse. Je le prie d'accepter toute ma gratitude.

Je tiens à remercier le Professeur Bernard BATAILLE (Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier I, UMR CIRAD 016), pour l'honneur qu'il m'a fait de présider ce jury de soutenance de thèse.

Je tiens également à remercier le Professeur Honoré Kossi KOUMAGLO (Université de Lomé, Togo) ainsi que le Dr HDR Paul-Henri DUCROT (Directeur de Recherche à l'INRA/Paris Versailles) qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

Mes remerciements vont aussi au Professeur Jean Cossi HOUNGBOSSA (Université d'Abomey-Calavi) qui a accepté de participer au jury de thèse. Je suis également reconnaissant au Dr Patrick PRUDENT (Représentant du CIRAD au Bénin) pour avoir accepté mon invitation à se joindre au jury de thèse.

Je voudrais particulièrement remercier Madame le Docteur Nadine AMUSANT, chercheur au Cirad-Forêt (Laboratoire de Préservation du Bois) pour sa disponibilité, sa sympathie et son sourire. Elle a guidé avec compétence et bienveillance, mes essais anti-termite. Je ne saurais oublier ses collègues du laboratoire de Préservation du Bois du Cirad à savoir : Christine BAUDASSE, Nicolas LEMENAGER, Luc MARTIN, Marie-France THEVENON pour l'aide.

Ce travail m'a par ailleurs conduit à collaborer avec différentes équipes du CIRAD EMVT et CBGP (Baillarguet), CIRAD-Forêt, CIRAD-CP et Cirad-US Analyses (Montpellier) ; de l'INP-HB (Yamoussokro-Côte d'Ivoire); du SCA-CNRS/Lyon ; de l'UMR CIRAD 016 (Montpellier) et de EMBRAPA (Brésil) dont je remercie sincèrement les chercheurs : Augustin A. ADIMA, Denis BASTIANELLI, Dominique FRIOT, Gisèle HERAL-LLIMOUS, Cathérine HERVOUET, Patrick JAME, Régina LAGO, Paul LOZANO, Yves LOZANO, Gilles MOREL, Serge PALU, Thierry RUIZ et Jean-Michel VASSAL pour leur appui primordial pour l'aboutissement de cette oeuvre.

Mes remerciements vont aussi au Dr. Steve BOWRA, Directeur de l'entreprise PHYTATEC qui a mis à la disposition du laboratoire au CIRAD, le pilote CO₂ supercritique.

Merci à tous les chercheurs du LERCA notamment les Professeurs Félicien AVLESSI, Henri SOCLO, Mohamed SOUMANOU et Docteurs Edwige AHOUSSE, Justine DANGOU, Valentin WOTTO et Mr Arnaud SAGBO, pour leur soutien et leurs conseils de même que mes compagnons de laboratoire au Bénin et en France notamment Alix, Guy, Farid, Fidèle et Linghua. L'esprit de groupe l'a emporté sur nos différences individuelles. Votre chaleur humaine et fraternelle m'ont fortement soutenu.

Ce programme de recherche a été financé par la Coopération Française par le biais de son Ambassade à Cotonou. Je saisis cette opportunité pour exprimer toute ma reconnaissance aux Responsables du SCAC/Cotonou.

Ma gratitude va également à la Délégation des Echanges Scientifiques Internationaux du CIRAD qui m'a octroyé des allocations de recherche dans le cadre des présents travaux, en particulier à Madame Patricia CHEIKHE qui a contribué à l'organisation des séjours. Je voudrais remercier Madame le Docteur Sylvie LEWICKI, Directrice Régionale de CIRAD-Afrique Centrale pour son appui.

DEDICACES

Je dédie cette thèse à

Toutes les personnes chères qui m'ont subitement quitté,

Mon Père André C. DJENONTIN, ma Mère Zinhoué A-M.T. TOBOSSI et à toute la Famille DJENONTIN à qui je dois tout,

Mon Fils Vidimi Déffodji S.P. et à mon épouse Opportune O.D. pour leur courage et esprit de sacrifice,

Mes Frères et soeurs ainsi qu'à leur petite famille, pour leur conseil et leur soutien,

Mes neveux : Aubin, Ahmed, Abdoul, Sabin, Tundé, Fifa, ainsi qu'à Vidimi afin de les tenir à suivre la voie tracée,

Mes Amis.

AVANT-PROPOS

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la biodiversité (espèces oléagineuses du Bénin), substitution des composés actifs de synthèses par des produits naturels.

Le Bénin est situé en Afrique de l'Ouest dans la zone tropicale entre l'équateur et le tropique du Cancer (entre les parallèles 6°30' et 12°30' de Latitude Nord et les méridiens 1° et 30°40' de longitude Est). Il est limité au Nord par le fleuve Niger qui le sépare de la République du Niger; au Nord-Ouest par le Burkina Faso, à l'Ouest par le Togo, à l'Est par le Nigeria et au Sud par l'Océan Atlantique. La superficie du Bénin est de 114.763 Km². Du Nord au Sud, il s'étend sur 700 Km; La largeur varie de 125 Km (le long de la côte) à 325 Km (à la latitude Tanguéta-Ségbana).

Il existe deux types de climat à savoir :

- *Le climat de type subéquatorial au Sud comprenant les saisons ci-après : une grande saison des pluies d'avril à juillet; une petite saison sèche de juillet à septembre; une petite saison pluvieuse de septembre à octobre ; une grande saison sèche de novembre à mars;*
- *Le climat soudanien au Nord comprenant deux saisons : une saison sèche de novembre à mai; une saison pluvieuse de juin à septembre.*

Le Bénin possède trois types de végétation: Savane arborée dans les régions soudanaises du Nord; Savane au Centre avec des essences comme l'Acajou, l'Iroko; Forêt au Sud et au Moyen Bénin.

Le Bénin dispose de deux parcs nationaux au Nord : PENDJARI 275.000 ha; et «W» 502.000 ha. On y rencontre des éléphants, des buffles, des hippopotames, des lions, des guépards, des caïmans, des antilopes, des oiseaux, des singes, des reptiles, des léopards, des insectes, etc.

Les échantillons analysés dans cette thèse sont récoltés principalement dans le Sud Bénin. Cette thèse s'organise autour des objectifs suivants :

1. *Etude de la composition de graines oléagineuses peu étudiées,*
2. *Recherche des composés à valoriser dans le domaine de la préservation du bois,*
3. *Mise au point de méthodes et procédés respectueux de l'environnement au bénéfice du développement rural.*

Le programme de thèse prévoit les étapes suivantes :

1. *Sélection des espèces, collecte, traitement post-collecte, fractionnement de la biomasse,*
2. *Etude de la composition chimique des fractions,*
3. *Obtention d'extraits et activité termicide.*

Le volet analyse chimique complétera la connaissance des espèces sélectionnées. Une utilisation sera recherchée pour les co-produits (coque, tourteau d'extraction, huile). L'activité des composés étudiés dans les quatre espèces sélectionnées couvre plusieurs domaines, mais seul celui de la préservation du bois a pu être étudié. Au plan fondamental, les résultats relatifs à la partition en milieu CO₂ SC et hydroéthanolique enrichiront la base de données du CIRAD et contribueront à l'effort de modélisation des interactions entre les nombreux composants de ces produits naturels (effets de matrice).

Le présent travail converge avec l'intérêt ou les attentes du CIRAD et de ses partenaires du sud dont l'UAC. La compétitivité économique d'une production sera évaluée à partir des résultats obtenus dans les différents laboratoires d'analyse, de tests et ceux axés sur les procédés d'extraction de bioproduits.

Le présent programme favorisera les liens avec les différentes institutions mises à contribution et favorisera :

1. *La formation d'un jeune chercheur du Sud (BENIN),*
2. *Le renforcement des activités d'un Laboratoire du Sud (LERCA),*
3. *La mise en place d'un Réseau Régional /Oléagineux Actifs.*

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION GENERALE	2
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	6
Introduction	7
Chapitre I : Description des espèces végétales sélectionnées : Botanique	
– Ecologie – Utilisations – Intérêt pour la thèse - Produits naturels insecticides	10
I.1 Historique	11
I.2 <i>Annona squamosa</i>	11
I.3 <i>Azadirachta indica</i>	13
I.4 <i>Carapa procera</i>	16
I.5 <i>Parkia biglobosa</i>	18
I.6 Produits naturels actifs des quatre oléagineux sélectionnés	21
I.7 Lutte anti-termites	31
Chapitre II : Lipides et composition chimique des graines oléagineuses	37
II.1 Composition des huiles végétales	37
II.2 Procédés d'extraction des huiles végétales	44
II.3 Techniques d'analyses des lipides	45
II.4 Utilisations des huiles végétales	48
II.5 Production d'huiles végétales	51
II.6 Composition chimique des graines	54
Chapitre III : Extraction en milieu CO₂ Supercritique	59
III.1 Historique	59
III.2 Propriétés des fluides supercritiques	59
III.3 CO ₂ SC comme solvant	60
III.4 Procédés d'extraction des produits actifs naturels avec le CO ₂ SC	67
Conclusion	71
DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES	72
Chapitre IV : Caractérisation chimique des graines	74
IV.1 Introduction	74
IV.2 Processus de sélection des espèces	74
IV.3 Récolte-stabilisation-transport	74
IV.4 Caractérisation physique et chimique	76
IV.5 Caractérisation des lipides	80
IV.6 Caractérisation des protéines par dosage des acides aminés	85
IV.7 Caractérisation des glucides	87
IV.8 Caractérisation des lignocelluloses : séquence de Van Soest	92

Chapitre V : Obtention des extraits – Caractérisation chimique	97
V.1 Introduction	97
V.2 Dénomination des extraits	97
V.3 Obtention d'extraits hexaniques	98
V.4 Obtention d'extraits hydroéthanoliques	99
V.5 Obtention d'extraits hydroacétoniques	101
V.6 Obtention d'extraits en milieu CO ₂ SC	101
V.7 Solides résiduels obtenus lors des extractions précédentes	101
V.8 Obtention d'extrait par partition liquide-liquide	103
V.9 Caractérisation chimique des extraits obtenus	106
Chapitre VI : Activité termicide d'extraits des quatre graines sélectionnées	110
VI.1 Introduction	110
VI.2 Description des termites utilisés	110
VI.3 Test de non choix (screening tests)	111
VI.4 Essai Normalisé EN118	113
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS	118
Chapitre VII : Caractérisation chimique des graines	120
VII.1 Introduction	121
VII.2 Processus de sélection des espèces sélectionnées	122
VII.3 Composition pondérale des quatre graines sélectionnées	126
VII.4 Caractérisation chimique des différentes parties des quatre graines sélectionnées	130
VII.5 Conclusion	145
Chapitre VIII : Obtention des extraits – Essai de caractérisation chimique	146
VIII.1 Introduction	146
VIII.2 Obtention des extraits	147
VIII.3 Essai de caractérisation des extraits obtenus	162
VIII.4 Caractérisation chimique des fractions de chromatographie	166
VIII.5 Conclusion	170
Chapitre IX : Activité termicide d'extraits des quatre graines sélectionnées	173
IX.1 Introduction	173
IX.2 Résultats des essais : tests de screening et essai normalisé EN 118	174
IX.3 Etude de l'activité termicide de <i>A. squamosa</i>	185
IX.4 Synthèse des résultats : Efficacité – Applications	198
IX.5 Conclusion	200
CONCLUSION GENERALE	203
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	207
ANNEXES	222

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Fruit de <i>Annona squamosa</i>	11
Figure 2 : <i>Azadirachta indica</i>	14
Figure 3 : <i>Carapa procera</i>	16
Figure 4 : <i>Parkia biglobosa</i>	19
Figure 5 : Structure chimique et mode d'action des acétogénines	22
Figure 6 : Structures chimiques de composés bioactifs de <i>A. squamosa</i>	24
Figure 7 : Structure chimique de composés bioactifs de <i>A. indica</i>	27
Figure 8 : Structure chimique de composés bioactifs de <i>C. procera</i>	29
Figure 9 : Structure chimique de composés bioactifs de <i>P. biglobosa</i>	30
Figure 10 : Termites en galeries	31
Figure 11 : Prévention et lutte anti-termites	34
Figure 12 : Structure chimique des acides gras courants dans les huiles végétales	38
Figure 13 : Structure chimique des glycérides	39
Figure 14 : Structure chimique des phospholipides dans les huiles végétales	40
Figure 15 : Structure chimique des stérols dans les huiles végétales	42
Figure 16 : Structure chimique des vitamines lyposolubles	43
Figure 17 : Répartition des polymères pariétaux dans les résidus de graines oléagineuses	57
Figure 18 : Diagramme de phase du gaz carbonique (CO ₂)	61
Figure 19 : Dénomination des extraits obtenus	97
Figure 20 : Méthode d'obtention des solides résiduels	102
Figure 21 : Diagramme de partition liquide-liquide : protocole de Fang-Rong (1999)	105
Figure 22 : <i>Reticulitermes santონensis</i>	110
Figure 23 : Différentes étapes du test de non choix	113
Figure 24 : Bois de <i>Pinus radiata</i>	114
Figure 25 : Différentes étapes de l'essai EN118	115
Figure 26 : Les quatre espèces oléagineuses sélectionnées	124
Figure 27 : Classement des quatre oléagineux choisis (score/critères)	126
Figure 28 : Les quatre graines sélectionnées	127
Figure 29 : Cascade de séparations successives des différentes parties des quatre graines sélectionnées	128
Figure 30 : Composition pondérale des différentes parties des graines	129
Figure 31 : Séparation des différentes parties du fruit mûr de <i>A. squamosa</i>	130
Figure 32 : Teneurs en stérols des huiles	139
Figure 33 : Teneurs en tocophérols des huiles	141
Figure 34 : Rendement d'extraction en Soxhlet d'amande de <i>A. squamosa</i>	150
Figure 35 : Rendement d'extraction d'amande de <i>A. squamosa</i> par étape avec l'hexane	151
Figure 36 : Rendement d'extrait par étape en fonction de la composition-éthanol/eau	154
Figure 37 : Evolution du rendement d'extraction cumulé (3 ^{ème} étape) en fonction de la composition du mélange hydroéthanolique	154
Figure 38 : Effet de la variation de la granulométrie sur le rendement d'extrait hydroéthanolique 80/20 d'amande de <i>A. squamosa</i>	155
Figure 39 : Courbes d'équilibre de l'extrait en fonction du pourcentage d'éthanol présent dans le solvant	157
Figure 40 : Droites opératoires des différentes étapes d'extraction pour les différents mélanges éthanol/eau	159
Figure 41 : Bilan de matière des différentes fractions après chromatographie préparative sur colonne	161
Figure 42 : Rendement d'extraction par étapes en milieu CO ₂ SC pur	162
Figure 43 : Rendement d'extraction par étapes en milieu CO ₂ SC avec éthanol	164
Figure 44 : Spectres MS-MS de la fraction F-13	169

Figure 45 : Structures des différentes acétogénines possibles dans F-13	170
Figure 46 : Activité termicide des huiles des quatre graines sélectionnées	176
Figures 47 : Effet répulsif des quatre huiles (H-Ai, H-As, H-Cp, H-Pb)	177
Figure 48 : Efficacité préventive sur bois des huiles des trois graines (H-Ai, H-As, H-Cp)	178
Figure 49 : Activité termicide de l'extrait hexanique à 20 °C de <i>A. squamosa</i> (Hx-As/Ex)	179
Figure 50 : Activité termicide de l'extrait au CO ₂ SC (SC-As/Ex) de <i>A. squamosa</i>	180
Figure 51 : Activité termicide d'extraits hydroacétoniques de trois graines oléagineuses (AW-Az/Ex, AW-As/Ex, AW-Cp/Ex)	181
Figure 52 : Activité termicide d'extraits hydroéthanoliques de trois graines oléagineuses (EW-Az/Ex, EW-As/Ex, EW-As/Ex)	183
Figure 53 : Activité des solides après extractions (Am-As, Hx-As/S, EW-As/S, EW-Asdef/S)	184
Figure 54 : Activité termicide des extraits concentrés à 50%, m/m d'amande (EW-As/Ex, Hx-As/Ex, EW-Asdef/Ex)	186
Figure 55 : Activité termicide des extraits hydroéthanoliques d'amandes de (EW-As/Ex) obtenus avec différentes proportions éthanol/eau	187
Figure 56 : Activité termicide d'extraits hexaniques de <i>A. squamosa</i> (Hx-As/Ex) en fonction de la dose appliquée	189
Figure 57 : Activité termicide de l'extrait hydroéthanolique (80/20) sur amandes de <i>A. squamosa</i> (EW-As/Ex)	189
Figure 58 : Activité termicide d'extraits hydroéthanoliques sur amandes délipidées (EW-Asdef/Ex)	190
Figure 59 : Activité termicide des phases (P-CHCl ₃ , P-EP) obtenues par partition liquide-liquide de l'extrait hydroéthanolique sur amande de <i>A. squamosa</i>	192
Figure 60 : Activité termicide de la phase (P-MeOH) enrichie en acétogénines d'extraits d'amande de <i>A. squamosa</i>	193
Figure 61 : Activité termicide de la phase (P-Hx) appauvrie en acétogénines d'extraits d'amande de <i>A. squamosa</i>	193
Figure 62 : Activité termicide des fractions issues de chromatographie sur colonne de la phase enrichie en acétogénines (P-MeOH)	194
Figure 63 : Activité termicide par test de non choix des extraits les plus actifs de <i>A. squamosa</i> en 3 jours (P-MeOH, EW-Asdef/Ex, EW-As/Ex, Hx-As/Ex)	196
Figure 64 : Efficacité préventive sur bois des extraits les plus actifs (EW-Asdef/Ex et P-MeOH) par essai EN118 : Cotations	198

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau 1 : Caractérisation des tourteaux d'extraction des quatre graines sélectionnées d'après la bibliographie	54
Tableau 2 : Caractéristiques physique et chimique des huiles des quatre graines sélectionnées	55
Tableau 3 : Composition en acides gras des huiles d'après la bibliographie	56
Tableau 4 : Composition pondérale de la fraction stérolique d'après la bibliographie	56
Tableau 5 : Caractéristiques et quantité de produits déposés en CCM	56
Tableau 6 : Gammes de dilution pour l'étalonnage des étalons de tocophérols	85
Tableau 7 : Gamme d'étalonnage des acides aminés	86
Tableau 8 : Liste récapitulative des différents extraits testés	102
Tableau 9 : Différents solides testés	103
Tableau 10 : Liste des différentes phases obtenues par partition liquide-liquide d'extraits d'acétate d'éthyle d'amande de <i>A. squamosa</i>	104
Tableau 11 : Description des cotations et caractéristiques de l'attaque	117
Tableau 12 : Synthèse des données bibliographiques sur les oléagineux ciblés pour cette étude – Classement selon différents critères	123
Tableau 13 : Caractérisation des coques des quatre graines sélectionnées	131
Tableau 14 : Eléments minéraux des coques des quatre graines sélectionnées	132
Tableau 15 : Caractéristiques chimiques des huiles	135
Tableau 16 : Rapport frontal des différents composés par CCM des huiles	136
Tableau 17 : Composition pondérale massique en acides gras des huiles	136
Tableau 18 : Composition de la fraction stérolique des huiles	138
Tableau 19 : Composition de la fraction tocophérolique des huiles	140
Tableau 20 : Caractérisation des tourteaux d'extraction	141
Tableau 21 : Eléments minéraux dans les tourteaux d'extraction	144
Tableau 22 : Composition en acides aminés des tourteaux d'extraction	145
Tableau 23 : Rendement en extraits hexaniques pour les quatre graines sélectionnées (Soxhlet et batch)	150
Tableau 24 : Rendement en extrait hydroacétonique d'amande de As, Ai, Cp	151
Tableau 25 : Rendement en extrait hydroéthanolique d'amande de As, Ai, Cp	152
Tableau 26 : Variation de la masse volumique du mélange eau/éthanol en fonction des proportions du mélange	156
Tableau 27 : Rendement en extrait des phases issues de la partition liquide-liquide	160
Tableau 28 : Rf des étalons et des composés de l'huile d' <i>A. squamosa</i> et des extraits d'amande de <i>A. squamosa</i>	165
Tableau 29 : Microanalyse élémentaire de quelques extraits	167
Tableau 30 : Synthèse des principaux résultats relatifs à l'activité termicide des extraits des quatre oléagineux sélectionnés	199

LISTE DES ANNEXES

	Pages
Annexe 1 : Production mondiale d'oléagineux	222
Annexe 2 : Accroissement des productions d'huiles végétales nécessaires d'ici à 2020 dans les pays de l'UEMOA, à ration constante	223
Annexe 3 : Composition en acides gras de quelques huiles végétales	223
Annexe 4 : Rendement d'extraction (REX) en fonction de la pression et de la température (20 min d'extraction)	224
Annexe 5 : Pouvoir solvant du CO ₂ SC en fonction de la température et de la densité réduite du CO ₂ SC	224
Annexe 6 : Rendement d'extraction en fonction du type de prétraitement mécanique	224
Annexe 7 : Schéma et Principe de fonctionnement de l'appareil du pilote à solvant CO ₂ supercritique	225
Annexe 8 : Mise en marche du pilote à solvant supercritique	227
Annexe 9 : Plaque CCM qualitative des quatre huiles végétales	228
Annexe 10 : Chromatogrammes des acides gras	229
Annexe 11 : Chromatogrammes des stérols	230
Annexe 12 : Courbes d'étalonnage des tocophérols	231
Annexe 13 : Chromatogrammes des tocophérols	232
Annexe 14 : Caractérisation de tourteau d'extraction de quelques graines d'importance économique au Bénin	233
Annexe 15 : Composition en acides aminés de tourteaux d'extraction de Soja	233
Annexe 16 : Masse volumique des binaires éthanol/eau	233
Annexe 17 : Plaque CCM des composés de référence	234
Annexe 18 : Plaque CCM des lipides présents dans les extraits	234
Annexe 19 : Plaque CCM de l'huile d' <i>A. squamosa</i>	235
Annexe 20 : Test colorimétrique des acétogénines avec les réactifs de Kedde	235
Annexe 21 : Méthode de dosage des acétogénines dans les extraits	236
Annexe 22 : Microanalyse élémentaire des extraits	237
Annexe 23 : Spectre RMN de F-13	237

ABREVIATIONS ET NOMENCLATURES

Abréviations utilisées

\$US	:	Dollar US
ADF	:	Acid Detergent Fiber
ADL	:	Acide Detergent Lignin
AFID-USAID	:	African Food Industry Development-US Agency for International Development
AFNOR	:	French Standardisation Agency
AG	:	Acide Gras
AOAC	:	Association of Official Analytical Chemists
ATP	:	Adénosine Triphosphate
BPD	:	Biocide Product Directive
CBGP	:	Centre de Biologie et de Gestion des Populations
CCM	:	Chromatographie sur Couches Minces
CEDEAO	:	Communauté Economique des Etats de l'Afrique de l'Ouest
CTFT	:	Centre Technique Forestier Tropical
CIRAD	:	Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement
CLHP	:	Chromatographie Liquide Haute Performance
CO ₂ SC	:	CO ₂ Supercritique
COFRAC	:	Comité Français de Certification
CPG	:	Chromatographie en Phase Gazeuse
CRA	:	Centre de Recherche Agricola
DIF	:	Détecteur à Ionisation de flamme
DOD	:	Désodorisation Oil Distillate
ELSD	:	Evaporating Light Scattering Detector
EN118	:	Essai Normalisé 118
EPAC	:	Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi
FAO	:	World Organisation for Food and Agriculture
FROs	:	Formes Réactives de l'Oxygène
FSC	:	Fluide Supercritique
GC	:	Gas Chromatography
GPEB	:	Génie des Procédés d'Elaboration des Bioproduits
GRAS	:	Generally Recognized As Safe
HPLC/MS	:	High Performance Liquid Chromatography/ Masse Spectrometry de
IITA	:	Institut International d'Agriculture Tropicale
INP-HB	:	Institut National Polytechnique - Houphouët Boigny
INRA	:	Institut National de la Recherche Agronomique
INRAB	:	Institut National de la Recherche Agricole du Bénin
IR	:	Infra-Rouge
IR-TF	:	Infra-Rouge- Transformée de Fourier
IUPAC	:	International Union of Pure and Applied Chemistry
LERCA	:	Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée
LDL	:	Low Density Lipoproteine
MGL	:	Matière Grasse Laitière
MPRI	:	Medicinal Plant Research Institute
NAPRALERT	:	Natural Product ALERT
NDF	:	Neutral Detergent Fiber
PAN	:	Pesticide Action Network
PL	:	Phospholipides
PSC	:	Point Supercritique
RME	:	Chaînes d'Acides Gras Méthylées
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire

SCA	:	Service Central d'Analyse
SFE	:	Supercritical Fluid Extraction
TAG	:	Triacylglycerol
THF	:	Tétrahydrofurane
TPPE	:	Three Phase Partioning Extraction
UAC	:	Université d'Abomey-Calavi
UEMOA	:	Union Economique et Monétaire Ouest-Africaine
UMI	:	Université Montpellier I
UMII	:	Université Montpellier II
UMR	:	Unité Mixte de Recherche
US	:	Unité de Service
USA	:	United state of America
UV	:	Ultra-Violet

Nomenclatures utilisées

As	:	<i>Annona squamosa</i>
Ai	:	<i>Azadirachta indica</i>
AW	:	binaire acétone/eau
°C	:	Degré Celcius
C	:	Concentration
Cp	:	<i>Carapa procera</i>
Conc.	:	Concentration
D _L	:	Dispersion axiale (m ² /s)
DUT	:	Durée d'Unité de Transfert
Ex	:	Extrait
EW	:	Binaire éthanol/eau
F	:	Fraction extraite cumulée
FOPDT	:	Modèle du temps mort
g/kg	:	Unité de rendement d'extraction
Hx	:	Hexane
k	:	Coefficient de transfert de masse dans le modèle de cyclone en t ⁿ
K	:	Kelvin
Kg/H	:	Unité de rendement
MPa	:	Méga Pascal
n	:	Paramètre dans le modèle en t ⁿ
NUT	:	Nombre d'Unité de Transfert
P	:	Pression
P-	:	Phase
Pa	:	Pascal
Pb	:	<i>Parkia biglobosa</i>
Pc	:	Pression critique
Rf	:	Rapport frontal
T	:	Température (K)
T-	:	Témoin
t	:	Temps d'extraction
T _c	:	Température critique
TM	:	Taux de mortalité
t ⁿ	:	Modèle de cyclone
ρ	:	Masse volumique
ρ _r	:	Masse volumique de la fraction extraite

INTRODUCTION GENERALE



Forêt classée dans le sud-Bénin (CRA-Niaouli)

Diversité de la flore béninoise



Introduction Générale

Les pays en voie de développement, dont le Bénin, sont dotés d'une riche biodiversité. Cependant, dans un environnement technique moins favorisé, il y a une lacune en termes de connaissance chimique, de procédés et d'équipements applicables à l'étude et à la valorisation de cette biodiversité (Adjanooun *et al.*, 1986; Ambé, 2001).

L'un des défis auxquels font face ces pays dans leur démarche de développement durable, consiste en effet à concilier de nombreux objectifs : créer des activités agricoles et industrielles vectrices de développement, réduire la dépendance de produits importés, valoriser leurs ressources naturelles tout en les préservant, adopter des technologies respectueuses de leur environnement.

Au Bénin, il existe une grande variété de plantes oléagineuses que l'on utilise pour l'alimentation, l'éclairage et pour des usages industriels et pharmaceutiques. Les plus importantes sont : *Eleais guineensis* (palmier à huile), *Arachis hypogaeae* (Arachide), *Gossypum hirsutum* (coton), *Vitellaria paradoxa* (karité). La production de graines oléagineuses est encore limitée au Bénin. En effet, mis à part quelques efforts de transformation domestique ou par de petites unités artisanales, aucune action d'envergure de diversification des oléagineux n'est encore visiblement entreprise, comme l'ont été en leur temps le développement d'*Eleais guineensis* et de *Gossypum hirsutum* (Hirsch, 2002).

L'extraction et les transformations dans de bonnes conditions d'huiles végétales dérivées d'espèces peu exploitées, permettraient d'accroître sensiblement l'offre d'huiles comestibles ou industrielles et de participer à la réduction de la pauvreté chez les paysans qui par l'extractivisme ou l'agroforesterie, pourraient diversifier leurs activités génératrices de revenus.

D'un autre côté, la protection de l'environnement en général, fait actuellement l'objet des préoccupations aussi bien de la part des scientifiques que de celle des décideurs politiques. Par exemple, dans le domaine de la protection du bois, la directive biocide (European Biocide Product Directive BPD 98/8/CE) introduite en mai 2000 a eu et continuera d'avoir une grande incidence sur le choix du type de produits pouvant être utilisés comme pesticides dans l'espace européen. Plusieurs produits de traitement du bois en l'occurrence l'aldrine et la lindane ont ainsi été prohibés. Le nombre de produits actifs autorisés sera réduit

important, pourrait connaître de nouveaux développements et nécessiterait des progrès en termes de rationalité. Celle-ci passe par la valorisation optimisée de la totalité de la biomasse collectée (par opposition au concept de l'extraction d'un seul principe actif) ; la mise en œuvre de procédés respectueux de l'environnement ; l'optimisation du couple avantage économique/impact environnemental (M'hrit et *al.* 1998); l'étude d'autres modes de régénération à faible coût que la seule reproduction sexuée en vue d'améliorer la préservation de la ressource (Alouani, 2003; Bellefontaine, 2005). Pour cette raison, nous avons fait l'effort de caractériser la biomasse collectée dans sa totalité, sans se limiter à l'amande oléagineuse.

Du point de vue méthodologique l'alternance des séjours en France et au Bénin a permis la consultation de spécialistes tant à l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin) qu'à l'extérieur : Cirad-Lavalette, INRA-Paris, CBGP-Baillarguet (France), INP-FHB (Côte-d'Ivoire) et des enquêtes de terrain, une liste d'une dizaine d'espèces a été dressée. Quatre espèces de cette liste ont été sélectionnées selon certains critères définis en fonction des objectifs scientifiques et appliqués de ce travail : *Annona squamosa*, *Azadirachta indica*, *Carapa procera*, *Parkia biglobosa*.

Le fait de donner une valeur aux produits d'oléagineux forestiers à travers une exploitation raisonnée devrait plaider en faveur de la préservation des espèces ciblées, surtout *Carapa procera* et *Parkia biglobosa*, et de leurs écosystèmes (biodiversité) tout en améliorant les conditions de vie des populations.

Ce mémoire de thèse comprend trois grandes parties structurées chacune en trois chapitres :

L'étude bibliographique de la Première Partie (§ Chapitres I - III) fait le point de la connaissance des quatre espèces considérées. Elle est complétée par les informations données par les accompagnateurs locaux (savoirs et savoir-faire) : composition et procédés d'extraction des huiles végétales, connaissance botanique et possibilités de valorisation, intérêt pour la thèse; produits naturels insecticides (comme substitut de produits de synthèse organique) dans le domaine de la préservation du bois; extraction de composés naturels par le CO₂ supercritique, en tant que procédé innovant.

La Deuxième partie, Matériels et Méthodes (§ Chapitres IV – VI), rassemble les protocoles utilisés pour caractériser la biomasse, méthodes normalisées ou non, techniques

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Chapitre I : Description des espèces végétales sélectionnées : Botanique –
Ecologie – Utilisations – Intérêt pour la thèse - Produits naturels insecticides

Chapitre II : Lipides et composition chimique des graines oléagineuses

Chapitre III : Extraction en milieu CO₂ Supercritique

Conclusion

Introduction

Depuis ses origines, l'homme a toujours su montrer de l'intérêt pour les lipides. On trouve au travers des siècles les plus anciens, les traces de cette connaissance. Si les Egyptiens savaient isoler les huiles et les graisses et les utiliser à diverses fins (teintures, cires), on ne peut oublier que déjà l'homme préhistorique savait s'éclairer en brûlant des graisses. Ces hommes utilisaient les lipides (huiles de pulpes, graisses d'animaux), notamment en cosmétique et en médecine.

Notre connaissance des huiles s'est maintenant améliorée et les applications se sont multipliées avec l'exploration et l'exploitation industrielle de nouvelles sources de corps gras (Gunstone *et al.*, 1986; Karleskind, 2000).

Dans les cinq ou dix prochaines décennies, les réserves pétrolières mondiales qui constituent l'essentiel de la matière première des industries chimiques seront épuisées (Derksen *et al.*, 1994). Contrairement aux ressources fossiles, les huiles végétales sont renouvelables, sans les idéaliser, elles offrent des avantages écologiques certains (Murphy, 1994).

L'importance de la demande future en huiles justifie les études d'exploratoires sur de nouvelles sources, en l'occurrence, graines et pulpes oléagineuses peu étudiées. Le champ est vaste car seulement 10 % des plantes du règne végétal ont été chimiquement analysées (Volker, 1999). La plupart de ces espèces sont localisées dans les régions tropicales et subtropicales auxquelles le Bénin appartient, et de nombreuses plantes, malgré leur potentiel lipidique sont encore peu ou pas exploitées.

En dépit de l'importance de la littérature durant ces dernières années sur les données chimiques, les informations restent incomplètes. Ainsi, il s'avère judicieux de sélectionner d'autres oléagineux potentiels afin de contribuer à la connaissance chimique de leurs produits (coque, tourteau d'extraction, huile) par des méthodes analytiques modernes (Byrdwell, 2005).

Le présent travail s'inscrit dans cette perspective et se veut exploratoire pour certaines graines oléagineuses du Bénin peu exploitées dans le but de favoriser leur valorisation (Volker, 1999).

De plus, la protection de l'environnement devenant l'une des priorités de notre société, tous les secteurs d'activité sont concernés, en particulier le domaine de préservation du bois, dans lequel

Chapitre I

Description des espèces végétales sélectionnées : Botanique – Ecologie – Utilisations Produits naturels insecticides

I.1 Historique

I.2 *Annona squamosa*

I.3 *Azadirachta indica*

I.4 *Carapa procera*

I.5 *Parkia biglobosa*

I.6 Produits naturels actifs des quatre oléagineux sélectionnés

I.7 Lutte anti-termites

Chapitre I

Espèces végétales retenues pour étude :

Botanique – Ecologie – Utilisations - Produits naturels
insecticides

L'année 1992 a marqué un tournant dans de nombreuses politiques industrielles. Non seulement certaines ressources naturelles s'épuisent plus vite qu'elles ne se renouvellent, mais en plus, leur utilisation par l'homme engendre des émissions polluantes dans l'air, le sol et l'eau (Iwata *et al.*, 1993; Loganathan *et al.*, 1994). Le constat fait lors de la Conférence de Rio (1992) sur l'état de dégradation inquiétant de notre environnement naturel a fait évoluer les mentalités. La Conférence de Rio n'est que la première étape d'un processus de « réforme environnementale ».

Une idée domine, il faut limiter la pollution à la source et élaborer les produits les moins nuisibles possibles pour le milieu naturel. Il a été démontré que beaucoup de composants naturellement présents dans les huiles végétales ou d'extraits de graines oléagineuses, ont des propriétés bénéfiques : triterpénoïdes, tétranortriterpénoïdes, composés phénoliques, acétogénines, alcaloïdes, limonoïdes.

Face aux nombreux cas de résistance aux insecticides chimiques classiques et aux conséquences souvent néfastes de l'usage des molécules de synthèse sur l'environnement, l'évolution des méthodes actuelles de lutte pour la sauvegarde de l'état sanitaire des cultures plaide en faveur de l'utilisation des moyens biologiques.

Le champ est donc très ouvert dans ce volet mais les potentialités des extraits naturels de plantes sont encore trop peu étudiées dans le domaine de la préservation du bois, quasi monopolisé par l'industrie chimique phytosanitaire.

Parmi les quatre espèces ciblées, *A. indica* est considéré comme référence en terme de bibliométrie et d'utilisation à grande échelle d'une espèce végétale en phytosanitaire.

I.1 Historique – Insecticides naturels

Vers le milieu du XIX^{ème} siècle, l'explosion démographique de la population humaine et le fort développement de l'activité industrielle, imposèrent l'intensification de la production et de la productivité agricole.

Avant cette période, le paysan disposait surtout de ses mains pour lutter contre les pullulations d'insectes (Riba et Sylvi, 1989). Très tôt cependant, en plus du recours à des dérivés du cuivre et de l'arsenic, on a cherché à tirer profit de l'action insecticide de diverses substances d'origine végétale pour protéger les cultures contre les ravageurs.

L'utilisation des produits dérivés de plantes, remonte ainsi aux temps anciens et, jusqu'à la seconde guerre mondiale, les seuls produits « botaniques » connus ont été le pyrèthre, la roténone, la nicotine et la sabadille (Jacobson, 1989).

Si les progrès de la chimie ont favorisé l'obtention d'analogues de synthèse tels les pyrèthrinoïdes, ils ont aussi permis d'étudier un nombre important de substances extraites de plantes et possédant des activités insecticides.

Arnason *et al.* (1987) ont évalué sur *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lépidoptère : Pyralidae), six limonoïdes extraites de plantes appartenant à la famille des rutacées. D'autres substances chimiques (alcaloïdes, terpénoïdes phénoliques) extraites d'asteracées, d'annonacées et de mavacées, ont révélé des activités biologiques diversifiées sur les insectes ravageurs, les nématodes et les agents phytopathogènes. Ces substances naturelles, notamment des dérivés du pyrèthre et de la nicotine, ont révélé des structures chimiques intéressantes pour leur mode d'action original, leur conférant une efficacité là où des résistances sont apparues vis-à-vis d'autres molécules chimiques (Delorme et Mauchamp, 1996).

I.2 *Annona squamosa*

I.2.1 Botanique (www.tropilab.com; www.tous.les.fruits.com, consultées en 2004)



Figure 1 : Fruit de *Annona squamosa*

Originaire des parties basses de l'Amérique tropicale, cette plante est maintenant cultivée dans de nombreux pays tropicaux. La pomme cannelle, zatte, zattier, ou annone écailleuse est l'un des représentants de la famille botanique des annonacées. Cette famille est importante non seulement par le nombre des espèces mais aussi par la richesse du point de vue chimique.

Les fruits sont globuleux de 7 à 10 cm de diamètre, un peu arrondis, de couleur vert-jaune à gris-rosée, l'épiderme est composé de

protubérances écailleuses. A maturité, les fruits présentent des marbrures et des reflets bleutés; ils s'ouvrent alors facilement. Le fruit est facilement attaqué par certaines chenilles et une surveillance phytosanitaire est donc nécessaire. La pulpe un peu granuleuse et blanche contient beaucoup de graines brunes et brillantes (Figure 1).

1.2.2 Ecologie (www.tropilab.com; www.tous.les.fruits.com, consultées en 2004)

La plante est très résistante aux conditions de sécheresse. Elle se plaît bien en climat chaud et sec, et peut pousser sur les sols pierreux et sur des terrains pauvres, en pente, plutôt secs. Pour cela, elle peut servir à stabiliser des zones fragiles et dégradées. *A. squamosa* peut se contenter d'une pluviométrie inférieure à 1.500 mm par an et a besoin d'un bon drainage.

Multipliée par semis, elle fructifie trois à quatre ans après la plantation. Sur des sols ordinaires, les rendements sont de l'ordre de 50 à 100 fruits par arbre. Par contre, sur des sols fertiles, un arbre peut porter jusqu'à 500 fruits. Un verger bien entretenu peut être rentable pendant 15 à 20 ans.

Cette espèce peut aussi donner une plante d'appartement intéressante supportant sans problème les atmosphères sèches.

1.2.3 Utilisations (www.tropilab.com; www.tous.les.fruits.com, consultées en 2004)

La pomme cannelle a la chair la plus délicate (douce, sucrée, parfumée) de toutes les annonacées. Le suc fermenté donne une boisson alcoolique analogue au cidre. Les fruits verts se donnent en décoction, et aussi en poudre desséchée, contre la diarrhée et la dysenterie.

Les graines peuvent être utilisées pour des préparations insecticides, antitumorale, antibactérienne. Elles contiennent un principe toxique irritant, utilisé pour la destruction de la vermine, et surtout des punaises de lit. Dans ce but on les emploie pulvérisées et mélangées à une poudre inerte. Il faut cependant veiller à ne pas laisser entrer dans l'oeil des particules de cette poudre qui provoque de vives douleurs avec inflammation. Les graines broyées ont une action insecticide. Au XVII^{ème} siècle les graines infusées dans du vin blanc soulageaient les coliques néphrétiques.

Les feuilles seraient utilisées en cataplasme contre certaines maladies de peau. Les études pharmacologiques montrent que les extraits aqueux des tiges et des feuilles de la pomme cannelle sont un puissant adrénérique provoquant la bronchodilatation et l'accélération du rythme cardiaque.

I.2.4 Intérêt pour la thèse

Bien que la littérature rapporte ses propriétés synergiques avec le neem, les travaux dans ce sens restent très rares (Latum, 1985).

Sur le plan scientifique pour *A. squamosa*, il existe bel et bien un net déficit d'études (Ansari *et al.*, 1985; Eloisa *et al.*, 2001). Certaines d'entre elles, sont relatives aux propriétés insecticides d'extrait de feuilles, à la lutte contre les mollusques ou à la multiplication avec hormones (Priyamvada-Singh, 2003 ; Dwivedi *et al.*, 2004 ; Gupta et Brahmachari, 2004).

Une synthèse des possibilités d'utilisation des méthodes de régénération peu coûteuses pour les espèces qui s'y prêtent (Bellefontaine, 2005) démontre clairement que dans ce domaine particulier, spécialement pour cette espèce en Afrique, les connaissances sont rares et qu'il est nécessaire de les développer si l'on veut assurer leur pérennité. Mais cela ne rentre pas dans le cadre de nos domaines de compétence pour être abordé dans les objectifs spécifiques de ces travaux de thèse.

L'intérêt de cette plante pour cette thèse, est qu'elle est de reproduction facile fructification en 2 à 3 ans et déjà bien disponible. Les différentes parties de la graine sont intéressantes, mais la seule valorisation à une échelle notable, en dehors des multiples vertus médicinales utilisées traditionnellement, est la consommation de la pulpe de son fruit. A part la pulpe qui pourrait donner un jus très rafraîchissant, les autres parties de la plante comme l'épicarpe, les feuilles, les écailles sont peu valorisées. Les graines dans lesquelles se trouvent la plupart des principes actifs sont par ignorance jetées dans la nature. Il semble qu'il n'existe pas encore au Bénin de coopératives dédiées à sa valorisation.

I.3 *Azadirachta indica* (www.codinet.net, consulté en 2004; www.afrik.com, consultée en 2006)

I.3.1 Botanique

A. indica ou neem originaire de l'Inde, est de la famille des méliacées. Les fruits du neem, jaunâtres à maturité, sont des drupes presque cylindriques de 18 mm de longueur et de 12 mm de largeur, le noyau est assez fort et couvert de pulpe peu épaisse, visqueuse et légèrement sucrée. L'écorce gris-foncée extérieurement et brun-rougeâtre intérieurement est crevassée longitudinalement et obliquement. Le neem se multiplie par graine et bouture. La fructification a lieu deux fois l'an. Elle se produit 3 à 4 années après la germination ou la reprise végétative (Delwaule, 1977; Bellefontaine, 1992) (Figure 2).



2-a : Arbres de neem en plantation



2-b : Fruits de neem



2-c : Fruits de Neem à différents stade de maturité

Figure 2 : *Azadirachta indica*

I.3.2 Ecologie (www.codinet.net, consulté en 2004; www.afrik.com, consultée en 2006)

Le neem est utilisé comme arbre d'avenue et de bordure, spécialement sous les climats secs même avec une pluviométrie variant entre 450 et 1250 mm avec un maximum de température pouvant atteindre 49 °C. C'est une essence de lumière mais qui peut supporter un fort ombrage dans sa jeunesse et se frayer assez bien un chemin dans les épineux. Il pousse beaucoup mieux à l'état isolé qu'en plantation dense. Il trouve son habitat naturel dans les savanes et dans les régions sèches de sorte qu'il est devenu subspontané dans de nombreuses régions tropicales (Berhaut, 1979).

En Asie comme en Afrique, on trouve de très beaux sujets en bordures de routes, limites de terrains, en arbre d'avenue ou isolés dans les villes et les villages où l'ombre de son feuillage, sur un tronc court, avec une cime arrondie « souhaite la bienvenue ».

A l'état isolé il semble, à première vue, peu exigeant et assez tolérant vis-à-vis du sol puisqu'on peut le trouver sur des terrains très divers: sols pierreux, secs, peu profonds ou argileux, ou même latéritiques. Il ne supporte pas cependant les sols inondés.

Il est utilisé avec succès dans les travaux de reforestation de terrains arides et de restauration des sols, en terrains latéritiques très dégradés, en procédant à des semis directs, en mélange avec diverses espèces et en lignes assez espacées, le long de fossés isohypses. En plantation dense, le neem est beaucoup plus exigeant et il lui faut des sols légers et profonds. Dans des sols sablonneux, le neem donne de bons résultats (Bellefontaine, 1992) (Figure 2).

I.3.3 Utilisations (www.codinet.net, consulté en 2004; www.afrik.com, consultée en 2006)

En Inde, toutes les parties de la plante sont utilisées d'où l'origine du nom « *Arishta* » qui signifie « *soulage les maladies* » ou « *pharmacie du village* ».

Cet arbre connu dans plusieurs pays d'Afrique dont le Bénin est fréquemment utilisé pour ses propriétés antimalariques car la décoction aqueuse de feuilles ou de racines s'emploie dans le traitement du paludisme (Maydell, 1983). Par ailleurs, il joue un rôle important pour combattre les vers et les maladies de la peau. La décoction d'écorce soulage en cas de fièvre, de malaise, de maladies de la peau et de morsures de scorpion ou de serpent. Le suc fermenté d'écorce ou de racines serait efficace contre la lèpre et les maladies chroniques de la peau. Le suc frais de jeunes feuilles est employé contre les ulcères et les vers et agirait sur les virus et les bactéries (Ortin *et al.*, 1990). L'écorce du tronc exsude une gomme de couleur brune moins amère que les tissus, complètement soluble dans l'eau et utilisée par les teinturiers, il est aussi préconisé contre le diabète. L'écorce de la racine est astringente, tonique, fébrifuge, elle possède aussi des propriétés antipaludiques. Les vendeurs de tisanes en Afrique recommandent les feuilles en décoction contre les oedèmes, les rhumatismes; en friction elles sont utilisées pour combattre la jaunisse, la variole et les tumeurs. Certains tradipraticiens conseillent l'infusion aqueuse pour soigner la constipation, la fièvre jaune et les parasites.

I.3.4 Intérêt pour la thèse

Les potentialités du neem comme pesticide sont abondamment discutées dans la littérature. Il constitue une excellente source de produits naturels actifs pour leurs activités biologiques. Les principes se trouvent dans toutes les parties de la plante, mais c'est surtout dans la graine que l'on rencontre les plus grandes concentrations (Koul, 1990; Schmutterer, 1995).

De plus, le neem est très disponible au Bénin. Cependant, malgré quelques efforts timides de recherche menés par l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA-Bénin) et quelques applications encore un peu archaïques (formulations savonneuses) ou application d'extraits aqueux de la plante; visiblement le neem n'a pas encore mis au service de l'agriculture béninoise toutes ses potentialités. Quelques Coopératives de transformation de l'huile en savons, shampoings et récupération du tourteau pour le bétail et comme engrais existent à Porto-Novo et à Parakou

respectivement au Sud et au Nord du Bénin. D'un autre côté, le fractionnement de la biomasse du neem très abondante (feuilles sèches, coques, tourteau, bois) peut ouvrir au Bénin de nouvelles possibilités de valorisations innovantes encore non connues surtout dans la production de l'énergie et dans le domaine de la construction.

1.4 *Carapa procera* (www.futura.sciences.com ; www.pharnet.com, consultées en 2004)

1.4.1 Botanique

C. procera encore appelé *crabwood* Africain est de la famille des méliacées (Figure 3). C'est un arbre de 15 à 45 mètres de haut à fût court, avec un tronc droit et cylindrique de 40 à 60 cm de diamètre. Il possède des fleurs, en racèmes paniculés, à pétales de couleur blanche ou blanc rosé. Six espèces au moins du genre sont connues en Afrique. L'écorce est fine et s'exfolie en petites lamelles. Les grumes ont une assez bonne conformation (Chudnoff, 1984). Les fruits de *C. procera* sont formés par une grosse capsule anguleuse, plus ou moins pentagonale, large de quatre à six centimètres, à écorce épaisse, coriace, longues de 3 à 4 cm (Vieux, 1970 ; Miralles, 1983).

1.4.2 Ecologie (www.futura.sciences.com ; www.pharnet.com, consultées en 2004)

On rencontre *C. procera* dans les Caraïbes, l'Amérique subtropicale, les Guyanes et également en Afrique Occidentale et Equatoriale, mais sous la forme d'un petit arbre branchu. Il se situe sur les terrains humides où il est souvent dominant : collines ou bord des cours d'eau. *C. procera* est plutôt une espèce de pleine lumière et fleurit entre février et mars (Forget *et al.*, 2004-2005).



3-a : Arbre de *C. procera*



3-b : Fruit de *C. procera*

Figure 3 : *Carapa procera*

I.4.3 Utilisations (www.futura.sciences.com ; www.pharnet.com, consultées en 2004)

Les créoles utilisent l'écorce et les feuilles contre les rhumatismes, les rhumes, les angines, les pneumonies et la dépression. L'écorce est employée par les amérindiens sous forme de décoction, pour traiter les ulcères, les plaies, coupures et mycoses, et en gargarisme pour soulager l'inflammation de gorge. En Guyane, une décoction d'écorce (ou bien une macération à froid obtenue en faisant tremper une poignée d'écorce grattée dans de l'eau) est utilisée contre les rhumatismes et la diarrhée. Au Nicaragua, au Brésil, en Colombie, au Pérou, la décoction d'écorce s'emploie contre les fièvres, le paludisme (Duke, 1994; Schultes et Raffauf, 1994). Enfin, au Brésil, un usage anti diabétique et comme stimulant digestif a été révélé (Hammer et Johns, 1993). Hors du continent américain, la décoction d'écorce de *C. procera* est également utilisée au Sénégal contre les rhumatismes, comme purgatif, fébrifuge, pour traiter les conjonctivites ou encore les problèmes de peau (Seignot *et al.*, 1991).

L'huile de *C. procera* serait de meilleure qualité que celle de *Carapa guianensis*, au sens où ses propriétés médicinales seraient davantage marquées : répulsif, anti-inflammatoire. L'huile de *Carapa*, par son action anti-parasitaire et anti-inflammatoire, permet de se débarrasser des poux et tiques. Les peuples natifs l'utilisent comme solvant pour l'extraction de certains colorants naturels avec lequel ils peignent leur peau. La tribu « *munduruku* » (Brésil) avait coutume de momifier les têtes de leurs ennemis, gardées comme trophées de guerre, à l'aide d'huile de *Carapa*. Elle peut être également utilisée pour enduire des meubles en bois ou de petits objets, ce qui les protège des parasites et nourrit le bois.

Chez les amérindiens, l'huile est utilisée pour traiter les inflammations, les rhumatismes, les maux de gorge, les petites tumeurs et les déchirements musculaires ou les crampes. De plus, elle possède des propriétés répulsives pour les insectes, traite les piqûres (elle permet *a posteriori* de calmer les démangeaisons d'insectes hématophages) et les maladies de peau (eczéma, mycoses).

En Guyane, il est recommandé d'ingérer une petite quantité d'huile de *Carapa* contre le paludisme. Chez les créoles guyanais, l'huile sert à traiter : eczémas infectés, brûlures dues aux plantes urticantes, piqûres d'insectes, petites plaies, contusions et douleurs d'arthrite. L'huile est aussi utilisée en application sur la muqueuse cervicale dans le cas de cancer du col de l'utérus. Mélangée à du lait, elle est utilisée en application locale pour traiter les otites ou pour apaiser des gorges enflammées (Hammer et Johns, 1993).

Dans de nombreux produits cosmétiques, l'huile de *Carapa* joue un rôle d'émollient actif. Une étude américaine menée en 1997 a également décrit que les lipides du *Carapa* ont un effet inhibiteur sur le glucose-6-phosphate déshydrogénase et également sur la différenciation des adipocytes, ce qui pourrait en faire un traitement efficace contre la cellulite.

Le bois de *C. procera* présente une résistance variable aux altérations fongiques et peut être considéré comme «moyennement durable» (Chudnoff, 1984). Il est de teinte rouge, veiné, de grain très fin, serré, compact, utile pour la charpenterie et l'ébénisterie.

1.4.4 Intérêt pour la thèse

L'espèce est connue au Bénin pour la qualité de son bois utilisé comme cure-dent, ce qui manifestement a conduit à une surexploitation de la ressource forestière jusqu'au risque de sa disparition. Seulement des peuplements d'une dizaine d'arbres existent au Bénin et conservés dans les forêts classées de Niaouli et de Sakété.

Sur le plan scientifique, les chercheurs ont étudié la régénération de *C. procera* par graines et les disperseurs naturels nocturnes, dont les rongeurs (Doligez, 1996; Forget, 2004). Dans le domaine des potentialités insecticide, des études ont été menées en Côte d'Ivoire sur les effets répulsifs (vis-à-vis des moustiques) de pommade à base d'huile de *C. procera* (Sylla *et al.*, 2002 ; Konan *et al.*, 2003). Pour les autres utilisations, comme les caractéristiques de l'huile comme biocarburant, ou comme source de produits naturels à activité insecticide à partir de l'écorce (Tuani *et al.*, 1994), il reste encore un gisement de découvertes à explorer. Le bois est connu pour sa durabilité et sa résistance aux termites et pourrait ainsi ouvrir la voie à de nouveaux matériaux durables de construction au Bénin où le bois de *C. procera* «*Iguito*» est déjà utilisé comme brosse à dents végétale «*Pobèlo*» (Jones *et al.*, 1983).

Les études sur les propriétés insecticides de *C. procera* sont rares, bien que la littérature rapporte la présence de certains principes actifs tels que les tétranortriterpénoïdes et limonoïdes (carapolide, proceranone) caractéristiques de la famille des méliacées et réputés pour leurs propriétés insecticides. Les études effectuées sur cette plante sont anciennes et donc la valorisation de cette espèce nécessiterait une mise à jour (Sodegam *et al.*, 1979-1980 ; Mikolajczack, 1988).

1.5 *Parkia biglobosa* (Ouedraogo, 1995)

1.5.1 Botanique

Encore connue sous les noms de *mimosa pourpre*, *arbre à farine*, *arbre à fauve*, *caroubier africain* ou *nééré*, *P. biglobosa* est de la famille des mimosacées. L'arbre à fût robuste atteint 10 à 13 m de hauteur. Le tronc cylindrique et court, couvert d'écorces foncées, profondément striées est garni par une cime étalée en parasol présentant de fortes branches primaires (Figure 4).

Le fruit du nééré se présente sous la forme d'une grappe de gousses d'environ vingt centimètres de long. Les gousses sont pendantes à l'extrémité des pédoncules, longues de plus de 30 cm, larges de 2 cm, jaunes à maturité, et contiennent des graines ovoïdes entourées d'une pulpe farineuse blanchâtre et très riche en protéines et en lipides (Adjanooun, 1986).

4-a : Arbre de *P. biglobosa*4-b Fruits de *P. biglobosa***Figure 4 : *Parkia biglobosa***

1.5.2 Ecologie (Ouedraogo, 1995)

Dénoté « *nére* » en langue bambara, le genre *Parkia* est mentionné sur trois continents : africain, asiatique, et sud-américain, notamment aux antilles. Espèce soudano-zambézienne, on la trouve : dans toutes les savanes de l'Ouest africain où elle a été introduite il y a longtemps, dans les zones climatiques de type soudanien. *P. biglobosa* est un arbre qui s'adapte aux zones affectées par une faible pluviométrie (Figure 4).

1.5.3 Utilisations (www.darwingambia.gm, consultée en 2006)

La pulpe est très appréciée des populations qui la consomment telle quelle ou délayée dans de l'eau comme laxatif. Elle est généralement consommée dans les mois qui suivent la récolte ; très riche en saccharose, elle constitue un excellent aliment énergétique. D'une manière générale, son commerce reste localisé et moins développé que celui des graines. La graine est utilisée dans la sous-région Ouest-Africaine pour fabriquer un condiment très prisé après fermentation : « *afitin* » au Bénin, « *netétu* » au Sénégal ou « *soumbala* » au Burkina Faso. Ce condiment est le produit fini le plus répandu dérivé des graines pour agrémenter les sauces. Il a de fortes vertus organoleptiques, mais aussi nutritives. Dans certaines régions et pendant les périodes de « soudure », ce condiment remplace la viande ou le poisson du fait de sa teneur en protéines. D'autre part, grâce à sa teneur élevée en fer, élément indispensable pour la santé humaine, il peut constituer un moyen de lutte contre la carence en cet élément.

La pâte de feuilles est appliquée sur le corps pour traiter le zona. La pâte de tige feuillée est utilisée en sauce dans le traitement de la dysenterie amibienne. Le décocté de feuilles est utilisé en inhalation et en bain pour calmer les palpitations.

Le macéré de poudre d'écorce est utilisé contre l'amibiase, l'ankilostomiase, l'ascaridiase, l'asthme, les ulcères gastroduodénaux et la diarrhée. Les écorces sont vendues sur le marché pour les ostéopathies, les oreillons, le ver de Guinée, la bilharziose. La décoction de poudre d'écorce de tronc est donnée à boire en cas de troubles cardiaques, de stérilité et d'hypertension artérielle. On fait aussi des pansements avec la décoction de cette écorce. C'est donc surtout les parties du tronc de l'arbre et de ses feuilles qui ont été scrutées du point de vue pharmacologique.

Outre ces usages médicaux et alimentaires traditionnels, l'arbre fournit du fourrage, de l'ombre aux cultures et au bétail; les coques peuvent servir d'engrais et sont aussi utilisées comme appât pour la pêche ou encore comme crépi pour enduire les murs des cases.

1.5.4 Intérêt pour la thèse (Ouedraogo, 1995)

A l'instar du karité, le néré est pratiquement un arbre providentiel dans le nord du Bénin. Au centre du pays sur le plateau d'Abomey, les graines de néré sont à la base d'un condiment jouissant d'une réputation diététique nationale, « *afitin* ». On constate de plus en plus une substitution du néré local par du soja importé. Cependant, la graine qui est aussi oléagineuse contient une huile sur laquelle on dispose de très peu d'informations scientifiques.

L'écorce de l'arbre qui est beaucoup plus connue pour ses propriétés médicinales est rapportée dans la bibliographie comme insecticide et larvicide ce qui peut laisser présager de ces propriétés pour l'huile également, mais très peu de travaux sont effectués dans ce sens.

Au cours de la préparation de « *afitin* », une quantité importante de biomasse est rejetée, il s'agit des coques des graines qui pourraient non seulement contenir des principes actifs recherchés mais aussi ouvrir la voie à la production d'énergie verte et d'engrais (Tringali *et al.*, 1998).

Le parc du néré au Bénin et en Afrique occidentale en général est vieillissant et des études sur la valorisation de cette espèce pourraient susciter un regain de reboisement qui serait bien salubre pour la flore et aussi pour l'alimentation (Agbahungba et Depommier, 1989; Ibarra, 1990) (Figure 4). Actuellement les composés phénoliques de type catéchine et gallocatéchine sont très recherchés à cause de leurs propriétés antioxydantes (Tringali *et al.*, 1998; Mulholland *et al.*, 2000). Cette plante pourrait en contenir des quantités importantes, ce qui donnerait une raison de plus pour l'exploiter.

D'un point de vue général, les références bibliographiques pour *P. biglobosa* sont assez nombreuses mais la situation est bien différente si l'on se réfère aux objectifs de cette thèse. Ainsi pour *P. biglobosa*, une des espèces les plus connues et appréciées pour ses vertus en Afrique de

l'Ouest, plusieurs thèses (Ouedraogo, 1995 ; Nikiema, 2005;) ont été préparées sur l'utilité des co-produits, la valeur nutritive du « *soumbala* » extrait des graines (Sopade *et al.*, 1996 ; Ouaba *et al.*, 2004), la génétique, la physiologie des graines, les possibilités de multiplication végétative par culture *in vitro* (Tomlinson, 1998).

1.6 Produits naturels actifs des quatre oléagineux sélectionnés

Les quatre espèces ciblées pour cette thèse (*A. indica*, *A. squamosa*, *C. procera*, *P. biglobosa*) sont connues (physiologie, propriétés des produits) à des niveaux différents, mais, à l'exception de *A. indica* cette connaissance ne permet pas à ce jour, la préservation de la ressource en même temps que son exploitation rationnelle (optimisée et durable).

1.6.1 *Annona squamosa*

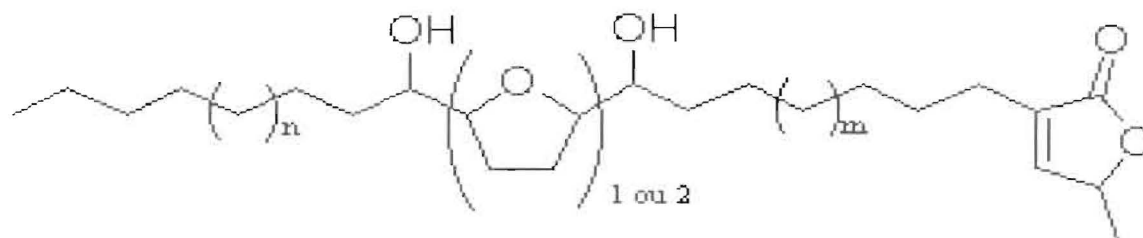
1.6.1.1 Structure et mode d'action des acétogénines (www.u-psud.fr, consultée en 2005)

Les acétogénines, composés communs aux espèces de la famille des annonacées, ont depuis ces dernières années fait l'objet d'investigations en raison du large spectre d'activité biologique (cytotoxique, anti-inflammatoire, insecticide) et de leurs structures spécifiques (Alali *et al.*, 1999).

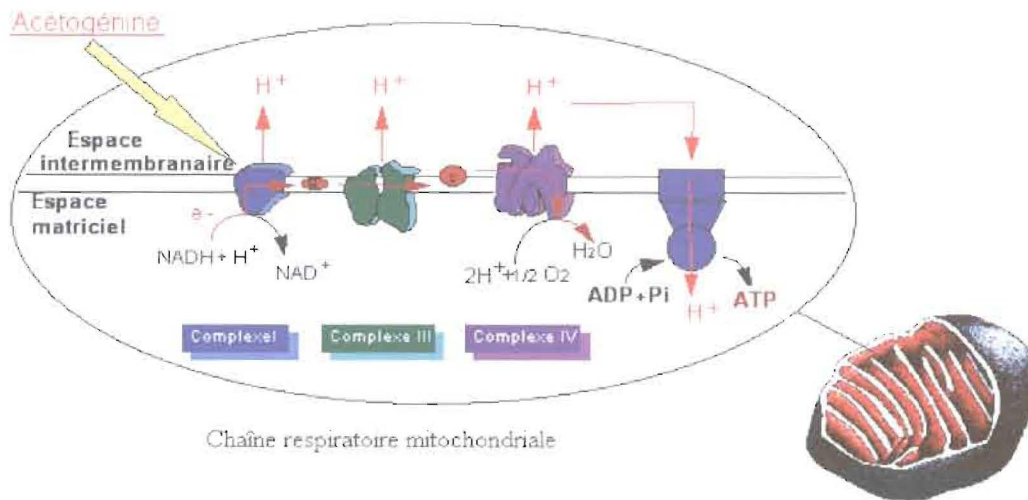
Ces molécules sont constituées d'une longue chaîne aliphatique terminée par une γ -méthyl- γ -lactone, généralement insaturée, et comportant un ou plusieurs noyaux tétrahydrofuraniques (Figure 5). La chaîne porte généralement d'autres groupes oxygénés, le plus souvent des hydroxyles, propices à une activité biologique. De par leur structure, ces molécules ont un caractère amphiphile.

Les acétogénines agissent au niveau de la mitochondrie (centrale énergétique cellulaire) en inhibant la production d'adénosine triphosphate (ATP), et plus particulièrement en inhibant le complexe NADH, ubiquinone oxydoréductase de cette chaîne respiratoire.

Les extraits de *A. squamosa* inhibent le fonctionnement des mitochondries et perturbent ainsi la respiration et l'approvisionnement en énergie des cellules d'où l'effet cytotoxique qui engendre la mort de ces dernières (Hopp *et al.*, 1996). Les acétogénines s'attaquent par exemple aux tumeurs cancéreuses en détruisant la fonction respiratoire (Figure 5).



5-a : Structure générale des acétogénines



5-b : Mode d'action des acétogénines (activité cytotoxique)

Figure 5 : Structure chimique et mode d'action des acétogénines

1.6.1.2 Acétogénines

Les graines contenues dans les pulpes ont révélé des propriétés insecticides et cytotoxiques. Plus de 300 acétogénines comportant 0 à 2 cycles tétrahydrofuraniques (THF), ont été rapportées dans la littérature (Figure 6) (Zafra-Polo *et al.*, 1998; Yazbak et Keinean, 1998).

Plusieurs acétogénines à activité cytotoxique ont été retrouvées dans des extraits de plantes de la famille des annonacées : *Annona reticulata*, *Annona montana* et *Rollinia mucosa* (Liang et Lee, 1994 ; Yen et Wu, 1996 ; Chen Chang *et al.*, 1998).

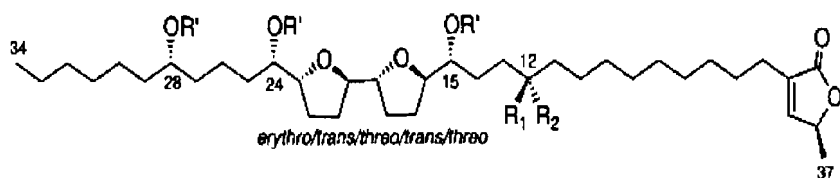
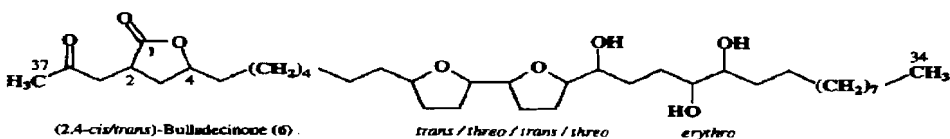
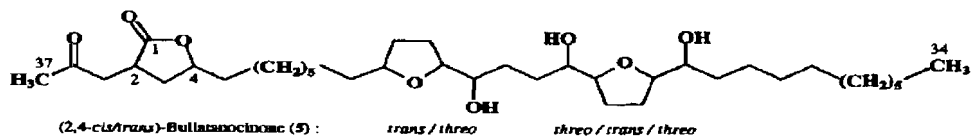
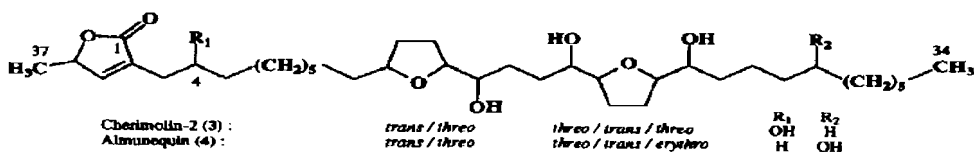
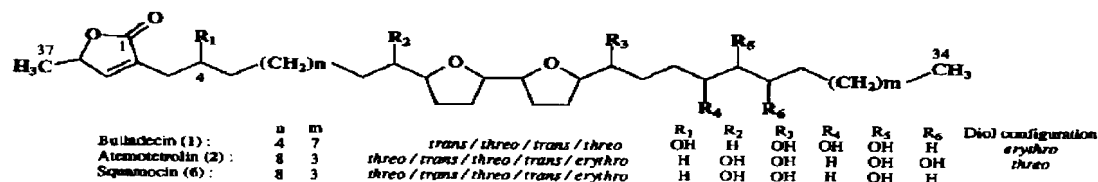
Cinq acétogénines à activité cytotoxique à savoir : annotemoyine-1, annotemoyine-2, atemoyine (squamocine K), atemoyacine A (parviflorine, squamocine E) et atemoyacine B, ont été isolées des graines de *Annona atemoya* (hybride *A. cherimolia* x *A. squamosa*) (Zeng *et al.*, 1996).

En ce qui concerne *A. squamosa* deux analogues ont été isolés d'extraits méthanoliques : squamocine O₁ et squamocine O₂. L'isolation et l'élucidation de la structure d'une vingtaine d'acétogénines extraites de graines de *A. squamosa* a montré que squamocine et squamostatine-A constituent les composés majoritaires (Fujimoto *et al.*, 1988; Sahai *et al.*, 1994; Araya *et al.*, 1994).

L'isolation et la caractérisation de six nouveaux composés ont été faite par Fang-Rong *et al.* (1999) à savoir : 12,15-cis-squamostatine D, 12,15-cis-squamostatine A, artemoyine A, artemoyine B, artemoyine C et artemoyine D. Au total : squamostatine A, squamostatine D, squamocine, néoannonine, bullatacine, desacétyluvaricine, isodesacétyluvaricine, 12,15-cis-bullatanocine, 12,15-cis-bullatalicine, bullatanocine, bullatalicine sont les acétogénines que l'on trouve dans les extraits de graines de *A. squamosa* (Etse et Waterman, 1986 ; Kawazu *et al.*, 1989 ; Born *et al.*, 1990 ; Fujimoto *et al.*, 1994 ; Sahai *et al.*, 1994; Duret *et al.*, 1995; Gu *et al.*, 1995).

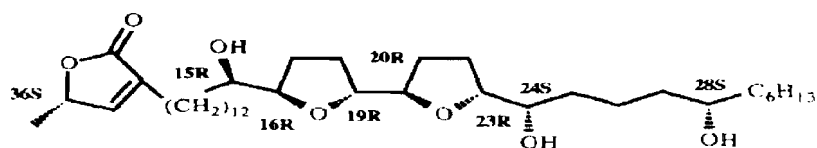
Les extraits d'autres parties de la plante contiennent des acétogénines qui seraient à la base de ses propriétés anti-inflammatoires : bullacine, bullatacinone et squamone ont été isolés des écorces de l'arbre (Li *et al.*, 1990; Londershausen *et al.*, 1991 ; Cortes *et al.*, 1993; Gypser *et al.*, 1995; Craig *et al.*, 1998; Hiroshi *et al.*, 2002 ; Jiang *et al.*, 2003).

Enfin, on trouve au moins 14 alcaloïdes (higénamine par exemple) dans la pulpe de la pomme cannelle ainsi que plusieurs flavonoïdes dans des extraits de ses feuilles ainsi que des cyclopeptides complexes (Ming *et al.*, 1997 ; Santos, 2000).



- 1: $R_1 = OH, R_2 = R' = H$
 1r: $R_1 = -O-(R)-MTPA, R' = -(R)-MTPA, R_2 = H$
 1s: $R_1 = -O-(S)-MTPA, R' = -(S)-MTPA, R_2 = H$
 2: $R_1 = R' = H, R_2 = OH$
 2r: $R_1 = H, R_2 = -O-(R)-MTPA, R' = -(R)-MTPA$
 2s: $R_1 = H, R_2 = -O-(S)-MTPA, R' = -(S)-MTPA$
 3: $R_1 = R_2 = R' = H$
 3r: $R_1 = R_2 = H, R' = -(R)-MTPA$
 3s: $R_1 = R_2 = H, R' = -(S)-MTPA$

- (1) 12,15 – cis - squamostatine D ;
 (2) 12,15 – cis - squamostatine A
 (3) squamocine
 (7) squamostatine A ;
 (8) squamostatine D



Annonine

Figure 6 : Structures chimiques de composés bioactifs de *A. squamosa*

(Gypser *et al.*, 1995 ; Sahai *et al.*, 1994 ; Duret et Hocquemiller, 1998; Morita *et al.*, 1999; Araya *et al.*, 2002)

I.6.2 *Azadirachta indica*

I.6.2.1 Généralités

Le neem a fait l'objet durant ces dernières décennies d'intenses investigations dans le but d'isoler l'azadirachtine (Butterworth et Morgan, 1968). C'est l'un des insecticides majeurs présents dans les extraits de graines rapporté pour la première fois par Zanno (1974) et confirmé par Nakanishi (1975).

S'il existe en dehors de l'azadirachtine plusieurs triterpénoïdes actifs, cette dernière est la principale des quatre composés bio-actifs majoritaires, elle représente à elle seule plus de 90 % des effets bio-actifs. Elle ne tue pas les insectes mais elle perturbe spécifiquement leur croissance, leur reproduction et leur appétance (Isman *et al.*, 1990; Wayne *et al.*, 1992; Mooto *et al.*, 1996; Chandel *et al.*, 1996). En effet, structurellement voisin de l'ecdysone (hormone régulant la croissance chez les insectes) qu'elle mime, ce tétranortriterpénoïde empêche le développement larvaire et compromet la synthèse de la chitine substance de base de la carapace de la plupart des invertébrés (Gill et Lewis, 1971).

Plusieurs molécules de tétranortriterpénoïdes ont pu être isolées de *A. indica* (Figure 7). Actuellement, plusieurs spécialités phytosanitaires à base d'azadirachtine sont commercialisées de par le monde pour assurer la protection des cultures contre certains ravageurs. Il s'agit de : *azatin*, *bioneem*, *neemsi*, *neemguard* etc. En Afrique y compris au Bénin, les produits à base de neem, sont préférentiellement utilisés contre les ravageurs en post-récolte (Sontakke *et al.*, 1994; Bathnagar et Sharma, 1995; Dales, 1996; Gakuru *et al.*, 1996; Ogunwolu et Odunlami, 1996).

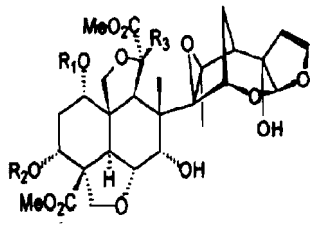
I.6.2.2 Autres composés insecticides de *Azadirachta indica*

Plusieurs autres composés ont été isolés et identifiés auxquels l'on n'a pu encore attribuer d'action spécifique. Parmi les triterpénoïdes majoritaires du neem, la salanine et la nimbine présentent une stabilité pouvant leur conférer des applications comme pesticides. La salanine (C₃₄H₄₄O₉) extraite de l'huile de neem est reconnue comme un inappétant de plusieurs insectes (Kubo et Klocke, 1986). Kraus *et al.* (1986) ont rapporté que sa bioactivité est comparable à celle de l'azadirachtine. Elle a fait l'objet d'intenses investigations chimiques incluant les analyses spectroscopiques et des modifications structurales par Henderson *et al.* (1968). La nimbine (C₃₀H₃₆O₉), est un principe amérisant de l'huile de neem qui est caractérisée par son noyau C seco-tétranortriterpénoïde. Des études sur la caractérisation et l'élucidation structurale de la nimbine ont été effectuées par Mitra (1957);

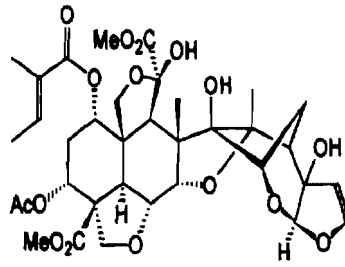
Sengupta *et al.* (1960) ; Narayanan *et al.* (1964); Harris *et al.* (1968). La salanine et la nimbine sont aussi extraites directement du solide (graines et tourteau) de neem.

Peu d'études ont été consacrées à la question de la variabilité chimique en fonction de la diversité biologique (provenance et génotype) du neem (Govindachari *et al.*, 1992). Dans ce sens, Ermel (1995); Kumar et Parmar (1997) ont révélé des variabilités entre les teneurs en azadirachtine de tourteaux provenant de différents écosystèmes de l'Inde. En ce qui concerne la salanine et la nimbine, aucune investigation ne paraît avoir été effectuée dans ce sens. Or l'activité en tant que pesticide et les propriétés pharmacologiques dépendent des métabolites comme la nimbine, la salanine et l'azadirachtine, mais aussi d'autres paramètres. Cette question de la variabilité en ce qui concerne le neem, pose des problèmes de normalisation et limite son exploitation commerciale. Selon Sidhu *et al.* (2004), il serait alors primordial pour pallier cet état de chose d'oeuvrer pour une sélection génétique des variétés de neem

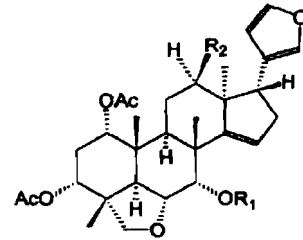
Certaines molécules à savoir la nimbidine, l'acide nimbinique et la nimbolide ont révélé des propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétiques (Okpanyi et Ezeukwu, 1981) et anti-arthritiques (Pillai et Santhakumari, 1981). Le méliantriol est efficace à très faible dose et provoque aussi l'inappétance chez les insectes.



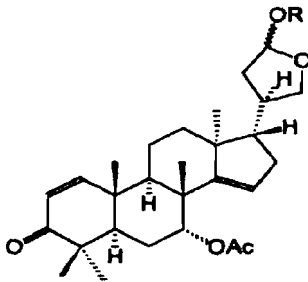
- 1 : R₁ = Tigloyl, R₂ = Acetyl, R₃ = OH
 2 : R₁ = H, R₂ = Tigloyl, R₃ = H
 3 : R₁ = H, R₂ = Tigloyl, R₃ = OH



4



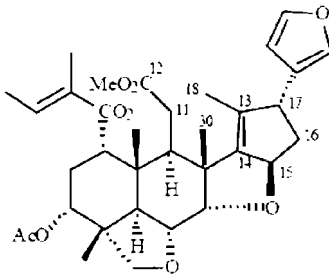
- 5 : R₁ = R₂ = H
 6 : R₁ = Tigloyl, R₂ = OH



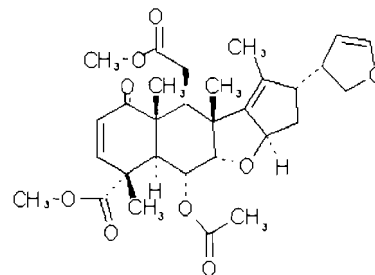
- 7 : R = Me
 8 : R = H

Légendes :

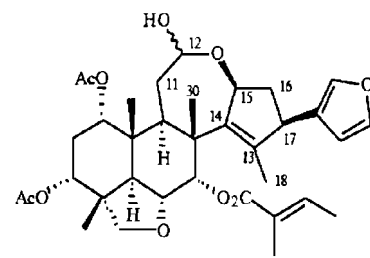
- (1) Azadirachtine A; (2) Azadirachtine B
 (3) 11-Hydroxyazadirachtine B,
 (4) 1-tigloyl-.3-acétylazadirachtinine
 (5) 1,3-diacétylvilasinine
 (6) 1,3- Diacetyl- tigloyl-3-acétylazadirachtinine
 (7) tigloyl- 12-hydroxyvilasinine
 (8) 23-Desméthyllimocine B



Salanine



Nimbine



Nimbolinine

Figure 7 : Structure chimique de composés bioactifs de *A. indica*
 (Kumar *et al.*, 1996 ; Mulholland *et al.*, 2000)

I.6.3 *Carapa procera* (www.futura.sciences.com ; www.pharnet.com, consultées en 2004)

I.6.3.1 Généralités (www.phytomania.com, consultée en 2004)

Les travaux de chimie sur *Carapa* ont commencé en 1859 avec Eugène Caventou, co-découvreur de la quinine, qui le premier a isolé de l'écorce des principes amers : touloucounine, carapine (insecticides et insectifuges non toxiques pour l'homme); des matières colorantes jaunes et rouges ; une matière cireuse ; de la gomme et des traces d'amidon. En 1993, des tests ont confirmé que l'écorce de *C. procera* possède des propriétés anti-bactériennes. Des tests ont aussi suggéré que *C. procera* pourrait avoir une activité anti-tumorale (Duke, 1994).

Dans la base de données pharmacologiques NAPRALERT (Natural Product ALERT), il n'apparaît pas d'étude de l'activité anti-malarique ni répulsive d'insectes pour *C. procera*. Les études menées sur les activités antibactériennes, antifongiques et anticancéreuses ont montré des résultats variables.

I.6.3.2 Autres composés insecticides de *C. procera*

On peut extraire de cette espèce plusieurs principes actifs surtout des limonoïdes et des tétranortriterpénoïdes à fort potentiel insecticide, antifongique (Mikolajczak *et al.*, 1999; Gilbert *et al.*, 1999). Les espèces de cette famille de plante sont en effet résistantes aux attaques de termites et des extraits sont utilisés pour préserver le bois (Jones *et al.*, 1983).

L'écorce contient 5 % de tannins et de carapine qui serait responsable des effets pharmacologiques de la plante (Le Cointe, 1947) (Figure 8).

Les graines contiennent plusieurs tétranortriterpénoïdes, particulièrement de nombreux limonoïdes caractéristiques de la famille des méliacées, de nouveaux tétranortriterpénoïdes ont été isolés : carapolides A, B, C, D, E, F mais aussi le mexicanolide-methylangolensate, qui confèreraient un fort potentiel filaricide aux huiles. Ceci justifie son utilisation dans le traitement de l'onchocercose encore appelé cécité des rivières (Ollis *et al.*, 1970 ; Mootoo, 1975 ; Cameron *et al.*, 1979 ; Titanji *et al.*, 1990 ; Connoly *et al.*, 1984, 1989 et 2004). D'autres composés actifs isolés de la plante sont aussi connus : procéranone, procéranolide, évodulone (Sondengam *et al.*, 1981).

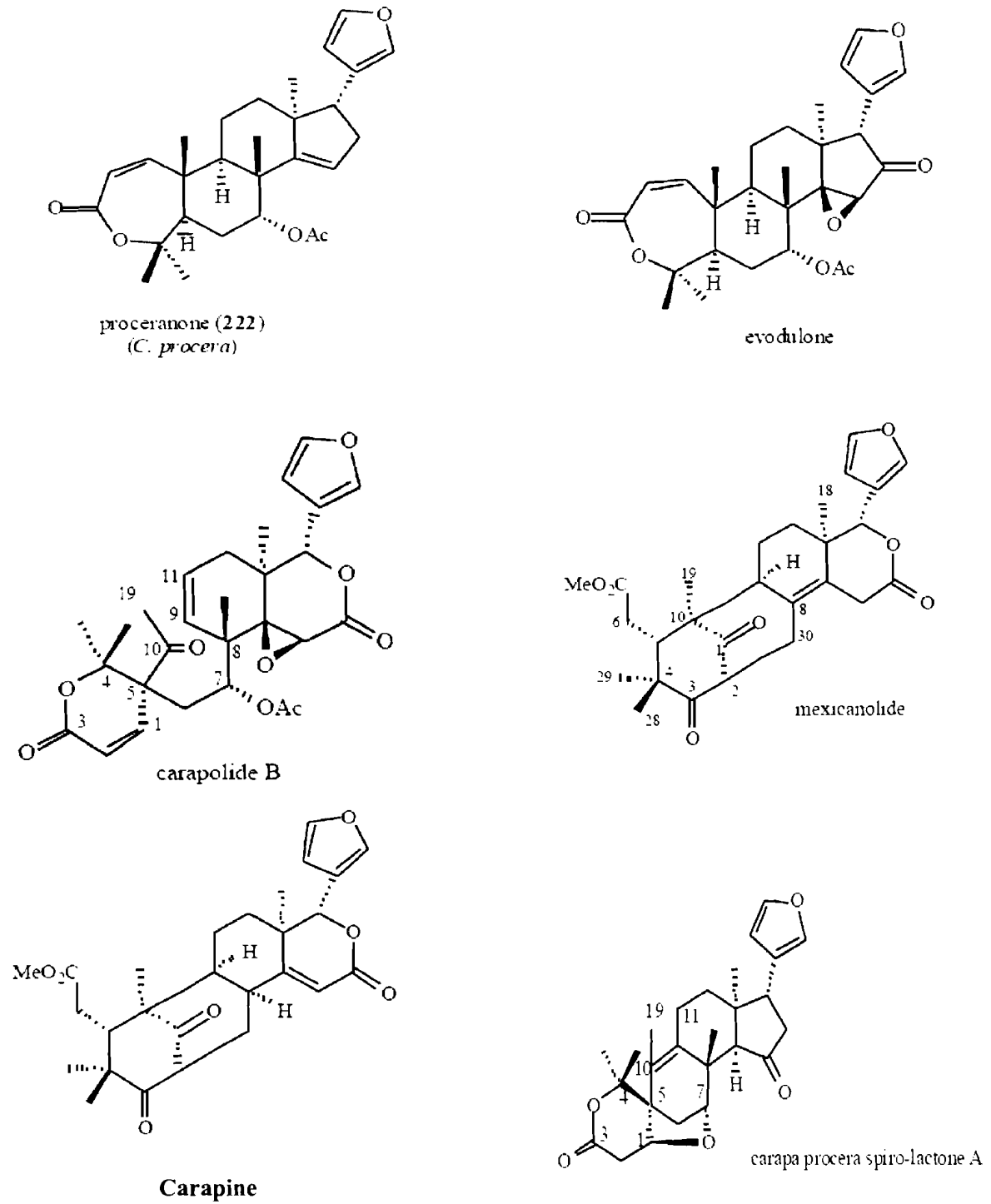
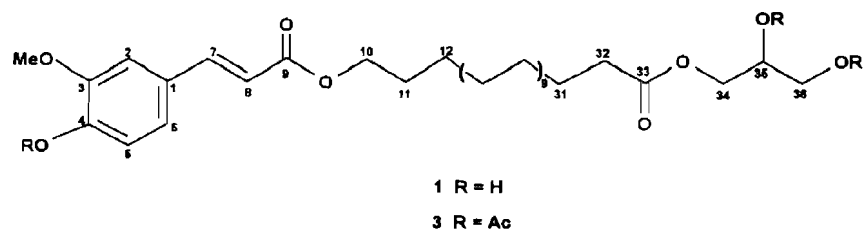


Figure 8 : Structure chimique de composés bioactifs de *C. procera*
(Mulholland *et al.*, 2000)

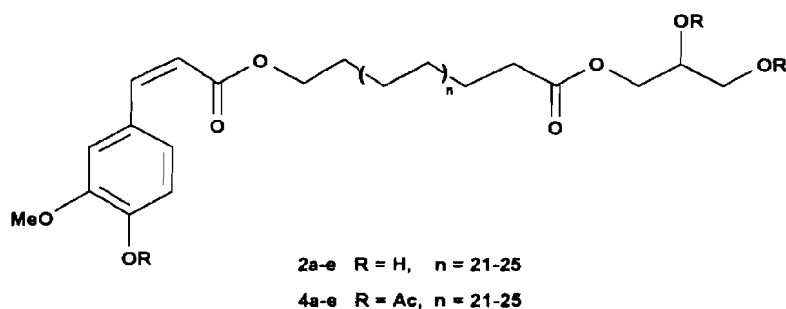
1.6.4 *Parkia biglobosa*

Un antioxydant, l'ester de l'acide trans-ferulique a été isolé, en mélange avec ses formes estérifiées comme le cis-ferulate (2a-e) (Figure 9). On y trouve aussi du lupéol, du 4-o-méthyl-epi-gallocatéchine, de l'epi-gallocatéchine, de l'epi-catéchine-3-o-gallate, de l'epi-gallocatéchine-3-o-gallate (Corrado *et al.*, 2000).

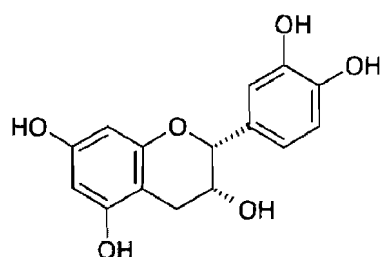
On a aussi isolé des triterpènes qui seraient à la base de certaines propriétés insecticides et larvicides observées avec des extraits de l'écorce de la plante (Anderson, 1991).



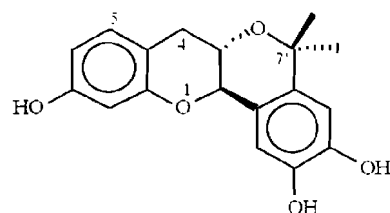
1- w-Feruloyllignocéryl-glycérol



2a-e: w-isoferuloylalkanoyl –glycérols; 4a-e : peracétate de 2-a



(-)-epicatéchine (EC)



Pubescine

Figure 9 : Structure chimique de composés bioactifs de *P. biglobosa* (Tringali *et al.*, 1998; Mulholland *et al.*, 2000)

I.7 Lutte anti-termites

Le bois est évidemment un matériau dégradable. Il nécessite le recours à sa préservation si sa durabilité naturelle est insuffisante (Rayzal, 1998). Un traitement peut-être une alternative plus économique que le choix d'une essence naturellement durable. L'alternative d'une durabilité conférée est possible, moyennant la mise en œuvre rationnelle d'une essence de bois dont la capacité d'imprégnation est connue, et d'un traitement mécanique approprié à la classe de risque définie (Dirol et Déglise, 2001).

La recherche dans le domaine de la préservation du bois s'oriente dorénavant vers la production de nouvelles molécules, ciblées par exemple sur la récupération par voie enzymatique des toxines d'origine fongique, sur une activité ovicide ou sur un stade particulier de la mue des espèces.

I.7.1 Genre *Reticulitermes* (www.sostermite.com, consultée en 2005)

Les termites sont des insectes sociaux qui appartiennent à la famille des isoptères. Il existe près de 2700 espèces de termites dans le monde, essentiellement dans les régions tropicales et équatoriales.

On distingue deux grandes catégories : termites souterrains qui vivent dans le sol et remontent dans le bois dont ils se nourrissent. Ils appartiennent au genre *reticulitermes*. Il convient de signaler qu'il existe d'autres genres dans ces familles de termites souterrains, mais chacun évolue dans un secteur géographique différent. *Reticulitermes santonensis* appartient à cette catégorie de termites ; termites de bois secs qui contrairement aux termites souterrains nichent directement dans le bois qu'ils consomment.

I.7.2 Indices de présence et dégâts des termites (www.xyloexpert.fr, consultée en 2005)

La présence des termites peut être mise en évidence lors d'un essaimage (envol de reproducteurs ailés) dans une maison.



Figure 10 : Termites en galeries

Les ouvriers construisent des galeries et des tunnels qui parcourent la surface des murs ou du sol appelés aussi cordonnets. Ces derniers sont constitués d'un mélange de terre, de salive et d'excréments qu'on retrouve dans des galeries creusées dans le bois, donnant

un aspect sale aux dégâts occasionnés par les termites (Figure 10).

Des cordonnets peuvent être construits sur des matériaux trop durs pour être creusés, afin de se protéger de la lumière et des prédateurs. Ces cordonnets leur permettent aussi de gravir des parois qui leur seraient insurmontables.

Le principal problème des dégâts causés par les termites est que l'apparence extérieure des matériaux comme le bois par exemple, est préservée. Mais les dégradations apparaissent souvent à la moindre pression sur la surface des pièces de bois, qui cède aussitôt.

I.7.3 Biologie des termites (www.sostermite.com; www.xyloexpert.fr, consultées en 2005)

Chez les termites, l'aliment de base est le bois, dans lequel les insectes trouvent la cellulose nécessaire à leur métabolisme. Ainsi, les termites jouent un rôle écologique important en participant au recyclage du bois mort en milieu forestier (au sens large de l'humus).

Les problèmes commencent quand ils envahissent les structures et les zones d'habitation humaine. La condition première de l'existence de termites est la possibilité d'un approvisionnement en eau. L'autre facteur important est la nécessité d'une température ambiante élevée. Si celle-ci peut être donnée par le climat, elle peut aussi leur être procurée par la chaleur des habitations. La colonie est constituée de la reine, des ouvriers, des soldats (assurant la défense de la colonie) et des reproducteurs. Les ouvriers sont responsables des dégâts. Ils consomment et digèrent la cellulose, qu'ils sont capables de régurgiter pour la distribuer aux autres membres de la colonie : phénomène de trophallaxie. Comme la plupart des invertébrés, les termites croissent par étapes.

Hormis les termites reproducteurs ailés, toutes les autres castes sont aveugles. Ils se déplacent et communiquent grâce à des substances qu'ils laissent derrière eux, et qui seront reconnues par leurs congénères. Ce sont les phéromones de piste. Il existe également des phéromones d'alarme sécrétées en cas de danger et destinées à alerter le reste de la population.

I.7.4 Prévention et lutte anti-termite

Certaines essences de bois ont une durabilité naturelle c'est à dire qu'elles ne sont pas attaquées par des agents de dégradation du bois (insectes et champignons) (Lawrence et Reynold, 1999). Cette résistance est due à la présence de composés du métabolisme secondaire (limonoïdes, terpénoïdes). Ces composés peuvent présenter des propriétés fongicides ou insecticides permettant d'envisager l'hypothèse de les utiliser comme matières actives dans la formulation de produits de préservation du bois. De nombreux chercheurs dans le domaine de la préservation essaient de trouver des solutions, afin d'éviter l'utilisation de produits de préservation pour protéger les bois contre les agents de biodégradation. Par exemple, extraire les biocides naturels du bois à partir d'essences durables (Kenneth *et al.*, 1997; Wakako *et al.*, 1999; Sogabe *et al.*, 2000) et d'en imprégner des essences peu durables ou des aubiers. Pendant longtemps on a opté pour des produits de synthèse de complexité variable du fait de leur moindre coût (produits organochlorés ou organophosphorés et sels métalliques) (Figure 11).

Les préoccupations croissantes du public à l'égard des effets néfastes que peuvent causer les produits de traitement d'origine synthétique sur l'environnement, ont conduit à un regain d'intérêt pour la mise au point et l'utilisation de produits naturels pour la protection du bois. L'activité de ces molécules a longtemps été mise en évidence à partir d'observations empiriques, puis par des protocoles adaptés (French, 1979 ; Kennedy et Powell, 2000 ; Chang *et al.*, 2001, Tellez *et al.*, 2001 ; Regnault-Roger, 1999 et 2003). Les produits naturels à activité termiticide sont : terpénoïdes (pinène), tannins, tropolones (isomères de thuyaplicine encore appelé « *Red Cedar* »), polyphénols (stilbènes) (Yazaki *et al.*, 1982; Kinjo *et al.*, 1988 ; Farshid, 2005). Par exemple, les études sur les fleurs de chrysanthemum ont permis la synthèse des pyréthrinoïdes très actifs (Tsunoda *et al.*, 1993). Simonin *et al* (2002) ont étudié l'activité termiticide d'huiles essentielles de bois de rose.

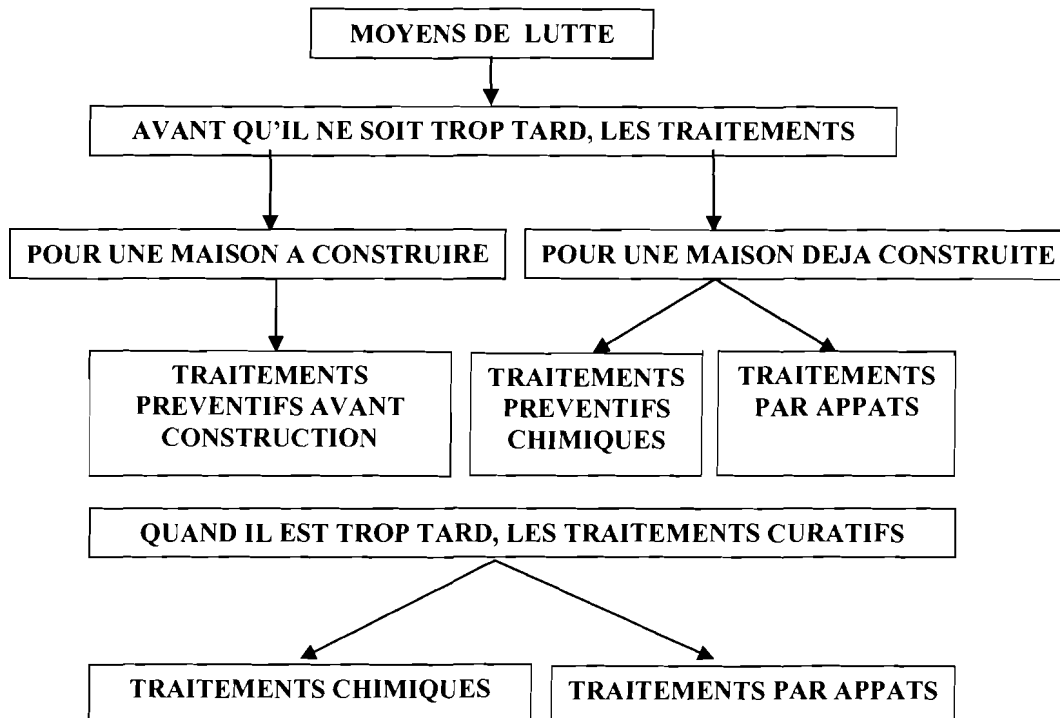


Figure 11 : Prévention et lutte anti-termites

Aujourd'hui, l'amélioration des méthodologies et des outils d'analyse a facilité l'isolement de produits naturels d'origine végétale, l'étude de leur structure et de leur activité biologique. L'utilisation des matières actives issues du monde végétal permet d'éviter les risques d'accoutumance ou de résistance des organismes ciblés, à cela s'ajoute un risque mineur pour les organismes non ciblés (Gonzalez *et al.*, 1994).

Cependant, d'après la bibliographie, la piste des graines oléagineuses à activité insecticide n'est pas jusque-là explorée ce qui ouvre ainsi la possibilité d'une valorisation intégrée et de nouveaux débouchés pour des produits d'oléagineux à activité insecticide.

1.7.5 Etat des lieux de la situation au Bénin

Au Bénin, les méthodes utilisées pour la protection du bois sont notamment l'utilisation de peintures, de vernis. Cependant, le pays dispose d'une biodiversité dont on pourrait tirer, par des procédés appropriés, des essences à activité insecticide (§ 1.6). La vulgarisation de l'utilisation de ces essences pourrait réduire l'importation de produits manufacturés. On ne connaît encore aucune méthode fiable de protection du bois mise à part le tri sélectif d'essences de bois. Les constructeurs (menuisiers, charpentiers) savent de façon empirique le type de bois qu'il faut pour tel ou tel usage en jouant sur leur durabilité et la

période propice à l'abattage (il y a des bois qui pourrissent quand on coupe l'arbre en pleine lune, etc.). Aucun traitement préalable n'est effectué.

Pour ce qui est de la protection des récoltes le problème majeur est l'attaque des greniers par les termites, les moyens traditionnels de stockage au niveau villageois sont le résultat de l'ingéniosité et de l'empirisme des paysans qui, au long des générations, ont mis au point des techniques souvent très élaborées et bien maîtrisées. Lorsque ces moyens n'ont pas évolué sous des formes modernes, du fait de contraintes climatiques ou socio-économiques, ils sont conçus de façon à éviter les pertes causées par les principaux ennemis des récoltes stockées : insectes, rongeurs, moisissures, vols et incendies. Une partie importante des récoltes étant perdue au cours du stockage faute d'une protection suffisante contre les ravageurs naturels, on conçoit l'utilité des recherches destinées à apporter des solutions.

Ce chapitre montre l'intérêt de quatre plantes oléagineuses. Le potentiel insecticide pour *P. biglobosa* est le plus faible à l'opposé de *A. indica* sur la base de la littérature consultée.

Les extraits de *A. indica* et *C. procera* possèdent une diversité en terme de produits naturels actifs alors que les acétogénines constituent les composés majoritaires dans les extraits de *A. squamosa*.

L'étude de l'activité termicide d'extraits de graines oléagineuses est peu abordée et montre l'intérêt de cette approche vectrice d'innovations.

Chapitre II

Lipides et composition chimique des graines oléagineuses

- II.1 Composition des huiles végétales
- II.2 Procédés d'extraction des huiles végétales
- II.3 Techniques d'analyses des lipides
- II.4 Utilisations des huiles végétales
- II.5 Production d'huiles végétales
- II.6 Composition chimique des graines

Chapitre II

Lipides et composition chimique des graines oléagineuses

Les huiles végétales sont essentiellement constituées de triglycérides (95 - 98%) et d'un mélange complexe de composés mineurs de (2 à 5 %). La teneur en ces composés dépend de l'espèce végétale dont ils sont extraits. Cependant, pour une même espèce, la composition peut varier en fonction des conditions climatiques et d'écosystème, notamment de la qualité du fruit ou de la graine, mais aussi des techniques d'extraction et de raffinage.

Durant le stockage de l'huile, les réactions d'hydrolyse et d'oxydation peuvent modifier la composition d'une huile. Pour apprécier la qualité d'une huile végétale, deux indices viennent en appoint, les indices d'acide et de peroxyde.

L'analyse des composés mineurs est aussi utile dans la détermination de la qualité, de l'origine, de la méthode d'extraction, de raffinage et aussi de l'état de dégradation de l'huile.

II.1 Composition des huiles végétales

La plupart des ouvrages définissent les lipides comme des composés solubles dans les solvants organiques tels que l'hexane, le chloroforme, le benzène, l'éther diéthylique et les alcools. Les acides gras (AG) et leurs dérivés (glycérides), les stéroïdes, les caroténoïdes, les terpènes et les acides biliaires appartiennent à ce groupe.

Cette définition semble erronée car certaines molécules lipidiques peuvent être plus solubles dans l'eau que dans les solvants organiques (par exemple les phospholipides). Par conséquent, une autre acception a été proposée par Christie (1987) qui définit les lipides comme étant des acides gras, leurs dérivés ainsi que les substances qui se rapportent biologiquement ou fonctionnellement à ces molécules.

Les composés mineurs présents dans les huiles végétales sont les suivants : stérols, alcools gras, cires, hydrocarbures, tocophérols et tocotriénols, composés phénoliques, pigments, di et mono glycérides minoritaires, phospholipides et acides triterpéniques.

L'analyse des composés mineurs, requiert souvent une étape préalable d'isolation de la matrice végétale essentiellement constituée de triglycérides, suivie de leur analyse par

plusieurs procédés de séparation, d'identification et de quantification. Une étape d'enrichissement peut être nécessaire.

II.1.1 Acides gras (AG)

Les AG sont des acides monocarboxyliques comportant une chaîne aliphatique généralement non ramifiée (chaîne grasse lipophile). Il existe plusieurs types d'AG (Figure 12). On distingue les AG saturés à courte ou à longue chaîne, tels que l'acide palmitique (C16:0) et l'acide oléique (C18:1) (Gunstone, 1986). Les doubles liaisons (C = C) des AG naturels sont en général de stéréochimie *cis* et non conjuguées.

Ils sont les composants lipidiques les plus fréquents (sous forme estérifiée) et sont utilisés comme réserve énergétique aussi bien dans le monde végétal que dans le monde animal. Chaque acide gras présente des propriétés spécifiques. A ce titre, une attention particulière doit être accordée à la composition en acides gras des huiles végétales. En effet, dans la même famille botanique on peut noter des variabilités de composition en fonction de l'écosystème et de la période de récolte.

La composition en acides gras permet de préciser la chémotaxonomie de chaque type d'oléagineux. Spécifiquement, la présence ou non de certains acides gras non usuels peut venir en appoint à la classification botanique de certaines espèces. Dans ce sens, il est à noter la grande diversité remarquée dans la famille des euphorbiacées (Volker, 1999).

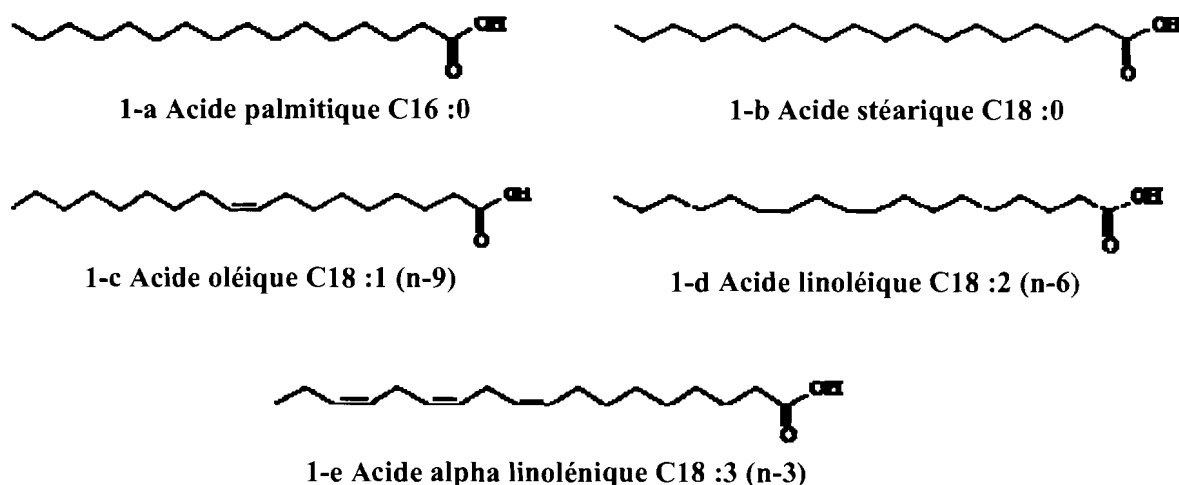


Figure 12 : Structure chimique des acides gras courants dans les huiles végétales (Smith, 1971)

II.1.2 Glycérides (ou acylglycérols)

Ce sont des esters d'acides gras et de glycérol (Figure 13). Ces composés sont considérés comme étant une forme simple et "non encombrante" de stockage des AG, lesquels sont facilement dissociés de la molécule de glycérol par simple clivage de la liaison ester (Harwood, 1986).

Les triglycérides ou triacylglycérols (TAG) sont les principaux constituants des matières grasses "neutres" naturelles. Il existe aussi les glycérides partiels : monoglycérides et diglycérides sont des intermédiaires métaboliques provenant essentiellement de l'hydrolyse des TAG et des phospholipides (PL) par action de lipases (Figure 14). Ces composés ont la particularité de posséder une extrémité hydrophile et une autre hydrophobe. Cette caractéristique structurale leur confère des propriétés tensioactives.

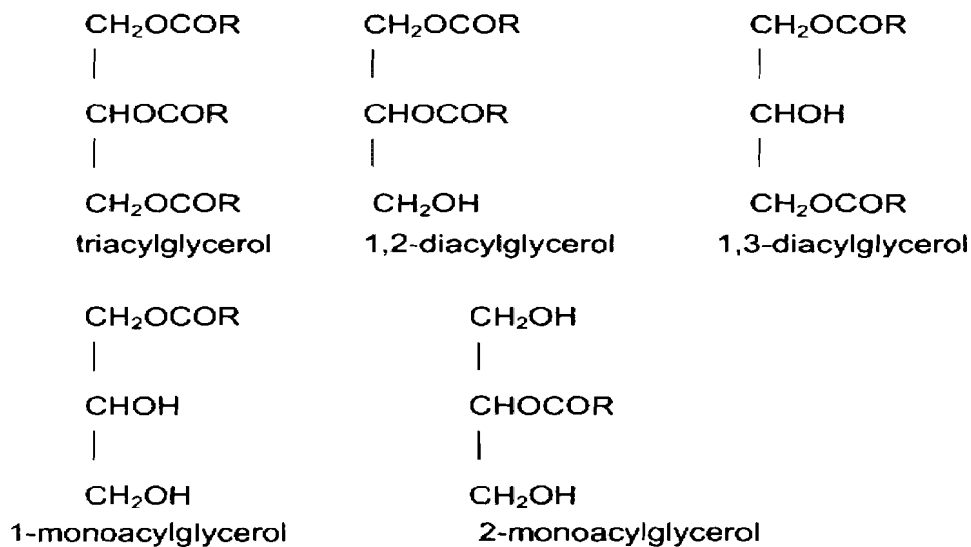


Figure 13 : Structure chimique des glycérides

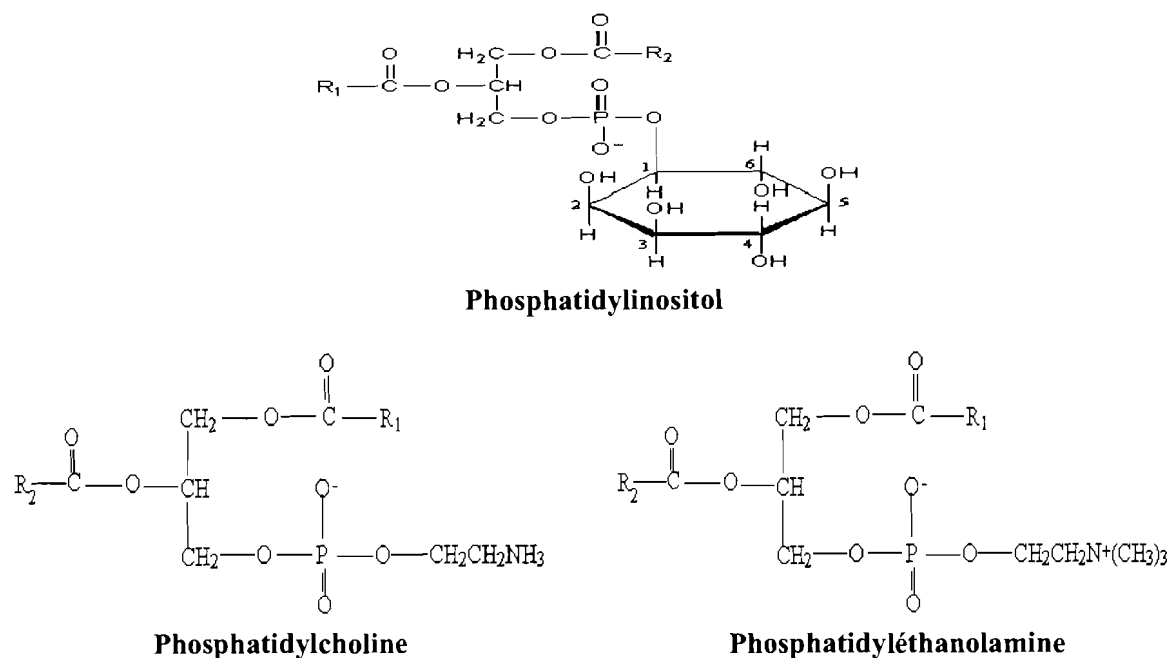


Figure 14 : Structure chimique des phospholipides dans les huiles végétales

II.1.3 Fraction insaponifiable

Il s'agit de l'ensemble des constituants d'un corps gras qui après hydrolyse basique (saponification), est très peu soluble dans l'eau, mais reste soluble dans les « solvants des graisses » comme l'éther diéthylique, les hydrocarbures aliphatiques (hexane, heptane, éther de pétrole), les solvants chlorés (chloroforme, tétrachlorure de carbone), hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène) (Dumazer *et al.*, 1986; Farines et Soulier, 1988). Il s'agit de : alcools gras, cires, stérols, vitamines liposolubles, hydrocarbures, pigments caroténoïdiques, triterpènes et dérivés (alcools triterpéniques par exemple), autres constituants comme les glucosinolates.

Lorsqu'on soumet une huile à l'action d'un alcalin (soude ou potasse), il y a hydrolyse des esters glycéridiques avec formation de savons et de glycérine (c'est la technique traditionnelle de fabrication du savon), le mot insaponifiable désignant « ce qui n'a pas été transformé en savon ».

La proportion de matières insaponifiables contenue dans un corps gras dépend bien évidemment de son origine biologique, des traitements qu'il a pu subir (raffinage), ainsi que de la nature du solvant d'extraction (éther diéthylique, hexane) qui peut être un facteur particulièrement important (William et Hron, 1996; Wakelyn, 1997). D'une façon générale, la fraction insaponifiable d'un lipide non raffiné en représente environ 0,2 à 2 %p-huile

(Halmiton et Rossel, 1986; Schwartz, 1988), bien que l'on rencontre des proportions pouvant exceptionnellement aller jusqu'à 10 %p-huile. C'est notamment le cas du beurre de karité.

Les tocophérols et les phytostérols constituent la partie la plus importante de la fraction insaponifiable des huiles végétales avec le squalène et d'autres hydrocarbures.

II.1.3.1 Stérols

Les phytostérols se retrouvent dans les huiles végétales, en particulier dans les huiles de germes. La composition en phytostérols dépend du type d'huile analysée. Le β -sitostérol, le campestérol, le stigmastérol et le brassicastérol sont dans l'ordre les principaux stérols du monde végétal (Figure 15).

Les taux naturels de phytostérols présents dans certaines huiles végétales de 970, 550 et 220 mg/100g respectivement pour les huiles de maïs, de germe de blé et d'olive contribueraient à abaisser de façon significative le taux de cholestérol. La recherche sur les phytostérols suscite un intérêt croissant chez les scientifiques mais aussi chez les consommateurs de par leur implication dans la diminution de l'absorption du cholestérol et dans la réduction du taux de LDL (lipoprotéine de basse masse volumique) circulant dans le sang (Awad *et al.*, 1996 et 2000 ; Amundsen *et al.*, 2002).

Cette famille de composés permettrait de lutter contre les maladies cardio-vasculaires, contre le développement du cancer du côlon et contre certaines maladies chroniques. Les stérols sont également utilisés pour la synthèse chimique de vitamines (vitamine D) et d'hormones stéroïdes : œstrogène, progestérone (Raicht *et al.*, 1980 ; Bouic et Lamprecht, 1999 ; Mendes *et al.*, 2001).

L'utilisation de ces molécules comme nutraceutiques est actuellement très répandue dans le monde industriel et bien acceptée par les consommateurs.

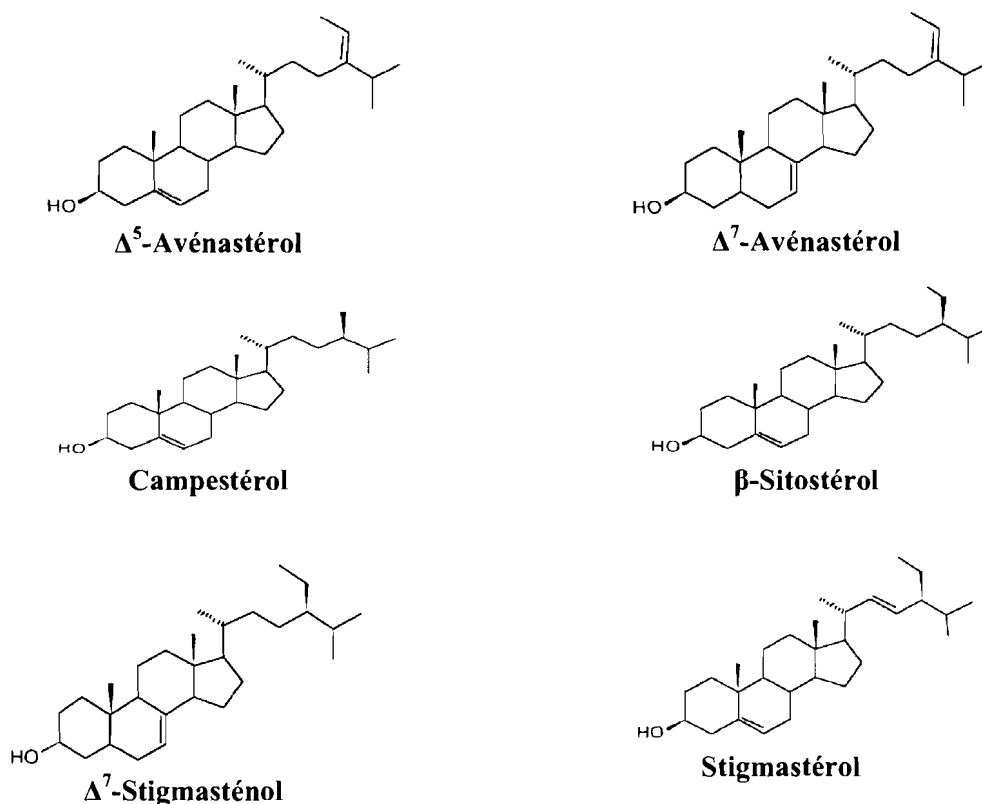


Figure 15 : Structure chimique des stérols dans les huiles végétales (Beare *et al.*, 2001)

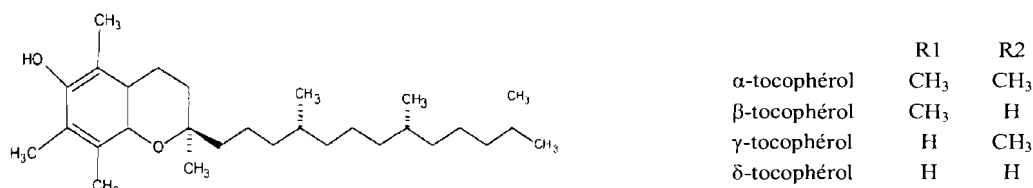
II.1.3.2 Tocophérols/tocotriénols et vitamines liposolubles

Les tocophérols sont des composés fonctionnels très importants dans l'alimentation. Ils appartiennent à la famille chimique des vitamines E, vitamines liposolubles (Figure 16), et révèlent des propriétés antioxydantes. Les tocophérols et tocotriénols sont des antioxydants grâce à leur capacité d'inhiber les peroxydations lipidiques. A cet effet ils participent avec de nombreuses autres substances, à la lutte contre les formes réactives de l'oxygène : radicaux libres et éléments non radicalaires produits lors de la formation des radicaux libres (Boelhouwer, 1983). Il a été montré que le γ -tocophérol permet une protection plus importante contre les radicaux. Le mécanisme qui sous-tend l'inhibition de la croissance cellulaire serait similaire à celui de la réduction de l'activité de la protéase C, aussi bien pour les tocophérols que pour les tocotriénols. Les isomères α -tocophérol et α -tocotriénol présentent l'activité biologique la plus importante, c'est pourquoi on les confond souvent avec le terme vitamine E (Hoglen *et al.*, 1997 ; Cuvelier *et al.*, 2003).

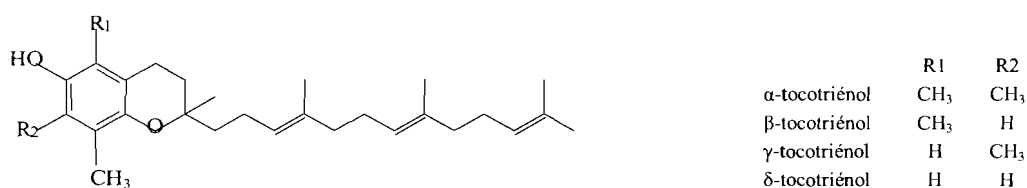
Le rôle de la vitamine E, en tant qu'antioxydant dans les produits alimentaires (conservation) et dans les systèmes biologiques, est très documenté dans la littérature. La vitamine E protège contre les maladies cardio-vasculaires, certains cancers et les maladies infectieuses (Nesarethnam *et al.*, 2000). Il a été aussi noté que les vitamines E diminuent

l'activité de la protéine kinase C et module ainsi la prévention contre l'athérogenèse (Traber et Packer, 1995). Les doses efficaces sont de l'ordre de 17 – 40 mg d' α -tocophérol par jour ce qui est largement au dessus des quantités journalières provenant de la ration alimentaire (Bender, 1997).

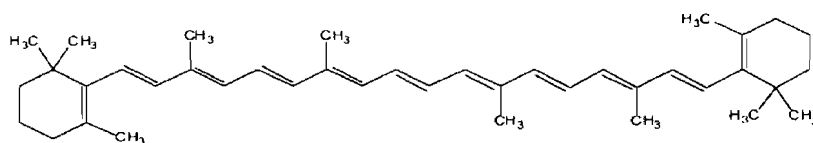
Les proportions des tocophérols varient en fonction de l'oléagineux mais aussi en fonction de la provenance du matériel végétal (Alasalvar *et al.*, 2003).



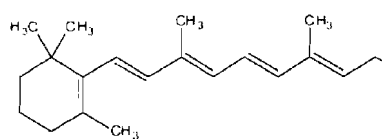
Structure des tocophérols



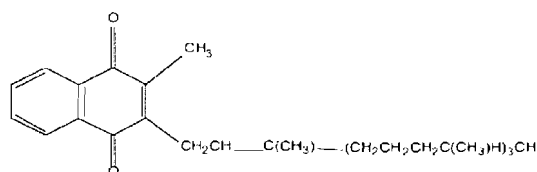
Structure des tocotriénols



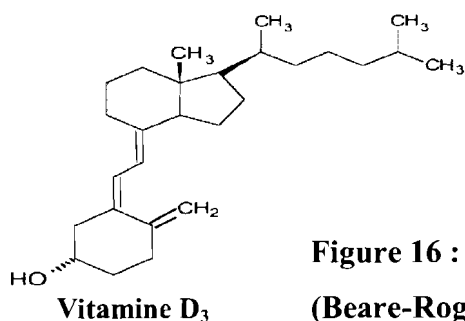
β -Carotène



Rétinol (Vitamine A)



Vitamine K1



Vitamine D₃

Figure 16 : Structure chimique des vitamines liposolubles (Beare-Rogers J. *et al.*, 2001)

II.2 Procédés d'extraction des huiles végétales

II.2.1 Procédés industriels d'extraction des huiles végétales

Les méthodes usuelles d'extraction de l'huile sont la pression, et la dissolution dans un solvant. Depuis 1940, l'hexane constitue le solvant de choix pour l'extraction industrielle des huiles végétales. Cependant, plusieurs directives existent aujourd'hui concernant l'utilisation de ce solvant dans les conditions respectueuses de l'environnement (William et Hron, 1996 ; Wakelyn, 1997).

D'autres solvants comme le chloroforme, le tétrachlorure de carbone et le benzène présentent des risques environnementaux et techniques, mais offrent des rendements et une sélectivité d'extraction importante (Wan *et al.*, 1995).

L'extraction de l'huile à l'aide d'un solvant offre des rendements meilleurs que ceux obtenus par la pression. Toutefois, le procédé d'extraction au solvant reste coûteux et complexe en terme d'investissements technique et financier. De plus, les risques d'accidents sont élevés et cela implique une rigueur de travail extrême.

Le résidu que l'on obtient (tourteau d'extraction) peut être utilisé comme aliment du bétail. Ce résidu contient encore des traces du solvant d'extraction et nécessite un stockage spécifique pour éviter les risques de pollution et d'explosion.

Face à tous ces problèmes, il existe d'autres méthodes d'extraction des huiles végétales, notamment la méthode d'extraction assistée par enzyme. En effet, la meilleure façon de provoquer la rupture des cellules végétales est l'utilisation des enzymes. Les enzymes sont moins problématiques du point de vue environnemental que les solvants organiques d'extraction. De plus, elles peuvent être utilisées en synergie avec des solvants organiques tel que l'hexane pour plus de sélectivité (Fullbrook, 1983 ; Foild *et al.*, 1996 ; Yaw, 1997). La TPPE (Three Phase Partitioning Extraction) l'extraction avec le CO₂ supercritique (§ Chapitre III) sont aussi de nouvelles techniques utilisées mais encore à l'échelle expérimentale (Shweta *et al.*, 2003). Les méthodes d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau ne conviennent pas aux composés visés; car ils sont pour la plupart thermosensibles et de masse moléculaire bien trop élevée pour ce qui est des triglycérides.

II.2.2 Procédé artisanal d'extraction d'huile végétale (www.enterpriseworks.org, consultée en 2005)

L'extraction de l'huile selon les méthodes traditionnelles induit diverses opérations préliminaires (concassage, décorticage, etc.), après lesquelles le produit est réduit en pâte. Cette pâte (ou le fruit entier) est ensuite portée à ébullition et brassée jusqu'à ce que l'huile

surnage et puisse être recueillie. Ces méthodes traditionnelles sont peu efficaces compte tenu de leur rendement très faible, en particulier lorsqu'elles sont manuelles.

L'extraction de l'huile par pression à froid est la méthode la plus simple et donne souvent un produit qui peut être consommé sans raffinage. Cette méthode s'applique aux matières premières (pulpes de palme et d'olive, coprah, graines d'arachide et de tournesol) à teneur élevée en huile. C'est une méthode qui peut être pratiquée en discontinu (action manuelle) ou en continu avec une presse équipée d'une vis à pas variable (EnterpriseWorks, 2001).

II.3 Techniques d'analyses des lipides (Volker, 1999)

II.3.1 Généralités

II.3.1.2 Chromatographie sur couche mince

Pour avoir des informations qualitatives sur la composition des lipides, la chromatographie sur couche mince, reste la solution de choix (Shukla et Touchtone, 1995). Le gradient de solvants communément utilisé pour l'élution des plaques est hexane/éther diéthylique/acide acétique, 80/20/2 v/v/v (Christie, 1989).

La détection des différentes classes de lipides peut être faite après vaporisation d'une solution d'acide sulfurique méthanolique à 50 %. Les taches se révèlent alors par simple chauffage à 110 °C à condition que les composés analysés soient insaturés. En général, une dizaine de « spots » peut être observée par cette méthode : hydrocarbures ($R_f \sim 0,94 - 0,98$), triglycérides ($R_f \sim 0,60$), ils constituent les composés majoritaires), acides gras libres ($R_f \sim 0,39$), stérols ($R_f \sim 0,19$), diglycérides ($R_f \sim 0,15 - 0,21$), monoglycérides ($R_f \sim 0,02$), phospholipides ($R_f \sim 0$)

En outre, la CCM est une méthode préliminaire pour détecter la présence ou non de composés insaturés à systèmes conjugués à double/triple liaisons (détection UV), les acides gras à chaîne oxygénée (Volker, 1999).

II.3.1.2 Spectroscopies Ultraviolette et Infra-Rouge

La spectroscopie Ultra-Violette (220 – 400 nm) est une méthode très sensible qui permet la détection des composés lipidiques insaturés conjugués (liaisons double et triple conjuguées) par un spectre de bandes d'absorption (Comes *et al.*, 1991). Dans certains cas, elle permet de distinguer les isomères géométriques.

Comme la spectroscopie IR, elle peut être appliquée directement aux huiles végétales sans étape intermédiaire ou aux esters méthyliques d'acides gras. Dans ce dernier cas, si la

proportion d'acides gras insaturés conjugués est très faible, cette technique est couplée avec la CPG.

La plupart des huiles végétales montrent des spectres IR semblables entre 660 et 4000 cm^{-1} . Ainsi, la présence dans le spectre, d'absorptions particulières révèle la présence de composés spécifiques. Il est plus avantageux d'obtenir le spectre IR avec la spectroscopie par Transformée de Fourier (IR-TF) car de très bons spectres sont obtenus avec de petites quantités d'huiles et en un temps d'analyse très court.

II.3.1.3 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Par le passé, la RMN était seulement réservée à l'analyse des composés purs. Mais actuellement, grâce aux avancées techniques, elle peut être appliquée à des matrices complexes comme les huiles végétales. En quelques minutes, environ 1mg d'huile suffit pour obtenir un spectre RMN ^1H contre 50 mg pour la RMN ^{13}C , ce qui montre les limites en terme de sensibilité de cette dernière méthode, mais la RMN permet de trouver la position des acides gras sur le squelette glycéridique par exemple (Wollenberg, 1990 et 1991; Gunstone, 1993).

II.3.1.4 Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) (Christie, 1987-1989; Volker, 1999)

La CPG reste la meilleure technique d'analyse des huiles végétales. La saponification transforme en savons les composés triglycéridiques et permet l'extraction de la fraction insaponifiable. Cependant, cette méthode n'est pas appropriée pour analyser : cires, stérols estérifiés, phénols, pigments, glycérides minoritaires et phospholipides qui sont altérés durant la saponification.

La partition liquide-liquide avec des solvants polaires (méthanol, méthanol/eau, acétonitrile) est une voie intéressante pour l'isolation des polyphénols, des hydrocarbures polycycliques aromatiques et des chlorophylles (Christie, 1989; Cert *et al.*, 2000). Avant l'utilisation de la CPG il faut s'assurer de l'effet de la température sur la structure des composés à analyser pour éviter leur décomposition.

La CPG reste la technique la plus couramment utilisée pour déterminer la composition en acides gras et en stérols. L'analyse des acides gras passe d'abord par la préparation des esters par transestérification (ou méthanolyse) de l'huile, en présence d'un catalyseur acide ou basique. Ces esters méthyliques sont ensuite injectés en CPG, munie d'une colonne capillaire pour une meilleure résolution des pics.

Quant à l'analyse des stérols, elle passe par une silylation afin d'éviter la déshydratation éventuelle de la fonction alcool et les rendre plus volatils.

Le détecteur à ionisation de flamme est le plus couramment utilisé. La spectrométrie de masse (SM) arrive souvent en complément de la CPG en cas d'ambiguïté, afin de confirmer la structure des produits et de les identifier.

II.3.1.5 Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Comme toute technique chromatographique, elle est basée sur les phénomènes d'adsorption et de partition entre deux milieux. La chromatographie d'adsorption (phase normale) est utilisée pour la séparation de classe de composés en fonction de la polarité des groupes fonctionnels (Christie, 1987). En phase normale, l'adsorbant (phase stationnaire) est le gel de silice et l'éluant est un mélange de solvants apolaires en majorité. La CLHP en phase inverse, basée sur la partition, permet de séparer individuellement les composés d'une même classe chimique. Dans ce cas, la phase stationnaire comporte usuellement une phase non polaire greffée d'octadécylsilane (C₁₈) et l'éluant est constitué d'un mélange de solvants polaires.

Plusieurs méthodes de détection sont couplées à la CLHP, la plus courante est la détection Ultraviolet-visible (UV-Vis). D'autres méthodes de détection sont aussi utilisées à savoir, les détecteurs ELSD (Evaporating Light Scattering Detector), à fluorescence et électrochimique.

Ces dernières années, de nouvelles techniques présentant une efficacité et une sensibilité très importante ont été développées. Elles combinent CLHP et CPG couplées à la SM dans un procédé polyvalent d'isolation et de fractionnement (Byrdwell, 2005).

II.3.1.6 CPG et CLHP couplées avec SM

Pour l'élucidation complète des structures des composés lipidiques, il est nécessaire de coupler les techniques de CPG et de CLHP. Cette technique renseigne plus spécifiquement sur la longueur des chaînes hydrocarbonées, le type de chaînes (linéaire, cyclique, aromatique), le nombre ainsi que la position et parfois la configuration des groupes fonctionnels (Ryhage *et al.*, 1960; Murphy, 1993).

II.3.1.7 Chromatographie en Phase Supercritique (CPS)

Récemment, l'extraction des lipides avec des fluides supercritiques a fait son apparition (King *et al.*, 1996; Dunford et King, 2002). Cette technique de séparation s'avère

intéressante car elle offre la possibilité de modifier la solubilité des composés par l'ajustement de la pression et de la température ou l'ajout de co-solvants. Elle peut être couplée à la fois à la CPG et à la CLHP où le CO₂ supercritique est utilisé comme phase mobile dans des conditions de température relativement plus basses que celles de la CPG.

II.3.2 Techniques d'analyse des composés majeurs de la fraction insaponifiable : stérols, tocophérols et tocotriénols

La CPG est utilisée pour l'analyse de ces composés. Cependant, cette technique demeure limitée car elle ne permet pas une séparation complète des isomères ou du moins nécessite un temps d'analyse assez long.

Une bonne résolution pour les tocophérols/tocotriénols et le β -sitostérol peut être observée en CLHP. En ce qui concerne les tocophérols et tocotriénols, il existe deux possibilités d'élution à savoir la CLHP en phase normale et en phase inverse (Abidi, 2000). Les isomères α , β , γ et δ -tocophérols sont souvent analysés en phase normale avec une meilleure résolution entre les isomères β - et γ -tocophérols et tocotriénols qu'en phase inverse (Panfili *et al.*, 1994; Manzi *et al.*, 1996; Psomiadou *et al.*, 2000).

Dans le cas de la séparation des carotènes et des stérols, l'analyse en phase inverse est plus avantageuse à cause de la reproductibilité et de la sensibilité plus grandes que celles observées dans l'analyse des tocophérols et tocotriénols en phase normale. Le type de détecteur influe aussi sur la qualité de l'analyse, les détecteurs à fluorescence permettent par exemple de minimiser les interférences entre différents composés d'une matrice végétale (Ruperez *et al.*, 1999 ; Ruperez *et al.*, 2001; Rodas *et al.*, 2003; Bada *et al.*, 2004).

II.4 Utilisations des huiles végétales (www.epobio.net/workshop0605.htm, consultée en 2006)

Les huiles végétales ont toutes sortes d'emplois alimentaires, notamment les huiles de table et de friture, et entrent dans la composition de la margarine, des graisses formulées. Hors du domaine alimentaire, elles servent aussi à préparer de nombreux produits transformés tels que les savons, les plastiques, les lubrifiants, les peintures et encres.

II.4.1 Surfactifs, détergents, savons

Le plus souvent les savons sont obtenus par saponification du groupe carboxylique des esters acides gras par de la soude. En fonction de l'application, les acides gras peuvent être sous forme estérifiés. Pour obtenir une détergence importante, les acides gras à courtes

chaînes sont nécessaires (moins de 16 atomes de carbone). Les huiles de coco et de palmiste constituent les matières premières les plus utilisées dans l'industrie des surfactifs lorsqu'un bon pouvoir moussant est recherché.

L'hydrolyse partielle des huiles en mono et diglycérides permet d'obtenir des agents émulsionnants. D'autres applications requièrent de courtes chaînes d'acides gras (moins de 12 atomes de carbones) comme les acides : caprilique (C8:0) et caprique (C10:0). Il existe par exemple un nombre important de plantes du genre *Cuphea*, qui possèdent des taux assez élevés en ces acides (plus de 95 %) (Röbbelen, 1989; Knapp, 1993). Le colza transgénique peut contenir 60 % d'acide laurique (Wiberg *et al.*, 2000; Larson *et al.*, 2002).

II.4.2 Lubrifiants et huiles hydrauliques

La fonction primaire des lubrifiants est de diminuer l'usure par friction, de faciliter les transferts à chaud de matières et de protéger contre la corrosion. Afin d'assurer de telles fonctions, les lubrifiants sont des formulations complexes la plupart à base d'huiles végétales (70 - 90 %) et d'additifs spécifiques qui leur confèrent des propriétés particulières.

Les secteurs d'utilisation des lubrifiants se répartissent de la façon suivante : 47 % industrie de l'automobile, 32 % lubrifiants industriels (incluant les huiles hydrauliques, 15 %), 11 % industrie huilière, 9 % marine et aviation.

Les lubrifiants peuvent être des dérivés d'huile végétale (triglycérides) mais le plus souvent ils sont aussi composés d'hydrocarbures ou encore d'esters synthétiques où la chaîne d'acides gras peut-être d'origine végétale. L'avantage des lubrifiants et des fluides hydrauliques d'origine végétale est qu'ils sont biodégradables et peu toxiques. Certaines huiles s'auto-oxydent et s'hydrolysent, ce qui augmente leur point de fusion et leur acidité. Malgré cela, plusieurs huiles végétales sont commercialisées comme lubrifiant. Ces dernières sont recommandées pour les fluides perdus tels que ceux des tronçonneuses utilisées pour les travaux forestiers.

Les huiles contenant des acides gras hydroxylés comme l'huile de ricin sont des biolubrifiants de choix (Salywon *et al.*, 2005; Ogunniyi, 2006). L'acide érucique (présent dans le colza érucique et dans *Crambe abyssinica*) est utilisé comme lubrifiant et agent de friction. La lubricité est en effet favorisée par une teneur élevée en acides gras monoinsaturés à longue chaîne (20:1 Δ^5) (Isbell *et al.*, 1999). Les esters de cire ont des propriétés lubrifiantes qui sont nettement supérieures aux huiles végétales ordinaires (*i.e.* triacylglycérols) à cause de leur stabilité à l'oxydation et de leur résistance à l'hydrolyse. Les esters dont la chaîne aliphatique est d'origine végétale sont des huiles synthétiques performantes pour automobiles.

L'huile de jojoba est une excellente source naturelle de mono esters (appelés cire) mais reste assez chère pour être utilisée comme biolubrifiant (Busson-Breysse, 1990).

Industriellement, les qualités essentielles pour qu'une huile soit prédisposée à être utilisée en tant que biolubrifiant et fluide hydraulique sont : teneur élevée en acide oléique en acide érucique, en acides gras hydroxylés et en esters de type cire ; stabilité oxydative élevée et point de fusion faible.

II.4.3 Peintures, bitumes, encres et plastiques (www.soyink.com, consultée en 2006)

Les huiles utilisables dans ces secteurs sont les huiles susceptibles de se polymériser en formant un film résistant. Le récent succès de nouvelles applications des huiles végétales dans ce domaine est le « *Soy Ink* » fabriqué à partir d'huile semi-raffinée de soja et enrichie aux pigments, résines et cires. Les huiles de lin et de soja contiennent une forte proportion d'acides gras polyinsaturés, ce qui est indispensable dans le secteur des peintures. Les huiles de lin et de soja sont aussi époxydées chimiquement et sont utilisées comme plastifiants.

Des essais de domestication de *Calendula officinalis* ont été lancés à cause de sa teneur élevée en acides gras insaturés conjugués (Marvin *et al.*, 2000). D'autres espèces, notamment *Euphorbia lagascae*, *Vernonia galamenensis* sont aussi de plus en plus explorées en raison de leur teneur en acides gras époxydés, ce qui simplifie leur utilisation en formulation (Thompson *et al.*, 1994). Certaines plantes transgéniques sont même développées avec des teneurs de 15 à 20 % d'acides gras époxydés ou conjugués (Cahoon *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2005).

II.4.4 Polymères

Les dérivés d'huiles végétales peuvent être utilisés dans la fabrication des polymères de grande utilité (mousses, élastomères, adhésifs, fibres, préservatifs, plastiques). Les huiles végétales peuvent servir dans la fabrication des polyuréthanes. Ces polymères sont formés d'une chaîne organique par l'uréthane qui est un ester d'acide carbamique (RNHCOOQ, où R et Q représentent différents groupements organiques).

Le polyuréthane d'origine végétale le plus courant est le « *Soyol* » obtenu à partir d'huile de soja. Il constitue une alternative sérieuse aux dérivés de la pétrochimie. La production des polyols dérivés des oléagineux a relancé la réaction d'hydroxylation des doubles liaisons des AG.

II.4.5 Solvants

En Europe par exemple, 23 % des émissions dans l'atmosphère proviennent des solvants dérivés de l'industrie pétrochimique. Les solvants d'origine naturelle obtenus par méthanolyse des huiles sont des alternatives aux solvants synthétiques en raison de leur polarité, l'absence de composés benzéniques et la faible volatilité.

Les esters méthyliques des huiles de colza et soja modifiées par transestérification sont utilisées comme agents de nettoyage lors des marées noires. À raison de 0,57 - 0,86 \$US/litre, les prix de ces solvants restent aussi très compétitifs.

II.4.6 Biocarburants

De plus en plus, les huiles végétales sont utilisées comme biocarburants et dans ce domaine d'application, le rendement par hectare de l'oléagineux reste un facteur important pour sa faisabilité à cause du prix toujours compétitif du carburant Diesel (Ragauskas *et al.*, 2006).

Selon la Directive 2003/30 EC, tous les Etats membres de l'espace économique européen sont tenus d'augmenter le taux d'additifs d'origine végétale dans les carburants à 2 % en 2005, et à 5,75 % en 2010. Les deux biocarburants couramment utilisés sont l'éthanol et l'ester méthylique d'huile de colza : «biodiesel». Pour l'éthanol, le Brésil et les USA sont en position forte alors que l'Europe focalise ses attentions sur le colza.

Les spécifications d'une huile utilisable comme biocarburant varient entre les USA et l'Europe. L'indice de cétane, la stabilité oxydative, le point de fusion sont des indices de qualité importants.

II.5 Production d'huiles végétales (www.epobio.net/workshop0605.htm, consultée en 2006)

Les données physiques et chimiques de centaines de plantes sont consignées dans les bases de données et leur potentiel a été déterminé sur la base de leur composition en acides gras (Gunstone, 1993; Ucciani, 1995 ; Volker, 1999). Une diversité dans la composition en acides gras reste un facteur important dans la désignation rationnelle de plantes ayant un potentiel élevé pour de telles applications. Ces huiles végétales sont susceptibles de satisfaire les demandes du marché mondial et peuvent alimenter l'industrie pétrochimique. Le développement de ce nouveau marché est prometteur à cause de la spécificité fonctionnelle des acides gras non usuels.

La production industrielle des graines oléagineuses constitue un facteur important dans l'approvisionnement durable des industries. De plus, les huiles végétales sont respectueuses

de l'environnement, elles sont biodégradables et participeraient par leur production à une réduction notable des émissions de CO₂ contrairement aux ressources fossiles.

II.5.1 Etat des lieux

Depuis les dix dernières décennies, l'humanité est devenue totalement dépendante des ressources fossiles non seulement pour les besoins énergétiques (transport, chauffage), mais aussi pour l'approvisionnement en matières premières pour les industries. Ces ressources ne sont pas renouvelables et cela implique inévitablement de nos jours l'augmentation des prix des produits dérivés. Cela risque d'avoir un impact très négatif sur les économies qui ne prévoient pas des alternatives aux ressources fossiles.

Les huiles végétales sont structurellement proches des chaînes hydrocarbonées dans les dérivés du pétrole et constituent donc une alternative importante dans la production de ces substances. Environ 15 à 20 % des huiles végétales produites (15 - 20 millions de tonnes) sont utilisées dans le secteur non alimentaire comme détergents, peintures, plastiques et lubrifiants.

Le prix par baril des huiles végétales varie autour de 70 - 80 \$US.

II.5.2 Production mondiale

La production mondiale de graines oléagineuses a avoisiné 662 millions de tonnes en 2005, correspondant à 117 millions de tonnes d'huiles végétales. Les huiles de palme, de soja, de coprah et de colza représentent 73 %.

En Europe par exemple, 31 millions de tonnes de graines ont été produites ce qui représente environ 8,5 millions de tonnes d'huiles végétales soit 7 % de la production mondiale.

Les graines les plus importantes sont le colza, l'olive, le tournesol avec respectivement 33, 71 et 13% de la production mondiale (Annexe 1). Les graines de soja et de coton sont aussi produites en Europe mais elles représentent seulement 0,4 et 2 % de la production.

II.5.3 La demande à l'horizon 2020 en zone UEMOA (Afrique de l'Ouest)? (Hirsch, 2002)

A l'horizon 2010, la population des 8 pays de l'Union Economique et Monétaire Ouest-Africaine (UEMOA), augmentera de 52 millions d'habitants. Cette augmentation générera une demande supplémentaire de corps gras végétaux de près de 423.000 tonnes, soit une hausse de 74 % par rapport à 1999 la situation de référence. Pour les 7 pays de la Communauté Economique des Etats de l'Afrique de l'Ouest (CEDEAO), non membres de

l'UEMOA, la demande additionnelle portera sur 1,44 million de tonnes (dont 80 % pour le seul Nigeria) et devra satisfaire une population en hausse de 98 millions d'habitants.

En supposant toujours constante la structure de la demande, les besoins additionnels pour les trois principales huiles actuellement produites dans l'UEMOA s'élèveraient à 118.000 tonnes d'huile de palme (+ 58 % par rapport à la demande actuelle), 86 000 tonnes d'huile d'arachide (+ 79 %) et à 70.000 tonnes d'huile de coton (+ 79 %). Pour les autres pays d'Afrique de l'Ouest, l'accroissement de la demande pour les trois huiles principales serait respectivement de 638.000 tonnes pour palme (+ 40 %), 420.000 tonnes pour arachide (+ 65 %) et 15.000 tonnes pour coton (+ 63 %) (Annexe 2).

II.5.4 Réponses possibles de l'offre à l'horizon 2020 en zone UEMOA (Hirsch, 2002)

Il y a peu de chances, compte tenu des rapports de force qui se sont instaurés à l'échelle mondiale entre les principaux producteurs, que de nouvelles plantes oléagineuses réussissent à s'implanter et à se développer sur des superficies significatives en Afrique de l'Ouest d'ici à 2020.

D'une part, le volontarisme des Etats susceptible de forcer le destin de ces filières est fortement amoindri, d'autre part, les bailleurs de fonds, publics et privés, sans lesquels tout développement à grande échelle n'est pas envisageable, semblent avoir d'autres priorités ou d'autres points d'application. En d'autres termes, ce qu'a réussi la Malaisie à partir des années 70, n'est pas reproductible en Afrique de l'Ouest d'ici à l'horizon 2020.

Par voie de conséquence, si un développement substantiel des oléagineux doit intervenir d'ici à 2020, on peut, sans prendre de risques inconsidérés, pronostiquer qu'il reposera sur les trois filières dominantes actuelles : palmier à huile, arachide et coton, cette dernière étant toutefois totalement tributaire des perspectives de la fibre. Le cocotier et le karité compléteront l'offre.

Les produits dont les systèmes de production relèvent principalement de la cueillette (comme les graines sélectionnées pour cette thèse) ne devraient pas remettre en cause cette hiérarchie. Même s'il est souhaitable qu'ils continuent à jouer, saisonnièrement ou localement, un rôle dans l'approvisionnement en corps gras dans l'UEMOA.

II.6 Composition chimique des graines

Les principales classes de constituants des graines considérées sont les suivantes : lipides, protides, glucides, celluloses et lignocelluloses. Les données de la littérature sur la caractérisation des graines sont très variables, notamment pour *A. squamosa* pour laquelle seule l'huile paraît avoir été étudiée. La composition en acides gras de quelques huiles végétales est présentée à l'Annexe 3. La caractérisation de la graine de *C. procera* datent des années 1960-1980 (Vieux, 1970; Miralles, 1983; Derbesy, 1983). Kauschik et Vir (2000) ont étudié la variabilité de la composition en acides gras de l'huile de graines de *A. indica* en fonction de l'écosystème. Andrade *et al.* (2001) ont abordé la caractérisation de *A. squamosa* de l'Amazonie. Akintayo (2004) a étudié la caractérisation des graines de *P. biglobosa*. Les données bibliographiques sur la caractérisation des graines sont présentées dans le Tableau 1. La teneur en matière minérale varie de 1,2 à 18 %MS-tourteau, celle en matière azotée de 13 à 50 %MS-tourteau. Les fibres varient entre 8 et 26 %MS-tourteau.

Tableau 1 : Caractérisation des tourteaux d'extraction des quatre graines sélectionnées d'après la bibliographie

Caractérisation des graines (%)	<i>A. squamosa</i> ⁴	<i>A. indica</i> ^{1,2,3}	<i>C. Procera</i> ^{5,6,7,8}	<i>P. biglobosa</i> ⁹
Humidité	-	-	12,5 – 12,7	10,2 ± 0,2
Matière minérale	-	5 - 18	4,8 – 7,2	1,2 ± 0,1
Matière grasse	-	-	4,5 – 9,9	-
Matière azotée	-	13 - 50	16,8 – 26,3	32,4 ± 1,2
Fibre	20,9	8 - 26	26,1 – 35,1	16,6 ± 0,8

1- Rao, 1987 ; 2- Radwanski and Wicken, 1982; 3- Fagoonée, 1981; 4- Andrade et al., 2001 ; 5- Vieux, A. S. 1970; 6- Derbesy et Busson, 1968 ; 7- Kabele, 1983 ; 8- Miralles, 1983 ; 9- Akintayo, 2004

II.6.1 Lipides

Dans les oléoprotéagineux, les matières grasses sont également présentes dans l'endosperme et en quantité plus importante : 22 % pour le soja, 45 % pour le colza et 50 % pour le tournesol. Les données sur les lipides des oléagineux sélectionnés sont présentées dans les Tableaux 2-4. Elles sont relatives à la qualité et à la composition chimique des huiles pour ces quatre graines sélectionnées. Les teneurs en huile varient de 25 à 52 % ; *C. procera* étant la plus riche, viennent ensuite *A. indica* (40 – 45 %) ; *A. squamosa* (25 – 45 %) et *P. biglobosa* (26 %). Ces graines sont donc effectivement oléagineuses et au moins pour les trois

premières, l'extraction peut être faite avec une presse continue, sans solvant, ce qui est un avantage pour une production artisanale. La composition en AG (Tableau 3) ne les différencie pas des huiles alimentaires courant de type oléique ou linoléique (Annexe 3). On note une variabilité importante pour *A. indica* (Kauschik et Vir, 2000). A l'exception de *P. biglobosa* en ce qui concerne la composition en stérol (Tableau 4) la fraction insaponifiable des trois autres huiles n'a pas été analysée.

Tableau 2 : Caractéristiques physiques et chimiques des huiles des quatre graines sélectionnées

Données physiques et chimiques	<i>A. squamosa</i> ¹¹	<i>A. Indica</i> ^{1,2,3,10}	<i>C. procera</i> ^{5,6,7,8}	<i>P. biglobosa</i> ⁹
Teneur en huile (%)	25 - 45	40 - 45	48 - 52,0	26,5
Masse volumique (20°C)	-	0,922	0,923	0,931
Indice de réfraction (25°C)	-	1,466	1,457 - 1,462	1,472
Point de fusion (°C)	-	-	37,5	-
Acidité oléique (%)	-	5,6	14,0	2,5 ± 0,1
Indice de saponification (mg de KOH/ 100g)	-	195	195 - 201	180 ± 1
Indice de peroxyde (meq de O ₂ /kg)	-	-	-	-
Indice d'iode (g d'I ₂ pour 100g d'huile)	-	69	37 - 70	95 ± 0,8
Insaponifiable (%p-huile)	-	0,5 - 2	0,8 - 3,0	2,6 ± 0

1- Rao, 1987 ; 2- Radwanski and Wicken, 1982; 3- Fagoonée, 1981; 4- Andrade et al., 2001 ; 5- Vieux, 1970; 6- Derbesy et Busson, 1968 ; 7- Kabele, 1983 ; 8- Miralles, 1983 ; 9- Akintayo, 2004

Tableau 3 : Composition en acides gras des huiles sélectionnées d'après la bibliographie

Acides gras (%)		<i>A. squamosa</i> ¹¹	<i>A. indica</i> ¹⁰	<i>C. procera</i> ^{3,4,5}	<i>P. biglobosa</i> ⁹
Acide palmitique	C16:0	14,1	16,5 – 34,3	22,6 – 26,4	27,5 ± 0,5
Acide palmitoléique	C16:1	0,1	-	0,5 - 2,4	
Acide stéarique	C18:0	14,4	6,6 – 24,0	6,2 - 11,9	10,5 ± 0,4
Acide oléique	C18:1	45,2	25,4 – 57,9	37,1 - 48,9	14,5 ± 0,5
Acide linoléique	C18:2	22,8	6,2 – 16,7	14,4 - 25,4	44,5 ± 1,5
Acide linoléique	C18:3	0,7	-	0,5 - 0,8	3,0 ± 0,2
Acide arachidique	C20:0	1,1	-	1,5 - 2,9	-
Acide gadoléique	20:1	0,1	-	-	-
Acide béhénique	C22:0	0,22	-	-	-

10- Kaushik and Vir, 2000; 11- Andrade et al., 2001

Tableau 4 : Composition pondérale de la fraction stérolique d'après la bibliographie

Stérols (%)	<i>A. squamosa</i>	<i>A. indica</i>	<i>C. procera</i>	<i>P. Biglobosa</i> ⁹
Cholestérol	-	-	-	-
Campestérol	-	-	-	18,3
Stigmastérol	-	-	-	29,8
β-Sitostérol	-	-	-	39,5
Δ-5 Avénastérol	-	-	-	12,4

9- Akintayo, 2004

II.6.2 Sucres et glucides

Ils se présentent sous la forme de sucres simples, mais surtout de composés plus ou moins complexes de ces mêmes sucres simples tels que glucose et pentose. Le plus important est l'amidon qui est la substance énergétique par excellence, facilement digestible. La cellulose qui entre dans la composition du péricarpe est un glucide complexe, digestible par les polygastriques seulement.

II.6.3 Lignocelluloses

Ce sont les constituants pariétaux de la graine (NDF-ADF-ADL ou séquence de Van Soest), La répartition de ces différents constituants dans les graines est donnée sur la Figure 17. Les fibres insolubles dans le détergent neutre ou NDF (Neutral Detergent Fiber) constituent le résidu organique obtenu par action sur la prise d'essai de la solution au

détergent neutre après un éventuel prétraitement de l'échantillon justifié par sa composition. NDF est théoriquement la somme des polymères suivants : cellulose, hémicellulose, lignine, partie des pectines. Il peut être contaminé par diverses substances fortement liées à ces polymères (protéines, amidon, tanins). A l'inverse, NDF sous-estime les fibres insolubles lorsque l'échantillon contient des pectines. Les fibres insolubles dans le détergent acide ou ADF (Acid Detergent Fiber) ou lignocelluloses constituent le résidu organique obtenu par action sur le résidu NDF de la solution au détergent acide. ADF est théoriquement la somme des polymères cellulose et lignine. Il peut être contaminé par des hémicelluloses, par des composés azotés. La différence NDF-ADF est une approximation des hémicelluloses. La lignine sulfurique appelée aussi ADL (Acid Detergent Lignin) constitue le résidu organique obtenu par action de l'acide sulfurique à 72 % sur le résidu ADF. La différence ADF-ADL est une approximation de la cellulose (dite de Van Soest). La bibliographie consultée n'a pas donné d'information relative aux lignocelluloses pour les quatre graines.

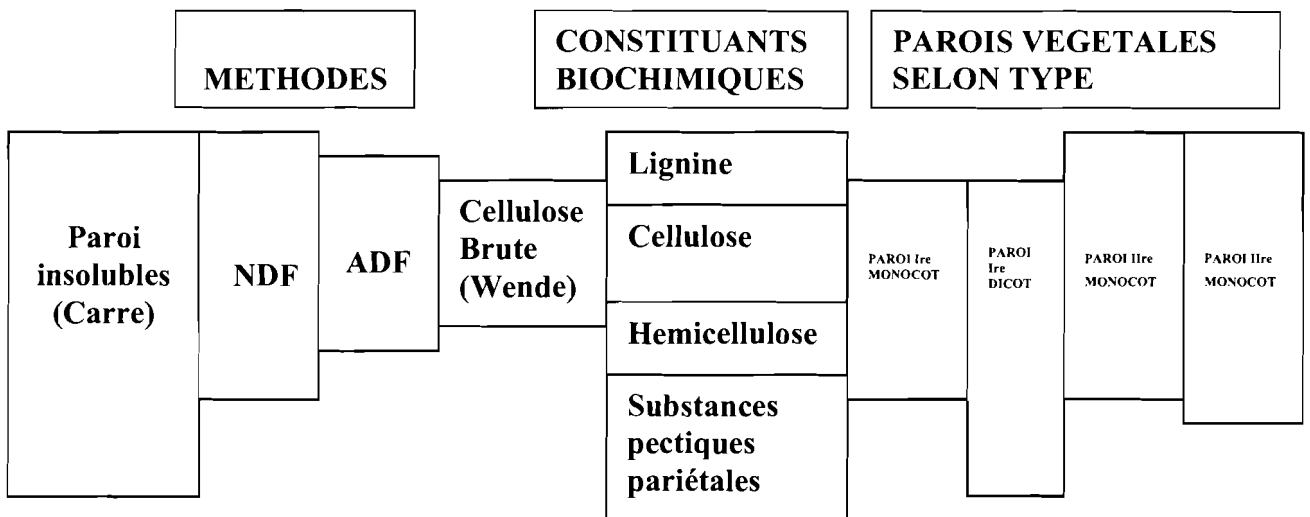


Figure 17 : Répartition des polymères pariétaux dans les résidus de graines oléagineuses (Carré, 1971)

II.6.4 Protides (www.fao.org, consultée en 2006)

Ils sont rencontrés sous forme simple (acides aminés) et sous forme complexe (protéines). La teneur en protéines des céréales et des protéagineux varie suivant les espèces, elle est en moyenne de 43 % pour le soja, 12 % pour le blé, 11 % pour l'orge et seulement 10 % pour le maïs. Certains de ces acides aminés, tels la lysine, sont indispensables pour l'alimentation animale (substance nécessaire à la croissance). Les graines de soja contiennent 45 % de protéines, celles de colza et de tournesol en contiennent 20 – 25 % et 40 – 45 % d'huile. La teneur en protéines des tourteaux et donc leur valeur nutritive constituent aussi un facteur important dans la rentabilité de la culture de telle ou telle graine oléagineuse.

Chapitre III

Extraction en milieu CO₂ Supercritique

III.1 Historique

III.2 Propriétés des fluides supercritiques

III.3 Le CO₂ SC comme solvant

III.4 Procédés d'extraction des produits actifs naturels avec le CO₂ SC

Chapitre III

Extraction en milieu CO₂ Supercritique

III.1 Historique (www.supercriticalconsulting.com, consultée en 2004)

Avant le XIX^{ème} siècle les scientifiques pensaient que la matière se présentait seulement sous trois états fondamentaux (liquide, gazeux et solide). En 1822, un chercheur français, le Baron Cagniard de la Tour, met en évidence l'existence d'un quatrième état fondamental, l'état supercritique, situé entre l'état liquide et l'état gazeux mais totalement homogène.

Dans les années 1920, des études d'applications sont menées dans le domaine de la pétrochimie, puis Kurt Zosel développe dans les années 1960 l'extraction des produits naturels par le CO₂ Supercritique.

Avec la décaféination du café, le CO₂ SC trouve sa première application industrielle à la fin des années 70. Les procédés d'extraction du houblon et de décaféination du thé sont mis au point durant la même période. Les années 80 voient une première phase de développement de la technologie, avec la construction d'unités industrielles pour le traitement des solides, en Europe, aux USA et en Australie, mais également la construction des premières unités de fractionnement des liquides. Les premiers extraits d'épices arrivent sur le marché.

L'émergence d'applications nouvelles des fluides supercritiques (FSC) arrive dès la fin des années 1990 : nettoyage de précision, aérogels, imprégnation, génération de particules, micro-encapsulation. Les développements industriels dans ces domaines sont aujourd'hui en cours. Les procédés réactionnels comme l'oxydation par l'eau supercritique ou la synthèse chimique et biochimique permettent d'espérer des succès industriels.

III.2 Propriétés des fluides supercritiques (www.supercriticalconsulting.com, en 2004)

L'étude du diagramme de phase (P, T) met en évidence à l'extrémité de la courbe de coexistence liquide-gaz, la présence d'un point limite défini par Gibbs dès 1876 et communément appelé "point supercritique" (PSC). Ce PSC est caractérisé par une température critique (T_c) et une pression critique (P_c).

A partir du PSC, toute augmentation de P ou de T conduit à un FSC possédant une masse volumique de type liquide et une viscosité de type gaz. Ainsi, les FSC ont une viscosité proche de celle des gaz, une masse volumique proche de celle des liquides, et une diffusivité élevée, intermédiaire entre celles des gaz et des liquides, mais beaucoup plus importante que celle des liquides.

Les changements d'état gaz/FSC et liquide/FSC se font d'une manière continue. Ainsi, les FSC ont un pouvoir solvant dit « à géométrie variable » : la solubilité des composés évolue avec les conditions de température et de pression du fluide. Au-delà de la température critique (T_c), une augmentation de pression appliquée au gaz induit une augmentation de masse volumique et donc un pouvoir solvant, ce qui se traduit par la formation d'un fluide plus condensé (supercritique), sans passer par l'état liquide. De même, au-delà de la pression critique (P_c), une augmentation de température imposée au liquide entraîne la formation d'un fluide moins dense et différent de l'état gazeux.

De nombreux FSC sont étudiés, en particulier l'eau et le propane, mais le plus communément utilisé reste le CO_2 .

III.3 CO_2 SC comme solvant (www.supercriticalconsulting.com, consultée en 2004)

De par ses coordonnées critiques relativement basses ($T_c = 304 \text{ K}$ (31°C) et $P_c = 7,4 \text{ MPa}$), le CO_2 se positionne en tête des FSC industriels (Figure 18). Il permet de développer des procédés à basse température pour des produits thermosensibles et présente par ailleurs des propriétés qui en font un solvant de choix : peu onéreux, non inflammable, quasi-inerte chimiquement, non toxique, insipide et inodore.

D'une manière générale, le CO_2 SC (solvant peu polaire) permet de solubiliser des composés apolaires et de faible poids moléculaire, inférieur à $1.500 \text{ g.mole}^{-1}$.

Sur la Figure 18, le diagramme de phase du CO_2 montre qu'à forte P et à faible T ($T > T_c$) la masse volumique du fluide sera forte et donc son pouvoir solvant élevé. La séparation du mélange extrait-solvant s'opère par simple abaissement de la masse volumique et donc du pouvoir solvant, en diminuant la pression ou en augmentant la température. De plus, le gaz carbonique (CO_2) étant très volatil, l'extrait sera récupéré sans aucune trace résiduelle du gaz.

Généralement, des composés sous-critiques, appelés modificateurs ou co-solvants, sont ajoutés à faible concentration ($< 15 \%$) au CO_2 SC afin d'augmenter son pouvoir solvant et ses propriétés de dissolution sélective. Ils agissent par la création de liaisons moléculaires avec le soluté (co-solvants polaires) ou par la mise en place de forces de dispersion (co-solvants apolaires).

L'eau est très souvent utilisée comme co-solvant car généralement présente dans les produits naturels. Récemment, le rôle de ce co-solvant dans l'extraction de l'acide palmitique par le CO₂ SC a été mis en évidence (Iwai *et al.*, 2004). L'augmentation de la solubilité de cet acide découle de la création de liaisons entre les molécules d'eau et les groupes carboxyliques du soluté. En moyenne, une molécule d'acide palmitique se lie à six molécules d'eau.

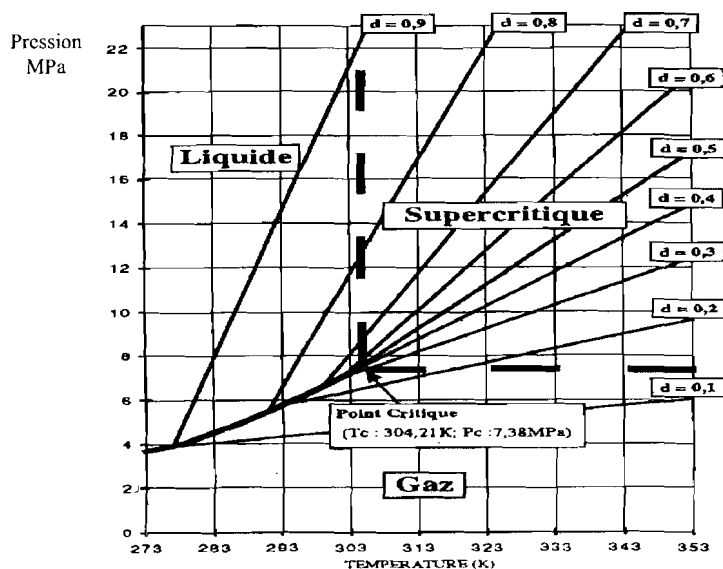


Figure 18 : Diagramme de phase du gaz carbonique (CO₂)

III.3.1 Procédés d'extraction des lipides avec le CO₂ SC

Le CO₂ SC offre des possibilités nouvelles d'extraction sélective et de fractionnement de milieux moléculaires complexes, tels les huiles (§ Chapitre II) (Bozan et Temelli, 2002 ; Dunford et King, 2002). Ainsi de nombreuses investigations ont été menées en vue de définir les paramètres optimaux de fractionnement (P et T) de différentes matières premières, voire de différents sous-produits des industries agroalimentaires.

III.3.1.1 Effet de la pression et de la température

Pour trouver les conditions optimales d'extraction des huiles végétales (huile de tournesol par exemple) par le CO₂ SC, des expériences ont été menées sur un éventail de pression compris entre 20 et 70 MPa, dans des conditions données de température. En travaillant à une température de 353 K, avec du CO₂ SC pur (sans ajout de co-solvant). Le pouvoir solvant du CO₂ SC est de 60 g/kg CO₂, pour 50 MPa et de 180 g/Kg CO₂, pour 70 MPa (Favati *et al.*, 1994).

Le rendement d'extraction d'huile augmente avec la pression pour toutes les valeurs de température adoptées (Andrich *et al.*, 2001). L'augmentation est particulièrement

significative en travaillant à température élevée (333 – 353 K) si bien que toute l'huile présente initialement dans la graine est pratiquement récupérée à 70 MPa, après 20 - 30 minutes d'extraction, et à une température de 333 K; le pouvoir solvant du CO₂ SC pur et le rendement d'extraction obtenus sont respectivement 17,5 g/Kg CO₂ et 28 %, pour 30 MPa et 123,7 g/Kg CO₂ et 96 %, pour 70 MPa.

Une augmentation de la température accroît le rendement d'extraction seulement lorsque de hautes pressions sont appliquées (> 30 MPa), pour 20 minutes d'extraction (Andrich *et al.*, 2001) (Annexe 4).

Pour de hautes pressions, l'influence de la température sur la solubilité est régie par l'effet de tension de vapeur du soluté plutôt que par les variations de masse volumique du CO₂ SC alors qu'aux basses pressions, les effets de masse volumique prédominent (Kiriamiti *et al.*, 2001). A 313 K, la quantité extraite est légèrement plus élevée qu'à 333 K, en travaillant à 25 MPa, avec un débit de CO₂ SC de 3,02 Kg/h. Le pouvoir solvant du CO₂ SC dépend à la fois de la masse volumique et de la température adoptées (Annexe 5).

Ces observations convergent avec l'idée qu'une augmentation de pression favorise l'extraction. Ainsi, jusqu'à une gamme de pression comprise entre 30 et 35 MPa, l'extraction est favorisée à plus basse température, alors que pour des pressions plus élevées (> 35 MPa), elle augmente considérablement avec la température. La raison de cet effet «cross-over» est que l'influence de la pression de vapeur des composants de l'huile devient plus significative alors qu'à des températures plus élevées le transfert de masse de l'huile est fonction de la faible viscosité de l'huile et du solvant.

III.3.1.2 Effet de l'addition d'un co-solvant au CO₂ SC

L'effet de la pression sur l'augmentation du pouvoir solvant est encore plus grand quand on ajoute au CO₂ SC un co-solvant du type alcool à courte chaîne, à faible concentration. Les phospholipides par exemple se solubilisent difficilement dans le CO₂ SC. Cependant, l'addition d'une petite quantité d'éthanol se traduit par une extraction des PL dans de faibles concentrations. Puisque l'on ne souhaite pas de phospholipides dans l'huile de table, l'addition d'éthanol est limitée à moins de 10 %, dans le CO₂ SC. Ainsi, l'ajout d'un alcool au CO₂ SC augmente, certes, la solubilité de l'huile mais diminue la sélectivité résultant de la concentration d'autres constituants (Calvo *et al.*, 1998).

A titre d'exemple, à 30 MPa et 313 K; la teneur totale en PL, dans l'huile extraite de graines de tournesol s'avère moindre, en utilisant 5 % de butanol en guise de co-solvant,

plutôt que l'éthanol dans les mêmes proportions, car la polarité du mélange CO₂-éthanol est plus élevée que celle du mélange CO₂ - butanol.

Le pouvoir solvant du CO₂ SC est : 6 g/Kg CO₂ pur, 24 g/Kg CO₂, avec 5 % butanol, 244 g/Kg CO₂, avec 20 % butanol. La solubilité de l'huile est plus élevée dans le CO₂ SC mélangé à 10 % de butanol que celle dans le CO₂ SC mélangé à la même quantité d'éthanol, avec respectivement un pouvoir solvant du CO₂ SC de 62 g/Kg CO₂ contre 48 g/Kg CO₂.

III.3.1.3 Effet de la taille des particules

Plus les particules sont petites, plus la surface de contact fluide-solide est grande. Par conséquent, les rendements d'extraction sont plus importants (Kiriamiti *et al.*, 2001). Par exemple, il a été montré qu'en travaillant à 25 MPa et 40 °C, avec un débit de CO₂ SC de 3 Kg/h, sur deux échantillons de 40 g de graines broyées, présentant des tailles moyennes de particules de 0,25 mm ou 1,25 mm, la quantité d'huile extraite de l'échantillon est plus importante, lorsque la taille des particules est plus petite. En effet, en utilisant une quantité de 10 Kg de CO₂ pur, on extrait 9,2 g des particules de taille 1,25 mm, soit un rendement d'extraction de 23 %, et 21,4 g des particules de taille 0,25 mm, soit un rendement d'extraction de 53 % (Annexe 6).

III.3.1.4 Effet du débit de CO₂ SC

Une expérience a été réalisée avec 40 g de graines broyées non tamisées, à des débits différents : 1,4 et 3 Kg/h. Jusqu'à 4 Kg de CO₂ utilisés, la quantité d'huile extraite est sensiblement la même quelque soit le débit, ce qui indique qu'au début, le transfert est contrôlé par la solubilité. A la fin, vers 10 Kg de CO₂ utilisés, l'extraction devient contrôlée par le transfert de masse, et comme les représentations graphiques qui illustrent la quantité d'huile extraite en fonction du CO₂ utilisés restent resserrées pour les différents débits. Ceci indiquerait, plutôt, que la limitation est due au transfert de masse interne (Kiriamiti *et al.*, 2001).

III.3.1.5 Prétraitement des graines avant extraction avec le CO₂ SC

Avant de débiter l'étape d'extraction, un pré-traitement des graines s'avère nécessaire, en raison de la difficulté rencontrée par le CO₂ pour accéder à l'huile piégée dans la structure cellulaire compacte des graines. Ainsi, afin d'augmenter le transfert de masse, il est préférable de casser la structure cellulaire de la graine renfermant l'huile, avant de débiter l'extraction. Parmi les pré-traitements mécaniques, le découpage en fines tranches

n'excédant pas 0,3 mm d'épaisseur a été montré comme étant le plus efficace, en terme de rendement d'extraction (Ali, 2004).

III.3.2 Extraction des différents lipides avec le CO₂ SC

III.3.2.1 Extraction des glycérides

Il est généralement constaté que la solubilité des TAG dans le CO₂ SC augmente lorsque la pression P augmente. L'influence de la température T sur leur extraction est beaucoup plus complexe. A faible P, une augmentation de T provoque une diminution de leur solubilité (effet rétrograde). A l'opposé, lorsque P est élevée, l'augmentation de T accroît la concentration en TAG dans l'extrait. Snyder *et al.*, 1999 ont montré que la fraction TAG de l'huile brute de soja pouvait être extraite sélectivement en utilisant du CO₂ SC (P : 55,1 MPa et T : 353 K). L'analyse des extraits par chromatographie supercritique a révélé une teneur en TAG de 95 % et la présence de stérols sous forme de traces.

Certains auteurs proposent des modèles mathématiques pour déterminer la solubilité de l'huile dans le CO₂ SC. Del Valle et Aguilera (1988) ont proposé l'Equation 1. D'autres modèles mathématiques sont disponibles dans la littérature (King et List 1996, Esquivel *et al.*, 1999 ; Cocero *et al.*, 2001).

$$\ln C = 40,361 - \frac{18708}{T} + \frac{2186840}{T^2} + 10,724 \ln \rho \quad (\text{Equation 1})$$

Où,

C : concentration en huile dans le CO₂ (g/L)

T : température (K)

ρ : masse volumique du CO₂ (g/L)

Il est connu que la solubilité des composés les moins volatils augmente dans un mélange comportant des espèces moléculaires plus solubles. Nilson *et al.* (1991) ont ainsi montré que la solubilité de la trimyristine et de la tripalmitine est améliorée en présence de la trilaurine.

III.3.2.2 Acides gras libres (AGL)

L'isolement des AGL présente peu d'intérêt en tant que composés à valeur ajoutée mais ils sont indésirables dans les huiles raffinées. Des chercheurs se sont intéressés à l'isolement de ces molécules afin de concentrer, par leur élimination, d'autres composés à plus forte valeur ajoutée (tocophérols, stérols).

A partir d'huile brute de son de riz on a montré que le CO₂ SC (P : 28 MPa, T : 343 K) peut extraire l'ensemble des AGL de C₁₄ à C₃₄. Ces auteurs ont confronté les extraits obtenus par le CO₂ SC et ceux obtenus par l'intermédiaire de l'hexane. Ils ont constaté que les acides palmitique, oléique, linoléique et linoléique étaient plus concentrés dans la phase hexanique. Cependant, la phase supercritique présentait une teneur en AGL à longue chaîne (C₂₀ à C₃₀) plus importante. Le CO₂ SC a également été utilisé pour le fractionnement des huiles de poisson particulièrement riches en acides eicosahénoïque (EPA) et docosahénoïque (DHA) appartenant à la classe des « ω-3 », et connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé (Garcia *et al.*, 1996).

III.3.2.3 Extraction des stérols

En plus de l'exemple présenté ci-dessus qui ne fait intervenir que le CO₂, plusieurs travaux relatifs aux stérols font intervenir un co-solvant. Le fractionnement de l'huile de soja en plusieurs étapes a permis de concentrer les stérols dans l'extrait CO₂ SC en présence de 10 % de MTBE (P : 22,5 MPa et T : 353 K); la concentration en stérols passe de 0,2 % dans l'huile, à 40 % dans l'extrait obtenu à la troisième étape de fractionnement. Une fraction moins riche (27 %) a également été produite à 41,4 MPa et 353 K avec du CO₂ SC contenant du MTBE (10 %) (Snyder *et al.*, 1999).

Le cholestérol étant connu pour son implication dans les maladies cardiovasculaires, de nombreux industriels ont cherché à l'éliminer de leurs produits alimentaires. Hubert *et al.* (1996) ont proposé un processus pour extraire cette molécule du lait. Ils recommandent tout d'abord de récupérer la matière grasse laitière (MGL), composée essentiellement de TAG, en utilisant du CO₂ SC à 40 MPa et 343 K. La MGL extraite est ensuite passée dans des conditions isobares et isothermes dans une colonne haute pression garnie d'un adsorbant adéquat (particules de gel de silice de 5 à 40 μm) pour éliminer le cholestérol.

L'extraction directe de la fraction stérolique par l'intermédiaire de FSC donne souvent des fractions de faible pureté. Certains auteurs ont donc proposé de concentrer ces composés dans le raffinat, le FSC étant alors utilisé pour extraire les composés autres que les stérols. Dunford et King (2000) ont réussi à accroître la teneur en stérols de l'huile de son de riz en utilisant du CO₂ SC (P : 20,5 - 32 MPa, T : 318 – 353 K).

L'utilisation d'une faible pression (25 MPa) et d'une haute température (353 K) ont été définies comme les paramètres adéquats pour concentrer au maximum les stérols dans le raffinat.

III.3.2.4 Extraction des tocophérols

Plusieurs travaux de recherches sur l'extraction et la purification de la vitamine E par le CO₂ SC sont présents dans la littérature (Ge *et al.*, 2002). Ils ont montré que les conditions (P, T, flux, temps d'extraction) permettant de récupérer le plus de tocophérols du germe de blé sont 27,5 - 34,5 MPa, 313 – 318 K, 2 ml/min et 90 min. Un broyage adéquat (diamètre moyen des particules : 0,505 mm) ainsi qu'un séchage préalable de la matière première (teneur en eau finale du substrat : 5,1 %), sont nécessaires pour atteindre une concentration dans l'extrait de $1,8 \pm 0,6$ g/100 g.

L'extraction et la purification des tocophérols à partir d'huile d'olive espagnole (mélange d'huile vierge et d'huile raffinée) par le CO₂ SC a donné des rendements d'extraction de l'ordre de 95 % (Ibanez *et al.*, 2002). Au cours de ce procédé continu mené dans une colonne à contre-courant, les paramètres d'extraction étaient maintenus constants (P : 20 MPa et T : 313 K).

Le fractionnement de l'extrait a aussi été mené en cascade au sein de deux séparateurs. Le premier maintenu à 10 MPa et 313 K présentait une concentration en stérols importante, alors que le second, riche en tocophérols, était soumis à des paramètres P et T respectivement de 2 MPa et 273 K.

Mendes *et al.* (2001) se sont intéressés à la concentration des tocophérols présents dans le DOD (Deodorisation Distillate, co-produit du raffinage de soja). Ils ont utilisé du CO₂ SC sous les conditions suivantes : T : 313 – 353 K et P : 9 - 17 MPa pour extraire sélectivement les AGL et concentrer les tocophérols d'un facteur 3 dans le raffinat. Les fractions les plus riches ont été obtenues à faible T et P.

III.3.2.5 Extraction des phospholipides

Etant polaires, les PL sont peu solubles dans le CO₂ SC et l'addition de 5 à 10 % d'éthanol s'avère nécessaire pour extraire cette fraction du jaune d'œuf mais aussi de la pomme cannelle, du son de soja et des germes de blé (Rossi *et al.*, 1990 ; Dunford et Temelli, 1995 ; Ronyai, 1998 ; Montanari *et al.*, 1996 et 1999). Toutefois, il a été montré que les PL peuvent aussi être extraits par du CO₂ SC sans co-solvant (Boselli et Caboni, 2000). Ainsi, du jaune d'œuf en poudre extrait par du CO₂ SC (P: 51,7 MPa, T: 313 K) a donné une fraction contenant 26 % de PL.

L'inconvénient majeur des conditions d'extraction (P: 51,7 MPa et T: 313 K) est qu'elles ne sont pas sélectives d'un PL particulier. Pour extraire de façon optimale les PL présents dans une matrice quelconque, un nombre important de données sont disponibles dans

la littérature. Cependant, peu d'informations sur le fractionnement des différentes espèces de PL sont disponibles. Montanari *et al.* (1999) ont étudié l'influence de P et T sur la teneur en PL de différents extraits. En présence de 10 % d'éthanol le CO₂ SC (P: 23,9 MPa, T: 343 K) a donné une fraction très riche en PC (81,9 %), à partir de son de soja. La fraction la plus riche en AP (4,2 %) a été récupérée à 30,1 MPa et 353 K. La fraction contenant le plus de PE (25,1 %) a été obtenue à 68,9 MPa et 353 K alors que la fraction la plus riche en PI (2,8 %) a nécessité une T identique (353 K) et une P plus basse (23,9 MPa). Les fractions récupérées par Montanari *et al.* (1999) présentent le défaut de contenir un grand nombre de PL résiduels dans les fractions enrichies. Des fractions plus pures auraient pu être générées, notamment en procédant à des extractions successives.

III.4 Procédés d'extraction des produits actifs naturels par le CO₂ SC

III.4.1 Généralités

On a révélé l'importance du CO₂ SC dans plusieurs autres domaines : Purification d'actifs de synthèse, extraction de principes actifs naturels, génération de particules et encapsulation pour les systèmes à libération contrôlée ; une gamme d'applications dans l'industrie pharmaceutique et la chimie fine qui conjuguent efficacité et innovation.

Extraits végétaux, raffinage d'huile végétale ou animale, les FSC pour la nutraceutique sont des outils performants pour le traitement des produits naturels. Certifiés « BIO » ou simplement naturels, les extraits cosmétiques peuvent être préparés, raffinés, désodorisés, formulés, à l'aide du CO₂ SC. L'extrait du bois de rose est l'un des plus célèbres produits de parfumerie obtenus par extraction avec le CO₂. Proche des saveurs originelles, ces extraits sont une innovation en parfumerie.

L'extraction par un FSC est équivalente à une extraction par un solvant liquide du point de vue des équilibres. Le principe repose sur une distribution inégale de divers constituants entre deux phases immiscibles : la phase à extraire et la phase extractante (ou solvant). La force motrice de cette extraction, de nature chimique, est due aux différences de potentiels chimiques des solutés entre la phase contenant le soluté à extraire et le solvant. Suivant la nature physique du produit à traiter, l'on distingue deux types d'extraction.

L'extraction fluide-solide présente le plus grand nombre d'applications industrielles, notamment en agro-alimentaire. Cependant, le procédé demeure limité dans son développement, par sa mise en œuvre discontinue, pénalisant ainsi le coût de traitement. La décaféination et la production des principes amérisants pour la bière sont les deux principales

applications industrielles, le traitement des plantes aromatiques présentant un intérêt significatif.

L'extraction FSC-liquide se trouve limitée dans son développement à l'échelle industrielle, malgré une grande diversité d'applications possibles et un fonctionnement en continu. Le traitement des huiles végétales ou animales CO₂ SC est le principal exemple, avec le cas particulier des huiles de poisson qui sont des sources d'acides gras polyinsaturés destinés à la nutrition et à la pharmacie (Catchpole *et al.*, 2000).

III.4.2 Modélisation de l'extraction de composés lipidiques au CO₂ SC

Plusieurs tentatives ont été effectuées dans le but de modéliser l'extraction de composés naturels de différentes matrices végétales (Brunner *et al.*, 1984 ; King et Bott, 1993; Akgerman et Madras, 1994).

La modélisation de l'extraction est basée sur les hypothèses suivantes :

- On suppose que les composés extraits ont un comportement similaire et peuvent être considérés comme un seul pseudo-composé en respect des phénomènes de transfert de masse.
- Les concentrations sont infiniment plus grandes que la dimension des particules
- Le flux du solvant de même que la vitesse u , sont uniformément répartis dans toutes les sections de l'extracteur
- Le volume de fluide ε , n'est pas affecté par la réduction de la masse du solide durant l'extraction
- Le soluté à extraire est réparti en deux phases. La première concerne la structure interne des particules : c'est la fraction notée ϕ_i . Sa valeur ne change pas durant l'extraction. La deuxième concerne la structure externe et est notée P' . Sa concentration est invariable et c'est pourquoi on l'assimile à la masse volumique du soluté pur ρ_0 .
- Après extraction la fraction de la matrice est supposée égale à $\phi_f = 1 - \phi_i$
- La fraction de la graine qu'occupe le soluté à extraire durant l'extraction est $\psi\phi_f$ où $\psi \leq 1$.
- La relation d'équilibre entre les deux phases est linéaire.

Plus de détails sur les hypothèses de modélisation sont proposés par Marronne *et al.* (1998); Reverchon *et al.* (1999).

Sur la base de ces hypothèses, l'Equation générale (2) du transfert de masse s'écrit :

$$\left(\varepsilon \times \rho_f \times D_L \times \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) + \left(\varepsilon \times \rho_f \times \frac{\partial C}{\partial t} \right) + \left(\rho_f \times u \times \frac{\partial C}{\partial t} \right) + \left[(1-\varepsilon) \phi \times \rho_s \times \frac{\partial P}{\partial t} \right] + \left[(1-\varepsilon) \phi_f \times \rho_0 \times \frac{\partial \psi}{\partial t} \right] = 0 \quad (\text{Equation 2})$$

Où,

D_L : dispersion axiale (m²/s),

ρ_f : masse volumique de la fraction extraite.

III.4.3 Extraction de produits naturels à activité insecticide avec le CO₂ SC

L'extraction supercritique (SFE) est devenue un centre d'intérêt dans le domaine d'extraction de produits naturels dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et de biotechnologie. Les propriétés excellentes de transfert de masse du CO₂ SC et la possibilité de jouer sur la température et la pression ou d'utiliser un co-solvant afin de faciliter l'extraction sont les raisons des progrès de cette technologie (Yang, 1995; Subra *et al.*, 1998; Rónyai *et al.*, 1998; Cocero, 2001).

On rencontre peu d'études dans la littérature concernant l'extraction avec le CO₂ SC de produits naturels à activité insecticide. L'extraction de la nimbine à partir des graines de neem en utilisant le CO₂ SC et le méthanol comme co-solvant a été effectuée par Tonthubthimthong *et al.* (2004) et reste le seul exemple notable.

Il ressort de cette étude que :

- La nimbine peut être extraite à partir de graines de neem d'une manière satisfaisante en utilisant le CO₂ pur (308 K, 20 MPa, débit de CO₂ de 0,62 cm³/min) avec un rendement d'extraction de 85 %.
- Le rendement d'extraction de la nimbine augmente avec le débit de CO₂, la pression, l'abaissement de la température et de la taille des particules.
- Le méthanol n'est pas un bon co-solvant pour extraire la nimbine même si le rendement d'extraction augmente avec le pourcentage de méthanol mais aussi avec la température d'extraction.
- Les modèles empiriques (modèle de Langmuir, de FOPDT et de cyclone en ⁿ) s'adaptent bien aux données expérimentales (Goto *et al.*, 1998).
- Le modèle théorique peut s'adapter aux données expérimentales d'une manière satisfaisante excepté l'effet de la taille des particules et du co-solvant.
- Le transfert ou l'équilibre de masse externe contrôle l'extraction.

Aucune étude sur la modélisation de composés naturels à activité insecticide n'a encore été rapportée dans la bibliographie mise à part celle de Tonthubthimthong *et al.* (2001) et (2004), concernant la nimbine. Dans ce travail, trois modèles empiriques et un modèle théorique ont été étudiés. Le modèle de Langmuir, proposé par Pappamichail *et al.* (2000), a été employé pour décrire les données expérimentales de l'extraction liquide supercritique d'huile de graines de céleri. Ce modèle qui n'explique pas les interactions entre le corps dissous et la matrice végétale, prévoit le rendement partiel en fonction du temps d'extraction en termes d'isotherme d'adsorption de gaz de Langmuir (Starmans *et al.*, 1999; Mira *et al.*, 1999 ; Berna *et al.*, 2000) (Equation 3). Les trois modèles empiriques rencontrés dans la littérature (Esquivel *et al.*, 1999) sont :

- modèle d'adsorption de gaz de Langmuir

$$F = \frac{t}{b+t} \quad \text{(Equation 3)}$$

- modèle du temps mort (FOPDT)

$$F = 1 - \exp\left(-\frac{t-t_d}{\tau_p}\right) \quad \text{(Equation 4)}$$

- modèle du cyclone en t^n ,

$$F = 1 - \exp\left(-\frac{kt^n}{n}\right) \quad \text{(Equation 5)}$$

Où :

- F : fraction extraite cumulée
- t : temps d'extraction
- n : paramètre dans le modèle en t^n
- k : coefficient de transfert de masse dans le modèle du cyclone en t^n

Conclusion

Au terme de cette étude bibliographique qui concerne l'ensemble des domaines d'intérêt de cette thèse, nous pouvons tirer un certain nombre de conclusions utiles pour la programmation expérimentale.

Il existe un grand nombre de graines oléagineuses non encore étudiées chimiquement.

Sur les quatre espèces sélectionnées pour cette thèse, mise à part *A. indica*, les trois autres espèces n'ont pas fait l'objet d'un grand nombre d'études même si la littérature rapporte l'activité insecticide d'extraits dérivés de leurs graines ou d'autres parties des plantes.

La composition des graines n'est que partiellement connue et dans le cas de *A. squamosa* seule la composition en acides gras de l'huile de l'amande a été étudiée. Aucune analyse de la fraction insaponifiable des huiles n'a été publiée à ce jour, hormis l'analyse des stérols dans l'huile de *P. biglobosa*.

Le potentiel insecticide d'extraits de graines de *P. biglobosa* est faible et, pour l'ensemble des espèces d'intérêt pour cette thèse, aucune étude sur l'activité termicide d'extraits des graines oléagineuses n'a été rencontrée, contrairement à l'activité vis-à-vis des ravageurs du cotonnier. Ce constat nous a donc poussé à privilégier les tests termicides qui pourraient être une approche vectrice d'innovation.

Le CO₂ SC présente de nombreux avantages ; si la littérature consultée est fournie en ce qui concerne l'extraction de lipides en milieu CO₂ SC, on y rencontre par contre peu de résultats relatifs à l'extraction de composés insecticides, seule celle de la nimbine à partir de graines de *A. indica* a été trouvée.

Le programme de cette thèse doit être à même de combler un vide en termes de connaissance chimique des quatre graines d'espèces oléagineuses du Bénin, mais aussi intégrer le domaine des procédés d'extraction des insecticides et celui de l'activité de ces derniers dans le domaine de la lutte anti-termite.

Chapitre IV

Caractérisation chimique des graines

IV.1 Introduction

IV.2 Processus de sélection des espèces

IV.3 Récolte-stabilisation-transport

IV.4 Caractérisation physique et chimique

IV.5 Caractérisation des lipides

IV.6 Caractérisation des protéines par dosage des acides aminés

IV.7 Caractérisation des glucides

IV.8 Caractérisation des lignocelluloses : séquence de Van Soest

Chapitre IV

Caractérisation chimique des graines

IV.1 Introduction

Sur la base d'une étude bibliographique et du recueil d'informations sur le terrain, l'intérêt de huit oléagineux du Bénin est évalué. Quatre espèces sont sélectionnées d'après certains critères précis. Ce chapitre porte sur la caractérisation des différentes parties de ces dernières (coque, tourteau d'extraction, huile). Pour cela nous avons utilisé plusieurs méthodes normalisées et des techniques d'analyse : CCM, CPG, CLHP. En fonction de la disponibilité des matériels nous avons effectué certaines analyses en collaboration avec d'autres laboratoires spécialisés du Cirad : Cirad-EMVT, Cirad-US Analyses, Cirad-CP, afin d'accéder à la caractérisation complète des graines : matière minérale, matière grasse, cellulose, lignocellulose, sucres totaux, amidon, éléments minéraux, acides aminés.

IV.2 Processus de sélection des espèces

L'étude a d'abord consisté à cibler au Bénin une dizaine d'oléagineux présentant un potentiel dans les domaines agroalimentaire et phytosanitaire. Cette phase préliminaire a permis la sélection d'une première liste de huit oléagineux : *Annona squamosa*, *Anarcadium occidentale*, *Azadirachta indica*, *Blighia sapida*, *Carapa procera*, *Chrysobalanus orbicularis*, *Jatropha curcas*, *Parkia biglobosa*.

Dans ce cadre, quatre espèces ont ensuite été choisies d'après certains critères définis en fonction des objectifs de la thèse :

- *A. squamosa* (custard apple, zatte, pomme cannelle, winglé) - Annonacée
- *A. indica* (neem, margousier, quininitin) - Méliacée
- *C. procera* (african crabwood, iguito, Pobèlo) - Méliacée
- *P. biglobosa* (nééré, caroubier africain, arbre à fauves, aïxwa) - Mimosacée

IV.3 Récolte-stabilisation-transport

IV.3.1 Récolte

Les conditions de collecte sont notées (écosystème, état des fruits, autres observations, renseignements provenant d'accompagnateurs locaux) en ce qui concerne *A. indica* et *A.*

DEUXIEME PARTIE

MATERIELS ET METHODES

Chapitre IV

Caractérisation chimique des graines

Chapitre V

Obtention des extraits – Caractérisation chimique

Chapitre VI

Activité termicide d'extraits des quatre graines sélectionnées

IV.4 Caractérisation physique et chimique

IV.4.1 Détermination des propriétés physico-chimiques des huiles

La teneur en eau et en matières volatiles est déterminée selon la norme NF T 60-201 et les matières extractibles à l'hexane (teneur en huile) par la norme NF V03-924. L'acidité, l'indice de peroxyde et l'indice de saponification sont déterminés respectivement suivant le protocole des normes NF T60-204, NF T60-220, NF ISO 3657.

L'indice d'iode est calculé selon la formule suivante sur la base de la composition en acide gras déterminée en chromatographie en phase gazeuse.

$$I_I = M(I_2) \sum_i \frac{\% AGI_i}{MAGI_i} \quad (\text{Equation 6})$$

Où,

%AGI_i : pourcentage en acide gras insaturé

MAGI_i : masse molaire moléculaire de l'acide gras insaturé correspondant

M(I₂) : masse molaire moléculaire du diode = 254 g/mol

IV.4.2 Matière sèche et humidité

La méthode utilisée est une adaptation de la norme AFNOR, NF V 18-109. L'humidité est déterminée par la perte de masse subie après séchage à une température de 103 °C pendant 24 h. Pour cela, une quantité de 5 g d'échantillon broyé à 0,8 -1 mm est pesée à 0,1 mg près, dans des creusets préalablement séchés en dessiccateur et tarés, soit M₀ la masse. La prise d'essai est uniformément répartie par un léger mouvement rotatif. Les creusets pleins sont ensuite placés dans une étuve à 103 °C pendant 24 h. Au bout de ce temps, ils sont refroidis dans un dessiccateur et pesés à 0,1 mg près, soit M₁ cette masse.

Le résultat est exprimé en pourcentage de matière sèche :

$$\% MS = \frac{M_1 - M_0}{PE} \times 100 \quad (\text{Equation 7})$$

Où,

M₀ : masse du creuset vide, en grammes

M₁ : masse du creuset contenant le résidu sec, en grammes

PE : masse de la prise d'essai, en grammes

$$\% HUMIDITE = 100 - \% MS \quad (\text{Equation 8})$$

IV.4.3 Matière minérale

La méthode utilisée est une adaptation de la norme AFNOR, NF V18-101. Les cendres représentent les matières minérales d'un échantillon. Les cendres brutes sont obtenues après destruction de la matière organique par incinération. Dans un dessiccateur, des creusets en nickel préalablement séchés à l'étuve pendant 1 h sont déposés et tarés. Après refroidissement, chaque creuset est taré à 0,1 mg près. Soit M_0 leur masse. Environ 3 g d'échantillon broyé à 1 mm est pesé dans les creusets, à 0,1 mg près. Soit PE la prise d'essai. La prise d'essai est uniformément étalée par un léger mouvement rotatif. Les creusets pleins sont introduits dans le four à moufle sous la hotte aspirante et leur contenu est calciné pendant 4 h à 550 °C. Au bout de ce temps, nous avons laissé la température redescendre à 100 °C et les creusets sont sortis, refroidis dans un dessiccateur puis pesés à 0,1 g près. Soit M_1 leur masse.

Les cendres totales sont calculées de la façon suivante :

$$\% MM = \frac{M_1 - M_0}{PE} \times 100 \quad (\text{Equation 9})$$

Où,

- MM : teneur en cendres exprimée en pourcentage du produit brut
 M_0 : masse en grammes du creuset vide
 M_1 : masse en grammes du creuset contenant les cendres
 PE : masse de la prise d'essai, en grammes

IV.4.4 Matières grasses

La méthode utilisée est une adaptation de la norme AFNOR, NF V 18-117. Les échantillons sont supposés comme étant de la catégorie A (aliments d'animaux non mentionnés dans la catégorie B, d'origine animale, y compris les produits laitiers) et c'est pourquoi, la méthode A est utilisée. On a pesé à 0,1 mg près, un matras contenant de la pierre ponce, préalablement séché à l'étuve. Soit M_0 la masse du matras. L'extrait éthéré est recueilli dans ce matras. Le chronomètre est déclenché quand le 1^{er} siphonage a lieu. L'extraction a duré 6 h. L'éther de pétrole est évaporé pendant une nuit sous la hotte. Le lendemain le matras contenant le résidu est séché pendant 1 h dans l'étuve réglée à 60 ± 2 °C. Après refroidissement du matras au dessiccateur, sa masse est pesée à 0,1 mg près. Soit M_1 , la masse

du matras contenant les matières grasses extraites. La teneur en matière grasse de l'échantillon pour essai est calculée selon l'équation :

$$\% MG = \frac{M_1 - M_0}{PE} \times 100 \quad (\text{Equation 10})$$

Où,

MG : teneur en matière grasse de l'échantillon, exprimée en % de la matière sèche

PE : masse de la prise d'essai, en grammes

M₀ : masse du matras contenant les morceaux de carbure de silicium, en grammes

M₁ : masse du matras contenant les morceaux de carbure de silicium et le résidu d'extrait étheré séché, en grammes.

IV.4.5 Dosage des éléments minéraux

Les éléments minéraux (N, P, Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, Na) sont dosés par ICP (Plasma à Couplage Inductif) après minéralisation de l'échantillon selon la procédure par voie sèche. Le spectromètre, de marque Varian Vista, est équipé du détecteur CCD (Coupled Charge Device).

IV.4.5.1 Méthodes d'analyse des éléments chimiques

La prise d'essai est de 1 – 3 g selon la nature de la matrice. L'échantillon est introduit dans une capsule en platine qui est ensuite placée dans un four dont la température est augmentée progressivement jusqu'à 500 °C et ainsi maintenue pendant 2 h. Des paliers sont effectués vers 200 °C et 300 °C jusqu'à la fin du dégagement de fumées. Après refroidissement, les cendres sont humectées avec quelques gouttes d'eau puis 2 mL de HCl 6 N sont ajoutés puis filtrés après 10 mn de temps de contact. Le filtre contenant le résidu est alors calciné à 500 °C, ensuite de l'acide fluorhydrique est ajouté sur les cendres puis évaporé sur plaque chauffante, la silice contenue dans les cendres est volatilisée sous forme de SiF₆. Le résidu est repris par 1 mL de HCl 6 N puis filtré dans la même fiole de 50 mL. Après avoir ajusté au trait de jauge puis homogénéisé par agitation manuelle, les solutions sont transvasées dans des godets préalablement rincés avec la solution et sur lequel le numéro de l'échantillon est inscrit.

IV.4.5.2 Minéralisation des huiles

Une prise d'essai de 10 g d'huile est introduite dans un bécher de 100 mL, lequel est recouvert d'un verre de montre puis placé dans un four. Afin d'éviter des pertes par volatilisation et pour éliminer les produits inflammables volatils, il faut effectuer la minéralisation de l'échantillon en plusieurs étapes : la température est élevée progressivement pendant 6 h jusqu'à 300 °C puis maintenue à cette valeur durant 12 h. Trois paliers, de 4 h chacun, sont effectués à 325, 350, 400 et 450 °C. La calcination se termine par une phase de 5 h à 475 °C pour éliminer la matière organique. Après refroidissement, les cendres sont dissoutes dans 4 mL d'acide chlorhydrique 6 N. La solution est chauffée lentement puis filtrée sur papier sans cendres Schleicher et Schull dans une fiole de 50 mL. Le volume est ensuite ramené à 50 mL avec de l'eau déminéralisée.

IV.4.5.3 Dosage des éléments minéraux par spectrométrie d'émission plasma I.C.P.

La minéralisation est suivie du dosage par spectrométrie d'émission Plasma à Couplage Inductif (ICP) sur un appareil Varian-Vista aux longueurs d'onde suivantes : $\lambda = 214,914$ nm pour le phosphore et $\lambda = 589,592$ nm pour le sodium. Les dosages sont effectués en réalisant un étalonnage qui respecte les conditions du milieu analysé (matrice, acidité). Les calculs sont faits par interpolation par rapport à la gamme d'étalonnage. La validation des résultats analytiques s'est effectuée par l'analyse d'échantillons de référence internes, baptisés témoins, dont la teneur en éléments minéraux est connue.

IV.4.5.4 Détermination de la teneur en azote total par la méthode DUMAS

Une prise d'essai (50 à 150 mg selon le cas) de chaque échantillon préalablement broyé à 0,5 mm et homogénéisé, est pesée dans une feuille d'étain et placée sur le passeur d'échantillon. Elle est introduite dans un four à environ 850 °C dans un flux d'oxygène. Les gaz de combustion ont subi une série de piégeage pour éliminer les poussières, les halogènes, la vapeur d'eau et les oxydes de carbone. Une réduction sur colonne de cuivre à 730 °C dans un flux d'hélium a permis de réduire les oxydes d'azote en gaz N₂. La teneur en azote est déterminée par une cellule thermoélectrique (catharométrie) après une calibration avec des substances de composition en azote connue (EDTA, Glycine). La validation des résultats analytiques s'est basée sur l'analyse d'échantillons de référence internes dont la teneur en azote est connue.

IV.5 Caractérisation des lipides

La caractérisation des lipides s'est effectuée de la façon suivante : CCM qualitative des différentes familles de lipides, CPG de la fraction d'esters méthyliques d'acides gras, dosage des stérols par CCM/CPG, dosage par CLHP des tocophérols.

IV.5.1 Analyse qualitative des huiles par CCM

Un volume de 10 – 20 μL d'une solution d'huile à 1 % m/v dans l'hexane sont déposés, sur une bande de 10 mm, à 1 cm du bord inférieur d'une plaque de gel de silice 60 F₂₅₄ de 0,50 mm d'épaisseur, 20 x 10 cm (Merck, Ref 105744.0001), à l'aide d'un déposeur automatique Linomat IV-Y Camag. Le développement est effectué sur 8 cm dans une cuve pré-saturée à l'aide du mélange hexane/éther/acide acétique, 70/30/1 v/v/v. La plaque est ensuite séchée à l'aide d'un sèche-cheveux manuel et révélée à 180 °C durant 10 mn après nébulisation d'un mélange d'une solution aqueuse saturée de sulfate de cuivre II et d'acide phosphorique à 50/50 v/v. Les taches correspondant aux différents constituants des huiles végétales sont identifiées à l'aide de témoins. Les quantités et les caractéristiques des produits déposés sont consignées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Caractéristiques et quantité de produits déposés en CCM

Echantillons déposés	Famille chimique	Caractéristiques	Concentration (mg/mL)	Quantité déposée ($\mu\text{l/cm}$)
AGL de Tournesol	Acide gras	Produit Sigma	1	10
Monooléine	Monoglycéride	Produit Sigma	1	10
Stigmastérol	Stérol (3 β -hydroxy-24-éthyl-5,22-cholestadiène)	Produit Sigma	1	10
(+)- γ -tocophérol	Tocophérol	produit Sigma ~ 100%	0,65	20
Squalène	Hydrocarbures (2,6,10,15,19,23-hexaméthyl-2,6,10,14,22-tétracosahexaène)	Produit Sigma ~98-100%	3 gouttes/mL	10
Mélange	-	Mélange des 5 étalons	Mélange de 1 mL de chaque standard	50
Extraits hexaniques	Huiles végétales	Huile extraite au Soxhlet	3 gouttes/ mL	10

IV.5.2 Détermination de la composition en acides gras par CPG

IV.5.2.1 Préparation des esters méthyliques des acides gras

On introduit dans un ballon de 20 mL : 3 gouttes d'huile à l'aide d'une pipette pasteur, 3 pierres ponce et 3 mL de méthylate de sodium (62 mL de MeONa : 0,5 M dans 560 mL de MeOH pour CLHP). Le ballon est surmonté par une canne à saponification et 10 mn après le début de l'ébullition, un volume de 3 mL de méthanol chlorhydrique (50 mL de chlorure d'acétyle dans 625 mL de MeOH) est ajouté par le haut de la canne à saponification. Le reflux est maintenu pendant 10 mn encore et le mélange est refroidi à température ambiante (environ 20 °C) pendant 10 mn. 5 mL d'hexane et 15 mL d'eau sont alors ajoutés et après agitation, le mélange est laissé déphaser avant de prélever la phase hexanique à la pipette Pasteur qui est transvasé dans un tube à hémolyse. Les échantillons ainsi préparés sont maintenus à + 4 °C sous azote pour analyse en CPG.

IV.5.2.2 Composition pondérale en acides gras

Pour déterminer la composition en acides gras, 1 µL d'une solution hexanique d'esters méthyliques est injectée dans un appareil CPG Agilent 6890 HP series (Agilent, USA) équipé d'une colonne de type Innowax (Agilent, USA), de 30 m de long, 0,32 mm de diamètre interne ayant un film d'épaisseur 0,25 µm. L'injecteur est en mode split, ratio 1/80 à la température de 250 °C. Le gaz vecteur est l'hélium, avec un débit 1,5 mL/mn. Le détecteur à ionisation de flamme est à 270 °C, le débit de l'hydrogène est de 35 mL/mn et celui de l'air de 350 mL/mn. La programmation de la température du four est la suivante : 150 °C pendant 3 mn, augmentation de 3 °C/mn jusqu'à 220 °C (26,3 mn), palier jusqu'à la fin de l'acquisition (35,3 mn). L'identification des pics est faite par comparaison des temps de rétention d'esters méthyliques d'acides gras d'huiles végétales connues, tournesol et palme, injectés dans les mêmes conditions opératoires. Afin de vérifier la reproductibilité des résultats, chaque échantillon est analysé trois fois dans les mêmes conditions opératoires. Le résultat est exprimé en pourcentage des aires d'acides gras non corrigés.

IV.5.3 Teneur en insaponifiable des huiles

La méthode utilisée est celle de l'IUPAC (2.401 détermination of the insaponifiable matter, 1987). Une masse de 5 g pesée à 0,1 mg est introduite dans un ballon de 250 mL à laquelle 50 mL de solution hydroéthanolique d'hydroxyde de potassium et des pierres ponce

sont ajoutés. Après avoir chauffé à reflux pendant 1 h, on rince par le haut du réfrigérant avec 100 mL d'eau distillée. Le mélange est alors transvasé dans une ampoule à décanter contenant 100 mL d'éther diéthylique et agité pendant 1 mn tout en ouvrant de temps en temps le robinet pour laisser échapper les gaz. La phase étherée est récupérée dans une autre ampoule à décanter et la phase aqueuse est reprise avec 100 mL d'éther. On opère ainsi trois fois de suite. 40 mL de KOH à 0,5 N et 40 mL d'eau distillée sont ajoutés alternativement aux phases étherées jointes. On lave ensuite à l'eau distillée la phase étherée jusqu'à ce que la solution aqueuse de lavage ne soit plus colorée en rose par la phénolphthaléine. La phase étherée est séchée sur du sulfate de sodium anhydre et l'éther est totalement évaporé à l'évaporateur rotatif à 50 °C. Enfin les insaponifiables sont obtenus par rinçage avec 4 mL de chloroforme, dans un tube à hémolyse et les échantillons sont conservés à - 20 °C sous azote. Pour déterminer le pourcentage d'insaponifiable, les phases étherées sont récupérées dans un ballon taré, soit M_0 sa masse. Après évaporation de l'éther, le ballon est mis en étuve à 103 ± 2 °C pendant 15 mn et laissé à nouveau refroidir en dessiccateur et enfin pesé. La manipulation est répétée jusqu'à masse constante, soit M_1 la masse obtenue.

La détermination du pourcentage pondéral d'insaponifiable est faite de la façon suivante :

$$\% \text{ Insapo} = \frac{(M_1 - M_0)}{PE} \times 100 \quad (\text{Equation 11})$$

Où,

- PE : prise d'essai,
 M_0 : masse du ballon à vide,
 M_1 : masse du ballon + insaponifiable.

Trois déterminations sont effectuées pour chaque échantillon. Le résultat est la moyenne des trois valeurs obtenues.

IV.5.4 Composition de la fraction stérolique

IV.5.4.1 Préparation de la fraction insaponifiable

Pour déterminer la teneur en stérols, 0,5 g d'huile, 1 mL de cholestérol et 5 mL de KOH éthanolique (0,5 N) sont introduits dans un ballon avec 2 grains de pierre ponce et portés à reflux pendant 15 mn. 5 mL d'éthanol sont alors introduits dans le ballon par le haut du réfrigérant. Un volume de 10 mL de ce milieu est déposé sur une colonne de chromatographie remplie d'alumine (0,063 - 0,2 mm). L'élution est faite avec 5 mL d'éthanol

puis 30 mL de diéthyléther. La totalité du volume élué est récupéré, le solvant est évaporé et le résidu stérolique est dissout dans 1 mL de chloroforme.

IV.5.3.2 CCM préparative de la fraction stérolique

400 μL de la fraction stérolique préparée comme précédemment décrit et 20 μL d'une solution étalon de cholestérol sont déposés à l'aide d'un déposeur Linomat IV-Y CAMAG (Merck) sur une plaque de gel de silice 60 (Alltech, 20 x 10 cm, 250 μm d'épaisseur). L'élution est faite par un mélange chloroforme/diéthyl éther (90/10 v/v). La partie de la plaque contenant le dépôt de cholestérol est séparé et révélée par nébulisation d'un mélange $\text{CuSO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ (1/1 v/v) et un passage au four à 180 °C pendant 10 mn. La bande de stérols correspondant au R_f du cholestérol est grattée et les stérols désorbés dans du chloroforme (10 mL/g de silice) à température ambiante sous agitation magnétique pendant 5 mn. Une fois la silice devenue transparente une filtration sur filtre Millipore (0,45 μm , Réf. SLFH 013 NL) permet de récupérer les stérols sans contaminant solide.

IV.5.3.3 Composition et teneur en stérols

Un volume de 1 μL de cette fraction chloroformique (avec 1 mL de cholestérol à 1 mg/mL utilisé comme standard interne est injecté en CPG pour déterminer la teneur en stérols de l'huile. L'analyse des stérols est faite dans des conditions isothermes (280 °C) dans un appareil GC 8000 (Fisons Instruments) équipé d'une colonne de type Supelcowax (Sigma-Aldrich, USA), possédant une phase stationnaire de 95 % diméthylpolysiloxane/5 % diphenylpolysiloxane (longueur 30 m, 0,25 mm de diamètre interne et 0,25 μm d'épaisseur de film). La température du détecteur à ionisation de flamme est maintenue à 300 °C et celle de l'injecteur, en mode split, ratio 1/100, à 280 °C. Un système d'acquisition ??? a permis le contrôle de l'appareil. Le gaz vecteur est l'hélium (1,5 mL/mn). L'identification des pics est faite grâce à des étalons, cholestérol, β -sitostérol, stigmastérol, campestérol (produits Sigma, concentration de 1 mg/mL), injectés séparément et avec du cholestérol afin de déterminer le coefficient de réponse (K) de chacun par rapport au cholestérol. Afin de vérifier la reproductibilité des résultats, chaque injection est reprise trois fois dans les mêmes conditions opératoires.

La teneur en mg/100g huile du stérols X est calculée de la façon suivante :

$$\text{Stérols } X \text{ (mg /100g huile)} = K \times \frac{A_x \times m_s}{A_s \times m} \times 100 \quad (\text{Equation 12})$$

Où :

- A_x : aire du pic du stérol X
 A_s : aire du pic du cholestérol
 m_s : masse, en mg, de cholestérol ajouté
 m : masse, en g, de l'échantillon prélevé pour la détermination.
 K : facteur de réponse du stérol calculé en fonction de l'aire de l'étalon interne pour une concentration identique.

Les stérols totaux sont calculés en faisant la somme des teneurs des stérols contenus dans l'huile.

IV.5.4 Détermination de la composition et de la teneur en tocophérols

L'analyse des tocophérols des huiles est réalisée par CLHP en phase normale d'après Abidi (2002) et Cuvelier (2003).

Les échantillons d'huile extraite à l'hexane sont dilués dans un mélange d'hexane et d'isopropanol (99/1 v/v) afin d'obtenir des concentrations respectivement de 20,2 mg/mL, 20,1 mg/mL, 10,4 mL et 10 mg/mL pour *A. squamosa*, *C. procera*, *A. indica* et *P. biglobosa* respectivement. L'échantillon subit ensuite une double filtration à l'aide d'un filtre Millipore de 0,45 µm de diamètre.

L'appareil et ses accessoires (pompe, injecteur, détecteur) sont de marque Agilent Série 1100 (France), comportant une pompe quaternaire, un injecteur manuel muni d'une boucle d'injection de 20 µL et un détecteur UV DAD (à barettes diodes) à longueur d'onde multiple. La colonne est de type Luna Si 60, 5 µm, 4,6 x 250 mm (Phenomenex, France). Le mélange de solvants dans les conditions isocratiques est composé d'hexane et d'isopropanol (99/1 v/v) pour CLHP de marques Sigma. Le débit de la pompe est de 1 mL/mn et la pression de 33 bars, la détection est effectuée à la longueur d'onde de 295 nm. (Stavros et Tsaknis, 2002; Crane *et al.*, 2005; Omah *et al.*, 2006; Ramadan, 2006) .

Les pics sont identifiés par injection d'étalons de (±)-α-tocophérol (25 µg/mL de (+)-γ-tocophérol (7,22 µg/mL) et (+)-δ-tocophérol (65 µg/mL) de marque Sigma Aldrich respectivement de références et de pureté : T3251-5G, ~ 95 % ; T1782-25MG; ~ 100 % ;

T2028-25G, ~ 90 %). L'injection dans les mêmes conditions d'un échantillon témoin d'huile de palme (variété Ténééré) provenant du Cameroun, a permis de repérer le temps de rétention du β -tocophérol.

Les courbes d'étalonnage sont tracées en injectant les solutions d'étalons obtenues par dilution d'une solution mère (Tableau 6).

Tableau 6 : Gammes de dilution pour l'étalonnage des étalons de tocophérols

Tocophérols	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	C1	C2	C3	C4
(\pm)- α -tocophérol	0,3	0,5	1	8
(+)- γ -tocophérol	0,75	1	2	3
(+)- δ -tocophérol	0,25	0,5	1	3,5

IV.6 Caractérisation des protéines par dosage des acides aminés

Les différents acides aminés constituant la fraction protéinique sont quantifiés par dosage par CLHP précédé d'une hydrolyse, par la méthode d'étalonnage externe. Elle a permis grâce à un traceur interne, le carboxyméthylcystéine (CMC), dans le milieu réactionnel de suivre le bon déroulement de la manipulation, ceci depuis l'hydrolyse, et de calculer la concentration de chaque acide aminé en fonction de son propre facteur de proportionnalité.

IV.6.1 Hydrolyse de la protéine

L'hydrolyse est effectuée en présence d'acide méthane sulfonique (AMS), selon la méthode décrite par Simpson *et al.* (1976). Environ 5 mg sont hydrolysées par 0,5 mL AMS 4 N contenant 0,2 % de tryptamine (son rôle est de réagir avec les résidus de cystéine de la protéine à la place du tryptophane et d'éviter ainsi les pertes par oxydation). L'hydrolyse est effectuée en tube bouché sous azote pendant 1 h dans un bloc chauffant à 150 °C. Le tube ouvert, le contenu est neutralisé par 0,5 mL de soude 4 N, le tube est rincé par une solution tampon hydrogénocarbonate de sodium 0,1 M à pH 9, QSP 5 mL; les solutions sont jointes et filtrées avant dérivation par le Dabsyl. On fixe une molécule de Dabsyl (réactif de dérivation pré-colonne) sur chaque acide aminé. Ces dérivés sont apolaires, contrairement aux acides

aminés libres. Cette partie est effectuée par le préparateur automatique, la dérivation s'est faite à 70 °C en tampon carbonate. Cette technique permet de protéger les acides aminés soufrés (méthionine, cystéine), ceux sensibles à l'oxydation (serine, thréonine) ainsi que ceux thermosensibles tels la lysine. La matière sèche sur échantillon délipidé est effectuée selon la méthode précédemment décrite (norme AFNOR, NF V 18-109).

IV.6.2 Séparation des acides aminés

La séparation et la quantification des acides aminés sont effectuées par CLHP. L'appareillage et ses accessoires sont de type Spectra-physics, muni d'une pompe P200-330, d'un préparateur-injecteur automatique AS3000, d'un détecteur UV 150-511 AS3000. La colonne est de type Symmetry Waters 5µm, 200 x 3,9 mm. Une centrale d'acquisition HPChem a permis le contrôle de l'appareillage. La phase mobile constituée de 78 % d'une solution aqueuse de NaCl pH 6,55 (solvant A) et de 22 % d'acétonitrile (solvant B), est injecté à un débit de 1 mL/mn dans une colonne (C₁₈ hydrophobe). La détection est faite par un spectrophotomètre UV à 436 nm.

IV.6.3 Calcul de la teneur en acides aminés

La gamme de concentration utilisée pour l'étalonnage externe est consignée dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Gamme d'étalonnage des acides aminés

	Concentrations (µmoles/ mL)		
Tous les acides aminés	0,050	0,125	0,250
Cystéine	0,025	0,0625	0,125

Le facteur de réponse (Fr) est calculé pour les valeurs de C_{aa} et donc de C_{cmc} de 0,25 µmol/mL selon la formule suivante :

$$Fr = \frac{C_{aa} \times S_{0,25}}{S_{aa} \times C_{cmc}} \quad (\text{Equation 13})$$

IV.7.2 Dosage des sucres totaux

1 g de l'échantillon broyé à 0,5 mm pesé à 0,1 mg près, est introduit dans une fiole jaugée de 100 mL. Soit PE la prise d'essai. A cette prise, un volume de 80 mL d'éthanol à 40 % est ajouté et agité pendant 1 h sur agitateur magnétique. Ensuite un volume de 2 mL de solution de Carrez I est introduit et agité pendant 1 mn. Ensuite 2 mL de solution de Carrez II sont ajoutés et agité à nouveau pendant 1 mn. Après avoir retiré le barreau aimanté soigneusement rincé, la solution complétée à 100 mL avec de l'éthanol, homogénéisé et filtré sur filtre plissé. 50 mL du filtrat sont prélevés dans une fiole jaugée et transvasé dans un Erlenmeyer de 100 mL. Le tout est plongé dans un bain bouillant afin d'évaporer environ la moitié du volume, et pour éliminer la majeure partie de l'éthanol. Le résidu d'évaporation est transvasé quantitativement, à l'aide d'eau chaude, dans la fiole jaugée de 50 mL, après avoir refroidis le milieu et complété le volume avec de l'eau. Le mélange est ensuite homogénéisé et filtré.

IV.7.2.1 Dosage des sucres totaux après inversion

Un volume de 25 mL de solution est prélevé et introduit dans une fiole jaugée de 50 mL (uniquement réservée à cet effet). Quelques gouttes de solution de méthylorange sont ajoutés puis, prudemment et tout en agitant, de l'acide chlorhydrique 4 N jusqu'à virage net au rouge. 7,5 mL d'acide chlorhydrique 0,1 N sont alors ajoutés. La fiole est mise dans un bain d'eau à forte ébullition durant 30 mn. Après avoir refroidi à 20 °C en plongeant la fiole dans de la glace un volume de 7,5 mL de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N est ajouté et complété à 50 mL avec de l'eau, puis homogénéisé.

IV.7.2.2 Titration selon Luff-Schoorl

25 mL du réactif selon Luff-Schoorl sont prélevés à la pipette et introduit dans un Erlenmeyer de 200 mL puis 25 mL exactement mesurés, de la solution déféquée de sucres sont ajoutés. Ce mélange est porté à reflux pendant 10 mn exactement, immédiatement refroidi pendant 5 mn environ, et titré comme suit :

Un volume de 10 mL de solution d'iodure de potassium est ajouté, immédiatement après et très doucement (en raison du risque de formation d'une mousse abondante), 25 mL d'acide sulfurique 6 N. Ce mélange est titré par la solution de thiosulfate de sodium 0,1 N jusqu'à apparition d'une coloration jaune terne. A cette étape, l'indicateur à l'amidon est ajouté

et la titration est achevée jusqu'à l'obtention d'une coloration rose. Un essai à blanc est effectué mais sans passer cette fois par l'étape de chauffage.

IV.7.2.3 Calcul des résultats

La différence entre le volume de thiosulfate de sodium versé lors du dosage du blanc et le volume de thiosulfate de sodium versé lors du dosage de l'échantillon est calculé, soit $V = V_0 - V_E$. A l'aide de la table de Luff-Schoorl, la quantité de glucose en mg correspondant au volume V est déterminée.

La teneur en sucres totaux exprimée en % d'échantillon est alors :

$$\% \text{ sucres totaux} = \frac{\text{milligramme de glucose lu}}{PE} \times 0,8$$

(Equation 17)

Où,

PE : prise d'essai exprimée en grammes.

IV.7.3 Dosage de la cellulose

Le dosage de la cellulose brute est adapté de la norme AFNOR, NF V 03-040.

IV.7.3.1 Extraction de la matière grasse

Si la teneur en matière grasse est inférieure à 5 %, ce type d'extraction ne pouvait se faire. Elle est recommandée lorsque la teneur en matière grasse est comprise entre 5 – 10 % et nécessaire lorsque la teneur en matière grasse est supérieure à 10 %. La matière grasse de l'échantillon est extraite en suivant le mode opératoire approprié (fonction de la teneur en matière grasse) du dosage de la matière grasse (§ IV.1.4). Mais on utilise ici l'éther diéthylique à la place de l'éther de pétrole. Le résidu dégraissé contenu dans la cartouche est séché à l'air libre et rebroyé si nécessaire. Parallèlement, on a déterminé sur un aliquote la matière sèche de l'échantillon dégraissé (soit MS2). Environ 1 g de l'échantillon broyé à 1 mm est pesé à 0,1 mg près et supposé renfermer plus de 2 % de cellulose brute dans le creuset filtrant. Soit PE, la prise d'essai, on y a ajouté environ 1 g de célite.

IV.7.3.2 Détermination

a- Attaque acide

Le creuset est déposé dans l'extracteur de fibres. Un volume de 150 mL de solution d'acide sulfurique préalablement chauffée et quelques gouttes d'octanol sont ajoutés. Le tout est porté rapidement à l'ébullition (en 5 mn environ), puis l'ébullition est maintenue pendant 30 ± 1 mn. Au bout de ce temps, l'insoluble est immédiatement filtré au moyen du dispositif de filtration de l'unité puis rincé avec de l'eau distillée bouillante. Les lavages de l'insoluble sont répétés jusqu'à ce que le filtrat soit sensiblement neutre (avec environ 3 x 150 mL). La séparation et le lavage de l'insoluble doivent être réalisés en moins de 30 mn.

b- Attaque alcaline

Le protocole est le même que pour l'attaque acide, seulement qu'ici, un volume de 150 mL de solution d'hydroxyde de sodium est versé dans le creuset. Le résidu est ensuite déshydraté par l'acétone en utilisant la fiole à vide prévue à cet effet. L'acétone est versée dans le creuset et l'échantillon est dispersé puis filtré.

c- Séchage

Le creuset et son contenu sont séchés à 103 ± 2 °C dans l'étuve pendant une nuit. Le lendemain, ils sont refroidis en dessiccateur et pesé à 0,1 mg près (soit M_1).

d- Incinération

Après séchage, le résidu est incinéré dans le four à 525 °C pendant 4 h. On l'a laissé refroidir en dessiccateur jusqu'à la température du laboratoire et pesé à nouveau à 0,1 mg près (soit M_2).

La teneur en cellulose brute exprimée en pourcentage est égale à :

$$CBW = \frac{M_2 - M_1}{PE} \times 100 \quad (\text{Equation 18})$$

Où :

PE : masse de la prise d'essai, en grammes

M_1 : masse totale du résidu sec et du creuset avant incinération, en grammes

M_2 : masse totale du résidu et du creuset après incinération, en grammes

IV.8 Caractérisation des lignocelluloses : séquence de Van Soest

La détermination séquentielle des constituants pariétaux est effectuée par une méthode adaptée de la norme AFNOR, NF V 18-122. L'intérêt de ces méthodes est d'isoler différentes fractions pariétales permettant de prédire la valeur énergétique des aliments. Cette méthode est d'application générale aux aliments simples et composés. Les traitements successifs aux détergents neutre et acide, puis à l'acide sulfurique 72 % conduisent à l'obtention de trois résidus appelés : fibres au détergent neutre (NDF), fibres au détergent acide (ADF) et lignine sulfurique (ADL). Le NDF, l'ADF et l'ADL sont respectivement l'estimation des fibres totales insolubles, du complexe lignocellulosique et de la lignine. Ces différentes fractions ne sont généralement pas des entités biochimiques pures, en particulier pour les produits ayant subi un chauffage, pour les produits riches en tanins, en cutine, en cires, en silice, etc. Une bonne indication de la contamination est la mesure de l'azote résiduel (azote piégé par les fibres et non attaqué par les microorganismes du rumen). L'obtention d'un résidu (NDF ou ADF) exempt ou peu contaminé en amidon, protéines, matière grasse, nécessite en général un ou plusieurs prétraitements.

IV.8.1 Modes opératoires

L'échantillon broyé à 1 mm pour essai, éventuellement prétraité, est attaqué par la solution au détergent neutre. Le résidu insoluble obtenu après filtration et lavage est séché jusqu'à masse constante. Il est ensuite hydrolysé par la solution au détergent acide, après filtration, lavage et séchage comme précédemment. Le résidu obtenu est traité par la solution d'acide sulfurique à 72 %. Après filtration et lavage le nouveau résidu est séché, pesé, minéralisé à 525 °C puis pesé à nouveau. Ces trois produits sont mélangés dans un bécher, auquel un volume de 400 mL d'eau est ajouté, puis agité en chauffant jusqu'à dissolution. Après refroidissement, cette solution est transvasée dans la fiole de 1 L et 10 mL de triéthylène glycol (antimousse) sont ajoutés avant d'ajuster à 1 L avec de l'eau. Il faut s'assurer que le pH se situe entre 6,9 et 7,1 à température ambiante (risque de précipitation à basse température).

IV.8.2 Solution au détergent acide ADS

Une masse de 20 g de CTAB est pesé et dissoute dans environ 0,5 L d'acide sulfurique à 0,5 M (tout en agitant modérément afin d'éviter qu'une mousse persistante ne se forme). Le volume est ajusté à 1 L avec de l'acide sulfurique 0,5 M.

IV.8.3 Délipidation

La matière grasse de l'échantillon est extraite en suivant le mode opératoire de la norme AFNOR, NF V 18-117, mais l'utilisation de l'éther diéthylique est préconisée en lieu et place de l'éther de pétrole. Le résidu dégraissé contenu dans la cartouche est séché à l'air libre et rebroyé si nécessaire. La matière sèche de l'échantillon dégraissé est déterminée parallèlement sur un aliquote (soit MS2).

IV.8.4 Prétraitements enzymatiques

Environ 1 g d'échantillon délipidé est pesé à 0,1 mg près directement dans le creuset filtrant, soit PE la prise d'essai. Les creusets sont placés sur le dispositif d'hydrolyse. 50 mL d'eau froide et 0,2 mL d'amylase est alors ajouté et porté à ébullition après agitation. Une fois le chauffage coupé, on a laissé le mélange réagir pendant 15 mn. Une quantité suffisante d'eau froide est ajoutée pour amener la température au-dessous de 45 °C (environ 100 mL), puis une masse de 10 mg de protéase est ajoutée. Après avoir mélangé, on a laissé agir pendant 15 mn et filtré avec un rinçage à l'eau chaude.

IV.8.5 Obtention du NDF

Dans chaque creuset 100 mL de la solution au détergent neutre est versée et portée à ébullition en moins de 10 mn. L'ébullition douce est maintenue pendant 60 ± 1 mn. Après avoir arrêté le chauffage, on a filtré sur le creuset en verre fritté. Pour faciliter la filtration, il est conseillé de ne pas utiliser le vide au départ. Il est rincé plusieurs fois avec de l'eau bouillante jusqu'à élimination totale du détergent (absence de mousse), puis par deux fois par 20 mL d'acétone sur la fiole prévue à cet effet. Il est ensuite séché dans l'étuve à 103 °C jusqu'à masse constante pendant 3 h. Après refroidissement dans le dessiccateur, le creuset est pesé à 0,1 mg près. Soit la masse M_1 .

IV.8.6 Obtention de l'ADF

Les creusets sont replacés sur le dispositif d'hydrolyse. A l'aide d'une baguette de verre les particules sont mises en suspension par addition d'eau distillée pendant un temps de contact de 2 h environ. Après avoir filtré, un volume de 100 mL de solution au détergent acide est ajouté avant de porter à ébullition en moins de 10 mn. Une ébullition douce est maintenue pendant 60 ± 1 mn. Le mélange est filtré immédiatement une fois le chauffage arrêté et rincé plusieurs fois avec de l'eau bouillante jusqu'à élimination totale du détergent. La neutralité est vérifiée avec de l'eau additionnée de vert de bromocrésol dans la dernière eau de rinçage. Le creuset est rincé deux fois par 20 mL d'acétone (sur une fiole uniquement réservée à cet usage) et séché dans l'étuve à 103 °C jusqu'à masse constante pendant 3 h. Il est ensuite refroidi en dessiccateur avant pesée à 0,1 mg près, soit M_2 la masse notée.

IV.8.7 Obtention de l'ADL (lignine sulfurique)

Les creusets sont placés sous une hotte dans un cristalliseur puis nous avons ajouté de l'acide sulfurique 72 % de façon à remplir le creuset jusqu'à mi-hauteur. Cette suspension est agitée (afin de briser les grumeaux) avec une baguette de verre. Après un temps de réaction d'environ 3 h, le mélange est fait toutes les heures en ajoutant de l'acide sulfurique 72 % si nécessaire. Le maximum d'acide sulfurique 72 % est éliminé par filtration et lavé à l'eau chaude jusqu'à neutralité. La neutralité de la solution est vérifiée en ajoutant de l'eau additionnée de vert de bromocrésol ou au papier pH au dernier rinçage. Les creusets sont enfin séchés dans l'étuve à 103 °C jusqu'à masse constante pendant 3 h. Après refroidissement en dessiccateur, ils sont pesés à 0,1 mg près, soit la masse M_3 .

IV.8.8 Minéralisation du résidu

Les creusets sont placés dans le four dont la température est progressivement augmentée jusqu'à 525 °C. La minéralisation a duré 2 h puis après avoir laissé le four jusqu'à 150 °C et les creusets sont refroidis dans le dessiccateur et pesés à 0,1 mg près, soit M_4 la masse.

IV.8.9 Calculs

$$NDF = \frac{M_1 - M_4}{PE} \times 100 \quad (\text{Equation 19})$$

$$ADF = \frac{M_2 - M_4}{PE} \times 100 \quad (\text{Equation 20})$$

$$ADL = \frac{M_3 - M_4}{PE} \times 100 \quad (\text{Equation 21})$$

Où,

- PE : prise d'essai en grammes
 M₁ : masse du creuset contenant le résidu NDF + cendres
 M₂ : masse du creuset contenant le résidu ADF + cendres
 M₃ : masse du creuset contenant le résidu ADL + cendres
 M₄ : masse du creuset contenant les cendres

87

Où,

S 0,25 : surface calculée par la droite d'étalonnage de l'acide aminé correspondant à une concentration de 0,25 μmoles/ mL.

Caa : concentration de l'acide aminé correspondant

Ccmc : concentration du CMC

Le calcul des teneurs s'est effectué comme suit :

$$mg \text{ (dans l'hydrolysate)} = \frac{mg / ml \times 5 \times dilution}{F_c} \quad (\text{Equation 14})$$

$$mg / 100g \text{ d'éch. sec délipidé} = \frac{mg \times 100 \times 10^{-3}}{mg \text{ d'éch. à } 0\% \text{ d'humidité} \times 10^{-3}} \quad (\text{Equation 15})$$

V.7 Caractérisation des glucides

La caractérisation des glucides s'est effectuée par dosage de l'amidon, de la cellulose brute et les sucres totaux sont exprimés par rapport au glucose.

Chapitre V

Obtention des extraits – Caractérisation chimique

V.1 Introduction

V.2 Dénomination des extraits

V.3 Obtention d'extraits hexaniques

V.4 Obtention d'extraits hydroéthanoliques

V.5 Obtention d'extraits hydroacétoniques

V.6 Obtention d'extrait en milieu CO₂ supercritique

V.7 Solides résiduels

V.8 Obtention d'extrait par partition liquide-liquide

V.9 Caractérisation chimique des extraits

Chapitre V

Obtention des extraits – Caractérisation chimique

V.1 Introduction

Dans ce chapitre, les extraits sont obtenus par plusieurs techniques afin de maximiser l'activité termicide : extraction en batch, partition liquide-liquide et chromatographie préparative sur colonne. Le matériel végétal a été récolté et stabilisé comme précédemment décrit (§ Chapitre IV). Avant de procéder aux différents essais, les graines sont décortiquées puis les amandes sont broyées et tamisées (0,6 – 0,8 mm et 0,3 – 0,5 mm selon le cas). Elles sont délipidées selon le cas avec l'hexane. Plusieurs solvants sont utilisés allant des moins polaires (hexane, éther de pétrole, CO₂ SC) aux plus polaires (H₂O, éthanol/eau, chloroforme, méthanol). Les extraits et fractions concentrées ont été soumis à des analyses qualitatives afin d'approcher leur composition : CCM, test colorimétrique de détection des acétogénines, CLHP, RMN et SM. Les différents extraits obtenus ont été soumis au test de non choix afin d'évaluer leur activité.

V.2 Dénomination des extraits obtenus

Les extraits obtenus en batch et ceux issus de la partition liquide-liquide et de la chromatographie préparative (cas de *A. squamosa*) sont dénommés (Figure 19) :

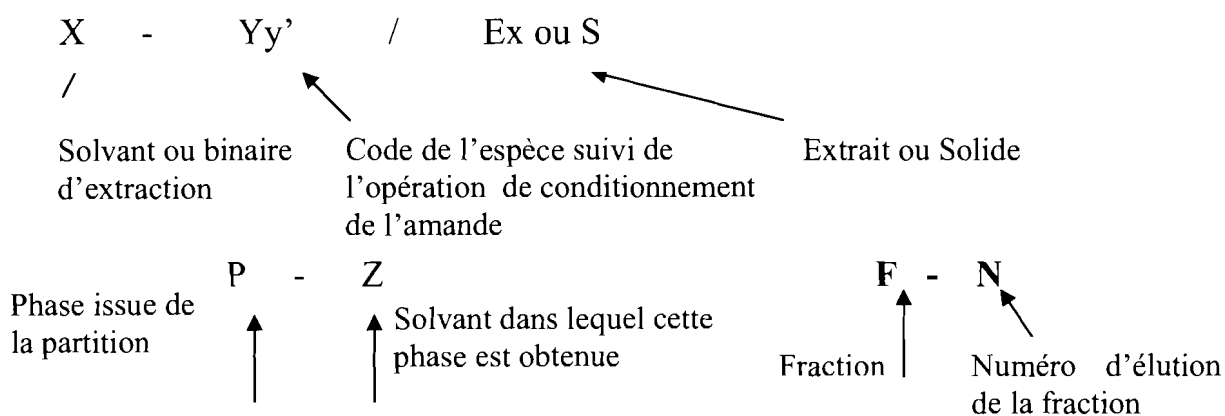


Figure 19 : Dénomination des extraits obtenus

Légende :

EW= Ethanol/eau ; AW = Acétone/eau
def = délipidé, Am = Amande

V.3 Protocoles d'extraction en milieu hexanique

Le but de cette étude est d'obtenir des extraits hexaniques par la méthode normalisée au Soxhlet et par extraction en batch à la température ambiante (20 °C). L'activité termicide des huiles extraites d'amandes des quatre espèces (*A. indica*, *A. squamosa*, *C. procera*, *P. biglobosa*) sera évaluée par test de non choix dans le Chapitre suivant.

V.3.1 Extraits hexaniques en Soxhlet

Une masse de 12,5 g d'amandes broyées (0,6 – 0,8 mm) est extraite pendant 8 h avec 300 mL d'hexane à 69 °C. Les extraits obtenus (huile) sont dénommés : H-As, H-Ai, H-Cp et H-Pb respectivement pour *A. squamosa*, *A. indica*, *C. procera* et *P. biglobosa*. Parallèlement afin de déterminer la courbe de l'évolution du rendement en extrait en fonction des étapes d'extraction, l'opération est effectuée quatre fois sur trois échantillons identiques mais pendant une durée de 24 h chacune.

V.3.2 Extrait hexanique à la température ambiante

Pour préparer ces extraits hexaniques, 12,5 g d'amandes broyées (0,6 - 0,8 mm) sont mises sous agitation (extraction batch, avec 125 mL d'hexane) à l'abri de la lumière et sous atmosphère d'azote, pendant 72 h à la température de 20 °C. La solution obtenue est évaporée jusqu'à obtention d'un extrait dénommé Hx-As/Ex. Afin de déterminer la courbe de l'évolution du rendement en extrait en fonction des étapes d'extraction, l'opération est effectuée quatre fois sur trois échantillons identiques pendant une durée de 24 h chacune.

V.3.3 Délipidation d'amande de *A. squamosa* avec l'hexane (20 °C)

Ce protocole est dérivé du précédent dans le but d'éliminer l'huile du tourteau. 12,5 g de poudre d'amande de *A. squamosa* (0,6 – 0,8 mm) et 62,5 mL sont introduits dans un ballon de 500 mL à fond plat (à col rodé et bouché). On inerte le milieu avec de l'azote, et on recouvre le ballon de papier aluminium, afin de prévenir les réactions radicalaires possibles. On lance alors l'agitation (500 tours/mn) pendant 24 h. Le solvant est récupéré par filtration sur du papier filtre de type Whatman, dans un ballon de 500 mL préalablement taré et conditionné en dessiccateur. Il est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu est pesé à 0,1 mg près après conditionnement en dessiccateur. L'extraction sur l'amande restante est

ensuite relancée avec un nouveau solvant. Trois échantillons identiques sont traités simultanément.

V.4 Obtention d'extraits hydroéthanoliques

Ce protocole a été suivi pour vérifier l'extraction par comparaison aux différents essais « à froid » décrits dans la suite du chapitre. Dans le cas où l'objectif était seulement l'obtention des extraits eux-mêmes (ou huile) le protocole ne comporte qu'une seule étape.

V.4.1 Obtention d'extraits hydroéthanoliques sur amandes

Sur les amandes de trois espèces, *A. indica*, *A. squamosa*, *C. procera*, l'extraction s'est effectuée en contacteur liquide-solide discontinu (batch) comme précédemment décrit (§ V.3.2) avec un binaire éthanol/eau, 80/20 v/v pendant 72 h à la température de 20 °C (Lawati *et al.*, 2002 ; Laetemia *et al.*, 2004). Le titre des solutions obtenues est déterminé après évaporation de 2 mL de solution dans un tube à hémolyse taré. Après évaporation sous courant d'azote avec un évaporateur de type N-EVAPTM 111 (Organomation Associates Inc, USA), les tubes sont pesés et les concentrations massiques (mg/mL) des solutions sont déterminées. L'extrait obtenu après évaporation est dissout dans le mélange éthanol/eau (80/20 v/v) pour obtenir une solution mère à 50 % et des solutions à 25 % et 6 % m/m destinées aux tests sur termites. Les solides sont séparés par filtration. Ce protocole a permis d'obtenir les extraits dénommés : EW-As/Ex, EW-Ai/Ex, et EW-Cp/Ex respectivement pour *A. squamosa*, *A. indica* et *C. procera*.

V.4.2 Obtention d'extrait hydroéthanolique sur amandes délipidées de *A. squamosa*

Les extraits obtenus selon ce protocole ont été utilisés pour étudier l'influence de la délipidation sur l'activité termicide et d'évaluer l'effet de la polarité du solvant sur l'activité termicide d'amandes de *A. squamosa*.

La poudre de *A. squamosa* est délipidée comme précédemment décrit (§ V.3.3). Une masse 12,5 g de cette poudre (0,6 – 0,8 mm) est mise sous agitation (extraction batch, 62,5 mL éthanol/eau, 80/20 v/v) à l'abri de la lumière et sous atmosphère d'azote, pendant 72 h à la température de 20 °C (Lawati *et al.*, 2002 ; Laetemia *et al.*, 2004). Les extraits sont obtenus en faisant varier les proportions éthanol/eau : 100/0, 80/20, 50/50, 20/80, 0/100 respectivement. Les extraits obtenus sont dénommés : EW-Asdef/Ex : 100/0 ; 80/20 ; 50/50 ;

20/80 ; 0/100 respectivement. Un essai a été réalisé avec une poudre de granulométrie 0,3 – 0,5 mm. L'extrait obtenu est dénommé EW-Asdef/Ex : 80/20 Gp. Quatre étapes d'extraction successives sont effectuées et trois échantillons identiques sont traités simultanément afin de déterminer la courbe de l'évolution du rendement en extrait en fonction de l'étape. Les solides obtenus sont conservés sous atmosphère d'azote afin d'effectuer les tests sur termites (§ V.9).

V.4.3 Analyse de l'opération d'extraction en milieu hydroéthanolique

Les essais d'extraction avec des binaires eau/éthanol sont analysés afin d'établir les courbes d'équilibre de l'extrait entre l'amande délipidée et le solvant. Les points expérimentaux présentés sont des états d'équilibre qui correspondent à la fin des quatre opérations d'extraction successives (§ chapitre VIII). Bien que les cinétiques d'extraction n'aient pas été expérimentalement établies, un modèle issu du génie chimique est cependant proposé pour rendre compte théoriquement des vitesses de transfert mises en jeu.

Les variables retenues sont les rapports massiques d'extrait dans le solvant (notée Y) et dans l'amande (notée X), définies comme suit (Equations 22 et 23) :

$$Y_i = \frac{m_i^{ex}}{m_s} \quad (\text{Equation 22})$$

$$X_i = \frac{m_T^{ex} - \sum_1^i m_j^{ex}}{m_{init}^g - m_T^{ex}} \quad (\text{Equation 23})$$

Où,

Y_i : rapport massique de l'extrait dans le solvant en fin d'extraction i ($1 \leq i \leq 4$) ;

m_i^{ex} : masse de l'extrait récupérée au cours de l'extraction i

m_s : masse de solvant reliée au volume *via* la masse volumique du mélange

$\rho_{eau/éthanol}$: masse volumique du binaire éthanol/eau

X_i : rapport massique de l'extrait restante dans l'amande en fin d'extraction i

m_T^{ex} : masse totale d'extractibles présents dans l'amande

m_{init}^g : masse totale de l'amande initiale

$\sum_1^i m_j^{ex}$: somme des masses d'extrait recueilli entre la première et la i ème extraction

V.5 Obtention d'extraits hydroacétoniques

12,5 g d'amandes broyées et tamisées (0,6 - 0,8 mm) sont traités selon le protocole décrit au V.3.2. Les extraits obtenus sont dénommés : AW-As/Ex, AW-Ai/Ex, AW-Cp/Ex pour *A. squamosa*, *A. indica*, *C. procera* respectivement.

V.6 Obtention d'extrait en milieu CO₂ supercritique

L'extraction au CO₂ supercritique est réalisée dans les conditions suivantes : pression égale à 10 MPa, température égale à 40 °C. On a utilisé des graines d'amandes de *A. squamosa* délipidées comme décrit au V.3.3 et ayant une teneur en eau de 10,75 %. Une masse de 500 mg est pesée à 0,1 mg près et déposée dans le contacteur en acier inoxydable. En fin d'extraction le CO₂ SC est transvasé vers une chambre de dépressurisation et le soluté est condensé sur les parois comme décrit aux Annexes 7 et 8. Les parois sont rincées avec l'hexane et le chloroforme. Les masses d'extraits obtenus après 15, 45 et 60 mn d'extraction sont pesées à 0,1 mg près et ont permis de tracer les courbes d'évolution de la quantité extraite en fonction du temps d'extraction. Le cas échéant un co-solvant en l'occurrence l'éthanol a été introduit à l'aide d'une pompe dans le contacteur à 10 % v/v.

L'extrait testé au chapitre IX quant à lui est obtenu de la façon suivante : une masse de 600 mg d'amande de *A. squamosa* est introduite dans le contacteur à la température de 45 °C et à la pression de 20 MPa pendant 2 h. Dix extractions successives sont faites et tous les extraits sont récupérés avec de l'hexane et réunis dans un même flacon. Le solvant est ensuite évaporé en vue d'obtenir l'extrait nommé SC-As/Ex. Le Tableau 8 présente les différents extraits soumis au test de non choix (§ Chapitre IX).

V.7 Solides obtenus lors des extractions précédentes sur amande de *A. squamosa*.

Les solides résiduels sont conservés sous atmosphère d'azote afin d'évaluer l'impact des solvants d'extraction (hexane et éthanol/eau) sur l'activité des résidus. La Figure 20 récapitule les différentes extractions réalisées et la méthode de conditionnement des solides.

La liste des différents solides et les quantités testés sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 8 : Liste récapitulative des différents extraits testés

Espèces végétales	Code de l'extrait	Solvant d'extraction	Méthode d'extraction	Concentration - Extrait sec déposé
<i>A. squamosa</i>	H-As ⁽¹⁾	Hexane	Soxhlet (8 H, 70 °C)	20 mg/cm ²
<i>A. indica</i>	H-Az ⁽¹⁾	Idem	Idem	Idem
<i>C. procera</i>	H-Cp ⁽¹⁾	Idem	Idem	Idem
<i>P. biglobosa</i>	H-Pb ⁽¹⁾	Idem	Idem	Idem
<i>A. squamosa</i> (Amande non délipidée)	Hx-As/Ex	Idem	Extraction batch à froid pendant (72H, 20°C)	- 50 %; 10 mg/cm ² - 25 %; 5 mg/cm ² - 6 %; 1,2 mg/cm ²
<i>A. squamosa</i> <i>A. indica</i> <i>C. procera</i> (Amande non délipidée)	EW-As/Ex EW-Ai/Ex EW-Cp/Ex	Ethanol/eau (80/20, v/v) 62,5 mL	Extraction batch à froid pendant (72H, 20°C)	-50%: 10 mg/cm ² - 25 %: 5 mg/cm ² - 6%: 1,2 mg/cm ²
<i>A. squamosa</i> <i>A. indica</i> <i>C. procera</i> (Amande non délipidée)	AW-AsEx AW-Ai/Ex AW-Cp/Ex	Acétone/eau (80/20, v/v- 62,5 mL)	Extraction batch à froid pendant (72H, 20°C)	- As : 0,3 mg/cm ² - Az : 0,6 mg/cm ² - Cp : 0,6 mg/cm ²
<i>A. squamosa</i> (Amande délipidée)	EW-Asdef/Ex ⁽¹⁾	Ethanol/eau 100/0; 80/20; 50/50; 20/80; 0/100 62,5mL respectivement	Extraction batch à froid pendant (72H, 20°C)	- 50 % : 10 mg/cm ² - 25 % : 5 mg/cm ² - 6 % : 1,2 mg/cm
<i>A. squamosa</i> (Amande non délipidée)	SC-As/Ex	CO ₂ Supercritique/Hexane	P= 20 MPa, T= 318 K	- 50%: 10mg/cm ²

(1) ces extraits sont aussi testés par EN 118

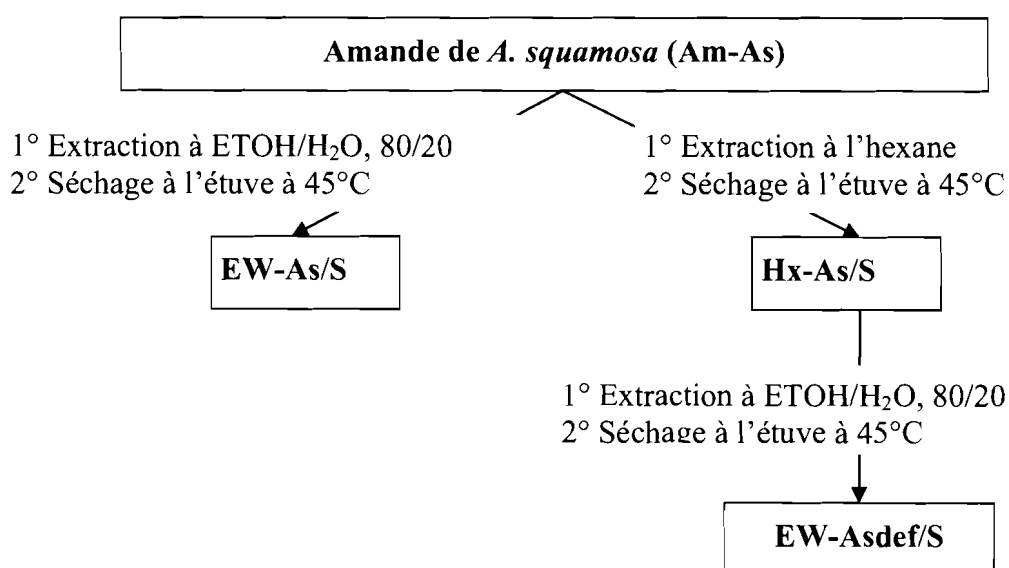


Figure 20 : Méthode d'obtention des solides résiduels

Tableau 9 : Différents solides testés sur termites

Observations	Dénomination des solides	Solvant de 1 ^{ère} extraction	Méthode de conditionnement
Amande de <i>A. squamosa</i>	Am-As	-	Séchage à l'étuve à 45 °C
Solide obtenu après extraction hydroéthanolique sur amande de <i>A. squamosa</i>	EW-As/S	Ethanol/eau, 80/20 v/v	Idem
Solide obtenu après extraction hydroéthanolique sur amande délipidée à l'hexane de <i>A. squamosa</i>	EW-Asdef/S	1° Hexane 2° Ethanol/eau, 80/20 v/v	Idem
Solide délipidée avec l'hexane de <i>A. squamosa</i>	Hx-As/S	Hexane	Idem

V.8 Obtention d'extraits par partition liquide-liquide : concentration de composés actifs

L'objectif de cette étude est de rechercher l'influence de la polarité du solvant sur l'extraction des composés termiticides et la phase dans laquelle ces composés sont concentrés.

V.8.1 Partition de l'extrait hydroéthanolique d'amande de *A. squamosa*

Le protocole utilisé est décrit par Mst Shahnaj *et al.* (2003). Il a permis à ces auteurs d'isoler d'extraits hydroéthanoliques d'amande de *A. squamosa*, une phase enrichie en acétogénines. L'extrait hydroéthanolique EW-As/Ex, 80/20, v/v est partitionné dans le chloroforme et l'éther de pétrole et a permis d'obtenir deux phases dénommées : P-CHCl₃ et P-EP qui sont concentrées à 50 % m/m.

V.8.2 Partition d'extraits d'acétate d'éthyle d'amande de *A. squamosa*

Ce protocole est décrit par Fang-Rong *et al.* (1999). Il a permis d'isoler et d'enrichir la phase méthanolique en acétogénines (Figure 21).

200 g d'amandes fraîches de *A. squamosa* dont l'humidité est de 5,8 % sont mises en suspension dans l'acétate d'éthyle (800 mL) à la température de 21 ± 1 °C. L'opération est répétée deux fois encore sur le solide résiduel. Les trois extraits obtenus sont combinés et filtré. Après évaporation du solvant sous atmosphère inerte d'azote, le résidu obtenu est

partitionné avec le mélange chloroforme/eau 1/5 v/v (8 fois la masse de l'extrait sec) et la phase chloroformique est rincée cinq fois de suite avec de l'eau. Cette phase après évaporation est partitionnée avec le mélange n-Hexane/MeOH 1/5 v/v (8 x la masse de l'extrait sec). Une phase P-MeOH est obtenue et serait enrichie en acétogénines et une phase P-Hx qui en serait appauvrie. Ces deux phases sont concentrées à 50 % m/m et a permis d'obtenir des solutions filles à 25 et 6 % m/m respectivement qui seront testés sur termites. Le Tableau 10, présente la liste des différentes phases testées et les concentrations utilisées (§ chapitre IX).

Tableau 10 : Différentes phases obtenues par partition liquide-liquide d'extraits d'acétate d'éthyle d'amande de *A. squamosa*

Extrait concerné	Dénomination des extraits	Solvant d'extraction	Méthode d'extraction	Concentration - Extrait sec déposé
Extrait hydroéthanolique, 80/20, v/v.	P-CHCl ₃	Chloroforme	Partition liquide-liquide de l'extrait EW-Ex dans le chloroforme (20°C)	- 50%; 10 mg/cm ²
	P-EP	Ether de Pétrole	Partition liquide-liquide de l'extrait EW-Ex dans l'éther de Pétrole (20°C)	- 50%; 10 mg/cm ²
Extrait d'acétate d'éthyle	P-MeOH ⁽²⁾	Méthanol	1- Extraction à l'ETOAc 2- Partition liquide-liquide dans CHCl ₃ /H ₂ O 3- Partition liquide-liquide dans MEOH-Hexane 4- Concentration de la phase méthanolique	- 50%; 10 mg/cm ² - 25%; 5 mg/cm ² - 6%; 1,2 mg/cm
	P-HX	Hexane	1,2,3- Idem 4- Concentration de la phase hexanique	- 25%; 5 mg/cm ² - 6%; 1,2 mg/cm
	F-13	MeOH/CHCl ₃ , 95/5	Fractionnement sur colonne	- 10 %: 2 mg/cm ²
	F-19	MeOH/CHCl ₃ , 90/10	Fractionnement sur colonne	- 5 %: 1 mg/cm ²

(2) cet extrait est aussi testé par EN 118

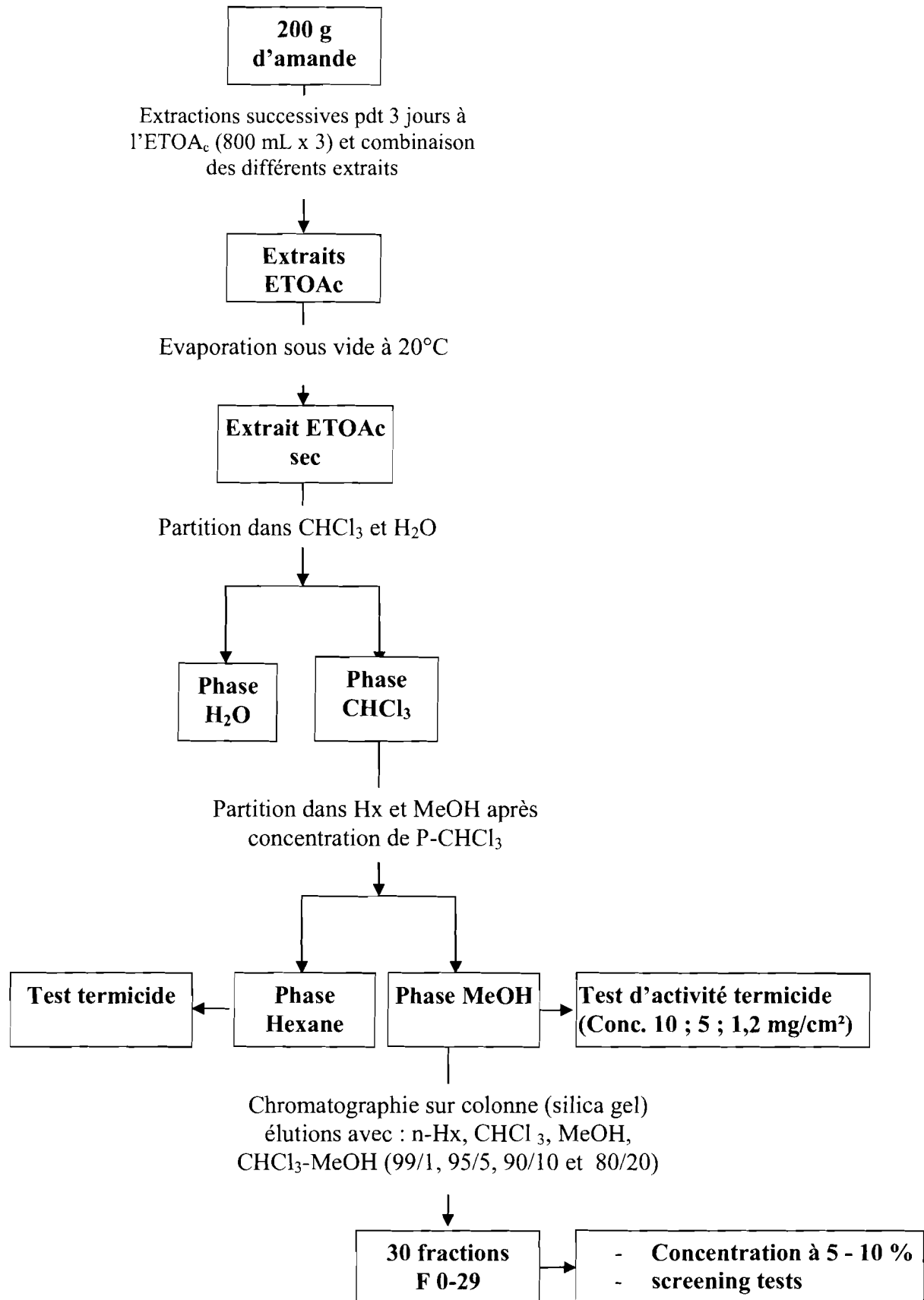


Figure 21 : Diagramme de partition liquide-liquide

V.8.3 Obtention de fractions de P-MeOH par chromatographie préparative

La phase méthanolique (P-MeOH, 50 % m/m) est fractionnée sur colonne remplie de gel de silice (Kieselgel, 0,060-0,200mm) (Figure 21). L'élution est faite successivement avec 200 mL respectivement de n-Hexane, CHCl₃, MeOH et différents mélanges CHCl₃/MeOH (99/1, 95/5, 90/10 et 80/20) (Figure 21). Ce protocole a permis l'obtention de 30 fractions (F-0 - 29). Ces dernières sont filtrées sur papier Wathman N°1 (ref 1001185, diamètre 0,185 mm) et les résidus sont pesés et mis en solution à 0,2 % m/m pour analyse. La fraction F-13 (10 % m/m dans MeOH/CHCl₃, 90/10) et F-19 (5 % m/m dans MeOH/CHCl₃, 90/10) ont été testées sur termites par test de non choix. Les différents extraits obtenus par fractionnement sont consignés dans le Tableau 10.

V.9 Caractérisation chimique des extraits

La caractérisation des extraits a porté essentiellement sur la détection d'acétogénines par test de colorimétrie et par analyse des extraits par CCM. Les fractions plus actives sont ensuite analysées par CLHP/SM et par RMN ¹H, ¹³C.

V.9.1 Méthode colorimétrique de détection d'acétogénines

A partir d'une étude bibliographique, un mode opératoire est établi pour analyser qualitativement et quantitativement les acétogénines, supposées présentes dans la poudre de graine. Cette méthode simple a été adaptée des protocoles du MPRI (1999) et de Naiyana (2002).

V.9.2 Essai de détection d'acétogénines en solution et par spectroscopie UV

Cette méthode simple consiste en une détection colorimétrique de la présence du noyau lactonique caractéristique des acétogénines, après dérivatisation par les réactifs de Kedde A et de Kedde B. Ces réactifs sont respectivement une solution aqueuse d'acide méta 3,5-dinitrobenzoïque (Panreac, réf. : 162836.1610, pureté 98 % à 2 % m/v et d'une solution de KOH méthanolique à 5,7 % m/v). Deux gouttes des réactifs A et B sont ajoutés successivement dans un tube à hémolyse contenant 0,5 mL de solution à 0,2 % m/v des différentes fractions F 0-29 issues de la chromatographie préparative. L'obtention d'une coloration rose violacée persistante pendant 10 mn dénote selon la littérature de la présence du noyau lactonique.

Cette analyse étant qualitative, on a essayé de la compléter par des mesures en spectroscopie UV. Le spectrophotomètre utilisé est de type Shimadzu 1605. Le domaine de

réponse linéaire de l'absorbance est déterminé au spectrophotomètre en fonction de la concentration des différents extraits EW-Asdef/Ex (0,25 – 1,25 %).

V.9.3 Conditions d'analyse en CCM préparative

Dans le cas de l'analyse des lipides résiduels, la plaque utilisée est de gel de silice 60 F₂₅₄. L'élution s'est effectuée avec le mélange hexane/éther diéthylique/acide acétique (70/30/1 v/v/v). Les dépôts de 10 ou 20 µL des différents extraits EW-Asdef/Ex et Hx-As/Ex sont effectués. La révélation des plaques est faite par vaporisation d'un mélange d'acide phosphorique et de sulfate de cuivre (1/1 v/v). La carbonisation de la plaque est faite en étuve à 130 °C, pendant 10 mn. Des étalons de marque sigma sont utilisés : acides gras libres de tournesol, monooléine, stérols, tocophérols et squalène.

Pour l'analyse des acétogénines 10 µL des fractions issues de la chromatographie préparative sont déposés sur une plaque de gel de silice 60 F₂₅₄. L'éluant est : MeOH/CHCl₃, 2/1. La révélation est faite par vaporisation du réactif de Kedde A, puis du réactif de Kedde B, ce qui a pour effet l'apparition de « spots » rouges violacés qui disparaissent au bout de 10 mn comme ci-dessus décrit.

V.9.5 Microanalyse élémentaire organique (C, H, O) de quelques extraits

La microanalyse élémentaire a été effectuée en collaboration des laboratoires d'analyse du Cirad-US 49 Analyses et du Service Central d'Analyse (SCA) du CNRS à Vernaison (Lyon) selon le protocole suivant. Une prise d'essai de chaque échantillon préalablement broyé et homogénéisé (de 50 - 100 mg, selon le type d'échantillon) est pesée dans une feuille d'étain et placée sur le passeur d'échantillon. L'échantillon solide, placé dans une capsule d'étain, est introduit dans un four à 1050 °C traversé par un courant d'hélium. Un apport d'oxygène provoque une montée en température (1800 °C) très brève et une combustion totale. Les gaz de combustion subissent une oxydation complémentaire pour transformer tous les oxydes de carbone en CO₂, et une série de piégeage pour éliminer les poussières, les halogènes et la vapeur d'eau. Une réduction sur colonne de cuivre à 750 °C permet de réduire les oxydes d'azote en gaz N₂ avant d'être quantifiés par catharométrie (conductimétrie thermique). Le carbone et l'hydrogène des échantillons sont respectivement transformés en dioxyde de carbone et en eau. L'eau est quantifiée soit par coulométrie soit par des détecteurs spécifiques infrarouge. Les teneurs respectives en C et N sont quantifiées par chromatographie gazeuse après une calibration appropriée avec des substances de composition connue en C et N (EDTA, atropine).

V.9.6 Analyse spectrale des fractions par CLHP/SM et par RMN.

Les spectres ^1H et ^{13}C RMN ont été enregistrés dans le $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ avec un spectromètre de type Varian Plus 300, 300 et 75 MHz, respectivement pour ^1H et ^{13}C (mode de découplage de bande de proton pour le carbone).

L'analyse de CLHP/MS est faite avec un système chromatographique (Alliance) comprenant un module de séparations Waters 2695 équipé d'un échantillonneur automatique et d'un détecteur Dual Absorbance Waters 2487 lambda (Waters, Milford, MA, Etats-Unis). La séparation est réalisée à un débit de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ sur une colonne de type Uptisphere 5ODB RP18 (5 μm ; 150 x 2 mm) protégée par une colonne de garde (Interchim, Montluçon, France). L'analyse est faite à la température de 24 $^\circ\text{C}$, les échantillons sont maintenus à 10 $^\circ\text{C}$ et un volume de 5,0 – 10,0 μl est injecté pour chaque analyse. L'élution est faite avec des mélanges de solvants A (H_2O et 0,5 % d'AcOH), B (CH_3CN et 0,5 % d'AcOH). Les conditions d'analyse sont les suivantes : gradients linéaires de 10 à 80 % de B en 30 minutes et de 80 à 100 % de B en 20 minutes, suivies du lavage et du reconditionnement de la colonne. Le système de CLHP est couplé à un spectromètre de masse ESI-MS dans lequel l'effluent du détecteur UV passe en mode splitless.

Les expériences de SM/MS sont faites avec un spectromètre de type Quattro LCTM avec une source de type Z-sprayTM (Waters, Milford, MA 01757). Les potentiels de source sont à : capillaire 3,25 kilovolts (mode positif) ou 3,0 kilovolts (mode négatif), extracteur 2,0 V et RF Lens 0,1 V. La tension de cône de prélèvement a varié de 20 à 50 volts pour les spectres de masse et la valeur spécifique de la tension de cône pour chaque expérience de dissociation induite par collision (DIC) est choisie afin d'optimiser l'ion parent. Les filtres de masse quadripolaires sont placés avec la résolution LM et HM de 15,0 (unités arbitraires), équivalente à la fenêtre de masse de 1,0 Da pour la transmission des ions de précurseur et de produit. Les températures des sources sont à 120 et 400 $^\circ\text{C}$ respectivement. L'azote est employé comme gaz de séchage et de nébulisation. L'argon à $3,5 \cdot 10^{-3}$ mbar est employé comme gaz de collision. L'acquisition et le traitement des données sont faites en utilisant le logiciel MassLynx version 4,0. Les composés sont séparés à l'aide d'un module de séparation Waters 2695 (Alliance). Pour l'injection directe, la solution est mise en présence de la source avec une pompe médicale de perfusion (appareillage de Harvard, Holliston, MA) à l'aide d'une seringue de 100 μL .

CHAPITRE VI

Activité termicide d'extraits des quatre graines sélectionnées

VI.1 Introduction

VI.2 Description des termites utilisés

VI.3 Test de non choix (screening tests)

VI.4 Essai Normalisé EN118.

Chapitre VI

Activité termicide d'extraits des quatre graines sélectionnées

VI.1 Introduction

Les différents extraits et poudres résiduelles obtenues après extraction (§ Chapitre V) sont utilisés afin d'étudier leur activité termicide. Une première série d'essais appelés tests de screening (test de non choix) permet de sélectionner les extraits les plus intéressants. Le cas échéant l'activité de ces derniers sera validée par la mise en place d'un essai normalisé (EN 118 - Détermination de l'efficacité préventive contre *Reticulitermes santonensis* de Feytaud - Méthode de laboratoire). Les extraits sont obtenus avec différents solvants (hexanique, éther de pétrole, CO₂ SC, éthanol/eau, acétone/eau, chloroforme, méthanol). La performance des extraits sera appréciée par l'essai EN 599-1 : Performances des produits préventifs de préservation du bois établies par des essais biologiques).

Les essais se sont déroulés au Laboratoire de Préservation du Bois du Cirad-Forêt. Depuis 1998, le laboratoire est engagé dans une démarche visant à répondre aux exigences de qualité et de traçabilité des tests d'efficacité de produits de préservation des bois. Ses activités reconnues conformes à la norme ISO 17025 par le Centre Technique du Bois et de l'Ameublement (CTBA) dans le cadre de la marque produit CTB-P+ et depuis le 1er janvier 2006, il est accrédité par le COFRAC pour cinq essais sur les matériaux bois et dérivés.

VI.2 Description des termites utilisés



Figure 22 : *Reticulitermes santonensis*

Les termites utilisés pour le test de non choix et pour l'essai EN118 appartiennent à la famille *Reticulitermes santonensis*. Ils ont été récoltés sur l'île d'Oléron (Figure 22) et sont conservés au laboratoire dans des bacs d'élevage placés dans des enceintes climatiques (27 °C – 80 % HR : humidité relative). La colonie est régulièrement approvisionnée en eau.

VI.3 Test de non choix (screening test)

Cet essai consiste à mettre les termites au contact d'un support (papier cellulose ou poudre de bois) imprégné de l'extrait à évaluer. Le test de non choix est le test de screening utilisé. Il consiste à contraindre les termites à s'alimenter avec le support cellulose imprégné par les extraits. Ce type de test permet sur un temps relativement court (inférieur à 30 jours) d'obtenir des informations sur l'impact que peut avoir un extrait sur les termites étudiés. L'activité des extraits peut se révéler sous différentes formes en fonction des effets causés :

- effet toxique si l'on observe une forte mortalité des termites après contact avec l'extrait
- effet répulsif si les termites évitent tout contact avec l'extrait; non alimenté à terme l'insecte meurt,
- effet anti-appétant si les termites gênés, se nourrissent plus ou moins du support imprégné

De plus il présente l'avantage de nécessiter une faible quantité de matière et de termites. Toutefois, cet essai a ses limites, car réalisé en conditions *in-vitro*, il ne prend pas en compte les interactions qui existent entre l'extrait et le bois. L'activité des solutions les plus intéressantes sera testée et validée à partir de la mise en place d'essais normalisés.

VI.3.1 Protocole

VI.3.1.1 Déroulement et suivi des tests : test sur support de cellulose

Dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, 20 g de sable de Fontainebleau sont imbibés de 7,5 ml d'eau. Pour chaque boîte de Pétri, 50 ouvriers sont placés avec 1 nymphe et 1 soldat (Figure 23). 3 à 5 replicats ont été utilisés en fonction de la disponibilité des termites. La durée de l'essai correspond au nombre de jours au bout duquel l'ensemble des termites meurt suite à l'absence de toute source d'alimentation. Plusieurs lots d'essai sont effectués :

a- Lot n° 1 (témoins diètes) : permet de déterminer la durée de l'essai : les termites sont placés dans la boîte de Pétri en absence de toute source d'alimentation. Cette dernière correspond à la période au delà de laquelle l'ensemble des termites meurt.

b- Lot n° 2 (témoins de contrôle de virulence) : permet de déterminer la virulence des termites. Les termites sont placés dans la boîte en présence d'un support de cellulose (papier Wattman ref 1001185) de 1 x 1 cm. Le test screening est validé si l'on observe un taux de mortalité inférieure à 50 % à la fin de la période d'essai.

c- Lot n°3 (témoins solvant) : afin de s'assurer de la non toxicité des solvants utilisés les solvants utilisés pour la préparation des extraits (hexane, éthanol/eau, éthanol/acétone, chloroforme, éther de pétrole, méthanol/chloroforme) sont mis en présence des termites.

d- Lot n°4 (lot d'essai) : un support de cellulose est imprégné de 20 µL d'extrait et est séché en chambre climatique pendant 72 h (20 °C, 65 % HR) avant d'être déposé au centre de la boîte en présence des termites.

e- Suivi du test

Pour chaque lot étudié, nous avons réalisé 3 à 5 réplicats en fonction de la disponibilité des termites. L'ensemble des dispositifs est placé dans une enceinte climatique (27 °C, 75 % RH) pendant toute la durée de l'essai. Le taux de mortalité et le comportement des termites sont enregistrés durant la période d'essai (décompte journalier du nombre de termites morts). La Figure 23 illustre les différentes étapes de cet essai. Les courbes des cinétiques de mortalité sont obtenues en étudiant le taux de mortalité TM en fonction des jours d'essai (§ Chapitre IX).

VI.3.1.2 Test sur poudre d'amande broyée

Le principe est le même que celui décrit précédemment, et le support de cellulose est remplacé par la poudre extraite. La méthode d'obtention de ces poudres est présentée au chapitre V (§ V.9). Cet essai permet d'étudier s'il existe une activité résiduelle sur ces dernières. Par boîte de Pétri, 10 mg de poudre d'amande sont placés au centre puis 52 termites (50 ouvriers, 1 nymphe et 1 soldat). Les différentes étapes du screening tests sont illustrées sur la Figure 23 ci-dessous. Le suivi de cette série d'essai est fait de la même façon que ci-dessus décrite.

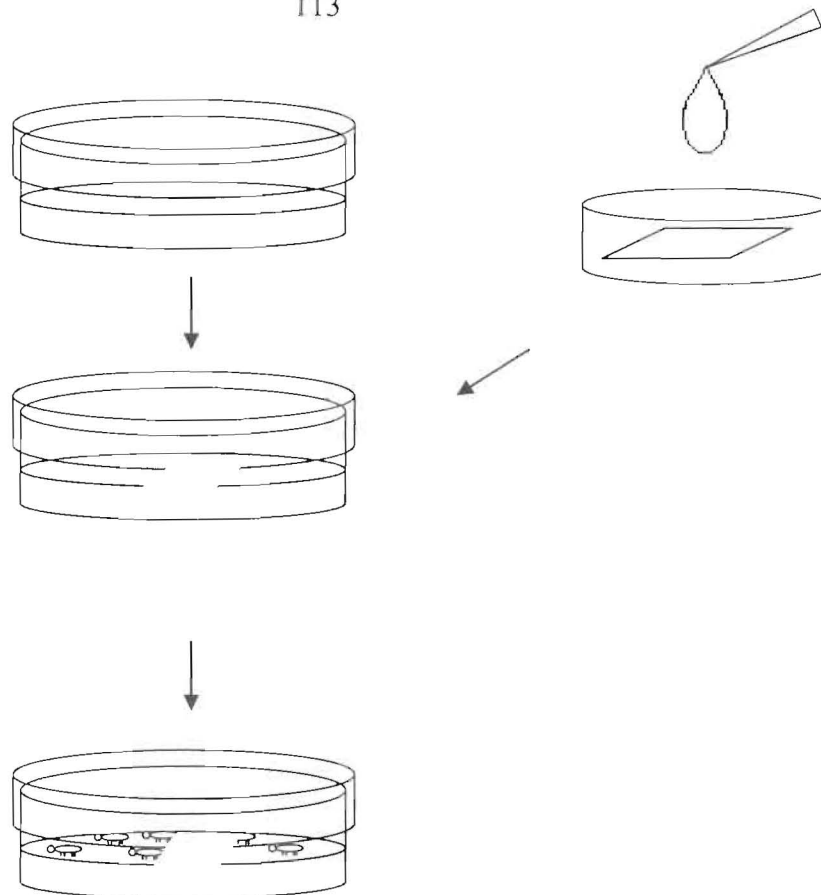


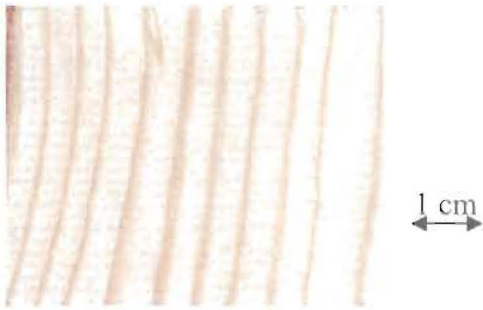
Figure 23 : Différentes étapes du test de non choix

VI.4 Essais normalisés EN 118

Les extraits qui se sont révélés efficaces par les tests de non choix, ont été étudiés conformément à la norme EN 118 (Produits de préservation - Détermination de l'efficacité préventif contre *Reticulitermes santonensis* de Feytaud - Méthode de laboratoire).

Cet essai permet de tester l'efficacité préventive d'un produit de traitement à l'égard des termites : *Reticulitermes santonensis*. En effet, il permet de juger de la valeur du produit de traitement étudié et de son aptitude à protéger préventivement le bois lorsque ce dernier est appliqué par un traitement de surface.

VI.4.1 Support de bois utilisé



Le bois utilisé pour les essais EN118 est *Pinus radiata* (Figure 24) classée parmi les espèces peu durables (Dirol et Deglise, 2001). L'éprouvette possède les caractéristiques suivantes : il est d'aubier sain, de fil droit, sans nœud. Avant utilisation, le bois a été stabilisé dans une enceinte climatisée (20 °C, 65 % HR).

Figure 24 : Bois de *Pinus radiata*

Nous avons utilisé deux sortes d'éprouvettes, ceci est dû au fait que la norme a évolué, mais cela ne doit rien changer aux résultats ni à leur interprétation. La quantité de produit nécessaire à l'application est réduite avec le nouveau protocole. Les deux types d'éprouvette de *Pinus radiata* (pin) utilisés ont les dimensions suivantes :

- pour la première série (extraits hexaniques H-Az, H-As, H-Cp), elles ont les dimensions de 100 x 40 x 10 mm
- pour la deuxième série (EW-Asdef/Ex, P-MeOH), elles ont les dimensions de 50 x 50 x 10 mm.

VI.4.2 Protocole

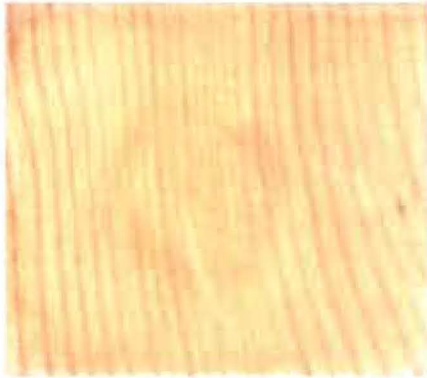
VI.4.2.1 Extraits utilisés et quantité déposée

Les extraits suivants sont utilisés: H-As, H-Az, H-Cp, EW-Asdef-Ex et P-MeOH (§ Tableaux 8 et 10). Une masse de 0,400 g pour H-Az, H-As, H-Cp et de 0,125 g pour EW-Asdef/Ex et P-MeOH sont appliquées respectivement (soit 10 mg/cm²). Les éprouvettes sont séchées en chambre climatique (20 °C, 65 % RH) pendant une semaine.

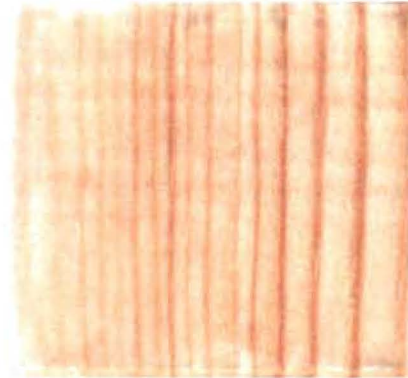
VI.4.2.2 Mise en place des dispositifs EN 118 et suivi des essais

Un tube en verre est fixé avec du colophane sur la face traitée de l'éprouvette puis il est rempli au ¼ de sable de Fontainebleau humide. 260 termites (250 ouvriers, 5 soldats, 5 nymphes) sont introduits sur le sable dans lequel on enfonce un bout de bois provenant des souches utilisées. Les dispositifs sont placés en chambre climatique pour une durée de huit semaines (Figure 25). 3 réplicats par type d'extraits testés sont utilisés. Un lot d'éprouvettes non traitées permet de contrôler la virulence des termites. L'essai est validé si le taux de mortalité est inférieur à 50 % à la fin de l'essai et si ces éprouvettes ont subi une attaque de niveau 4 (attaque forte).

Les essais sont suivis de façon hebdomadaire et le sable est arrosé en cas de besoin. Les effets répulsifs des extraits sont notés en fonction de l'activité des termites. Le nombre d'insecte mort est compté et la formation de cordonnets est noté éventuellement.



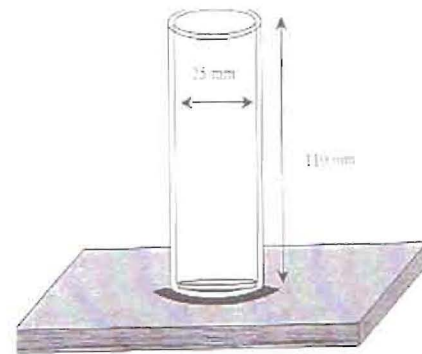
25-a : Epreuve imprégnée
d'extrait EW-Asdef/Ex



25-b : Epreuve imprégnée
d'extrait P-MeOH



25-c : Epreuves imprégnées
d'extraits hexaniques en séchage



25-d : Dispositifs d'essai EN118



25-e : Suivi de l'essai EN118

Figure 25 : Différentes étapes de l'essai EN118

VI.4.2.3 Exploitation des résultats de l'essai EN 118 : Cotation des attaques et efficacité préventive sur bois

A la fin de l'essai, le taux de mortalité est déterminé, un examen visuel permet de caractériser la profondeur d'attaque du bois. La profondeur de l'attaque est directement reliée à un système de cotation s'étalant de 0 (aucune attaque subie) à 4 (attaque forte). Le Tableau 11 décrit les dégâts observés en fonction des cotations.

La norme EN 599-1 (Durabilité des bois et des matériaux dérivés du bois - Performances de produits préventifs de préservation du bois établie par des essais biologiques) prescrit les exigences minimales de performance des produits de préservation destinés au traitement préventif du bois massif contre les agents de dégradation. Elle spécifie les critères que doivent atteindre les produits évalués en fonction de la classe d'emploi visée. Les classes d'emploi sont les différentes situations en service auxquelles peuvent être exposés le bois et les produits à base de bois. Ces classes, au nombre de cinq, sont définies dans la norme EN 335 (Durabilité des bois et des matériaux dérivés du bois – Définition des classes de risque d'attaque biologique – Partie 1, Généralités). Elles prennent en compte les risques d'attaque aussi bien par les champignons que par les insectes. Cette étude, concerne les bois traités par les extraits qui peuvent être utilisés en classe d'emploi 1 (bois toujours sec). Le risque majeur rencontré étant l'attaque du bois par les insectes. On considère qu'un produit donné, appliqué selon un traitement de surface, est apte à être utilisé en classe d'emploi 1, si aucune attaque de type 2 n'est observée sur le lot des trois éprouvettes testées. On peut admettre, au plus, une éprouvette de cotation supérieure à 2.

Tableau 11 : Description des cotations et caractéristiques de l'attaque

Cotation	Caractéristiques de l'attaque	
0	Aucune attaque	-
1	Tentative d'attaque	Nettoyage ou effleurage superficiel de profondeur échappant à toute mesure
2	Attaque légère	Attaque superficielle (<1mm) et limitée en étendue à au plus ¼ de la surface exposée de l'éprouvette ; ou Forage unique de profondeur inférieure à 3mm à l'exclusion de toute autre trace d'attaque
3	Attaque moyenne	Attaque superficielle (<1mm) s'étendant sur plus de ¼ de la surface exposée de l'éprouvette ; ou Erosion (de 1 à 3mm) sur une surface inférieure ou égale au ¼ de la surface exposée de l'éprouvette, ou Forages ponctuels supérieurs à 3mm et ne s'étendant pas en caverne et non transversants.
4	Attaque forte	Erosion sur une étendue supérieure au ¼ de la surface exposée de l'éprouvette, ou Attaque pénétrante supérieure à 3mm s'étendant en caverne dans la masse de l'éprouvette ou ne s'étendant pas en cavernes mais transversantes

TROISIEME PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSIONS

TROISIEME PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre VII

Caractérisation chimique des graines

Chapitre VIII

Obtention des extraits – Essai de Caractérisation chimique

Chapitre IX

Activité termicide d'extraits des quatre graines sélectionnées

Chapitre VII

Caractérisation chimique des graines

VII.1 Introduction

VII.2 Processus de sélection des espèces sélectionnées

VII.3 Composition pondérale des quatre graines sélectionnées

VII.4 Caractérisation chimique des différentes parties des quatre graines
sélectionnées (coque, huile, tourteau d'extraction)

VII.5 Conclusion

Caractérisation chimique des graines

VII.1 Introduction

Le but de ce chapitre est d'apporter une contribution à la connaissance chimique de quatre oléagineux de préférence peu étudiés et peu exploités du Bénin et qui seront ensuite étudiés au cours de la préparation de la thèse du point de vue de leurs propriétés insecticides. Après avoir donné les critères ayant présidé au choix des quatre oléagineux sélectionnés *in fine*, et collecté des échantillons sur des arbres identifiés par des botanistes, nous avons séparé les différentes parties des graines (coque, huile, tourteau délipidé) et établi leur importance pondérale. Ensuite, ces fractions ont été soumises à différentes analyses :

- Coque : matière sèche, minérale, azotée ; cellulose brute de Wende, lignine,
- Huile : indices (d'iode, d'acide, de peroxyde, de saponification); teneurs en P, Ca et Mg ; composition en acides gras, stérols et tocophérols ; stérols et tocophérols totaux,
- Tourteau : matière sèche, matière minérale, matière azotée, protéines totales et acides aminés ; cellulose brute de Wende ; lignine ; sucres totaux ; amidon.

VII.2 Processus de sélection des espèces

Le travail a d'abord consisté à cibler une dizaine d'oléagineux du Bénin présentant un intérêt potentiel du point de vue de leur utilisation.

Cette étude préliminaire a permis de sélectionner huit oléagineux :

Anarcadium occidentale,

Annona squamosa,

Azadirachta indica,

Blighia sapida,

Carapa procera,

Chrysobalanus orbicularis,

Jatropha curcas,

Parkia biglobosa.

VII.2.1 Synthèse des données bibliographiques et des informations de terrain sur les espèces ciblées pour cette étude

De nombreuses espèces oléagineuses présentent un potentiel intéressant en raison de leur teneur en composés à intérêt nutraceutique (stérols, tocophérols, polyphénols) et en composés à activité insecticide : tétranortriterpénoïdes, acétogénines, limonoïdes, tannins (Jacobson, 1989).

L'observation sur le terrain et nos enquêtes ont permis d'accéder à une certaine connaissance de ces végétaux. Lors des collectes d'échantillons, les informations données par les accompagnateurs locaux relatives aux savoirs et savoir-faire éventuels sont complétées par les données de la littérature (§ Tableau 12) et comparées à ces dernières (§ Chapitre II). Le Tableau 12 comporte une cotation pour chaque critère (nombre entre parenthèses) et la dernière ligne met en évidence le score total le plus élevé pour *A. indica* (16) suivi de *A. squamosa* (14) ; *J. curcas* (13) ; *P. biglobosa* (12) et *C. procera* (11).

VII.2.2 Critères de choix des quatre espèces sélectionnées (Figure 26)

Les critères de base ayant présidé au choix des espèces sont les suivants :

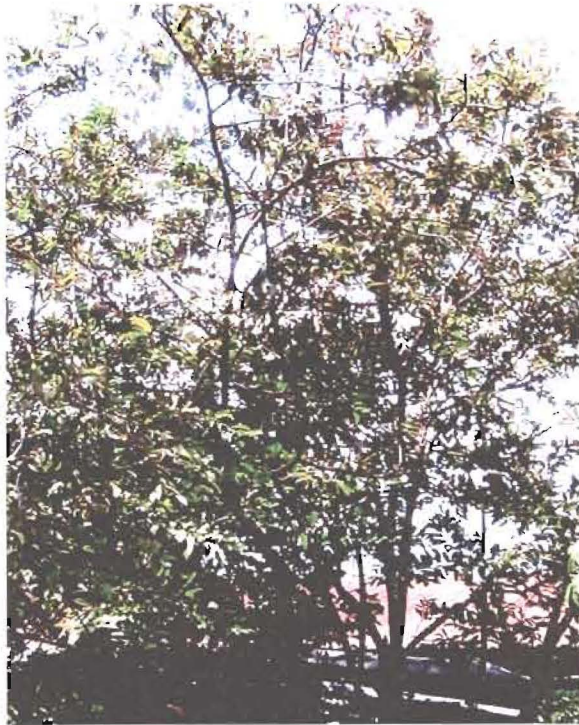
- Disponibilité de la biomasse au Bénin,
- Activité insecticide prouvée dans des formulations phytosanitaires ou en protection du bois,
- Volume de la littérature scientifique,
- Possibilité de filière de production, de valorisation (possibilité d'organiser la collecte),
- Opportunité d'innovations.

Cette liste de critères reflète bien le contexte d'application des résultats au bénéfice du développement dans lequel s'inscrit notre démarche scientifique. Le classement par score des quatre oléagineux est présenté sur la Figure 27 qui complète le Tableau 12.

Tableau 12 : Synthèse des données bibliographiques sur les oléagineux ciblés pour cette étude – Classement selon différents critères

Espèces	<i>A. occidentale</i>	<i>A. squamosa</i>	<i>A. indica</i>	<i>B. sapida</i>	<i>C. procera</i>	<i>C. orbicularis</i>	<i>J. curcas</i>	<i>P. biglobosa</i>
Critères								
Famille botanique	<i>Anacardiaceae</i>	<i>Annonaceae</i>	<i>Méliciaceae</i>	<i>Sapindaceae</i>	<i>Méliciaceae</i>	<i>Rosaceae</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Mimosaceae</i>
Disponibilité de la biomasse au Bénin	Grande (3)	Grande (3)	Très Grande (4)	Grande (3)	Faible (1)	Faible/urbanisation (1)	Grande (3)	Grande (3)
Activité insecticide prouvée	Moyenne mais toxicité (Ester de phorbol) (2)	Très Grande (4)	Très Grande (4)	Faible mais toxicité (Hypoglycine A et B) (1)	Grande (3)	Faible (1)	Grande mais toxicité (Ester de phorbol) (3)	Faible (1)
Volume de la littérature scientifique	Moyenne (2)	Moyenne (2)	Très Grande (4)	Moyenne (2)	Faible et vieille (1)	Faible (1)	Très Grande (4)	Moyenne (2)
Possibilité de filière de production et de valorisation	Grande (3)	Moyenne (2)	Grande (3)	Moyenne (2)	Existante (cure-dent) (4)	Inconnue (0)	Moyenne (2)	Très grande (4)
Opportunités d'Innovations scientifiques	Faible (1)	Grande (3)	Faible (1)	Faible (1)	Moyenne (2)	Inconnue (0)	Faible (1)	Moyenne (2)
Total des cotations	(11)	(14)	(16)	(9)	(11)	(3)	(13)	(12)

(-) - Score/critère (0) : inconnue ; (1) : faible ; (2) : moyen ; (3) : élevé ; (4) : très élevé ; § Figure 27



26-a : Arbre de *A. squamosa*
(Sikècodji)



26-a : Arbre de *A. indica*
(CRA-Niaouli)



26-c : Arbre de *C. procera* au bord d'un puit artésien (CRA-Niaouli)



26-d : Arbre de *P. biglobosa*
(Parc néré à Zogbodomè)

Figure 26 : Les quatre espèces oléagineuses sélectionnées

La Figure 27 montre que *A. squamosa* et *A. indica* semblent avoir les potentiels insecticides les plus élevés, cependant *A. squamosa*, a été moins étudiée que *A. indica* d'après la littérature. Bien que le potentiel insecticide de *P. biglobosa* soit très faible, cette espèce est retenue à cause de l'importance de ses graines dans l'alimentation au Bénin et dans la sous-région Ouest-Africaine (§ 1^{ère} Partie, II-4-3). Le choix de cette espèce est donc guidé par le souci d'apporter une contribution à la caractérisation complète de ses graines afin de soutenir la primauté de *P. biglobosa* sur le soja importé dans la préparation du condiment « *Afitin* » au Bénin.

Les études sur *C. procera* sont assez anciennes (Vieux, 1970; Miralles *et al.*, 1983). Le choix de cette espèce qui possède déjà une filière artisanale de production en Amazonie (Brésil) par exemple, permettrait de *réactualiser* et de compléter les données de la littérature. *B. sapida*, *J. curcas* et *A. occidentale*, malgré leur potentiel, contiennent des toxines dans certaines parties de leur plante (graines, latex par exemple). Il s'agit pour *Blighia sapida* essentiellement des deux isomères (A et B) de l'hypoglycine et pour les deux autres d'esters de phorbol (Foidl et Elder, 1997 ; Blake *et al.*, 2006).

Le non choix de *C. orbicularis* est lié à sa répartition dans des zones humides, sur les plages, où l'urbanisation croissante ne devrait pas favoriser la disponibilité durable de cette espèce.

Finalement, les quatre espèces choisies pour débiter les travaux sont les suivantes dans l'ordre de score/critère décroissant : *A. indica* (*Ai*), *A. squamosa* (*As*), *P. biglobosa* (*Pb*), *C. procera* (*Cp*).

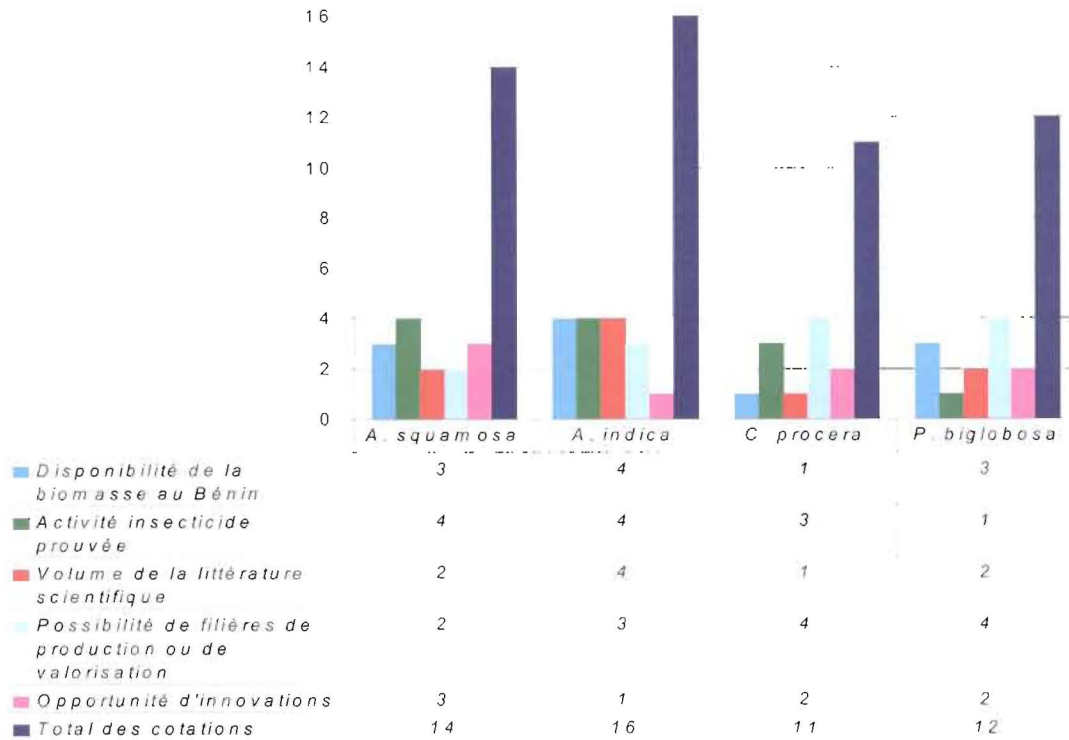


Figure 27 : Classement des quatre oléagineux choisis (score/critères)

VII.3 Composition pondérale des quatre graines sélectionnées (Figure 28)

En général, seule la partie d'une plante ou d'un fruit présentant un intérêt avéré pour les populations est valorisée. Les autres, par ignorance, sont négligées.

Par exemple pour *P. biglobosa*, les coques obtenues après décorticage des graines étaient utilisées au Bénin pour enduire les murs en terre de barre ou servir d'appâts pour la pêche (§ Chapitre I). Aujourd'hui, avec l'urbanisation la plupart des constructions sont en briques et les coques n'ont plus d'usage. Pour les autres espèces, aucune valorisation des graines n'est connue au Bénin. La séparation convenable des différentes parties complétée par une caractérisation chimique fine pourrait ouvrir des possibilités de valorisation comme engrais, aliment du bétail ou matières premières industrielles (Figures 29 et 30).



28-a : Graines de *A. squamosa*
(Covè)



28-b : Graines de *A. indica*
(Abomey-Calavi)



28-c : Graines de *C. procera*
(Sakété)



28-d : Graines de *P. biglobosa*
(Zogbodomè)

Figure 28 : Les quatre graines sélectionnées

Nous avons collecté les fruits comportant des parties très humides qui ont été séparées en cascade au laboratoire comme le montre la Figure 29.

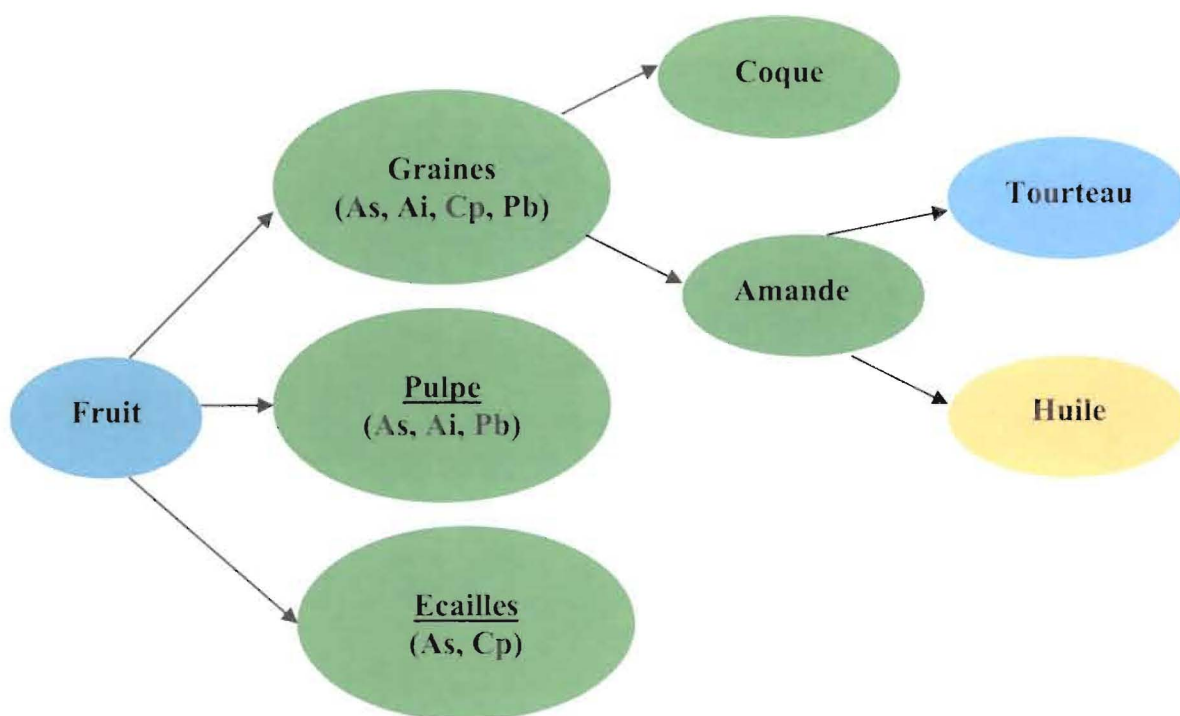


Figure 29 : Séparations successives des différentes parties des quatre graines sélectionnées

La Figure 30 donne les pourcentages pondéraux des différentes parties des graines obtenues à partir des échantillons collectés sur le terrain. Il ressort de cette synthèse que les trois espèces, à savoir *A. indica*, *A. squamosa* et *C. procera*, possèdent une teneur en huile très élevée, comprise entre 33 - 62 %MS-amande. Cette valeur élevée par rapport aux oléagineux cultivés au Bénin comme le coton et l'arachide (16 - 28 et 45 - 50 %MS-graine respectivement ; Kapseu *et al.*, 1997 et 1999), laisse espérer la possibilité d'extraire ces huiles par pression, donc par un procédé simple sans solvant. La caractérisation chimique des huiles pourrait permettre d'orienter leur valorisation vers des débouchés alimentaires ou industriels.

Les pourcentages de coques varient entre 33 et 46 %MS-graine, lesquelles seraient valorisables par voie énergétique par exemple, ce qui n'empêcherait pas l'extraction préalable de composés utiles le cas échéant. *A. indica* et *A. squamosa* après extraction de l'huile donnent des pourcentages de tourteaux élevés (30 et 42 %MS-graine respectivement) la valeur la plus élevée étant pour *P. biglobosa* (55 %MS-graine) (Figure 30). La caractérisation fine de cette partie de la graine pourrait permettre d'envisager l'utilisation des tourteaux dans l'alimentation du bétail ou comme engrais.

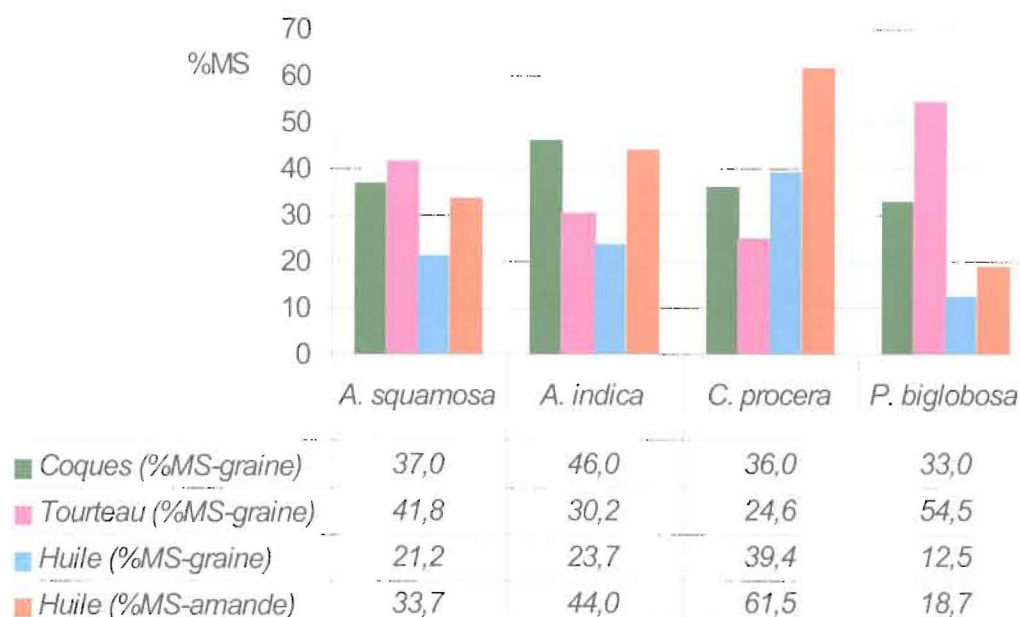
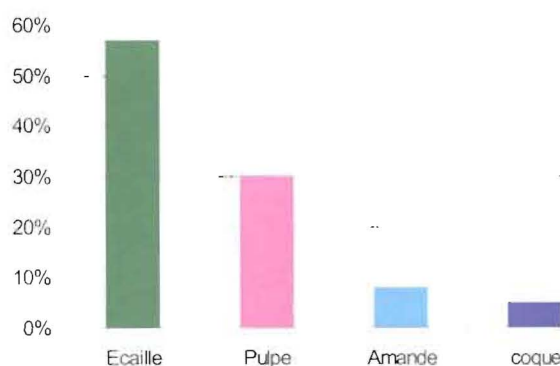


Figure 30 : Composition pondérale des différentes parties des graines : coque, tourteau d'extraction, huile

La Figure 31 qui complète la précédente montre les pourcentages des différentes parties du fruit mûr de *A. squamosa*, espèce sur laquelle porte l'essentiel de la thèse. L'épicarpe (protubérances écailleuses), constitue la majeure partie du fruit mûr (60 %MS-fruit) suivie de la pulpe, de l'amande et des coques (environ 30, 10 et 5 % respectivement). On connaît d'ores et déjà des applications alimentaires au Bénin pour la pulpe (consommation en l'état, fabrication de jus). Les autres parties à valoriser sont l'enveloppe d'écailles et la graine.

Cette thèse concerne la caractérisation fine des différentes parties de la graine pour les quatre espèces végétales choisies.

31-a : Fruit mûr de *A. squamosa*31-a Composition pondérale du fruit mûr de *A. squamosa* (%MS-fruit)Figure 31 : Importance pondérale des différentes parties du fruit mûr de *A. squamosa*

VII.4 Caractérisation chimique des différentes parties des quatre graines sélectionnées (coque, huile, tourteau délipidé)

Cette caractérisation porte sur les composants suivants :

- Coque : matière sèche, matière minérale, matière azotée, cellulose brute de Wende, lignine,
- Huile : indices (d'iode, d'acide, de peroxyde et de saponification); teneur en P, Ca et Mg ; composition en acides gras ; en stérols et tocophérols,
- Tourteau : matière sèche ; matière minérale ; matière azotée ; protéines totales ; composition en acides aminés ; cellulose brute de Wende ; lignine ; sucres totaux ; amidon.

VII.4.1 Caractérisation des coques des quatre graines sélectionnées

Le Tableau 13 présente les résultats de l'analyse des coques. Globalement la stabilisation post-récolte a été suffisante car les taux d'humidité sont de l'ordre de 10 % voire inférieurs (norme ISO 665 : 2000). Mis à part *P. biglobosa*, la biomasse collectée a été caractérisée dans sa totalité. Des investigations ultérieures devront permettre de compléter la caractérisation des coques de cette espèce.

Les coques de *A. squamosa*, *A. indica* et *C. procera* pour lesquelles la somme des composants est voisine de 100 % ont des teneurs en cellulose et lignine élevées (61 – 71 %MS-coque et 16,6 – 18,6 %MS-coque). Les teneurs en minéraux par contre sont faibles (0,8 – 2,3 %). Ce constat limite l'intérêt des coques de *A. squamosa*, *A. indica* et *C. procera* comme aliments du bétail et surtout comme engrais. Elles pourraient servir comme

combustibles grâce aux teneurs élevées en matière organique. Cependant les teneurs en matière grasse ou tout au moins en matière extractible avec l'hexane qui sont de bons combustibles sont assez faibles (1,2 – 4,0 %)

L'humidité de 10,8 % trouvée pour *P. biglobosa* serait liée aux résidus de pulpe jaune hygroscopique restée sur les coques lors du tri manuel. Les coques de *P. biglobosa* sont pauvres en fibres (24,6 %) et en lignine (11,4 %) mais sont relativement bien pourvues en éléments minéraux (5,1 %). Cette valeur est proche des teneurs en minéraux des tourteaux d'arachide, de coton et de soja (3 – 7 %), ce qui favoriserait leur utilisation en alimentation des ruminants et comme engrais, mais la teneur en matière azotée (5,7 %) est assez faible pour une telle utilisation.

Tableau 13 : Caractérisation des coques des quatre graines sélectionnées

(%MS, coque)	<i>A. squamosa</i>	<i>A. indica</i>	<i>C. procera</i>	<i>P. biglobosa</i>
Humidité	6,5	6,7	9,4	10,8
Matière sèche	93,5	93,3	90,6	89,2
Cendres	1,3	2,3	0,8	5,1
Matière grasse	4,0	3,0	1,2	4,8
Matière azotée	8,7	3,4	3,3	5,7
Cellulose brute de Wende (CBW)	61,0	71,0	67,7	24,6
Lignine	18,6	16,6	18,0	11,4
Total de la biomasse caractérisée (%MS-coque)	93,6/100,1*	96,3/103,2*	91,0/100,4*	51,6/57,8*

* pourcentages rapportés à la matière sèche

Le Tableau 14 donne les éléments minéraux dans les coques des quatre graines sélectionnées. Globalement, les coques sont principalement constituées de cellulose et ne constituent pas une source importante de protéines ni de matière minérale.

L'analyse détaillée des éléments minéraux montre que les proportions en N, P, K sont intéressantes surtout pour *A. squamosa* (1,4 ; 0,07 et 0,3 %MS-coque respectivement). *C. procera* contient les teneurs les plus faibles de la série (0,5, 0,01 et 0,2 %MS-coque respectivement). *P. biglobosa* contient (1,0 ; 0,07 et 1,4 %MS-coque respectivement de N, P, K). Ces valeurs sont néanmoins assez faibles pour qu'on envisage une application comme engrais. Il est à noter les teneurs relativement élevées en calcium (0,6 %), en sodium (148 ppm), manganèse (254 ppm) et en fer (85 ppm) des coques de *P. biglobosa*.

Tableau 14 : Eléments minéraux des coques des quatre graines sélectionnées

(%MS-coque)	<i>A. squamosa</i>	<i>A. indica</i>	<i>C. procera</i>	<i>P. biglobosa</i>
Azote (%)	1,4	0,5	0,5	1,0
Phosphore (%)	0,07	0,04	0,01	0,07
Calcium (%)	0,2	0,3	0,1	0,62
Magnésium (%)	0,07	0,04	0,04	0,26
Potassium (%)	0,3	0,2	0,2	1,4
Sodium (ppm)	15	11	29	148
Fer (ppm)	36	19	12	85
Cuivre (ppm)	14	8	7	9,5
Manganèse (ppm)	12	22	1	254
Zinc (ppm)	12	11	6	61

VII.4.2 Caractérisation des huiles des quatre graines sélectionnées

VII.4.2.1. Caractérisation chimique des huiles

Il faut tout d'abord noter sur le Tableau 15 que *P. biglobosa* possède la teneur en huile la plus faible de la série (18,7 %MS-amande) mais tout de même proche de la graine de coton (16 – 28 %MS-graine). Les teneurs en huile pour *A. squamosa* et *A. indica* (33,7 et 44,0 %MS-amande, respectivement) sont comparables à celle de l'arachide (45 – 53 %MS-graine) par exemple. L'huile de *C. procera* a la teneur en huile la plus élevée avec 61,5 %MS-amande, ce qui est assez exceptionnel.

Pour ce qui est de l'acidité qui donne une bonne indication de la qualité des échantillons collectés, elle est assez élevée pour *A. indica* et *C. procera* récoltées au sol (6,4 et 6,8 % respectivement) et peu élevée (1,3 et 2,0 %) pour *A. squamosa* et *P. biglobosa*. On peut considérer comme « raffinables » notamment les deux dernières huiles dont l'acidité est inférieure aux valeurs limites fixées pour la plupart des huiles marchandes brutes (soja, 6 % et tournesol, 4 %) (Codex Stan, 1999). De plus ces deux dernières huiles pourraient être consommées vierges si obtenues par pression, à condition de s'assurer de leur non toxicité.

Pour ce qui est de l'indice de peroxyde, autre critère de qualité des échantillons obtenus, il est élevé pour *C. procera* (15,5 meq d'O₂ /kg huile), résultat d'un contact avec l'oxygène de l'air suite par exemple à une attaque probable des fruits par des insectes ou des oiseaux. Les valeurs obtenues pour les autres huiles (5,3 – 9,9 meqO₂/kg huile) sont inférieures à 10 qui est la limite fixée par la norme pour les huiles végétales (Codex Stan, 1999).

Les indices de saponification sont assez élevés (161 - 188 mgKOH/g huile) et compatibles avec une prépondérance des acides gras en C18. Ces valeurs sont légèrement

inférieures aux indices de saponification des huiles végétales courantes au Bénin comme le soja (189-195 mgKOH/g huile), l'arachide (187-196 mgKOH/g huile) et le coton (189 - 198 mgKOH/g huile) (Codex Stan, 1999). Ces huiles, notamment celle de *C. procera* (188 mgKOH/g huile), pourraient trouver une application en savonnerie. On trouve d'ailleurs au Brésil du savon à base de *C. procera*.

Les indices d'iode calculés montrent le caractère moyennement insaturé et ces huiles devraient donc être relativement stables au stockage vis-à-vis de l'oxydation. Ces indices sont plus faibles que celui du soja (105 - 123) et du tournesol (110 - 143), mais du même ordre de grandeur que celui des huiles d'arachide (85 - 90), de coton (100 - 105) et d'olive (75 - 94) et de certaines huiles végétales d'origine africaine comme *Coula edulis* (90 - 95), *Canarium schwenfurthii* (71 - 95) (Kapseu *et al.*, 1999 ; Abaley *et al.*, 1999).

La teneur en insaponifiable est voisine de 1 %p-huile pour *A. squamosa* (1,0 %p-huile), *A. indica* (1,0 %p-huile) et *C. procera* (1,3 %p-huile) avec une valeur légèrement plus grande pour *P. biglobosa* (1,8 %p-huile). L'étude de la fraction insaponifiable montre que cette dernière, conformément à son taux élevé en insaponifiables (1,8 %p-huile), possède des teneurs élevées en stérols et surtout en tocophérols (2.720 et 882 ppm respectivement) gage d'une bonne résistance à l'oxydation.

La teneur en tocophérols de *P. biglobosa* est plus faible que celle de l'huile de soja brute (980 ppm), de l'ordre de grandeur de celle des huiles de germe de maïs (816 ppm) et de palme (718 - 818 ppm). Il faut noter la teneur plus faible en tocophérols de l'huile de *C. procera* (93 ppm), comparable à celle de l'olive (110 - 183 ppm) (Kamal-Eldin, 1997 ; Yan-Hwa, 1998; Al-Sager, 2004).

Enfin, les teneurs en phosphore sont faibles pour *A. squamosa*, *A. indica* et *P. biglobosa* (14 ; 12 et 25 ppm respectivement), contrairement à ce qui est attendu pour des huiles de graines extraites par solvant. La teneur extrêmement faible pour *C. procera* déroge complètement à la règle avec 1 ppm seulement. Ces teneurs sont convertibles en teneurs en PL, en faisant la supposition habituelle que l'essentiel du phosphore est sous forme d'esters glycéridiques (où les PL présentent une charge nette [-1]). Nous pouvons définir le rapport R qui est le rapport atomique des cations bivalents (Ca et Mg) sur les anions monovalents (P). Il permet de prévoir la prépondérance de l'une des classes de PL (hydratable et non hydratable).

$$R = \frac{\left(\frac{M}{T} Ca + \frac{M}{T} Mg^{2+} \right)}{\frac{M}{T} P} \times 2 \quad \text{(Equation 25)}$$

Où,

M : masse atomique des éléments,

T : teneur (ppm) des éléments, des cations bivalents

Ca^{2+} et Mg^{2+} correspondent aux PL non hydratables c'est-à-dire parfaitement liposolubles, par opposition aux PL hydratables qui traduisent une certaine instabilité au cours du stockage en cuverie industrielle, par absorption lente d'eau atmosphérique et précipitation pour former des « pieds de cuve » (Denise, 1982 ; Largueze, 1997).

Nous constatons que ce rapport est bien supérieur à 1 pour *A. squamosa* (1,5); *A. indica* (1,6), *P. biglobosa* (2,6), ce qui montre la prépondérance des phospholipides hydratables dans ces huiles. Par contre, comme attendu (au vu de sa teneur en phosphore), ce rapport est inférieur à 1 pour *C. procera* et laisse attendre la prépondérance dans cette huile des PL non hydratables. A l'opposé, il faut remarquer que ce rapport est particulièrement élevé pour *P. biglobosa* (2,6).

Il faudrait prévoir une étape de dégommeage au moins pour les trois premières huiles en cas de raffinage. Cette instabilité au stockage est très probable pour *P. biglobosa*. Par contre le risque de trouble est faible pour *C. procera* en raison de sa très faible teneur en PL. Il faut néanmoins considérer que les huiles de *A. squamosa* et *A. indica* qui sont extractibles par simple pression auraient certainement des teneurs en PL nettement plus faibles en appliquant cette technique et le raffinage pourrait être évité sous réserve de tests appropriés.

Il faut dire aussi que ces huiles extraites par solvant pour les besoins de l'étude possèdent déjà des teneurs en P comparables à celle d'huile de pression. La teneur exceptionnelle en phospholipides de l'huile de *P. biglobosa* (0,63 %p-huile) est comparable à celle du colza, l'une des plus riches (0,69 %p-huile) (Tran et Skiba, 2005).

Les propriétés physiques et chimiques des huiles présentées dans le Tableau 15 sont globalement en accord avec les données bibliographiques du Chapitre II, pour les résultats qui peuvent être comparés (Annexe 5).

Tableau 15 : Caractéristiques chimiques des huiles

Données physiques et chimiques	<i>A. squamosa</i>	<i>A. indica</i>	<i>C. procera</i>	<i>P. biglobosa</i>
Teneur en huile (%MS-amande)	33,7	44,0	61,5	18,7
Acidité oléique (%)	1,3	6,8	6,4	2,0
Indice de saponification (mgKOH/ g huile)	161	167	188	169
Indice de peroxyde (meq d'O ₂ /kg huile)	6,9	5,3	15,5	9,9
Indice d'iode calculé (g d'iode pour 100g)	92	75	69	91
Insaponifiable (%p-huile)	1,0	1,0	1,2	1,8
Tocophérols totaux (ppm)	142 ± 4	298 ± 14	93 ± 11	882 ± 70
Stérols totaux (ppm)	1340 ± 18	1880 ± 18	2490 ± 20	2720 ± 35
Phospholipides totaux (%p-huile)	0,35	0,30	0,04	0,63
Phosphore (ppm)	14	12	1	25
Calcium (ppm)	51	36	7	38
Magnésium (ppm)	29	25	6	45
Rapport atomique divalents / monovalents	1,5	1,6	0,6	2,6

VII.4.2.2 Analyse qualitative des huiles par CCM

Les rapports frontaux obtenus lors de l'analyse qualitative des huiles en CCM sont présentés dans le Tableau 16 (Photographie de la plaque de CCM à l'Annexe 9). Comme attendu, les triglycérides sont très largement majoritaires dans les huiles, ce qui corrobore leur faible dégradation par hydrolyse notée à partir de l'acidité. Les autres taches visibles correspondent à des classes de lipides connues sauf pour *P. biglobosa*. Les lipides polaires sont présents dans les huiles de *P. biglobosa* et *A. squamosa*. Des hydrocarbures insaturés probablement d'origine naturelle (squalène) sont détectés dans les huiles. Nous avons aussi noté un spot particulier ($R_f \sim 0,50$) lors de l'élution de l'huile de *P. biglobosa*. L'étude ultérieure de cette fraction devrait compléter la connaissance de la fraction insaponifiable. Cette huile n'ayant pas montré une activité termicide intéressante (§ Chapitre IX), nous n'avons pas poussé plus loin les investigations pour identifier cette fraction. Il n'en reste pas moins que l'identification ultérieure de cette fraction permettrait de trouver une singularité à cette huile qui contient rappelons-le des teneurs élevées en tocophérols (882 ppm), en stérols (2.720 ppm) et des phospholipides (0,63 %p huile).

Tableau 16 : Rapport frontal des différents composés par CCM des huiles

Composés	Rf des étalons	Huiles
Stérols	0,22	0,22
Monooléines	0,11	0,10 et 0,14
Acides gras libres	0,30	0,29
Tocophérols	0,33	-
Diglycérides	0,40	0,40
Triglycérides	0,63	0,63 (Majoritaire)
Squalène	0,97	0,90

VII.4.2.3 Composition en acides gras des huiles

Le Tableau 17 donne la composition pondérale en acides gras et montre que les huiles sont globalement de type oléique, mais. pour *P. biglobosa*, c'est l'acide linoléique C18 : 2 qui est majoritaire avec 41,2 %p-huile. De ce point de vue, elles ne se différencient pas de la plupart des huiles de grande consommation au Bénin et ailleurs comme arachide, coton, olive, tournesol (Kapseu *et al.*, 1997 et 1999 ; Grosso *et al.*, 2000) (Annexe 3).

Tableau 17 : Composition pondérale en acides gras des huiles

(%p-huile)		<i>A. squamosa</i>	<i>A. indica</i>	<i>C. procera</i>	<i>P. biglobosa</i>
Acide palmitique	C16:0	12,6	17,8	21,1	9,4
Acide palmitoléique	C16:1	-	0,2	0,4	-
Acide stéarique	C18:0	11,6	17,4	8,5	15,4
Acide oléique	C18:1	47,4	43,5	59,1	15,3
Acide linoléique	C18:2	25,4	18,7	8,1	41,2
Acide linolénique	C18:3	0,9	0,6	0,1	0,6
Acide arachidique	C20:0	0,9	1,3	1,2	4,0
Acide gadoléique	C20:1	0,2	0,1	0,2	0,7
Acide béhénique	C22:0	0,2	0,3	-	12,6
Total	(%)	99,2	99,9	98,7	99,2
Acides gras insaturés (AGPI)					
(% p huile)		73,9 (26,3)	62,9 (19,3)	67,5 (8,2)	57,9 (41,8)
Acides gras saturés	(% p huile)	26,1	27,1	22,5	42,1
Rapport AGPI / AGS		1	0,72	0,36	1

Les acides gras insaturés sont donc majoritaires, avec la prépondérance de l'acide oléique pour les huiles de *A. squamosa*, *A. indica* et *C. procera* (47,4 ; 43,5 ; 59,1 %p-huile respectivement). La teneur en acide linoléique (41,2 %p-huile) pour l'huile de *P. biglobosa* est proche de celle de l'huile de coton par exemple (Annexe 3). Les pourcentages des autres huiles sont proches d'autres oléagineux connus au Bénin (huile d'avocat, 15,5 %, pour *A. indica* ; *Canarium schwenfurthii* 28,8 %, pour *A. squamosa* ; karité 6,9 %, pour *C. procera*). Les acides gras saturés sont essentiellement constitués d'acides palmitique et stéarique et aucun acide gras inconnu selon Volker (1999), n'a été noté dans les chromatogrammes (Annexe 10).

Le rapport (AGPI / AGS) des pourcentages des acides gras polyinsaturés (AGPI) sur les acides gras saturés (AGS) est d'environ 1 pour *A. squamosa* et *P. biglobosa*, et inférieur à 1 (0,72 et 0,36 respectivement pour *A. indica* et *C. procera*). Ces valeurs sont assez faibles car elles doivent être comprises entre 1,25 et 1,50 pour que les huiles aient une valeur du point de vue médicale (Denise, 1982). Sur la base de leur composition en acides gras, toutes ces huiles pourraient offrir des possibilités de valorisation comme biocarburant (Ragauskas *et al.*, 2006).

Cette composition en acides gras des huiles correspond aux valeurs de la littérature (§ Chapitre II). Il faut toutefois remarquer que *C. procera* y est montré nettement moins riche en C18 :1 (37 – 49 %p-huile, comparé à 59 % pour notre échantillon) et en C18 :2 (14 – 25 %p-huile comparé à 8 % pour notre échantillon). Pour *P. biglobosa*, notre résultat est bien inférieur à celui de Akintayo (2004) qui a obtenu 27 %p-huile, alors que cet auteur ne mentionne pas la présence du C22 :0 pour lequel nous avons trouvé 12 %p-huile. Ces différences se reflètent ensuite dans les valeurs des indices de saponification et d'iode déjà mentionnées.

VII.4.2.4 Etude de la fraction stérolique des huiles

Le Tableau 18 et la Figure 32 donnent la composition en stérols individuels et rappellent les teneurs en stérols totaux des huiles analysées.

Les huiles de *P. biglobosa* et *C. procera* sont bien pourvues en stérols avec un total de l'ordre de 272 et 249 mg/100g respectivement (Tableau 18). Ces valeurs sont proches de celles connues dans la littérature pour l'huile de coton (292-308 mg/100g) (Philips *et al.*, 2002 ; Cercaci *et al.*, 2003). *A. indica* et *A. squamosa* présentent une teneur en stérols totaux (188 et 136 mg/100g, respectivement) plus faible que celle des deux huiles précédentes. Ces

huiles, notamment celle de *A. indica*, ont une teneur proche de celle de l'huile d'arachide (147 - 171 mg/100g).

Le β -sitostérol est toujours prépondérant (54 – 78 %p-huile) suivi du stigmastérol (11 – 29 %p-huile) et du campestérol (5 – 18 %p-huile) sauf pour *A. squamosa* pour laquelle l'ordre des deux derniers est inversé (Tableau 18). Pour ces stérols, les résultats de *P. biglobosa* ne contredisent pas les données de la littérature (§ Chapitre II) mais Akintayo (2004) a trouvé aussi 12 % p-huile de $\Delta 5$ -avénastérol alors que ce dernier n'est présent qu'à hauteur de 0,3 %p-huile dans notre échantillon. Nous n'avons pas trouvé de mention au sujet de la fraction stérolique des autres huiles dans la littérature. L'huile de *C. procera* présente quant à elle, une faible proportion de stérols (chromatogramme à l'Annexe 11) qui n'ont pu être identifiés par notre méthode (8 %p-huile). Elle comporte aussi la plus grande variété de stérols de la série avec notamment le $\Delta 5$ -avénastérol (4,8 %p-huile) et le $\Delta 5$ -24 stigmastadiénol (1 % p-huile).

Tableau 18 : Composition de la fraction stérolique des huiles

(%p-huile)	<i>A. squamosa</i>	<i>A. indica</i>	<i>C. procera</i>	<i>P. biglobosa</i>
Campestérol	17,8 ± 1,8	5,5 ± 1,4	5,7 ± 1,9	15,4 ± 2,0
Stigmastérol	12,5 ± 0,5	11,1 ± 0,3	19,3 ± 5,7	28,7 ± 1,0
β -Sitostérol	68,7 ± 1,9	77,7 ± 0,9	61,2 ± 0,9	54,0 ± 1,3
$\Delta 5$ -Avénastérol	0,5 ± 0,5	0,9 ± 0,1	4,8 ± 1,6	0,4 ± 0,1
$\Delta 5$ -24 Stigmastadiénol	-	0,7 ± 0,4	1,0 ± 4,4	0,9 ± 0,2
$\Delta 7$ -Stigmastérol	0,2 ± 0,0	-	-	0,3 ± 0,1
$\Delta 7$ -Avénastérol	0,3 ± 0,0	4,0 ± 0,2	-	0,3 ± 0,1
Total	100	99,1	92,0	100
Stérols totaux (mg/100g huile)	136 ± 8	188 ± 8	249 ± 15	272 ± 3

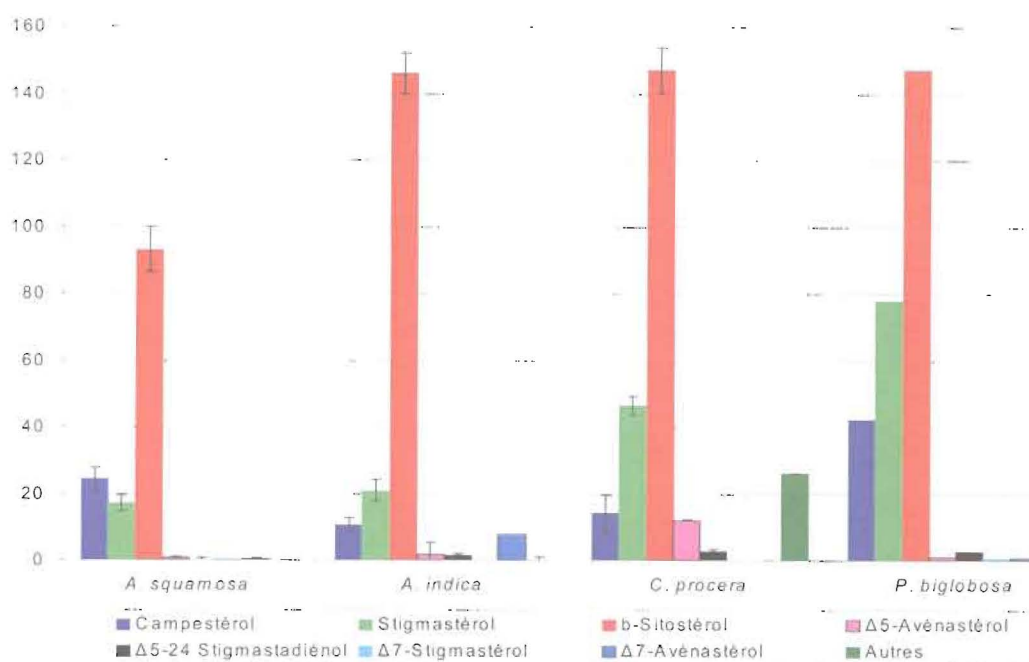


Figure 32 : Teneurs en stérols des huiles

VII.4.2.5 Etude de la fraction tocophérolique des huiles

Les coefficients de régression des courbes d'étalonnage des standards de tocophérols sont très proches de 1, ce qui est donc satisfaisant pour cette méthode de dosage par CLHP avec étalon externe (Annexe 12). Il en est de même pour les écart-types en général très inférieurs à 10 % (Tableau 19).

Le Tableau 19 et la Figure 33 présentent la composition de la fraction tocophérolique et les teneurs en tocophérols des huiles. Cette fraction est essentiellement constituée de α , γ , δ - tocophérols, avec la prépondérance du γ - tocophérol dans les huiles de *A. squamosa* et *A. indica* (73,5 et 67,3 % des tocophérols totaux respectivement) qui présentent des profils comparables et des teneurs en tocophérols plutôt moyennes avec 143 et 298 ppm respectivement (Annexe 13). L'huile de *P. biglobosa* est caractérisée par sa concentration très élevée en tocophérols totaux (882 ppm) avec la prépondérance en α -tocophérol (619 ppm) contrairement aux deux huiles précédentes. Cette teneur exceptionnelle qui la rapproche des huiles de palme et de soja (Appelquist, 1997 ; Yan-Hwa, 1998 ; Al-Sager, 2004) doit lui conférer une bonne protection vis-à-vis de l'oxydation.

A l'opposé, l'huile de *C. procera* possède la plus faible teneur en tocophérols totaux (92 ppm) soit environ le dixième de celle de l'huile de *P. biglobosa*. Elle contient 39 %p-huile de δ -tocophérol de la fraction, soit 35,8 ppm ce qui la singularise dans la série. Cette

huile ne paraît pas bien protégée contre l'oxydation et des précautions particulières seraient à prendre pour son stockage. Evidemment, en cas d'exploitation, il conviendrait de tester les stabilités oxydatives de ces huiles pour des échantillons obtenus selon le procédé appliqué (pression, hexane, CO₂ SC).

$$\text{Le rapport } R = \frac{\alpha\text{-tocophérol (mg/100 ghuile)}}{\%AGPI} \quad (\text{Equation 25})$$

Où,

AGPI : pourcentage d'acides gras polyinsaturés

Ce rapport est inférieur à 0,6 pour toutes les huiles sauf celle de *P. biglobosa* où comme attendu sur la base de sa composition en acides gras, ce rapport est nettement supérieure à 1 (1,48). Il est en effet nécessaire de respecter un certain équilibre entre AGPI et vitamine E (Denise, 1982). Selon certains scientifiques, ce rapport doit être égal ou supérieur à 0,6 pour que l'huile ait une valeur médicale. Seule l'huile de *P. biglobosa* serait intéressante de ce point de vue.

Tableau 19 : Composition de la fraction tocophérolique des huiles

(%/Tocophérols totaux)	<i>A. squamosa</i>	<i>A. indica</i>	<i>C. procera</i>	<i>P. biglobosa</i>
A-tocophérol (%)	26,5 ± 0,4	30,8 ± 0,0	32,5 ± 2,0	70,2 ± 0,9
B-tocophérol (%)	-	-	16,7 ± 1,9	-
Γ-tocophérol (%)	73,5 ± 0,3	67,3 ± 0,3	12,2 ± 2,0	29,8 ± 0,9
Δ-tocophérol (%)	-	9,6 ± 0,3	38,9 ± 5,3	-
Tocophérols totaux (ppm)	143 ± 4	298 ± 14	92 ± 1,7	882 ± 70
$R = \frac{\alpha\text{-tocophérol (mg/100 ghuile)}}{\%AGPI}$	0,14	0,48	0,36	1,48

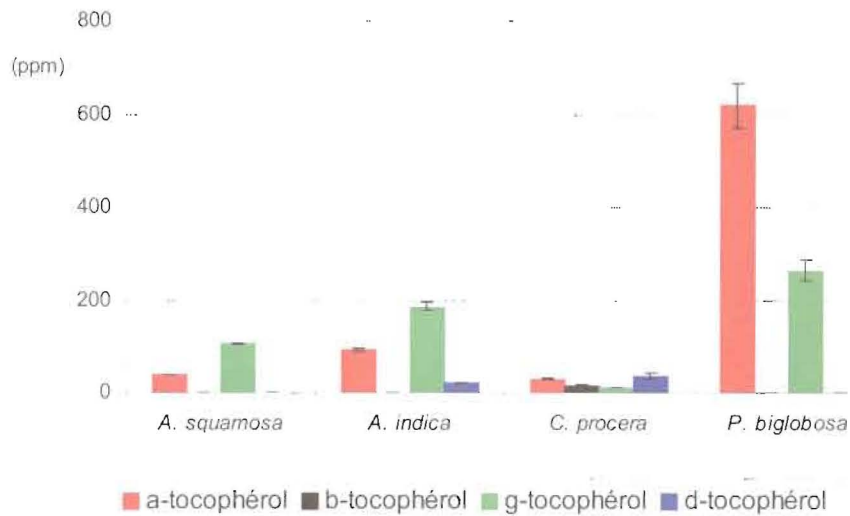


Figure 33 : Teneurs en tocophérols des huiles

Ces huiles sont essentiellement constituées de triglycérides composés d'acides gras courants. L'huile de *P. biglobosa*, caractérisée par un indice d'iode peu élevé, une acidité faible et une teneur élevée en stérols et surtout en tocophérols pourrait être utilisée en alimentation. Les autres huiles pourraient être utilisées en savonnerie ou comme biocarburant.

VII.4.3 Caractérisation des tourteaux d'extraction des quatre graines sélectionnées

VII.4.3.1 Composition chimique

Le Tableau 20 donne les résultats de la caractérisation chimique des tourteaux d'extraction. Avec un total des composés analysés de 89, 81, 95 et 92 %MS-tourteau respectivement pour *A. squamosa*, *A. indica*, *C. procera* et *P. biglobosa*. On peut considérer que le taux de caractérisation est globalement satisfaisant. Les taux d'humidité sont tous inférieurs à 9 % ce qui devrait permettre le stockage.

D'une façon générale, nous constatons sur ce tableau que la matière azotée et les protéines constituent le composant principal des quatre tourteaux (25 – 49 et 20 – 31 %MS-tourteau) alors que les proportions des autres composants sont variables. Les proportions de protéines totales des tourteaux de *A. indica* et *P. biglobosa* (31 %MS-tourteau) sont comparables aux données de la littérature (36,8 %MS-tourteau) concernant les graines de *Balanites aegyptiaca* (Cook *et al.*, 1998) ; et le tourteau d'arachide (26 – 42 %MS) et de coton (28 – 50) présentées à l'Annexe 14. Ces valeurs sont plus faibles que celle du tourteau de soja (36 – 53 %MS-tourteau) (Lusas et Hernandez, 1997), et plus élevées que celles des tourteaux

de colza et de tournesol (20 – 25 %MS). Les teneurs en protéines des tourteaux de *A. squamosa* et *C. procera* (25,5 et 20,2 %MS-tourteau respectivement) sont les plus basses de la série et se rapprochent de celles du colza et du tournesol.

Si l'on considère chaque tourteau individuellement, *A. squamosa* présente quant à lui, la plus forte teneur en cellulose brute (28,3 %MS-tourteau) et en lignine (7,2 %MS-tourteau). La matière azotée est relativement faible (28,6 %MS-tourteau) ce qui limiterait son utilisation comme aliment du bétail. *A. indica* contient une forte teneur en matière azotée (49,2 %MS-tourteau), une proportion moyenne de matière minérale (5,3 %MS-tourteau) et une faible proportion de cellulose (4,1 %MS-tourteau), mais surtout de lignine (1,9 %MS-tourteau), ce qui destinerait ce tourteau à une utilisation potentielle comme aliment du bétail si l'on parvient à extraire les principes amérisant à l'éthanol par exemple (Rao, 1987). Cette opération présenterait aussi l'avantage d'abaisser la teneur en matière grasse (6,4 %MS-tourteau), ce qui serait préférable pour le bétail.

Pour le tourteau de *C. procera*, la teneur en matière minérale est assez élevée (8,3 %MS-tourteau), cette valeur est supérieure à celles des tourteaux d'arachide, de coton, et de soja (3 – 7 %MS-tourteau) présentée à l'Annexe 14 utiles dans les aliments et les engrais. La teneur en matière grasse résiduelle est assez élevée dans le tourteau de *C. procera* (19,2 %MS-tourteau) par rapport aux données sur le tourteau d'arachide, de coton et de soja (0,6 – 5 %MS-tourteau) (Annexe 14). Le tourteau de *C. procera* peut donc servir comme source énergétique pour certains animaux à condition qu'il ne soit pas sujet au rancissement. Cette valeur exceptionnelle pourrait s'expliquer par une proportion élevée en lipides polaires et/ou par une position particulière de ces lipides dans la matrice végétale. Cette observation est à rapprocher de la teneur exceptionnellement basse de l'huile en phosphore trouvée précédemment (1 ppm seulement). Il est probable que les lipides polaires, les phospholipides notamment ne soient pas extractibles avec l'hexane et nécessitent impérativement une attaque acide préalable qui permet de détruire les parois cellulaires). De plus les teneurs en cellulose brute et lignine assez faibles (12,1 et 7,7 %MS-tourteau) font du tourteau de *C. procera* un composant intéressant pour les animaux, hors polygastriques.

La situation est un plus favorable pour *P. biglobosa* dans ces deux domaines d'applications (engrais et aliment des animaux). On sait déjà que les graines de *P. biglobosa* servent dans l'alimentation humaine au Bénin et en Afrique de l'Ouest et ces analyses confirment sa valeur nutritionnelle. En effet, sa teneur en matière azotée (33,5 %MS-tourteau) et en protéines (31 %MS-tourteau) élevée, en revanche ses teneurs en cellulose brute

(13,0 %MS-tourteau) et en lignine (7,0 %MS-tourteau) sont assez faibles mais une teneur en amidon et en sucres assez importante (13,6 et 8,5 %MS-tourteau).

Les données du Tableau 20 sont comparables aux données de la littérature présentées à l'Annexe 14. On remarque néanmoins une teneur plus élevée en fibres (8 – 26 %MS-tourteau) soit au moins le double par rapport à notre résultat. Inversément, la teneur en matière grasse n'est pas aussi singulièrement élevée que dans notre échantillon, alors que c'est l'inverse pour la teneur en fibres. Pour *P. biglobosa*, la teneur en cendre est nettement inférieure à notre résultat (1,2 et 5,7 %MS-tourteau respectivement).

Tableau 20 : Caractérisation des tourteaux d'extraction

(%MS-tourteau)	<i>A. squamosa</i>	<i>A. indica</i>	<i>C. procera</i>	<i>P. biglobosa</i>
Humidité	6,7	4,6	7,6	8,6
Matière sèche	93,3	95,4	92,4	91,4
Cendre	3,2	5,3	8,3	5,7
Matière grasse	8,2	6,4	19,2	2,8
Matière azotée/protéines totales	28,6/25,5	49,2/31,5	25/20,2	33,5/31,1
Amidon	1,7	1,1	2,9	13,6
Sucre	5,9	9,6	12,4	8,5
Cellulose Brute (CBW)	28,3	4,1	12,1	13,0
Lignine	7,2	1,9	7,7	7,0
Total de la biomasse caractérisée	89	81	95	92

VII.4.3.2 Composition de la fraction minérale des tourteaux d'extraction

Le Tableau 21 montre la teneur en éléments minéraux des tourteaux d'extraction. Les teneurs relativement élevées en N, P, K pour le tourteau de *A. squamosa* (4,7 ; 0,5 et 0,3 %MS-tourteau) pourraient favoriser son utilisation dans des formulations d'engrais.

Les teneurs assez élevées en N, P, K pour *A. indica* (8,1 ; 0,8 ; 0,3 % MS-tourteau) permettraient son utilisation comme engrais. Son tourteau est pauvre en sodium (202 ppm) Le tourteau de *C. procera* est pauvre en différents éléments minéraux, mais exceptionnellement pourvu en sodium (1.574 ppm).

Le tourteau de *P. biglobosa*, avec 0,6 et 0,4 % MS-tourteau respectivement en Ca et en Mg et 135 et 117 ppm, respectivement en Fe et Mn confirment l'intérêt nutritionnel du condiment « *Afitin* », préparation dérivée de ses graines au Bénin et en Afrique de l'Ouest.

Tableau 21 : Eléments minéraux dans les tourteaux d'extraction

(/MS-tourteau)		<i>A. squamosa</i>	<i>A. indica</i>	<i>C. procera</i>	<i>P. biglobosa</i>
Azote	(%)	4,7	8,1	4	5,4
Phosphore	(%)	0,5	0,8	0,7	0,4
Calcium	(%)	0,3	0,3	0,2	0,6
Magnésium	(%)	0,3	0,5	0,5	0,4
Potassium	(%)	0,9	2,6	3,6	1,5
Sodium	(ppm)	104	202	1574	76
Fer	(ppm)	75	107	97	135
Manganèse	(ppm)	25	31	16	117
Cuivre	(ppm)	33	25	32	16
Zinc	(ppm)	56	56	41	48

VII.4.3.3 Composition des acides aminés des tourteaux d'extraction

Le Tableau 22 donne la composition en acides aminés des tourteaux d'extraction. Les teneurs en acides aminés essentiels pour les humains (isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, valine), sont dans la gamme de 1,6 - 2,7 %MS-tourteau pour la leucine. Les teneurs pour les autres acides aminés essentiels sont dans la gamme de (1 - 1,6 % MS-tourteau). Cependant les teneurs en méthionine sont faibles (0,3 - 0,4 % MS-tourteau). Il faut remarquer la teneur exceptionnellement élevée dans la série pour la lysine en ce qui concerne *P. biglobosa* (2,4 % MS-tourteau), les autres espèces ayant respectivement 1,2 ; 1,2 et 0,9 % MS-tourteau pour *A. squamosa*, *A. indica* et *C. procera*, ainsi que 2,3 % MS-tourteau de leucine et 2,4 % MS-tourteau pour *A. indica*.

La composition en acides aminés de *A. indica* et *P. biglobosa* est comparable à celle de soja présentée à l'Annexe 15 (Lusas et Hernandez, 1997). Ces données confirment la valeur nutritionnelle des graines de *P. biglobosa* et de l'utilité de celles de *A. indica* dans l'alimentation du bétail si l'on parvient à isoler les principes amérisants.

Tableau 22 : Composition en acides aminés des tourteau d'extraction

(%MS-tourteau)	<i>A. squamosa</i>	<i>A. indica</i>	<i>C. procera</i>	<i>P. biglobosa</i>
Arginine	3,1	2,7	2,0	2,1
Histidine	0,4	0,5	0,5	0,8
Isoleucine*	1,0	1,2	0,7	1,6
Leucine*	2,3	2,4	1,6	2,7
Lysine*	1,2	1,2	0,9	2,4
Méthionine*	0,3	0,4	0,2	0,3
Phénylalanine*	1,1	1,4	1	1,8
Thréonine*	0,9	1,0	0,8	1,0
Valine*	1,2	1,8	0,9	1,6
Alanine	1,6	1,6	1,1	1,8
Acide aspartique	2,5	2,7	2,0	3,3
Acide glutamique	4,5	8,6	4,7	5,7
Glycine	1,7	1,4	1,1	1,7
Serine	1,2	1,4	1,1	1,4
Tyrosine	0,9	0,7	0,6	1,4
Cystéine	0,1	0,1	0,2	0,2
Proline	1,7	1,6	1,9	1,6

* en gras les acides aminés essentiels détectés

VII.5 Conclusion

Ce chapitre a permis de caractériser la biomasse issue des graines des quatre oléagineux sélectionnés au tout début de ce travail, plus précisément les coques, les huiles et les tourteaux d'extraction. Les analyses ont permis d'identifier (sauf pour *P. biglobosa*) au moins 90 % de la graine du point de vue pondéral, soit par grande classe de composants (lipides, protéines, glucides et lignocelluloses) soit de façon plus détaillée pour certaines classes présentant un intérêt particulier en termes de débouchés (acides aminés, lipides) mais aussi du point de vue du procédé de fractionnement de la biomasse et d'extraction des composés insecticides domaine sur lequel porte les deux chapitres suivants (§ Chapitres VIII et IX). La caractérisation devra être poursuivie pour *P. biglobosa*.

Cette étude a permis d'accéder à des données non disponibles dans la littérature pour *A. squamosa* et de réactualiser celles concernant *C. procera*. Nous avons pu compléter celles concernant *P. biglobosa* concernant les stérols et les tocophérols de la fraction insaponifiable.

Les huiles qui représentent une fraction pondérale importante de la graine, mais surtout de l'amande après séparation de la coque, pourraient être extraites par simple pression, sans solvant, ce qui présente un avantage pour une exploitation artisanale en termes de simplicité de mise en œuvre mais aussi de sécurité et de qualité du produit et d'impact environnemental. Ces huiles sont d'une composition courante quoique l'une d'entre elles, en l'occurrence *P. biglobosa*, soit particulièrement riche en composés d'intérêt diététique (acide linoléique, phytostérols, tocophérols) ou tout simplement pour garantir sa stabilité au stockage ou en friture. D'une façon générale leur caractère faiblement insaturé et le faible pourcentage de C18 :3 (< 1 %p-huile) les destinerait à un tel usage. *C. procera* serait une source de C18 :1 intéressante pour la chimie (59 %p-huile) ; une variété de tournesol dite « oléique » a par exemple été créée dans ce même but.

Une mention particulière doit être faite au sujet de *P. biglobosa* dont la graine est utilisée pour la fabrication du condiment « *afitin* », très prisé au Bénin et dans la sous-région ouest-africaine. Nous avons en effet confirmé sa richesse en composants d'intérêt diététique (stérols, tocols, acides aminés essentiels, oligoéléments) qui donne raison aux savoir-faire et traditions ancestraux. Pour les autres huiles et tourteaux d'extraction sélectionnés sur la base de la présence d'insecticides naturels, il conviendrait de s'assurer de leur parfaite adaptation à un usage alimentaire. On peut déjà anticiper que l'étape d'extraction des insecticides devrait aussi retirer de l'huile et du tourteau des composés indésirables, tels les principes amérissants de *A. indica* (nimbine). Les tourteaux seraient utiles pour l'apport de protéines et d'autres composants, suivant le cas, pour la formulation d'aliments pour animaux.

La troisième fraction de la biomasse, les coques, pourrait déjà trouver, par défaut, une utilisation comme combustible, notamment comme substitut de bois de feu, mais il faut mentionner que l'exploitation de son intérêt comme source de composés extractibles n'a pas été menée dans le cadre de cette thèse.

Chapitre VIII

Obtention des extraits Essai de caractérisation chimique

VIII.1 Introduction

VIII.2 Obtention des extraits

VIII.3 Essai de caractérisation des extraits

VIII.4 Caractérisation chimique des fractions de chromatographie
(CLHP/SM et RMN)

VIII.5 Conclusion

Chapitre VIII

Obtention des extraits - Essai de caractérisation chimique

VIII.1 Introduction

Dans le but de tester l'activité insecticide, des extraits ont été préparés dans des conditions compatibles avec une application à plus grande échelle, à savoir avec l'hexane, le binaire éthanol/eau en différentes proportions et le CO₂ SC avec ou sans co-solvant (éthanol). Une panne survenue sur le pilote de CO₂ SC n'a pas permis d'approfondir l'étude et d'obtenir des extraits dans les conditions requises afin de les tester sur termites. Dans l'optique d'un procédé à faible impact environnemental, la piste éthanol/eau a été privilégiée (éthanol/eau). Nous avons évalué l'influence de la polarité du solvant sur l'activité des extraits, ce qui a permis de caractériser les points d'équilibre et les transferts d'extractibles entre phase liquide et phase solide, et de proposer les conditions d'extraction. Afin de cerner la nature des composés susceptibles de participer à l'activité termicide, des essais de purification ont été nécessaires faisant intervenir la partition liquide-liquide et la chromatographie préparative. Les fractions supposées enrichies sur la base des tests d'activité sont alors soumises à diverses analyses qualitatives afin de caractériser les extraits de *A. squamosa*.

Des extraits d'amande de *A. squamosa* ont été analysés par CCM pour déceler la présence de lipides et d'acétogénines, *via* une dérivatisation pour ces dernières ; un essai de détection des acétogénines par spectroscopie UV dans les extraits a aussi été effectué.

La complexité de l'analyse des composés mineurs à activité termicide a été contournée *via* l'analyse élémentaire (C, H, N, O) des extraits les plus actifs afin de les comparer aux pourcentages calculés pour certaines acétogénines de la littérature. Enfin la démarche vers l'identification de certains composés termicides dans les extraits a été poursuivie par couplage CLHP/SM et par RMN en collaboration avec l'INRA (Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques).

VIII.2 Obtention des extraits

Les extraits sont obtenus par trois méthodes différentes :

- extraction en Soxhlet à 69 °C avec de l'hexane,
- extraction en contacteur fermé agité à la température de 20 °C avec différents solvants,
- Partition liquide-liquide d'extraits suivie du fractionnement sur colonne de silice.

Plusieurs solvants ont été testés pour *A. squamosa*, couvrant une large gamme de polarité depuis l'hexane jusqu'à l'eau, incluant différents binaires hydroéthanoliques et hydroacétoniques.

Les protocoles sont décrits en Partie Matériels et Méthodes (§ Chapitre V), et les résultats présentés dans ce chapitre sont la moyenne de trois essais pour chaque protocole, ce qui a permis d'accéder à l'écart-type et de pouvoir discuter les résultats sur cette base.

VIII.2.1 Obtention d'extraits hexaniques

Les huiles sont obtenues avec l'hexane de deux façons :

- par la méthode normalisée en Soxhlet pour obtenir les huiles,
- par extraction en contacteur fermé à 20 °C pour obtenir l'extrait hexanique sans risquer de dégrader les composés thermosensibles.

VIII.2.1.1 Obtention des huiles en Soxhlet

Il nous a paru utile de déterminer le taux d'extraction après la durée recommandée par la norme, et ensuite de réaliser quatre étapes successives d'extraction de 24 h chacune, ce qui permet la récupération totale et rapide des extractibles avec l'hexane comme attendu (Figure 34). On constate donc que la deuxième étape de 24 h permet de récupérer une quantité qui représente seulement 1 % de l'extrait précédent. Le Tableau 23 donne le rendement final présenté au Chapitre VII aux erreurs d'expérience près. Sans préjuger de l'activité termicide, il faut constater que les rendements ne sont pas équivalents puisqu'ils varient du simple au triple entre *P. biglobosa* et *A. indica*.

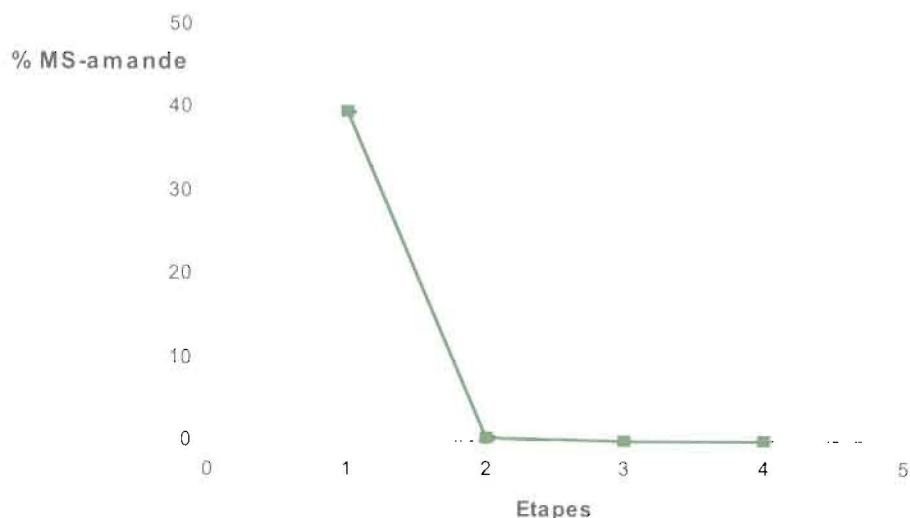


Figure 34 : Rendement d'extraction d'amande de *A. squamosa* en Soxhlet

Tableau 23 : Rendement en extraits hexaniques pour les quatre graines sélectionnées (Soxhlet et batch)

Espèces (amande)	Code de l'extrait	Humidité de l'amande (%)	Taille des Particules (mm)	Rendement en extrait (%MS- amande)	Observations
<i>A. squamosa</i> (As)	H - As	7,0	0,8 - 1	40,1 ± 0,0	Huile Jaune orangé
<i>A. indica</i> (Ai)	H - Ai	9,0	0,8 - 1	44,0	Huile Brun verdâtre
<i>C. procera</i> (Cp)	H - Cp	5,0	0,8 - 1	61,5	Huile Jaune clair
<i>P. biglobosa</i> (Pb)	H - Pb	9,1	0,8 - 1	18,7	Huile visqueuse Orange

VIII.2.1.2 Obtention d'extrait hexaniques de *A. squamosa* à 20 °C

La délipidation « à froid » est préférable afin de ne pas risquer de dégrader les composés actifs. Sur la Figure 35 est présentée l'extraction pour *A. squamosa* en « batch » avec l'hexane. L'écart-type est supérieur à celui trouvé pour l'extraction en Soxhlet. On remarque que si l'on obtient la majorité des extractibles dès la première étape, la quantité de lipides obtenue à la deuxième et troisième extraction, n'est pas négligeable puisqu'elle représente environ le quart du premier extrait. Il faut donc que la délipidation « à froid » se fasse en trois étapes pour être complète. Le rendement (42 %MS-amande) est légèrement supérieur selon ce protocole par comparaison à l'extraction en Soxhlet (40 %MS-amande).

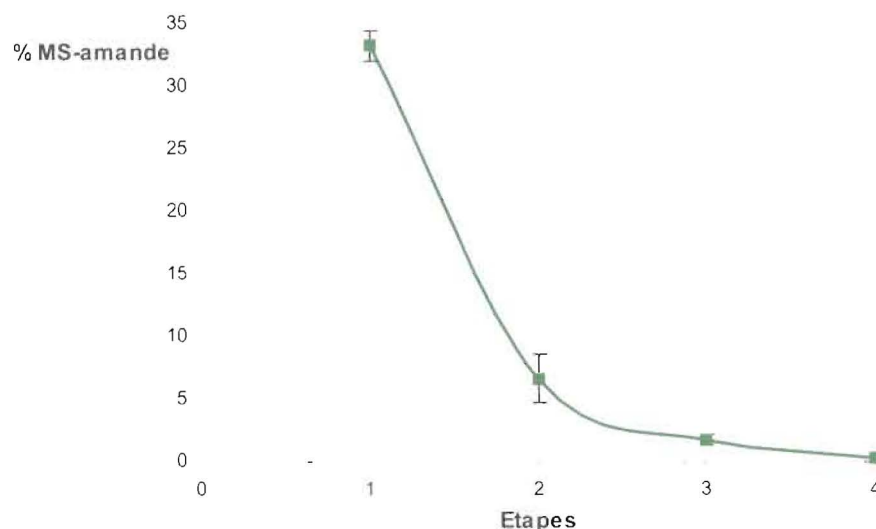


Figure 35 : Rendement d'extraction d'amande de *A. squamosa* par étape avec l'hexane à 20 °C

VIII.2.2 Obtention d'extraits hydroacétoniques (80/20 v/v)

Le Tableau 24 présente les rendements en extraits des amandes de *A. squamosa*, *A. indica*, *C. procera*. *P. biglobosa* n'a pas été incluse à cette série, les premiers tests d'activité termicide n'ayant pas été encourageants (§ chapitre IX). Après trois extractions successives, le rendement le plus élevé est observé pour *C. procera* (17,0 %MS-amande) mais il reste éloigné de la teneur en huile de cette espèce trouvée au Chapitre VII (61,5 % MS-amande). Ceci pourrait justifier l'activité termicide faible observée pour cet extrait (§ chapitre IX). En ce qui concerne *A. squamosa* et *A. indica* les rendements sont sensiblement les mêmes (8,5 et 8,3 %MS-amande respectivement) et bien inférieurs au rendement en extrait hexanique (40 – 44 %MS-amande). Du point de vue du rendement, nous pouvons en déduire que l'acétone pourrait convenir pour l'extraction de composés insecticides d'amande de *C. procera*.

Tableau 24 : Rendement en extrait hydroacétonique d'amandes de As, Ai, Cp

Espèces (amande)	Code de l'extrait	Humidité de l'amande (%)	Taille des Particules (mm)	Rendement en extrait (%MS-amande)	Observations
<i>A. squamosa</i> (As)	AW – As/Ex	7,0	0,8 - 1	8,5	liquide jaune clair
<i>A. indica</i> (Ai)	AW – Ai/Ex	9,0	0,8 - 1	8,3	idem
<i>C. procera</i> (Cp)	AW – Cp/Ex	5,0	0,8 - 1	17,0	idem

VIII.2.3 Obtention d'extraits hydroéthanoliques

La bibliographie relative à l'extraction des composés insecticides à partir d'*A. squamosa* ne fournissant pas d'informations précises, nous avons donc étudié l'influence de certains paramètres sur le rendement d'extrait : composition du binaire hydroéthanolique, rendement pondéral de l'extraction, influence de la granulométrie de la poudre d'amandes. Par contre la température a été maintenue constante, les essais préliminaires ayant montré une moindre activité termicide pour l'extrait obtenu à 69 °C par comparaison à 20 °C.

VIII.2.3.1 Obtention d'extraits hydroéthanoliques 80/20, v/v

Le Tableau 25 présente les rendements en extraits hydroéthanoliques après trois étapes. *A. indica* a donné le meilleur taux (25,0 %MS-amande) par rapport aux deux autres, à savoir : *A. squamosa* (12,1 %MS-amande) et *C. procera* (13,6 %MS-amande). On verra au chapitre IX que ce taux élevé observé pour *A. indica* n'a pas pour autant favorisé son activité termicide. Ces valeurs sont plus grandes que celles obtenues avec le binaire acétone/eau 80/20 au paragraphe précédent pour *A. squamosa* et *A. indica*, par contre c'est l'inverse pour *C. procera*, ce qui montre la sélectivité différente de ce mélange.

Tableau 25 : Rendement en extrait hydroéthanolique d'amande de As, Ai, Cp

Espèces (amande)	Code de l'extrait	Humidité de l'amande (%)	Taille des Particules (mm)	Rendement en extrait (%MS-amande)	Observations
<i>A. squamosa</i> (As)	EW – As/Ex	7,0	0,8 - 1	12,1	liquide jaune clair
<i>A. indica</i> (Ai)	EW – Ai/Ex	9,0	0,8 - 1	25,0	idem
<i>C. procera</i> (Cp)	EW– Cp/Ex	5,0	0,8 - 1	13,6	idem

VIII.2.3.2 Etude des conditions d'extraction en milieu hydroéthanolique pour *A. squamosa*

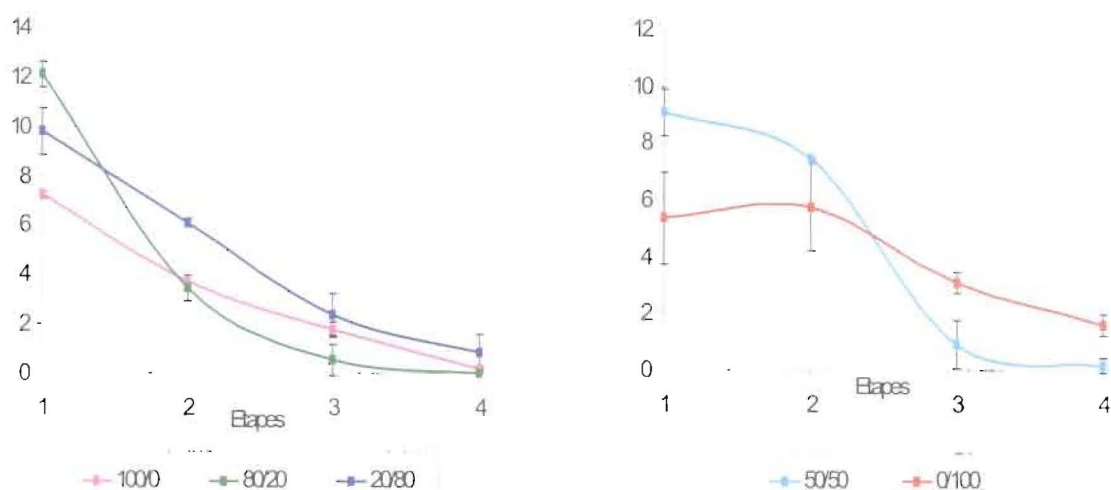
Cette étude a été réalisée après plusieurs séries de tests sur termites ayant conduit au choix de *A. squamosa* pour la suite. Les paramètres expérimentaux influents ont donc été étudiés avec *A. squamosa* seulement et pour le milieu hydroéthanolique, ce dernier paraissant préférable à l'acétone (facilité d'obtention par fermentation de biomasse, faible toxicité pour les opérateurs d'un atelier de production, connotation moins « chimique » que l'acétone auprès

des consommateurs). Le tourteau délipidé avec l'hexane a été choisi comme substrat dans le but d'éviter la dilution des composés actifs par les lipides non polaires. Le temps de contact pour chaque étape a été réduit à 24 h, par rapport à 72 h au paragraphe précédent, afin de faciliter les expérimentations ; toutefois il a été maintenu suffisamment long pour espérer atteindre l'équilibre entre les phases.

On peut remarquer à la Figure 36 que les écarts-types obtenus pour les extraits avec EW-Asdef/Ex 20/80 (Extrait Ethanol/Eau 20/80 avec *A. squamosa* délipidé (def pour defatted) et 0/100 sont les plus élevés. Ceci peut s'expliquer par le fait que plus la composition du solvant est riche en eau, plus le mélange [solvant + poudre] est « pâteux » et ce phénomène d'agrégation empêche probablement une extraction efficace par la limitation diffusionnelle qui en résulte. On verra plus loin que cette agrégation de la poudre, aléatoire d'un essai à l'autre dans le cas de l'eau pure, doit participer à la plus grande variabilité des résultats avec ce solvant.

Les séries avec l'éthanol pur et avec les binaires éthanol/eau 50/50, 20/80 et 0/100 montrent que la quantité d'extrait obtenue diminue d'une étape à la suivante et ce de façon pratiquement linéaire (Figure 36). Par contre pour l'extrait avec le binaire éthanol/eau 80/20, on récupère presque tout le produit dès la première extraction. En règle générale, la proportion d'extrait obtenue à la quatrième étape est négligeable, sauf pour l'eau pure qui se singularise encore. Du point de vue du rendement pondéral cumulé sur trois étapes (durée d'obtention des extraits testés), on remarque que plus le solvant d'extraction est riche en eau, plus la quantité de composés recueillie est élevée (Figure 37). Mais l'extrait avec de l'eau pure ne suit pas cette règle, soit du fait du problème de mouillage du solide (mélange pâteux) soit du fait de la polarité trop élevée. L'eau pure n'est probablement pas le solvant le mieux adapté.

Cette étude avec le binaire hydroéthanolique montre donc l'influence notable de la polarité du solvant sur le déroulement de l'extraction. De ce point de vue il serait plus intéressant de procéder avec le binaire éthanol/eau 80/20, car dès la première étape, on recueille la majorité des extractibles. Par contre au plan du rendement pondéral, le binaire éthanol/eau 20/80 donne le meilleur résultat (2,14 g d'extrait soit 19,1% MS-tourteau).



36-a : Rendement d'extrait par étape en fonction de la composition du mélange éthanol/eau

36-b : Rendement d'extrait par étape en fonction de la composition du mélange éthanol/eau

Figure 36 : Rendement en extraits par étape des extraits hydroéthanoliques

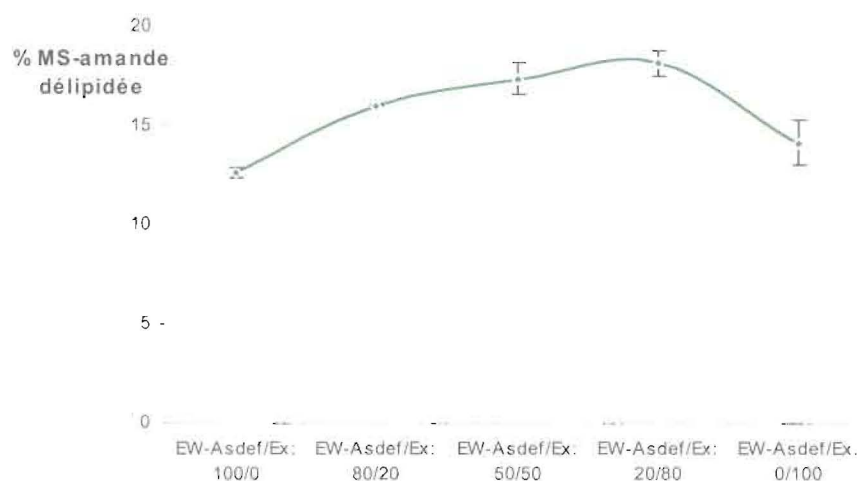


Figure 37 : Evolution du rendement d'extraction cumulé (3 étapes) en fonction de la composition du mélange hydroéthanolique

VIII.2.3.3 Effet de la granulométrie sur le rendement en extrait

Sur la Figure 38 est présentée l'influence de la granulométrie sur l'extraction d'amande délipidée (tourteau) de *A. squamosa*. Le fait de travailler avec la fraction 0,3 – 0,5 mm au lieu de 0,6 – 0,8 mm comme précédemment, réduit le rendement en extrait au cours des deux premières étapes mais le rendement cumulé reste pratiquement le même sur trois étapes (15,5 %MS-tourteau). On notera le changement d'allure de la courbe qui devient presque une droite

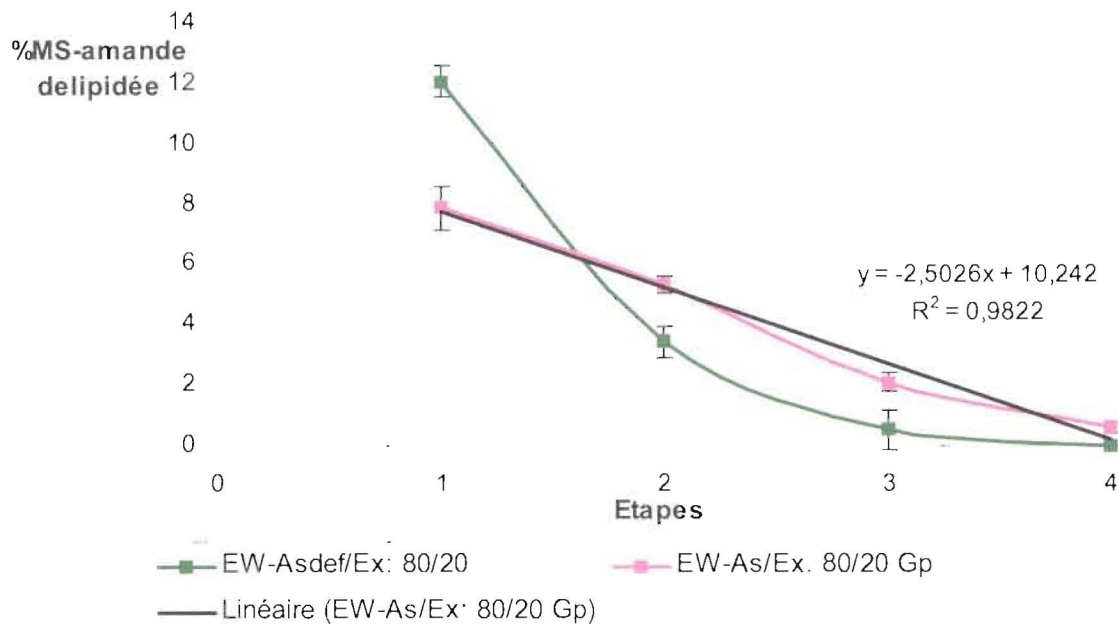


Figure 38 : Effet de la variation de la granulométrie sur le rendement d'extrait hydroéthanolique 80/20 d'amande de *A. squamosa*

VIII.2.3.4 Analyse de l'opération d'extraction en milieu hydroéthanolique

Les résultats des essais d'extraction avec les binaires éthanol/eau du paragraphe précédent ont conduit à analyser l'opération unitaire afin d'établir les courbes d'équilibre de l'extrait entre l'amande délipidée et le solvant ainsi que les droites opératoires. Les points expérimentaux présentés sont des états d'équilibre qui correspondent à la fin des quatre opérations d'extraction successives (§ VIII.2.3.2). Bien que les cinétiques d'extraction n'aient pas été expérimentalement établies, un modèle issu du génie chimique est cependant proposé pour rendre compte théoriquement des vitesses de transfert mises en jeu.

Les variables retenues sont les rapports massiques d'extrait dans le solvant (notée Y) et dans l'amande (notée X), définies au Chapitre V (Equations 22 et 23) :

$$Y_i = \frac{m_i^{ex}}{m_s} \quad (\text{Equation 22})$$

$$X_i = \frac{m_T^{ex} - \sum_1^i m_j^{ex}}{m_{mit}^g - m_T^{ex}} \quad (\text{Equation 23})$$

N'ayant pas pu mesurer la masse totale d'extractibles présents dans l'amande (cette masse dépend en fait de la polarité du solvant), nous ferons l'hypothèse suivante :

$$m_T^{ex} = \sum_1^4 m_j^{ex}. \text{ Cette hypothèse suppose que tout l'extrait est transféré au terme des quatre}$$

étapes d'extraction. La masse totale d'extractibles est donc assimilée à la somme des masses d'extrait; si cette hypothèse s'avérait inexacte, cela entraînerait une pondération de la valeur de m_T^{ex} , mais ne nuirait pas au raisonnement qui suit. Notons tout de même que cette hypothèse est vérifiée pour l'opération réalisée avec le mélange éthanol/eau 80/20, v/v, mélange qui est le plus utilisé pour les tests termiticides du chapitre suivant. Les valeurs des masses volumiques selon la littérature sont consignées dans le Tableau 26.

Tableau 26 : Variation de la masse volumique du mélange eau/éthanol en fonction des proportions du mélange (<http://nicole.cortial.net>) (§ Annexe 16)

Binaire éthanol/eau, v/v	$\rho_{eau/éthanol}$ (g.cm ⁻³) à 20 °C
100/0	0,789
80/20	0,86
50/50	0,93
20/80	0,973
0/100	0,998

La Figure 39 présente les courbes d'équilibre de l'extrait pour les cinq solvants issus des mélanges éthanol/eau. Ces courbes d'équilibre ne sont pas superposées, ce qui traduit l'influence de la polarité du solvant. On constate que pour les solvants 0/100, 20/80 et 100/0, les courbes sont pratiquement linéaires. Pour l'eau pure, une stabilisation de la courbe est cependant enregistrée. Le mélange 80/20 quant à lui se distingue par une courbe présentant une variation plus forte. Ces résultats constituent une première approche dans la caractérisation fine de l'équilibre des extractibles entre la graine (le diluant) et le solvant. Une distinction plus précise de la composition des extractibles devrait notamment permettre d'améliorer leur établissement.

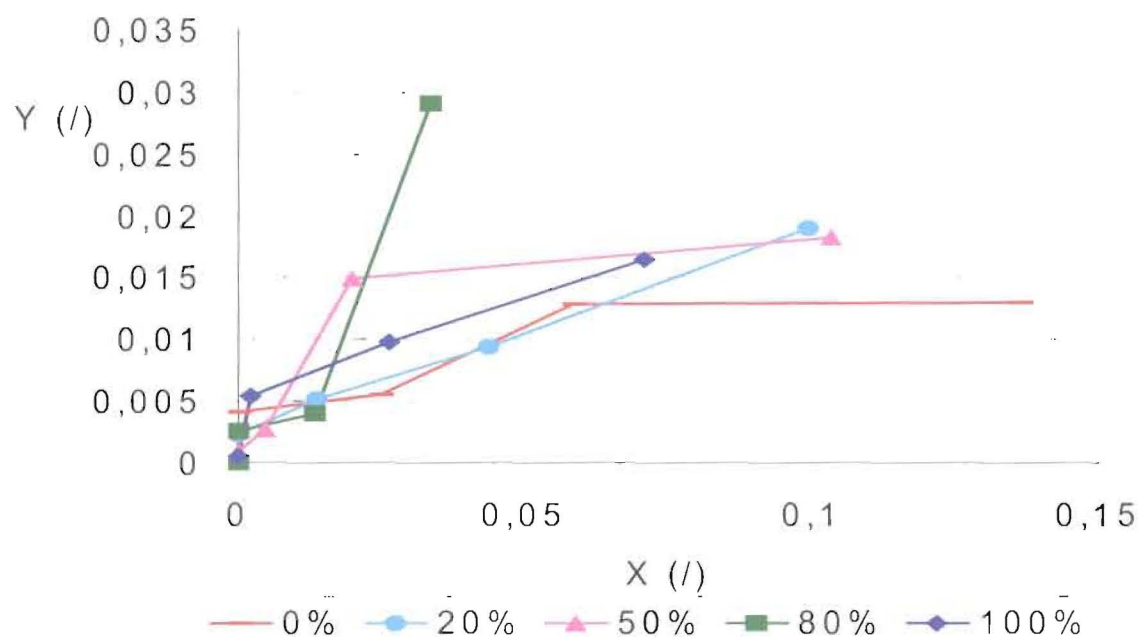


Figure 39 : Courbes d'équilibre de l'extrait en fonction du pourcentage d'éthanol présent dans le solvant

La Figure 40 rassemble les graphes sur lesquels sont reportées les valeurs des rapports massiques X et Y correspondant aux quatre étapes d'extraction et ce, pour les différents binaires éthanol/eau testés. Les courbes qui correspondent à chacune des extractions sont les droites opératoires établies à partir du bilan de matière de l'extractible dans le réacteur. Les conditions opératoires correspondent à celles usuellement rencontrées dans un réacteur fermé parfaitement agité. Le bilan de conservation de l'extractible se traduit donc par la constance de la masse d'extractible dans le temps, qui est répartie entre l'amande délipidée (le diluant) et le solvant :

$$m_{mit}^{ex,g} + m_{mit}^{ex,s} = m_i^{ex,g} + m_i^{ex,s} = m_T^{ex} \quad (\text{Equation 24})$$

Où,

$m_{mit}^{ex,g}$: masse initiale d'extractible dans l'amande délipidée,

$m_i^{ex,g}$: masse initiale d'extractible dans le solvant,

$m_{mit}^{ex,s}$: masse à l'instant t d'extrait dans l'amande délipidée,

$m_i^{ex,s}$: masse à l'instant t d'extrait dans le solvant.

Avec les définitions des rapports massiques (Equation 22 et 23), pour les conditions initiales de solvant : $m_{mit}^{ex,s} = 0$, l'équation 22 s'écrit :

$$Y = \left(\frac{m_{init}^g - m_T^{ex}}{m_s} \right) (X_{init} - X) \quad (\text{Equation 25})$$

Cette relation constitue l'équation de la droite opératoire qui relie, pour chaque extraction, le point de composition initiale (X_{init} , $Y_{init} = 0$) au point d'équilibre correspondant (X_{eq} , Y_{eq}) situé sur la courbe d'équilibre. La pente de ces courbes est le rapport entre la masse de diluant (l'amande délipidée) et la masse de solvant. Ce modèle permet donc de définir l'état d'équilibre potentiellement atteint une fois que ces proportions ont été fixées et par conséquent de définir le nombre d'extraction à mettre en œuvre pour extraire la totalité de l'extractible.

L'étape de modélisation suivante consisterait alors à établir le bilan de masse sur l'une des deux phases en présence (le solvant ou le diluant), suivant l'approche classique de génie chimique, ce qui conduit à exprimer le temps de l'opération comme le produit d'une Durée d'Unité de Transfert (DUT) multipliée par un Nombre d'Unité de Transfert (NUT). Cette analyse est ici envisagée comme une perspective s'ouvrant à l'optimisation du procédé et à la transposition d'échelle. Le travail présenté dans ce manuscrit porte quant à lui essentiellement sur la démonstration d'une faisabilité de l'extraction et d'une efficacité termicide des substances extraites. Il nous apparaît cependant indispensable d'indiquer que les préoccupations de mise en œuvre des procédés, de façon optimale au moins à une échelle pré-industrielle, constituent l'un des enjeux essentiels de la valorisation de ce travail.

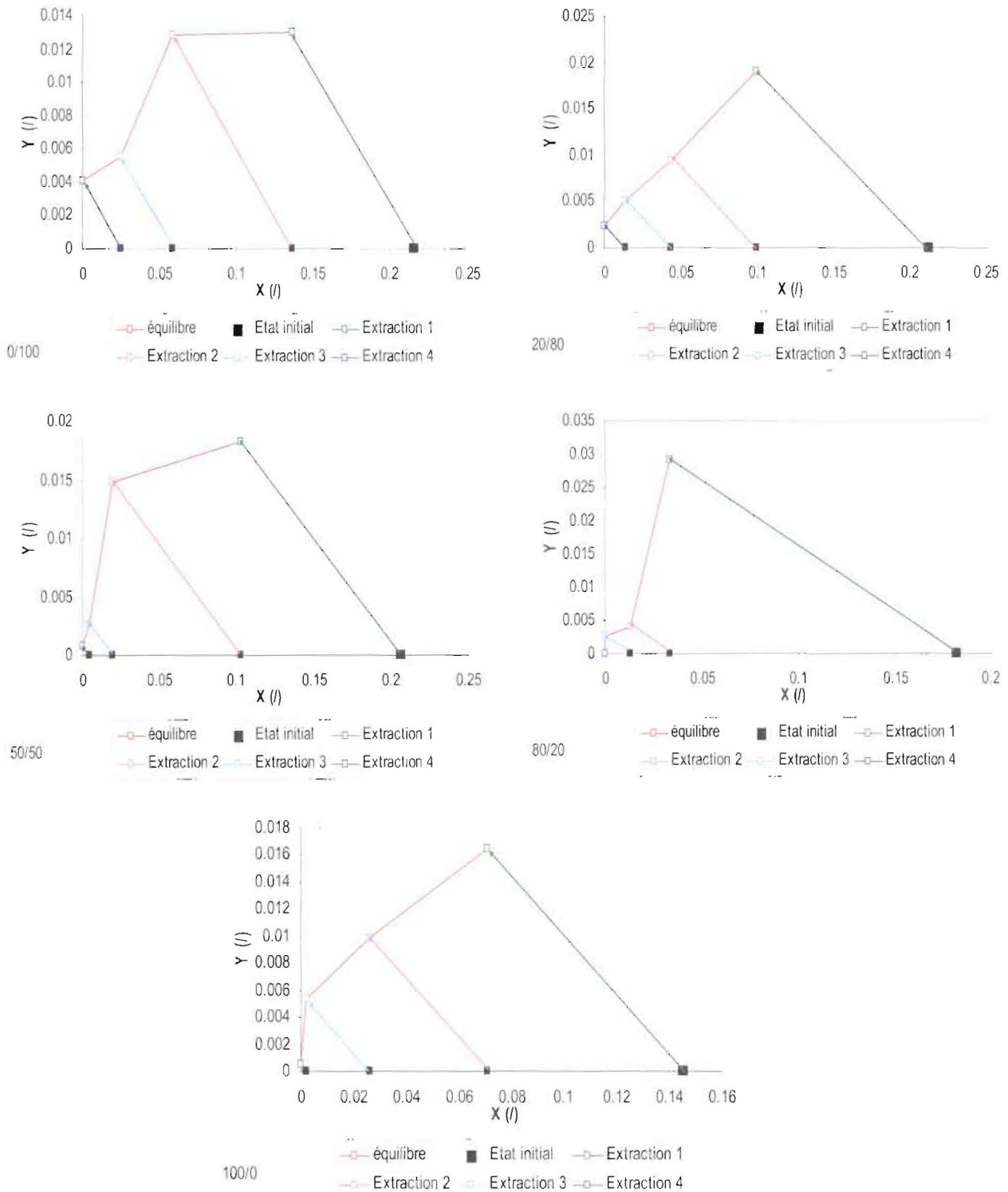


Figure 40 : Droites opératoires des différentes étapes d'extraction pour chaque mélange éthanol/eau

VIII.2.4 Obtention de phases enrichies en acétogénines et des fractions d'acétogénines

Sur le Tableau 27 est présenté le rendement en extrait. Les composés termicides sont très peu solubles dans l'eau (2,2 %MS-amande). La phase méthanolique qui est sensée être enrichie en acétogénines a un rendement faible (7,2 %MS-amande). Les rendements les plus élevés sont obtenus avec l'acétate d'éthyle et le chloroforme (42,3 et 40,1 %MS-amande respectivement) suivi de l'hexane (32,9 %MS-amande).

Lors d'un essai de concentration des acétogénines selon Fang-Rong *et al.* (1999), la chromatographie sur colonne préparative, sur 1,5 g d'extrait méthanolique (cf séquence d'extraction au chapitre V), nous a permis de récupérer des fractions de masses variables, en fonction de la polarité du solvant. La Figure 41 montre que l'on récupère deux produits ou mélanges de produits, vu que la quantité recueillie croît dans un premier temps, puis diminue presque à 0, et augmente ensuite pour atteindre un deuxième maximum. La masse totale obtenue est de 1,7 g, supérieure à celle du produit déposé en tête de colonne (1,5 g); il est possible que le solvant n'ait pas été totalement éliminé mais aussi que de faibles quantités de silice soient passées avec le solvant (Figure 41).

Tableau 27 : Rendement en extrait des phases issues de la partition liquide-liquide

Espèces (amande)	Dénomination de l'extrait	Rendement en extrait (%MS-amande)	Observations
<i>A. squamosa</i> (As)	EtOAc-As/Ex	42,3	Liquide jaune verdâtre
	P-CHCl ₃	40,1	liquide Rouge vin
	P-H ₂ O	2,2	Liquide Jaune clair
	P-MeOH	7,2	Liquide Rouge vin
	P-Hx	32,9	Huile Jaune clair

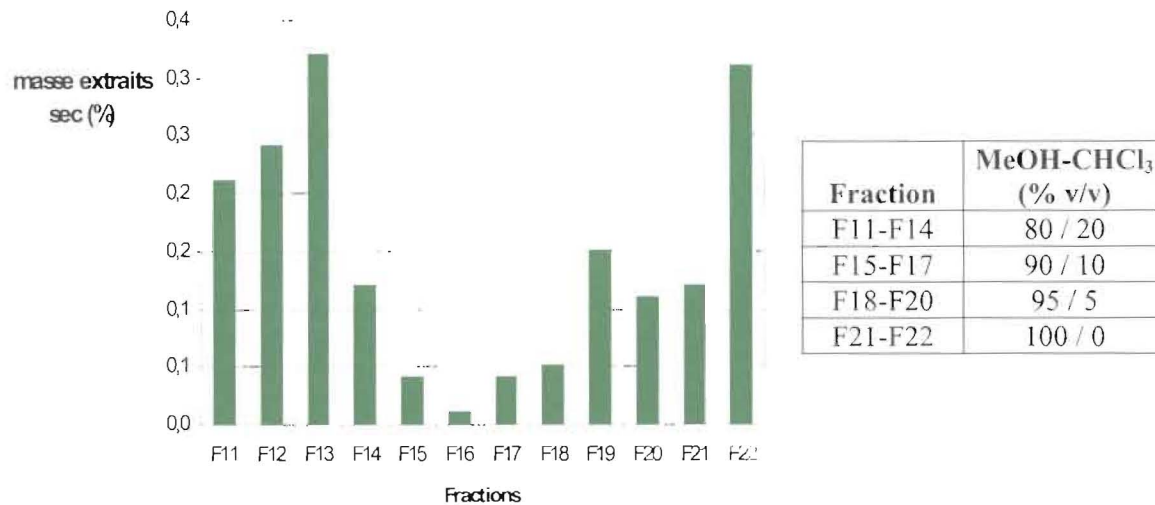


Figure 41 : Bilan de matière des différentes fractions après chromatographie préparative sur colonne

VIII.2.5 Essai d'extraction avec CO₂ Supercritique (CO₂ SC)

Cette technique est déjà bien utilisée pour extraire les lipides et d'autres composés actifs (King, 1993 et 1996 ; Reverchon *et al.*, 1999 et 2001 ; Tonthubthimthong *et al.*, 2001 et 2004). L'extraction en milieu CO₂ SC devrait permettre de bénéficier des propriétés décrites en partie bibliographique (§ Chapitre III). La description du pilote de laboratoire et son mode de fonctionnement sont présentés aux Annexes 7 et 8. L'extraction avec le CO₂ supercritique a été réalisée dans les conditions suivantes : Pression 10 MPa, Température 40 °C.

VIII.2.5.1 Cinétique d'extraction avec CO₂ SC sans co-solvant.

Les essais sont réalisés en soumettant un même échantillon d'amandes broyées, successivement à des étapes d'extraction laissant un temps de contact de plus en plus long entre le CO₂ SC et le solide. Les résultats sont exprimés en termes de masse d'extrait recueillie pour chaque étape en fonction de sa durée, ils sont la moyenne de trois essais identiques. Le condenseur de récupération de l'extrait lors de la séparation du CO₂ est d'abord lavé avec de l'hexane, puis rincé avec du chloroforme et les deux extraits pesés séparément après évaporation du solvant. Les masses obtenues pour chaque lavage sont additionnées afin de connaître l'extrait total. Nous observons sur la Figure 42 que la masse (totale) extraite diminue à chaque étape, ceci malgré l'allongement significatif des temps de contact.

Cependant, il faut noter l'incertitude sur les mesures avec une balance à 0,1 mg près, l'écart-type étant à peine la moitié de la mesure. Les écart-types calculés étant élevés par

rapport à la masse extraite, nous pouvons conclure que les valeurs sont dispersées et donc la courbe évolue plutôt vers un palier, voire aurait une pente négative. Si l'on retient la première observation, il faut en conclure que le solvant supercritique serait saturé en soluté. L'expression des résultats en cumulant les temps de contact d'une part et d'autre part les masses des extraits obtenus à chaque étape (Figure 42) montre que la quantité extraite croît de façon quasi linéaire avec le temps cumulé, c'est-à-dire le nombre d'étapes d'extraction, ce qui traduirait le contrôle par un phénomène de saturation. Si l'on retient la tendance à la baisse en considérant surtout la quatrième étape d'extraction, il faut invoquer un phénomène d'épuisement des extractibles. Mais il est difficile de conclure à cause des écarts-types, comme déjà dit.

Il faut surtout remarquer à l'issue de cette première série d'essais que l'extrait cumulé des quatre étapes qui correspond pourtant à un temps de contact cumulé relativement long de 150 mn reste de l'ordre de 0,9 %MS-tourteau. Le CO₂ pur ne permet donc qu'un rendement extrêmement faible par comparaison aux extraits obtenus avec le binaire éthanol/eau qui est de l'ordre de 16 %MS-tourteau (§ Figure 37). Du point de vue pratique il semblerait qu'un seul lavage avec l'hexane ne permette pas de récupérer la totalité de l'extrait condensé, mais il est difficile de conclure à cause des faibles quantités mises en jeu, inférieures à 1mg pour chaque pesée. Cette première série d'essais incite donc à poursuivre l'étude en incluant un co-solvant afin de tenter d'augmenter le pouvoir solvant du milieu SC.

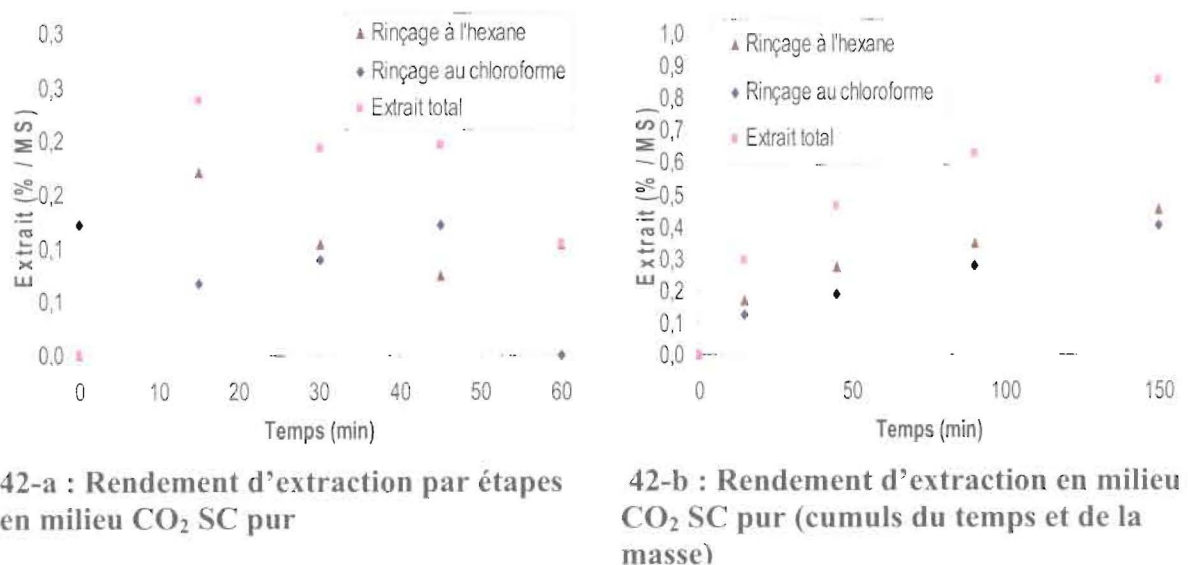


Figure 42 : Rendement d'extraction par étapes en milieu CO₂ SC pur

VIII.2.5.2 Cinétique d'extraction avec le CO₂ supercritique et un co-solvant

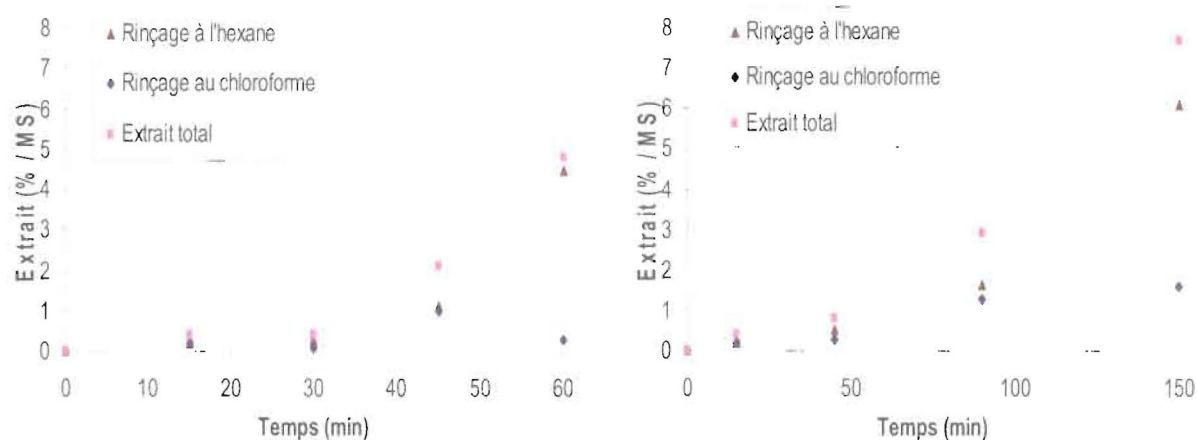
Pour augmenter le pouvoir solvant du milieu nous avons modifié la polarité du CO₂ par ajout d'un co-solvant en l'occurrence l'éthanol introduit à l'aide d'une pompe dans le contacteur. Une nouvelle série d'essais selon le protocole précédent montre sur la Figure 43-a (temps et extraits non cumulés) que la masse extraite reste constante entre les deux premières étapes, ceci malgré le doublement du temps de contact ; elle aurait même tendance à baisser.

La courbe obtenue montre l'augmentation de la masse de l'extrait avec l'allongement du temps de contact et n'évolue pas vers un plateau sur la Figure 43-a. Autrement dit le CO₂ n'est pas saturé en solutés. Il reste donc une quantité à extraire mais l'extraction est limitée par le transport des solutés depuis l'intérieur de la matrice végétale, vers l'extérieur de la graine broyée. Ce transport prend un certain temps (30 minutes) ; au-delà, l'allure linéaire plaide en faveur de l'hypothèse de la limitation par le phénomène de diffusion intraparticulaire.

L'allure exponentielle de la courbe en temps et masse cumulés (Figure 43-b) laisse penser que ce phénomène de transport intraparticulaire est plus important encore qu'avec le CO₂ seul. Ceci est normal si l'on remarque que la quantité d'extrait obtenue (5 %MS-tourteau) avec le co-solvant est bien supérieure à celle obtenue avec le CO₂ pur (0,9 %MS-tourteau), donc le nombre de molécules à transporter est lui aussi plus grand, ce qui doit amplifier le phénomène. Nous observons donc sur la Figure 43 l'effet du co-solvant éthanol qui bouleverse complètement la cinétique d'extraction : alors que la masse extraite sans co-solvant n'augmente pas avec l'allongement du temps de contact dans le cas du CO₂ seul, elle dépend ici largement du temps de contact en présence d'éthanol. Le solide de départ ayant été délipidé on peut penser que les extraits sont des composés anti-termite.

De plus le fait que le rendement obtenu à la fin de la 4^{ème} étape (150 mn) sans avoir étudié l'influence des paramètres d'extraction (température, pression, temps de contact, débit d'éthanol, humidité et granulométrie du solide) soit déjà de 8 %MS-tourteau, nous laisse penser qu'en optimisant ceux-ci nous pourrions atteindre un rendement proche des 16 % obtenus avec le binaire éthanol/eau 80/20 à la 3^{ème} étape. Au bout de 150 mn nous n'obtenons d'ailleurs pas de palier et cela laisse entendre que toute la masse extractible n'est pas extraite. La multiplication du nombre de paliers dans une colonne d'extraction reste aussi à explorer en termes de génie chimique.

Bien que n'ayant pas été poursuivie à cause d'une panne du pilote et des contraintes de temps, cette étude exploratoire du potentiel du CO₂ SC pour l'extraction des composés recherchés montre l'intérêt de cette voie..



43-a : Rendement d'extraction en milieu CO₂ SC avec éthanol 10 % (sans cumul)

43-b : Rendement d'extraction en milieu CO₂ SC avec éthanol 10 % (avec cumul)

Figure 43 : Rendement d'extraction par étapes en milieu CO₂ SC avec éthanol

VIII.3 Essai de caractérisation des extraits

Les résultats d'extraction ou de fractionnement ci-avant ont été discutés seulement au plan pondéral et de façon globale. Il est utile de tenter de mieux connaître leur composition chimique, parallèlement aux tests d'activité termiticide auxquels ils ont été soumis par ailleurs. Bien que les amandes aient été délipidées au préalable, nous avons tenté de caractériser les lipides résiduels des extraits obtenus avec le binaire éthanol/eau. Pour finir nous avons recherché la présence d'acétogénines, les composés supposés apporter l'activité termiticide recherchée.

VIII.3.1 Analyse qualitative par CCM des lipides présents dans les extraits

Nous avons déposé 10 µg de chaque lipide étalon sur 10 mm (Annexes 17 et 18). Par contre les extraits hydroalcooliques ont été déposés sur la plaque à raison de 20 µl de solution à 25 % p/v, soit une quantité importante (5 mg, sur 10 mm), car l'extrait ne contient *a priori* que des lipides résiduels, le solide ayant été délipidé au préalable ; néanmoins il faut se souvenir que l'analyse des tourteaux a révélé la présence de matière grasse à raison de 8,2 %MS-tourteau (§ Chapitre VII).

Les Rf (Rapports frontaux) sont présentés dans le Tableau 28. Les « spots » ont été comparés à ceux des étalons, des composants de l'huile de *A. squamosa* (Annexe 19) obtenue lors de la délipidation et des autres extraits (Annexe 18). On retrouve dans les extraits les mêmes composants que dans l'huile de *A. squamosa*, malgré de légères variations des Rf d'un extrait à l'autre, à cause du fait que l'on travaille avec des solutions fortement concentrées (vu

que les extraits contiennent de faibles quantités de lipides), et donc que la migration des composés est gênée par la forte quantité de produits restée sur la bande de dépôt. Bien que l'analyse soit qualitative, il est clair que les binaires riches en éthanol extraient préférentiellement des lipides peu polaires (triglycérides) alors que les autres binaires extraient surtout les lipides polaires résiduels (acides gras libres et glycérides partiels) à l'exclusion des hydrocarbures et des triglycérides.

Tableau 28 : Rf des lipides étalons, des composés de l'huile de *A. squamosa* et des extraits d'amande de *A. squamosa*

Composés	Rf						
	Etalons	Huile <i>A. Squamosa</i>	Extraits EW-Asdef/Ex : v/v				
			100/0	80/20	50/50	20/80	0/100
Stérols	0,22	0,22	0,24	-	0,24	0,17	00,17
Monooléines	0,11	0,10 et 0,14	~0,12 et 0,14	-	0,10 et 0,13	0,12 et	0,17
Acide gras libre	0,30	0,29 Traces	-	-	0,24 Major.	0,28 Major.	0,24
Tocophérols	0,33	-	-	-	-	-	-
Diglycérides	0,40	-	-	-	-	-	-
Triglycérides	0,63	0,63 Major.	0,66 Major.	0,53 Major.	-	?	0,63
Squalène	0,97	0,9	0,95	-	-	-	-

VIII.3.1.1 Essai de détection d'acétogénines par CCM et par test de colorimétrie

a- CCM des extraits

Après plusieurs tentatives, nous avons noté que 30 μ l d'extrait à 25 %, soit un dépôt de 7,5 mg, sur 10 mm, sont nécessaires afin de détecter une tâche en CCM, comme le montre la plaque après élution et révélation par les réactifs de Kedde A et de Kedde B, permettant la dérivatisation spécifique des lactones, groupements présents dans les acétogénines.

On remarque donc que l'analyse en CCM fait apparaître, pour chaque extrait, une tâche violette, caractéristique de la présence d'acétogénines. Le rapport frontal de ces tâches est de 1 avec le système solvant utilisé. On remarque que plus le binaire de solvants est riche en eau, moins la tâche est visible, ce qui pourrait laisser supposer une corrélation entre la richesse en acétogénines de l'extrait et la richesse en éthanol du solvant, corrélation inverse par rapport à sa polarité. On s'attend en effet à ce que les molécules d'acétogénines soient peu solubles dans l'eau en raison de la présence de chaînons hydrophobes. Un même comportement est observé avec les fractions de chromatographie F13 à 19, avec diminution

de la coloration en fonction de la diminution de la proportion en chloroforme du mélange de solvant d'élution.

b- Test de colorimétrie en solution sur les fractions issues de chromatographie préparative

Les résultats de cette méthode de colorimétrie sont présentés sur le diagramme à l'Annexe 25. Cette méthode est qualitative. De plus, elle est très influençable par d'autres composés en solutions en l'occurrence les alcaloïdes. Nous n'avons pas cependant eu ce problème car les fractions F-12 à F-19 ont donné une coloration rose violacée après ajout des réactifs de Kedde A et B. La solution se décolore après 10 mn et apparaît un précipité coloré (Annexe 20). Cette simple observation visuelle est assez limitée car nous n'avons pas pu déterminer la limite de détection en termes de concentration des acétogénines, ne disposant pas d'étalons purs d'acétogénines. Néanmoins il est bon de signaler dans le cas où une suite serait donnée à cette thèse, qu'il serait possible de mettre en place une méthode de dosage des acétogénines en solution, soit par titrage acido-basique en se basant sur les protocoles du MPRI, (1999) et de Naiyana (2002), soit par spectrométrie UV à la longueur d'onde d'absorbance des acétogénines d'après Hiroshi Haraya (2004) (Annexe 21).

La méthode de détection en spectroscopie UV n'a rien donné lorsque nous l'avons pratiquée sur les extraits disponibles à ce moment là en raison de la faible concentration des acétogénines et de la perturbation introduite par les autres composants des extraits qui absorbent aussi dans la même zone.

Compte tenu de ces difficultés, nous avons privilégié l'obtention de fractions plus concentrées par partition liquide-liquide et chromatographie préparative qui ont été analysées par couplage HPLC-SM. Nous avons aussi demandé l'analyse élémentaire (C, H, N, O) de quelques fractions.

VIII.3.2.2 Microanalyse élémentaire organique (C, H, O) de quelques extraits.

Sur le Tableau 29 sont présentés les résultats de l'analyse élémentaire C, H, O, N de différents extraits ainsi que la composition calculée de quelques acétogénines pouvant être présentes dans nos extraits d'après la littérature (Hiroshi, 2002; Sahai, 1994 ; Fang-Rong, 1999). La présence d'une faible proportion d'azote dans certains extraits a conduit à normaliser à 100 % la proportion de C, H, O uniquement ; même s'il s'agit d'une approximation, cela facilite l'exploitation des résultats. On constate que pour l'extrait hexanique Hx-As/Ex, la composition C, H, O (76,6 ; 11,9 et 12,1 %) est éloignée de la

composition des acétogénines (71, 11 et 18 % respectivement). Par contre la composition de l'extrait éthanolique EW-As/Ex 100/0 (69 ; 10,9 ; 20,1 % respectivement) est très proche de la composition moyenne des acétogénines de référence (squamacines et squamostatines). La fraction purifiée P-MeOH (73,4, 11,4, 15,2 % respectivement) quant à elle, se rapproche aussi de ce résultat, notamment de la squamacine L. La priorité ayant été donnée aux tests sur termites, il n'a pas été possible d'analyser la fraction chromatographique la plus active (F-13).

De plus les résultats de l'analyse des autres extraits hydroéthanoliques n'ont pu être exploités à cause de la prépondérance du pourcentage d'O qui dénote la présence d'eau malgré le séchage effectué durant la préparation de l'échantillon destiné à cette analyse (Annexe 22).

Nous pouvons néanmoins retenir que l'un des extraits, EW-As/Ex : 100/0 figurant parmi les produits actifs de notre étude termicide possède une composition élémentaire C, H, O, semblable à celle de la squamostatine-A.

Tableau 29 : Microanalyse élémentaire de quelques extraits

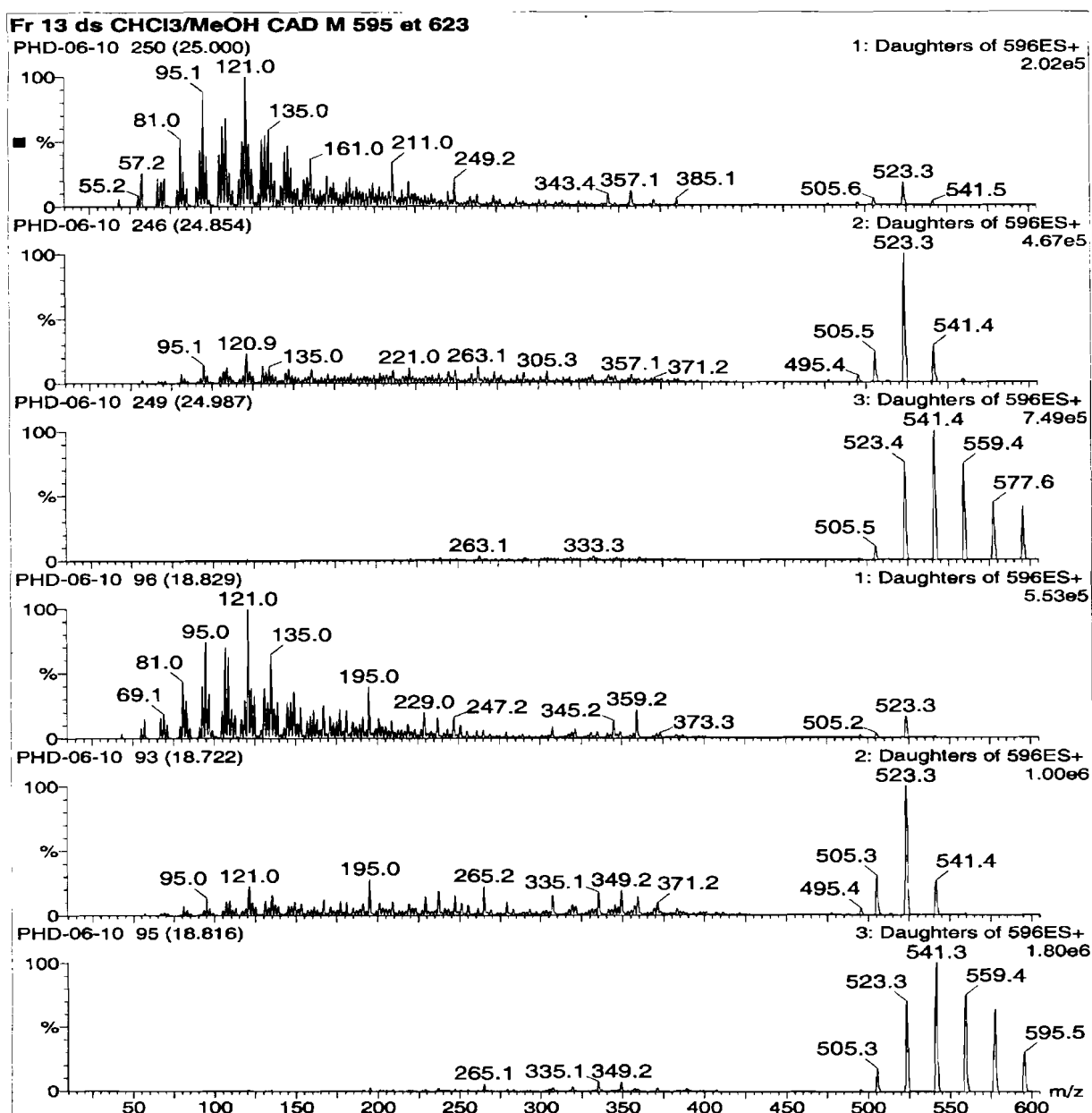
Dénomination des extraits de quelques molécules d'acétogénines	Formule moléculaire	Masse moléculaire g/mol	% C	% H	% O
EW-As/Ex : 100/0	-	-	69,0	10,9	20,1
Hx-As/Ex	-	-	76,6	11,9	11,5
P-MeOH	-	-	73,4	11,4	15,2
squamacine B ou E	$C_{35}H_{62}O_7$	594	70,7	10,4	18,9
desacetylvaricine/squamacine-L	$C_{37}H_{66}O_6$	606	73,3	10,9	15,8
asimicin/squamacine-H	$C_{37}H_{66}O_7$	622	71,4	10,6	18,0
cis-squamostatine-D	$C_{37}H_{66}O_7$	622	71,4	10,6	18,0
Squamacine-O ₁ ou O ₂	$C_{37}H_{66}O_8$	630	70,5	10,5	19,0
12,15-cis-squamosatatine-A	$C_{37}H_{66}O_8$	630	70,5	10,5	19,0

VIII.4 Caractérisation par CLHP/SM de la fraction F-13

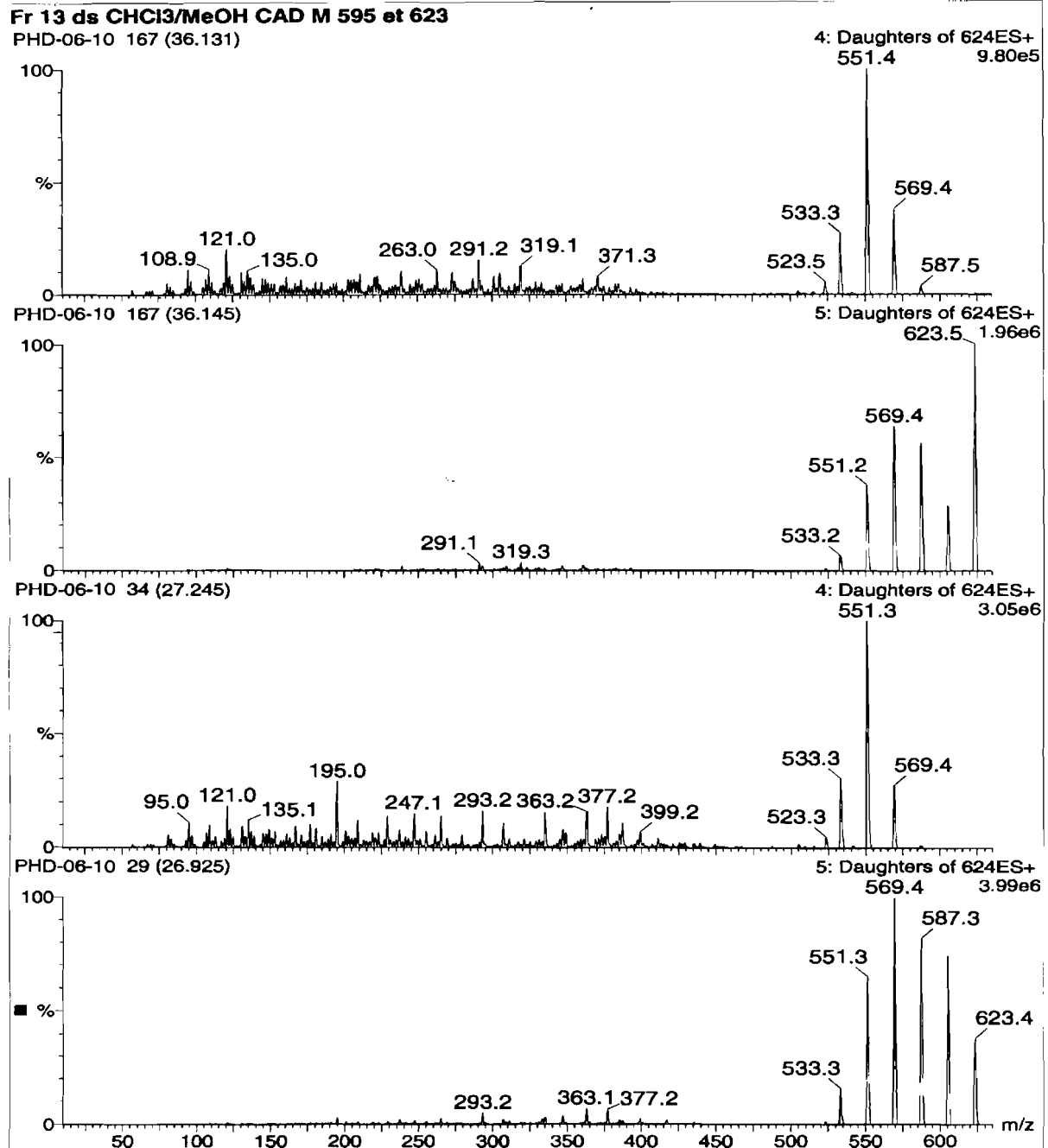
La fraction F-13 analysée par CLHP/SM est composée essentiellement de deux produits de masse moléculaire 594 et d'un produit de masse 622 (Figure 44). Il est difficile de faire une quantification quelconque d'après les spectres MS en l'absence d'échantillons de référence. Les spectres de RMN montrent aussi deux produits très majoritaires (en proportions 1/2-2/3) sans qu'il soit néanmoins possible actuellement de savoir si ce sont ceux de masse 594 ou 622 (Figure 45). Par contre, l'ensemble des données spectroscopiques de la fraction F-

13, montre bien que ces différents produits sont bien des acétogénines et pourraient correspondre à des produits déjà décrits dans la littérature, de type squamocine B, E ou L (Sahai *et al.*, 1994, Fujimoto *et al.*, 1994 ; Hiroshi *et al.*, 2002). Les spectres de RMN ^1H , ^{13}C , COSY et MS-MS de la fraction F-13 sont donnés à l'Annexe 23.

Ces résultats viennent appuyer ceux de l'analyse élémentaire ci-dessus qui a aussi pointé des composés de masse 594, 606 et 622 comme composants de ces extraits notamment des squamocines B, E, H, L. Il s'agit pour ces dernières de composés possédant deux groupements tétrahydrofuraniques adjacents et trois fonctions hydroxyles dont deux portées par les atomes de carbone liés aux cycles précédents, l'autre pouvant se situer en différentes positions sur la chaîne hydrocarbonée (Figure 45).

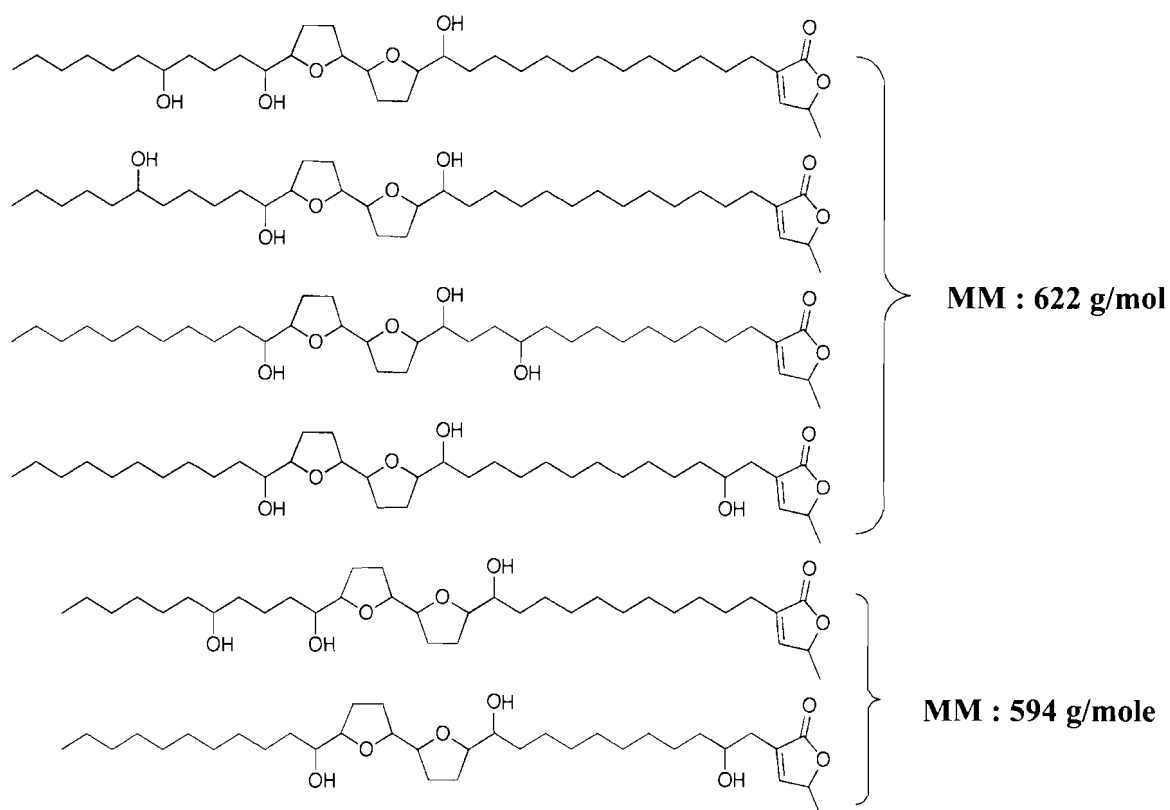


44-a spectres MS-MS d'un produit de poids moléculaire 594 de la F-13



44-b spectres MS-MS d'un produit de poids moléculaire 622 de la F-13

Figure 44 : Spectres MS-MS de la fraction F-13(CLHP /SM)



squamocins A, C, D, F, G, B, E

**Figure 45 : Structures des différentes acétogénines possibles dans F-13
(Structures décrites par Sahai *et al.*, 1994 ; Fujimoto *et al.*, 1994)**

VIII.5 Conclusion

Ce chapitre a permis de proposer des conditions expérimentales pour l'extraction des composés termicides, incluant l'étude des rendements pour des étapes successives. L'hexane permet d'avoir les rendements les plus élevés (mais pas l'activité termicide la plus importante ; § chapitre IX). Les composés termicides sont en fait solubles de préférence dans les phases polaires et l'étude de certains paramètres (polarité/composition du solvant, granulométrie), a permis de cibler le mélange binaire éthanol/eau comme solvant dans la mise en œuvre d'un procédé d'extraction de composés termicides à l'échelle industrielle. L'étude des courbes d'équilibre a permis de confirmer l'importance de la polarité et de déboucher sur la faisabilité de la mise en œuvre d'un procédé à l'échelle industrielle *via* une amorce de modélisation sur la base d'un modèle simple issu du génie chimique, cependant l'étude des cinétiques d'extraction serait obligatoire à cette fin.

La technique du CO₂ SC comme solvant d'extraction des composés termicides qui a été brièvement testée, a montré la nécessité de l'ajout d'un co-solvant, en l'occurrence l'éthanol, pour parvenir à obtenir une partie des extractibles du tourteau délipidé. Si les conditions testées peuvent paraître moins favorables en termes de rendement par comparaison au binaire éthanol/eau, elles laissent en réalité présager d'une plus grande sélectivité d'extraction donc de l'obtention d'extraits plus actifs.

Les différents extraits obtenus ont été caractérisés par des méthodes simples, CCM, test colorimétrique. Cette dernière a permis de détecter la présence d'acétogénines et elle pourrait permettre un dosage quantitatif des acétogénines à condition de disposer de composés étalons. L'analyse des fractions les plus concentrées, notamment issues de la chromatographie préparative, par les techniques appropriées (couplage CLHP/SM, RMN ¹H et ¹³C) a confirmé la présence d'acétogénines probablement de la classe des squamocines, malgré les limitations imposées par le fait de disposer de mélanges et non de produits purs. L'élucidation des structures des composés termicides des espèces végétales étudiées au cours de cette thèse nécessiterait un long travail qu'il n'était pas prévu de programmer, la priorité devant en effet être donnée à la recherche de fractions dotées d'une activité termicide. Les résultats dans ce volet essentiel de la thèse sont exposés au chapitre suivant.

Chapitre IX

Activité termicide d'extraits des quatre graines sélectionnées

IX.1 Introduction

IX.2 Résultats des tests de screening et essai normalisé EN 118
pour les quatre graines sélectionnées

IX.3 Etude de l'activité termicide de *A. squamosa*

IX.4 Synthèse des résultats : Efficacité - Applications

IX.5 Conclusion

Chapitre IX

Activité termiticide d'extraits des quatre graines sélectionnées

IX.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous évaluons l'activité termiticide d'extraits dérivés des amandes des quatre graines oléagineuses du Bénin sélectionnées au chapitre VII. Ces graines sont : *A. squamosa* (As), *A. indica* (Ai), *C. procera* (Cp) et *P. biglobosa* (Pb). Cette évaluation s'est déroulée en plusieurs étapes, d'abord pour sélectionner les fractions les plus intéressantes parmi les deux parties disponibles (coque, amande) pour les quatre graines.

Ces essais d'orientation ont été effectués (§ Chapitre VI) *via* :

- des tests de « screening » (test de non choix) qui présentent l'avantage d'être relativement rapides (durée maximum de 30 jours) et de nécessiter un nombre de termites réduit (52 termites par boîte de Pétri)
- des essais normalisés EN 118 qui consomment 260 termites par dispositif (pour trois répliques par extraits) et qui nécessitent un temps d'essai assez long (9 semaines).

Il nous a fallu tenir compte de ces spécificités et contraintes imposées par ces tests, combinées à celles imposées par l'alternance des séjours au Bénin et en France. Par exemple, il n'était possible de lancer qu'une seule série d'essais EN 118 par séjour annuel de cinq mois au Cirad, si l'on tient compte des études préalables d'extraction. L'ensemble de l'étude a été fait grâce au test de non choix adapté au screening et les extraits les plus actifs ont été alors soumis à l'essai EN 118. Les premiers extraits disponibles ont été les huiles obtenues avec de l'hexane selon le protocole normalisé permettant de connaître la teneur en huile de l'amande. Par précaution afin d'éviter le risque de dégradation thermique, les extraits suivants ont été obtenus à la température ambiante.

Ce travail a permis de comparer l'activité d'extraits obtenus avec plusieurs solvants : hexane, acétone/eau, éthanol/eau dans diverses proportions du mélange dans ce dernier cas. Pour le solvant choisi, l'activité a aussi été étudiée en fonction de la quantité d'extrait soumise aux termites. Enfin, les extraits ont été fractionnés *via* une succession de partitions liquide-liquide et par chromatographie, afin de disposer de fractions plus actives.

IX.2 Résultats des essais : test de non choix et essai normalisé EN 118

Les essais sur termites sont effectués par deux tests (§ Chapitre VI) :

- test de non choix qui permet d'apprécier la toxicité de l'extrait par le décompte du taux de mortalité en fonction des jours d'essai
- essai EN 118 qui permet de confirmer l'activité termiticide révélée par test de screening et d'évaluer l'efficacité préventive dans le domaine de la préservation du bois.

Ces essais concernent des organismes vivants (termites) et compte tenu aussi de l'intervention de solvants organiques dans la préparation des extraits, chaque série de tests doit être accompagnée d'un certain nombre de tests qui permettront de valider les résultats.

IX.2.1 Validation des essais

Pour les tests de non choix, les observations suivantes permettent de valider les essais :

- La durée de survie des termites (diète, sans une source d'alimentation) est de 24 jours, alors que l'activité observée concerne les 13 premiers jours au maximum,
- Le taux de survie du contrôle (termites normalement alimentés par de la cellulose) est égal à 65 % à la fin de l'essai. L'essai est validé lorsque le taux de survie est supérieur à 50 %,
- L'effet des solvants déposés seuls sur cellulose séchée ensuite pendant 72 heures est faible, le taux de mortalité est de l'ordre de 4-10 %.

En ce qui concerne les essais normalisés EN 118, les observations suivantes permettent de valider les essais :

- Les trois éprouvettes-témoins non traitées de contrôle de virulence présentent à l'examen visuel la cotation 4 (attaque forte du bois),
- Les colonies correspondantes comprennent 57 % de survivants à la fin de l'essai. Pour que l'essai soit validé, ce taux de survie doit être supérieur à 50 %.

IX.2.2 Activité des fractions solides (coque, amande)

Nous avons commencé les tests de non choix en soumettant 30 mg de coques des quatre graines (*A. squamosa*, *A. indica*, *C. procera*, *P. biglobosa*) aux termites. Nous n'avons noté aucun effet répulsif et les termites ont consommé toutes les coques sans que cela n'ait provoqué leur mort (TM 0 % en 13 jours). Les taux de mortalité sont respectivement de 40, 47, 32 et 33 % pour C-As, C-Ai, C-Cp, C-Pb, proches de celui des témoins « diète ». Nous avons conclu que les composés termiticides se trouveraient dans les amandes.

Les amandes testées dans les conditions précédentes ont conduit au développement de moisissures, probablement en raison de l'humidité du sable utilisé pour le test. Il n'était pas

possible de conclure quant à l'effet des amandes par rapport à celui des métabolites secrétés par les moisissures. On peut toutefois se référer au seul essai exploitable faisant intervenir l'amande de *A. squamosa* (Am-As, 10 mg) mais réalisé au cours d'une autre période qui montre un taux de mortalité de 37 et 50 % respectivement après 7 et 13 jours (§ IX.2.6). L'amande contient donc bien des composés actifs mais cette activité ne se révèle pas nettement, d'où l'intérêt des essais d'extraction dont il a été question au chapitre précédent.

IX.2.3 Activité termicide des extraits hexaniques des quatre espèces sélectionnées

Nous avons effectué deux types d'extraction avec l'hexane :

- extraction selon la méthode normalisée en Soxhlet
- méthode d'extraction « en batch » à la température ambiante.

IX.2.3.1 Activité termicide des huiles extraites en Soxhlet (69 °C)

a. Test de non choix

La Figure 46 montre l'évolution du taux de mortalité en fonction du temps pour les quatre huiles testées. L'huile de *Annona squamosa* (H-As) est la plus active (TM 69 % en 13 jours) suivie de l'huile de neem (H-Ai) (TM 65 % en 13 jours). Il faut noter que l'activité de H-As ne se manifeste nettement qu'après le 7^{ème} jour pour rattrapper celle de H-Ai le 10^{ème} jour. Le classement des taux de mortalité observés après 13 jours d'essai est dans l'ordre décroissant : H-As (69 %) > H-Ai (65 %) > > H-Cp (21 %) > H-Pb (17 %). L'activité de l'huile de *A. indica* n'est pas surprenante, car déjà discutée dans la bibliographie (Jacobson, 1989 ; Koul *et al.*, 1990 ; Schmutterer, 1995).

Seules trois espèces paraissent intéressantes d'après ce test d'orientation, à savoir : *A. squamosa*, *A. indica*, *C. procera*. Afin de limiter le nombre de termites utilisés, nous éliminons de la liste *P. biglobosa* qui paraît être l'espèce la moins active. *C. procera* n'est pas éliminé car la bibliographie fait état de son activité anti-insectes (Sondengam *et al.*, 1979 – 1981 ; Konan *et al.*, 2003). En ce qui concerne cette dernière nous avons donc préféré poursuivre l'étude de l'activité anti-termites.

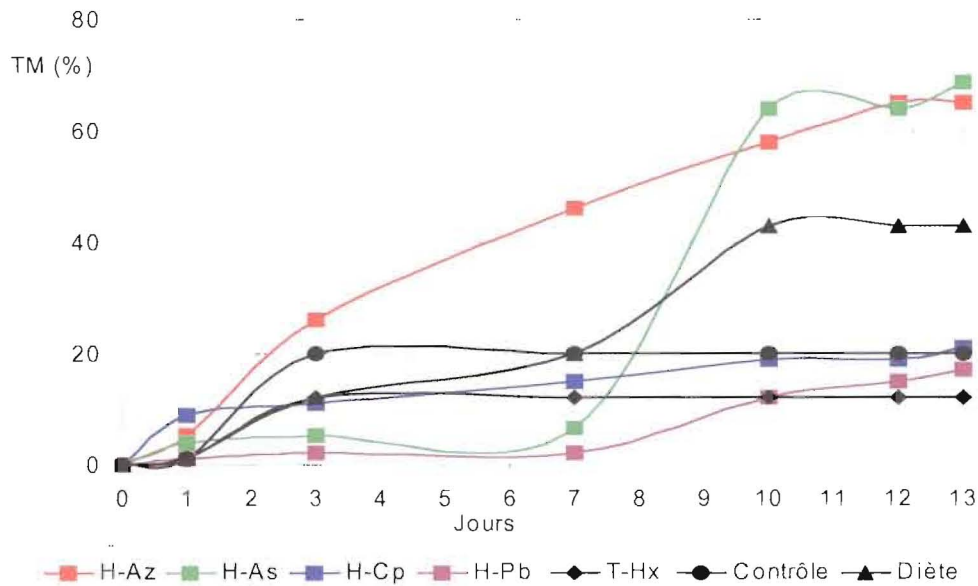
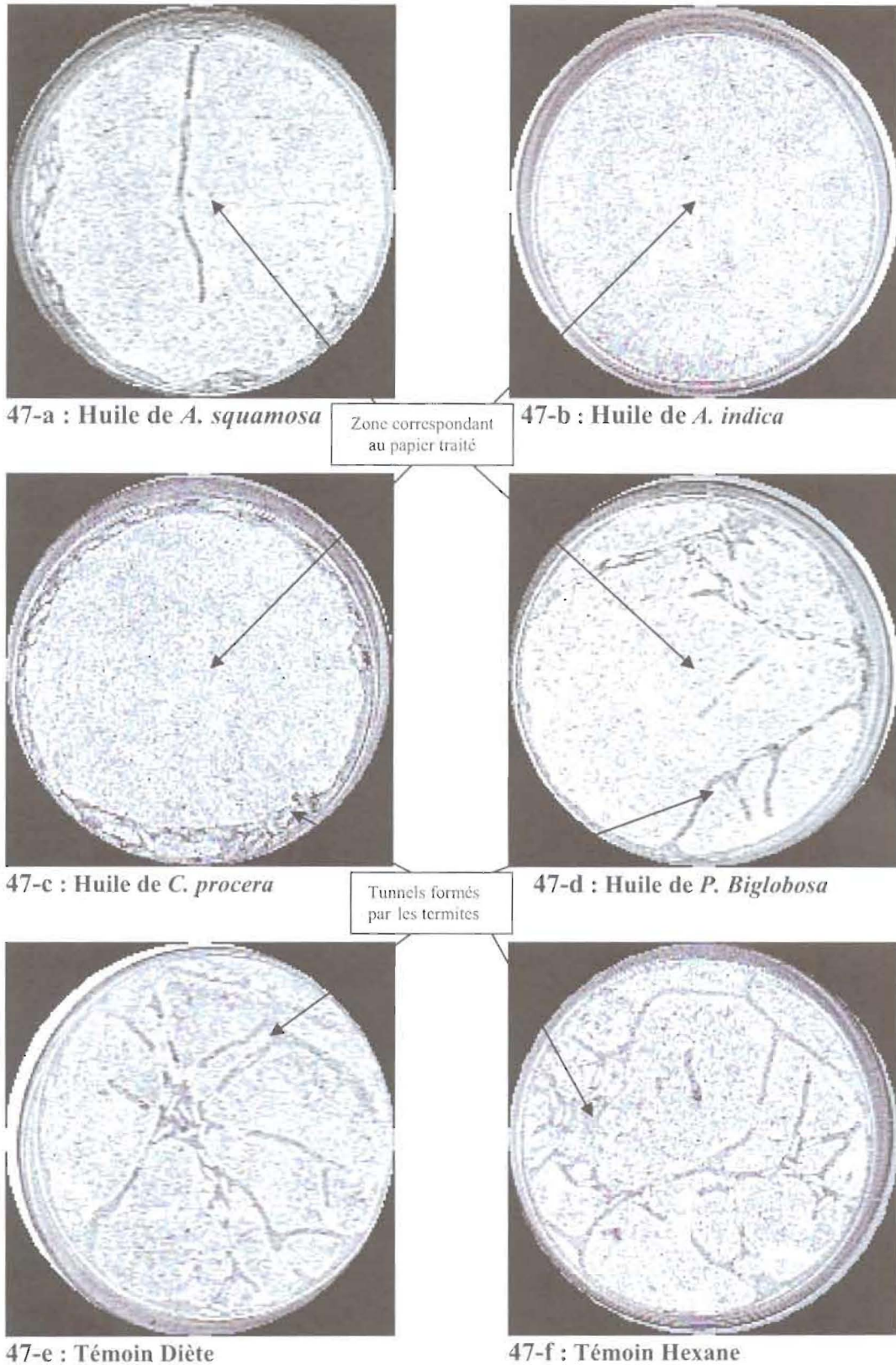


Figure 46 : Activité termicide des huiles des quatre graines sélectionnées (Conc : 20 mg/cm²)

b. Etude de la répulsivité des huiles

Face à un agent « répulsif », les termites s'organisent de façon à limiter au maximum leur contact avec un tel milieu. Ils s'organisent alors en tunnels au dessous du sable de Fontainebleau (utilisé comme milieu modèle dans les boîtes de Petri). La photocopie de la face inférieure des boîtes de Petri peu après le début de l'essai permet de mettre en exergue la répulsivité éventuelle de l'extrait. Au vu de la Figure 47, nous pouvons classer les extraits par ordre décroissant de répulsivité : H-Ai > H-Cp > H-As > H-Pb. Ces résultats sont conformes aux données de la littérature sur la répulsivité d'extraits de *A. indica* et *C. procera* (Koul *et al.*, 1990 ; Schmutterer, 1995 ; Konan *et al.* 2003)



Figures 47 : Effet répulsif des quatre huiles (H-Ai, H-As, H-Cp, H-Pb)
(Test de non choix, Conc : 20 mg/cm²)

c. Essai de répulsivité normalisé EN118

Afin de confirmer l'activité des trois huiles les plus actives à l'issue des tests de non choix précédents (H-Ai, H-As, H-Cp), un essai EN118 a été effectué (Figure 48). Les cotations (note de l'attaque du bois observée) obtenues sont respectivement de 2 (attaque légère) pour *A. squamosa* (H-Ex), et de 3 (attaque moyenne) pour les deux autres espèces (*A. indica*, H-Ai ; *C. procera*, H-Cp).

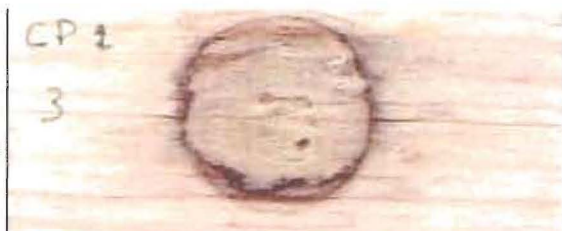
Il faut souligner que selon l'essai EN 118, aucune de ces huiles ne pourrait être utilisée comme produit de préservation du bois à cause des cotations obtenues, toutes supérieures ou égales à 2. *A. squamosa* qui a donné la cotation la plus faible (2) semble présenter un intérêt pour la suite des travaux. Même si H-Cp est moins efficace que H-Ai, en terme de taux de mortalité par test de non choix, ces deux huiles montrent ici la même efficacité préventive sur bois (Cotation 3, attaque moyenne). Il est donc préférable de conserver *C. procera* pour des essais complémentaires. En effet, le fait d'avoir obtenu ces huiles à chaud n'est pas satisfaisant, il était nécessaire de tester des extraits hexaniques obtenus à la température ambiante.



48-a : Etat de l'éprouvette imprégnée de H-As (Cotation 2)



48-b : Etat de l'éprouvette imprégnée de H-Ai (Cotation 3)



48-c : Etat de l'éprouvette imprégnée de H-Cp (Cotation 3)



48-d : Etat de l'éprouvette - témoin (Cotation 4)

Figure 48 : Efficacité préventive sur bois des huiles des trois graines (H-Ai, H-As, H-Cp) Cotations en fin d'essai par essai EN118 (Conc : 20mg/cm²)

IX.2.3.2 Activité termicide de l'huile extraite à froid (Hx-As/Ex) d'amande *A. squamosa* par test de non choix

Les huiles précédentes ayant été obtenues à 69 °C, nous avons aussi testé l'extrait de *A. squamosa* qui était le plus actif, mais obtenu ici à 20 °C, afin de nous affranchir du risque de dégradation thermique des composés. L'extrait hexanique (Hx-As/Ex), obtenu sans chauffer (20 °C), montre une activité notable en 10 jours (TM 68 %, 10 mg/cm²) (Figure 49). Ce test ayant été effectué à peu de temps d'intervalle, le résultat peut être comparé à celui de H-As en 10 jours (TM 58 %) (Figure 46) mais obtenu pour une quantité déposée de 20 mg/cm² soit le double. L'extrait hexanique à 20 °C paraît donc présenter une activité bien supérieure. Etant donné que d'une part, nous avons vérifié au chapitre VIII, que la totalité des extractibles a été récupérée aussi bien à 69 °C qu'à 20 °C et que, d'autre part, la solubilité des composés organiques dans l'hexane est améliorée avec l'élévation de température, il est raisonnable d'attribuer cette différence notable d'activité à la dégradation thermique. Par la suite, la méthode au Soxhlet ne sera plus mise en œuvre, l'abaissement de la température d'extraction ayant montré un effet plus important que l'application d'une dose double.

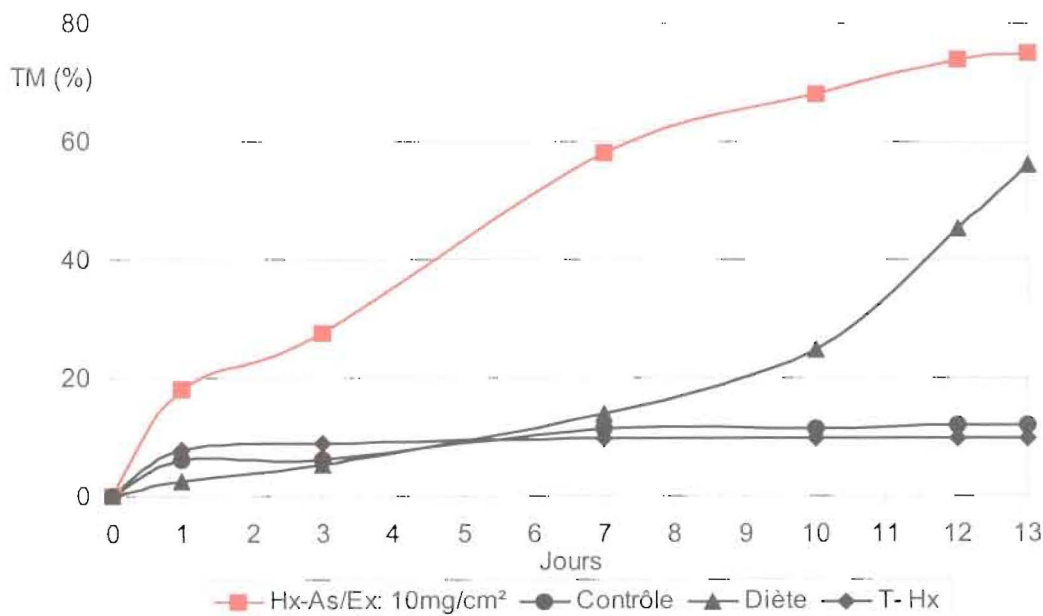


Figure 49 : Activité termicide de l'extrait hexanique à 20 °C de *A. squamosa* (Hx-As/Ex)
(Conc : 10 mg/cm²)

IX.2.3.3 Activité termicide d'extraits obtenus avec le CO₂ SC par test de non choix

L'extrait obtenu en milieu CO₂ SC (Sc-As/Ex) dans des conditions de P et T (20 MPa et 45 °C) convenant *a priori* pour l'extraction des huiles (§ chapitre VIII), ne montre aucune activité à la concentration de 10 mg/cm² (TM 4 % seulement) donc inférieur au contrôle (Figure 50). Le CO₂ SC étant très sélectif en fonction des conditions, T et P, ceci laisse penser que la structure moléculaire de la classe de composés actifs ne se rapproche pas de celle des triglycérides par exemple. Lors d'une étude postérieure à la présente thèse, il sera peut-être possible d'utiliser cette sélectivité du CO₂ SC pour obtenir une fraction exempte de lipides et contenant donc une concentration supérieure en composés termicides.

Les extraits précédents ont été obtenus avec des solvants peu polaires, y compris pour CO₂ SC. La suite des essais concerne les solvants de polarité bien supérieure.

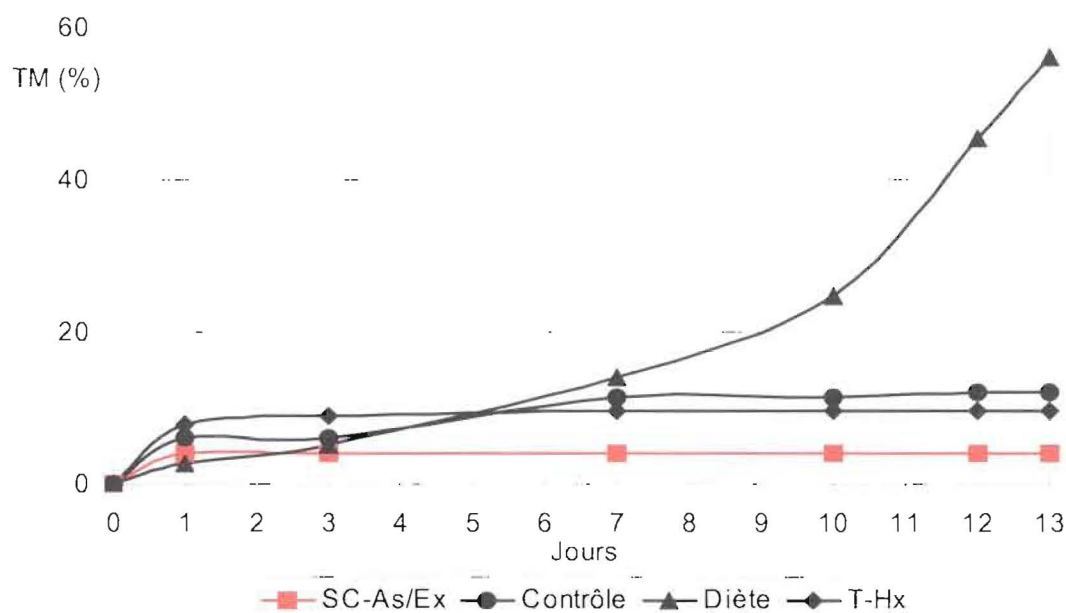


Figure 50 : Activité termicide de l'extraits avec le CO₂ SC (SC-As/Ex) de *A. squamosa* (Conc : 10 mg/cm²)

IX.2.4 Activité termicide des extraits hydroacétoniques de *A. indica*, *A. squamosa* et *C. procera* par test de non choix

La Figure 51 montre l'évolution du taux de mortalité des extraits hydroacétoniques en fonction du temps, obtenus au chapitre VIII précédent (acétone/eau, 80/20, v/v) (AW-Az/Ex : 0,6 mg/cm² ; AW-As/Ex : 0,3 mg/cm² ; AW-Cp/Ex : 0,6 mg/cm²). Le taux de mortalité en 13 jours d'essai est seulement de 7 % pour *A. indica*. Par contre on note une certaine activité en 13 jours de l'extrait hydroacétonique de *C. procera* AW-Cp/Ex (TM 47 %). Ceci

confirme le bon niveau d'activité termicide de *A. squamosa*. Dans ces conditions très discriminantes (0,6 mg/cm²), AW-Cp/Ex est tout de même bien supérieure à celle de H-Cp (Figure 46) (TM 19 %). Cette activité quoique faible de l'extrait pour *C. procera* montre que les composés actifs seraient plutôt extractibles dans une phase polaire (acétone/eau) et justifierait l'inactivité observée avec l'extrait hexanique. De plus pour H-Cp, on ne peut exclure la contribution de la dégradation thermique déjà observée pour H-As. L'extrait AW-As/Ex, présente quant à lui l'activité la plus élevée de la série (TM 87 %, en 13 jours) pour une dose appliquée de 0,3 mg/cm² seulement, à comparer au TM 69 % pour l'huile correspondante H-As mais à la dose de 20 mg/cm². Il faut aussi noter que AW-As/Ex présente une activité supérieure à celle de l'extrait hexanique (Figure 49) (TM 75 % ; 10 mg/cm²), bien que cette dernière soit appliquée à une concentration 30 fois supérieure. Plus encore que pour *C. procera*, les composés termicides de *A. squamosa* sont donc bien plus solubles en solvant polaire.

Globalement, l'ordre d'activité trouvé est donc le suivant :

AW-As/Ex > AW-Cp/Ex > AW-Az/Ex .

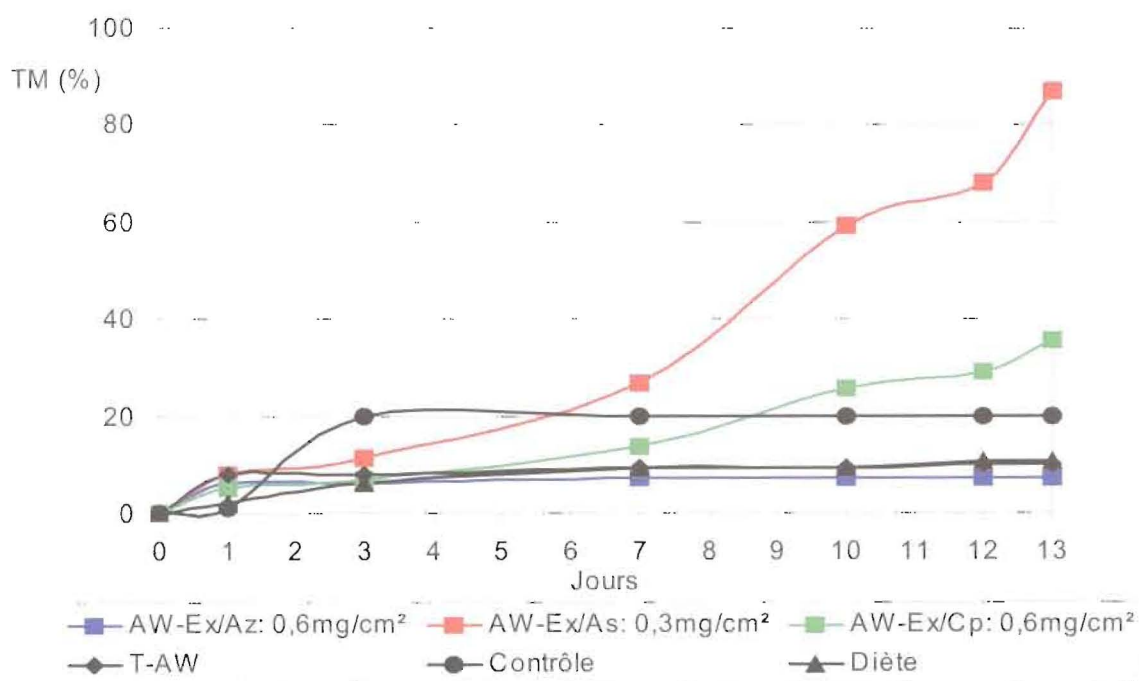


Figure 51 : Activité termicide d'extraits hydroacétoniques de trois graines oléagineuses (AW-Az/Ex, AW-As/Ex, AW-As/Ex, AW-Cp/Ex) (Conc : = 0,3 – 0,6 mg/cm²)

IX.2.5 Activité termicide des extraits hydroéthanoliques d'amande de *A. indica*, *A. squamosa* et *C. procera* par test de non choix

La Figure 52 montre l'activité à différentes concentrations des extraits hydroéthanoliques des trois espèces retenues pour l'instant. A très faible concentration (0,4 mg/cm²) l'extrait hydroéthanolique (EW-As/Ex) donne sensiblement le même taux de mortalité en 13 jours (61 %) que l'huile correspondante à 20 mg/cm² (TM 69 %) et l'extrait hexanique (Hx-As/Ex) à 10 mg/cm² (TM 75 %). Ceci confirme la préférence des composés termicides de *A. squamosa* pour un solvant polaire, déjà notée (§ IX.2.4). Par contre, à la concentration de 0,9 mg/cm², l'extrait hydroéthanolique de *A. indica* a donné un TM de 9 % seulement. Ce résultat est convergent avec les conclusions faites lors de l'étude en milieu hydroacétonique ; ces solvants ne conviennent pas pour *A. indica*.

En fait, les doses variables qui ont été appliquées pour la série des trois espèces végétales, sont destinées à permettre la comparaison en termes d'efficacité combinée au rendement en extrait puisque la concentration a été déterminée en fonction de cette dernière donnée. Le mélange EW apparaît donc d'autant plus efficace en terme d'aptitude à donner un extrait plus actif, que le rendement en extrait est le plus faible pour As. L'inactivité des extraits de *C. procera* à 0,5 mg/cm² (TM 11 % en 13 jours), confirme le résultat obtenu avec le mélange acétone/eau.

Globalement, l'activité des extraits hydroéthanoliques évolue de la façon suivante : EW-As/Ex > EW-Cp/Ex > EW-Az/Ex.

A ce stade, il est intéressant d'étudier l'activité des solides obtenus après cette étape d'extraction, avec différents solvants, afin de vérifier la présence des composés termicides en fonction de l'activité des extraits.

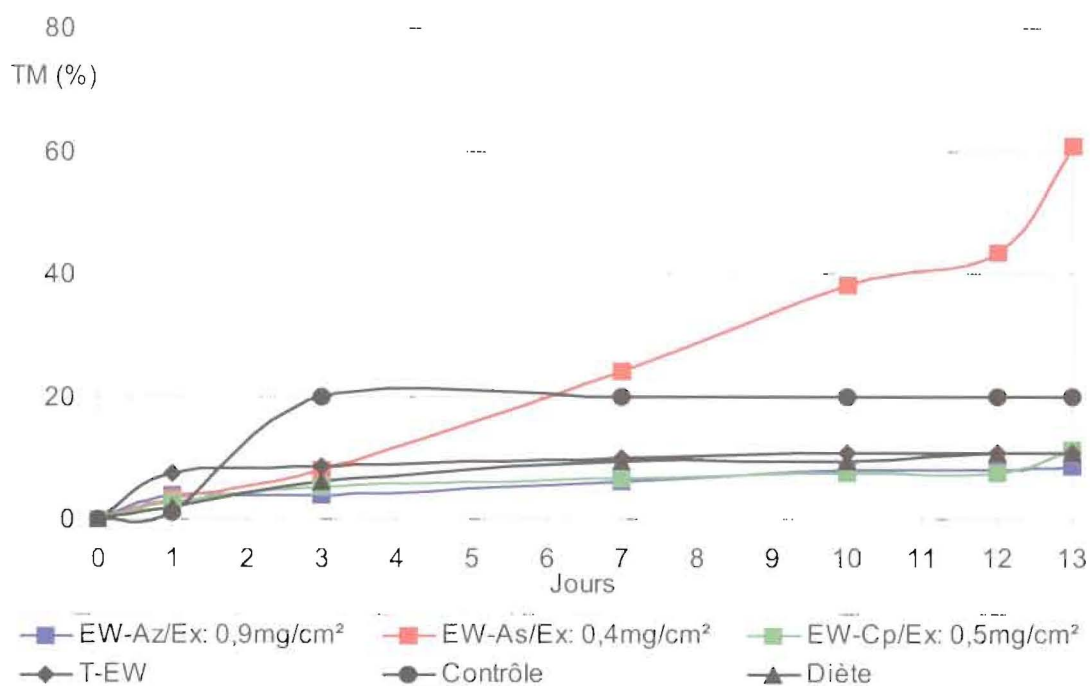


Figure 52 : Activité termicide d'extraits hydroéthanoliques de trois graines oléagineuses (EW-Az/Ex, EW-As/Ex, EW-As/Ex) (Conc : = 0,4 – 0,9 mg/cm²)

IX.2.6 Activité des poudres résiduelles d'amande de *A. squamosa* après extraction

La Figure 53 montre que l'amande de *A. squamosa* (Am-As) et les solides obtenus avec l'hexane (Hx-As/S) et le mélange éthanol/eau sur amande (EW-As/S) ont donné la même cinétique avec un taux de mortalité de 50 % en 13 jours. Ce TM est du même ordre de grandeur que celui du témoin diète, mais on peut remarquer un effet termicide certain après 7 et 10 jours d'essai. On n'en attendait pas moins pour l'amande broyée, dans la mesure où cette activité est ensuite présente dans les extraits. On remarque de plus que la courbe de EW-As/S est située au dessous des autres (> 10 %) entre les troisième et dixième jours, ce qui est en accord avec le fait que le solvant polaire extrait plus ou de façon plus sélective les composés termicides par rapport à l'hexane, conclusion des paragraphes précédents ; on s'attend donc à ce que le solide restant soit moins actif, ce qui semble être le cas.

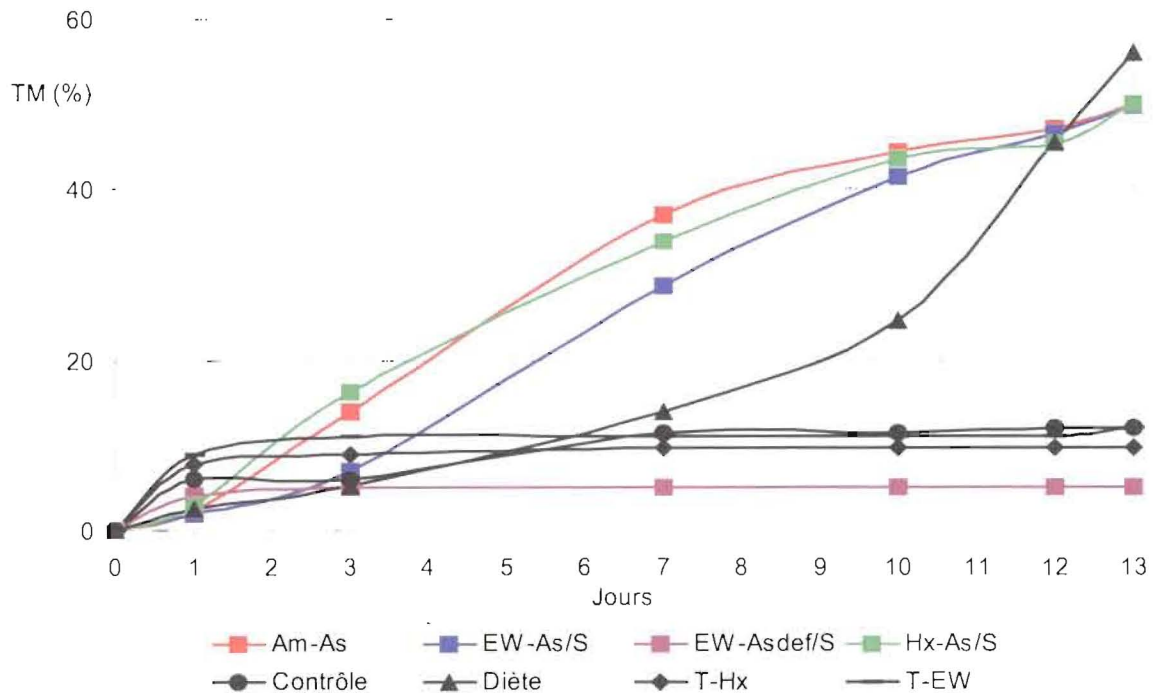


Figure 53 : Activité des solides après extraction

(Am-As, Hx-As/S, EW-As/S, EW-Asdef/S)

(Quantité soumise 10 mg)

IX.2.7 Choix du solvant éthanol/eau pour l'extraction de composés termicides d'amande de *A. squamosa*.

L'un des objectifs de cette thèse étant de contribuer au développement durable *via* la mise en œuvre de procédés respectueux de l'environnement, l'éthanol présente des avantages par rapport à l'acétone :

- Il peut-être facilement obtenu par simple procédé de fermentation d'agro-produits (manioc, maïs par exemple) alors que l'acétone est plutôt un produit de synthèse organique actuellement,
- Son coût est moins élevé que celui de l'acétone,
- Sa toxicité est faible en tant que solvant industriel. De plus, seule une composition du binaire aqueux a été testée à ce stade et il est *a priori* possible qu'une autre formulation s'avère plus performante

Ceci justifie le choix du mélange éthanol/eau dans la suite du travail d'extraction de composés termicides d'amande de *A. squamosa*.

Au regard de ce qui précède, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- L'activité termicide des huiles des quatre espèces sélectionnées évolue dans l'ordre suivant : *A. squamosa* > *A. indica* > *C. procera* > *P. biglobosa*. Cette séquence reste valable dans le cas d'extraction en solvant polaire (séquence obtenue en complétant le résultat de l'essai normalisé EN 118 avec les tests de screening pour *C. procera*)
- L'effet répulsif des huiles évolue quant à lui de la façon suivante : *A. indica* > *C. procera* > *A. squamosa* > *P. biglobosa*,
- Les composés termicides de *A. squamosa* ne seraient pas extraits de façon efficace avec des solvants apolaires comme l'hexane (ou le CO₂ SC) mais le sont avec des solvants polaires (éthanol/eau et acétone/eau, 80/20, v/v),
- La température influe défavorablement sur l'extraction des composés termicides de *A. squamosa*,
- Pour *A. squamosa* qui donne les extraits les plus actifs quel que soit le solvant testé, l'activité est sensiblement plus élevée en présence d'acétone/eau (TM 87 % ; 0,3 mg/cm²) par comparaison au milieu éthanol/eau (TM 61 % ; 0,4 mg/cm²).

A ce stade, l'amande de *A. squamosa* paraît être la plus intéressante pour la suite des travaux et nous avons donc choisi pour l'extraction des composés termicides le mélange éthanol/eau.

IX.3 Etude de l'activité termicide de *A. squamosa*

Les taux de mortalité élevés observés ci-avant se manifestent après des durées d'essai assez longues (13 jours), ce qui incite à augmenter l'efficacité des extraits soit en optimisant les conditions d'extraction (proportion éthanol/eau) à partir de l'amande soit par partition d'extraits primaires en milieu liquide-liquide dans des solvants de polarité différente, complétée par une chromatographie préparative.

Avant de poursuivre l'étude de l'influence du solvant, il convient de préciser les conditions de réalisation des tests, du point de vue de la dose d'extrait qu'il serait préférable de mettre en jeu.

IX.3.1 Effet de la délipidation préalable de l'amande de *A. squamosa*

Tout d'abord, il faut rappeler le fait que les extraits des essais précédents (IX.2.3) ont été bien souvent comparés pour des dépôts de masse différente (0,3 à 20 mg/cm²), les doses appliquées obéissant à des objectifs spécifiques de chaque partie du travail. Cette série d'essais permet de comparer les différents extraits de *A. squamosa* dans des conditions de test

rigoureusement identiques, ce qui n'était pas possible à partir des tests précédents. La dose maximale qui paraît possible pour tous les extraits étant limitée à 10 mg/cm² (§ paragraphe suivant), il a été décidé de s'en tenir à cette concentration qui est la plus proche possible de celle recommandée par la norme EN 599-1 (classe d'emploi 1).

Cette étude a été réalisée sur l'extrait hydroéthanolique 80/20 (EW-As/Ex) déjà étudié auquel on a joint l'extrait obtenu avec ce même solvant mais à partir du solide résultant de l'extraction préalable avec l'hexane (EW-Asdef/Ex) ainsi que l'extrait résultant de cette étape intermédiaire (Hx-As/Ex). La Figure 54 permet de vérifier par rapport aux essais précédents (§ IX.2) que la concentration a un effet important sur l'activité comparée des extraits hexaniques et hydroéthanoliques.

L'activité de Hx-As/Ex n'est pas négligeable mais la mortalité n'atteint pas 70 % en 10 jours pour 10 mg/cm². La délipidation préalable paraît quant à elle améliorer l'activité puisque l'extrait (EW-Asdef/Ex, Conc : 10 mg/cm²) obtenu sur amande délipidée, présente un TM en 7 jours de 99 % contre 87 % pour l'extrait (EW-As/Ex, 10 mg/cm²) obtenu sur amande non délipidée. La délipidation permet donc une concentration plus importante des composés actifs dans la matrice végétale par le simple fait de l'absence de l'huile neutre. Ceci permet d'envisager la récupération de l'huile de cette amande, indépendamment de son exploitation comme source de produits insecticides mais aussi de produits nutraceutiques (stéroïdes, tocophérols) (§ Chapitre VII).

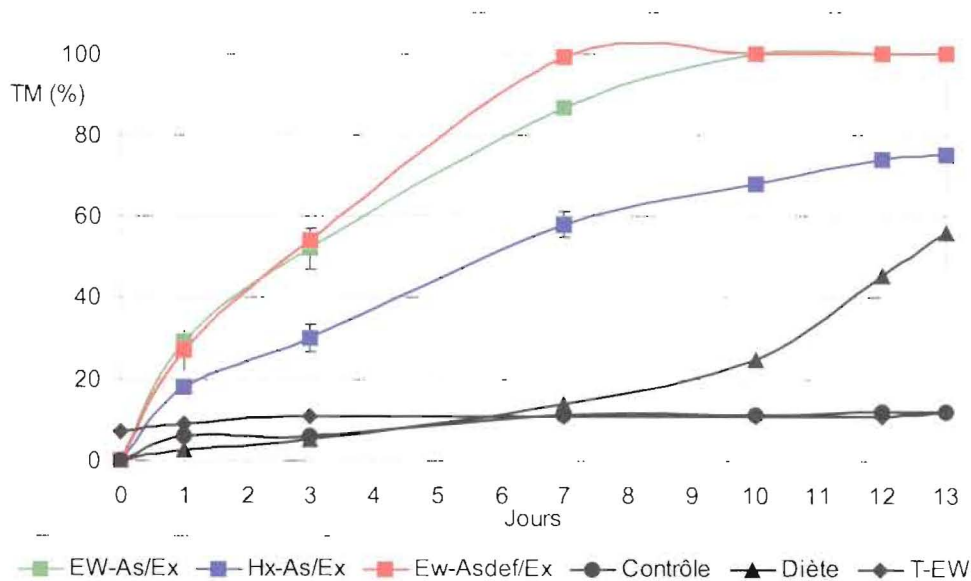


Figure 54 : Activité termicide des extraits concentrés à 50%, m/m d'amande (EW-As/Ex, Hx-As/Ex, EW-Asdef/Ex) (Conc : = 10 mg/cm²)

IX.3.2 Effet de la variation de la proportion éthanol/eau sur l'activité termicide

Nous allons maintenant essayer d'optimiser l'un des paramètres importants d'un procédé d'extraction des composés termicides, la polarité du solvant. Les cinq extraits préparés, éthanol/eau 100/0, 80/20, 50/50, 20/80, 0/100, ont été soumis au test de non choix à la dose de 5 mg/cm². En effet, la concentration de 10 mg/cm² qui a été utilisée au paragraphe précédent ne permettrait pas de bien discriminer les extraits.

La Figure 55 montre que l'extrait EW-Asdef/Ex, 80/20 a donné le taux de mortalité le plus élevé en 7 jours (94 %). Viennent ensuite successivement les extraits obtenus avec les mélanges éthanol/eau 100/0 et 50/50 (64 % en 7 jours). Les mélanges 20/80 et 0/100 ont donné les taux de mortalité les plus faibles pendant la même durée (51 et 34 % respectivement). L'activité évolue en fonction de la proportion éthanol/eau de la façon suivante : 80/20 > 100/0 = 50/50 > 20/80 > 0/100 sur une plage de TM de 94 à 34 %.

L'activité termicide ne semble donc pas évoluer en fonction de l'augmentation de la proportion d'eau. Le transfert de composés actifs serait donc limité par une polarité supérieure du solvant d'extraction, néanmoins l'absence d'eau (cas de l'éthanol pur) n'est pas non plus favorable à l'augmentation de l'activité. Il conviendrait donc d'explorer la zone autour de 80/20 dans la suite qui serait donnée à ce travail. Il faudrait aussi étudier les conditions de réalisation des tests de façon plus détaillée, notamment les seuils d'efficacité.

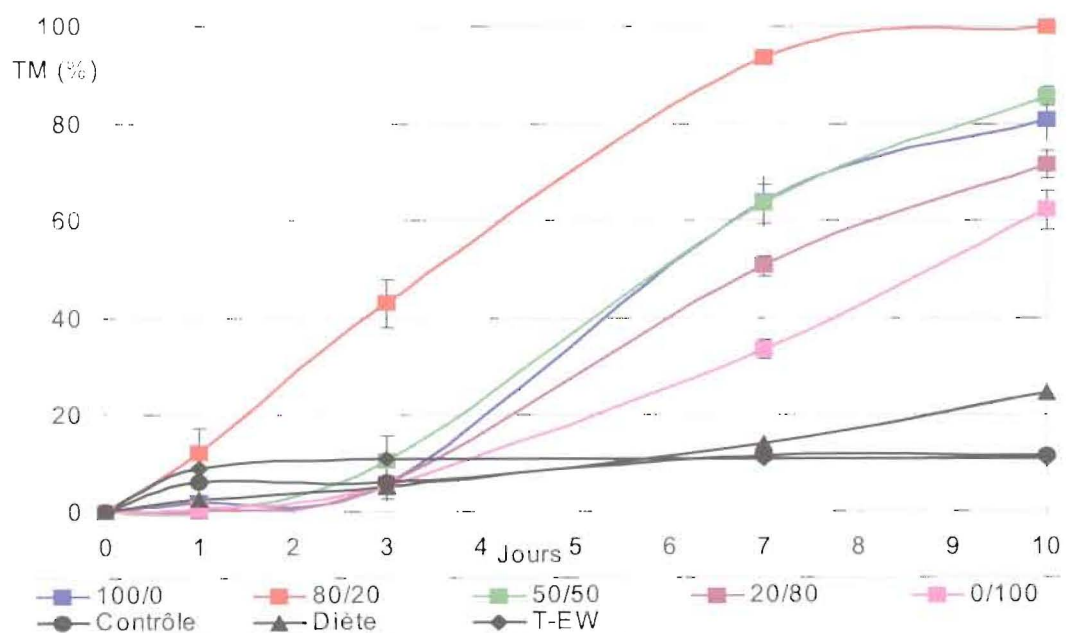


Figure 55 : Activité termicide des extraits hydroéthanoliques d'amandes de (EW-Asdef/Ex) obtenus avec différentes proportions éthanol/eau : (100/0, 80/20, 50/50, 20/80, 0/100) (Conc : 5 mg/cm²)

Nous avons déjà observé l'importance de la dose soumise au test de non choix (§ IX.2.4 et IX.2.5). La quantité déposée est limitée par la solubilité des extraits dans le solvant de dépôt si l'on s'en tient à un dépôt en une seule fois afin d'éviter un éventuel effet de chromatographie qui aboutirait à une répartition non homogène de la matière active sur la surface du support de cellulose. Le volume déposé qui doit rester constant est fixé à 20 μL par le protocole en vigueur dans le Laboratoire de Préservation du Bois du Cirad. En conséquence, en utilisant des solutions plus diluées que celle à 50 % m/m, on peut faire varier la gamme d'extrait déposé de 0 à 10 mg/cm^2 . Il faut remarquer que ce dépôt maximum autorisé par notre protocole de 10 mg/cm^2 (soit 100 g/m^2) est la moitié de celui recommandé par la norme EN 599-1 (classe d'emploi 1) qui est de 200 g/m^2 .

IX.3.3 Détermination du seuil d'efficacité des extraits hexaniques et hydroéthanoliques d'amande de *A. squamosa*.

Après avoir montré l'importance de la polarité sur l'extraction des composés termiticides, nous allons maintenant évaluer le seuil d'efficacité des différents extraits. Le seuil d'activité est défini comme l'intervalle de concentration entre l'activité la plus forte et la plus faible observée lorsqu'un des extraits atteint le seuil limite de mortalité (100 %) au cours du test. Pour évaluer le seuil d'efficacité des différents extraits, nous avons testé trois concentrations à savoir : 10 ; 5 et 1,2 mg/cm^2 . Nous pouvons noter qu'à 5 mg/cm^2 , l'activité obtenue en 7 jours (TM 95 %) est sensiblement la même que celle précédemment obtenue (§ IX.2.4) pour l'extrait semblable (EW-Asdef/Ex, 80/20, TM 94 %), ce qui permet de vérifier la répétabilité de nos mesures.

IX.3.3.1 Seuil d'efficacité de l'extrait hexanique de *A. squamosa* obtenu à 20 °C

La Figure 56 montre que le seuil d'activité pour l'extrait à 20 °C est situé entre 5 - 10 mg/cm^2 . Le seuil d'efficacité des extraits hexaniques à froid (Hx-As/Ex) est assez élevé et dénote la concentration relativement faible des composés termiticides dans ces extraits.

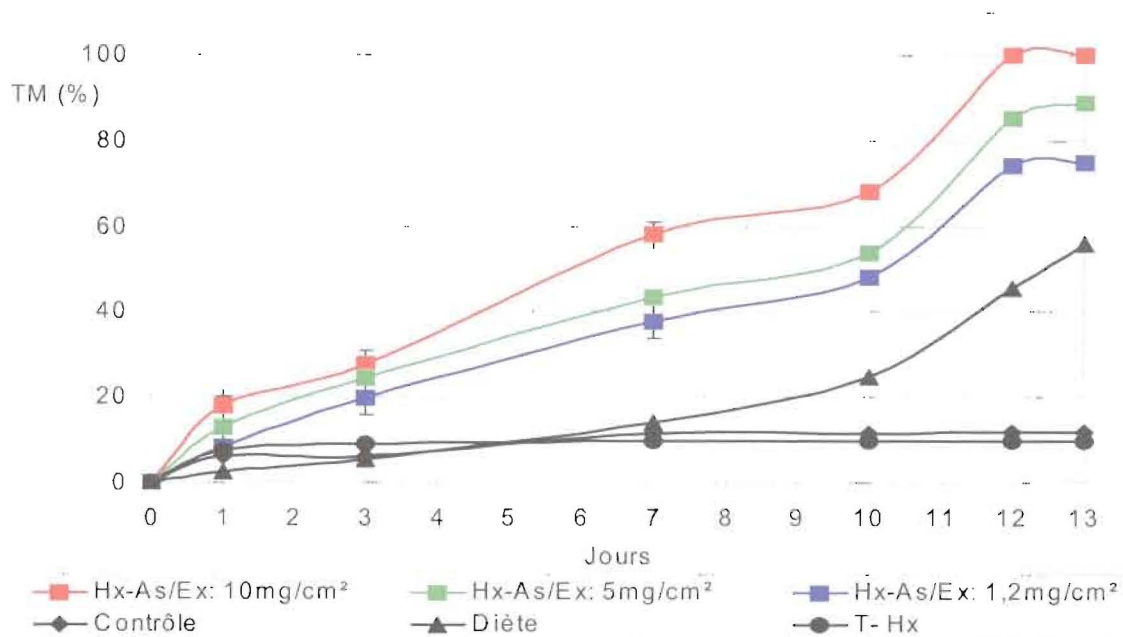


Figure 56 : Activité termicide d'extraits hexaniques de *A. squamosa* (Hx-As/Ex) en fonction de la dose appliquée (Conc : 1,2 5 10 mg/cm²)

IX.3.3.2 Seuil d'efficacité d'extraits hydroéthanoliques d'amande de *A. squamosa*.

La Figure 57 montre que le seuil d'efficacité pour l'extrait hydroéthanolique (80/20) sur amande de *A. squamosa* est situé entre 1,2 - 5 mg/cm², donc au-dessous de celui trouvé pour l'extrait hexanique.

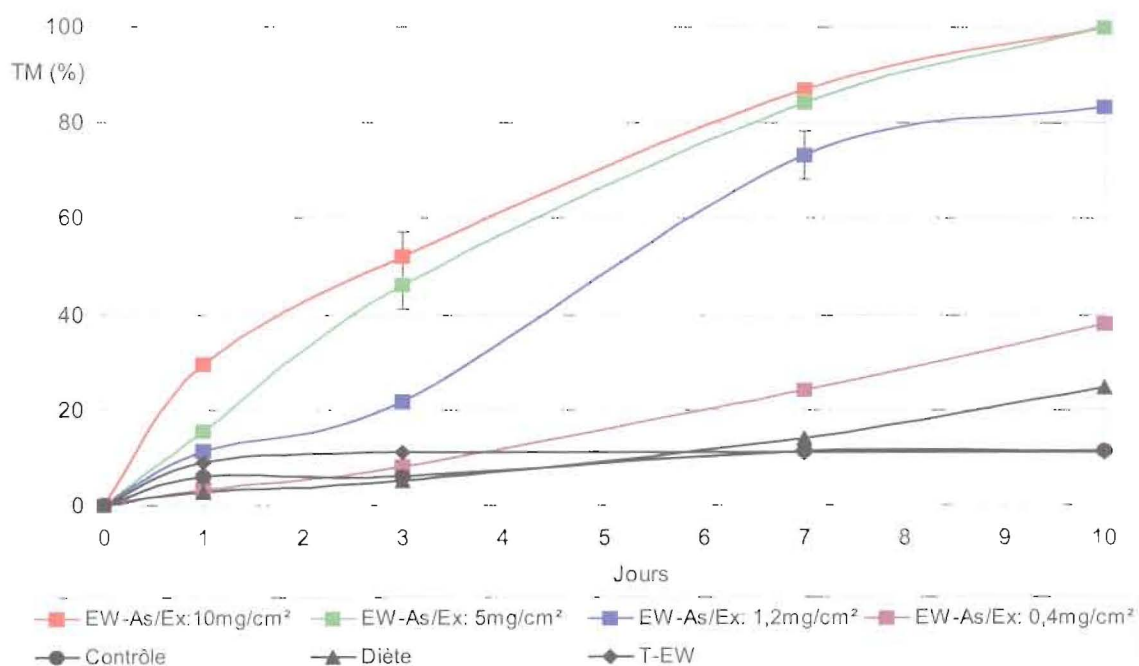


Figure 57 : Activité termicide de l'extrait hydroéthanolique (80/20) sur amandes de *A. squamosa* (EW-As/Ex) (Conc : 1,2 : 5 : 10 mg/cm²)

IX.3.3.3 Seuil d'efficacité de l'extrait hydroéthanolique sur amande délipidée de *A. squamosa*.

Sur la Figure 58, le seuil d'efficacité de l'extrait obtenu sur amande délipidée (EW-Asdef/Ex) est manifestement inférieur à celui des extraits obtenus sur amande non délipidée (situé à 1,2 – 5 mg/cm²). Il est dommage que le dépôt à 0,4 mg/cm² n'ait pu être exploité pour cet extrait, car le TM de 100 % obtenu en seulement 7 jours laisse croire que le seuil d'efficacité serait dans ce cas 0,4 – 1,2 mg/cm². Cela confirme l'effet positif de la délipidation préalable (§ IX.3.1) sur l'extraction des composés termicides. Cette série d'essais confirme l'efficacité supérieure de l'extrait hydroéthanolique 80/20 sur amande délipidée, avec la séquence EW-Asdef/Ex > EW-As/Ex > Hx-As/Ex.

Le fait d'avoir clairement établi l'activité la plus élevée pour l'extrait hydroéthanolique (ETOH/H₂O, 80/20 v/v) obtenu à partir d'amande délipidée a aussi montré les limites que l'on pourrait attendre d'un procédé simple d'extraction.

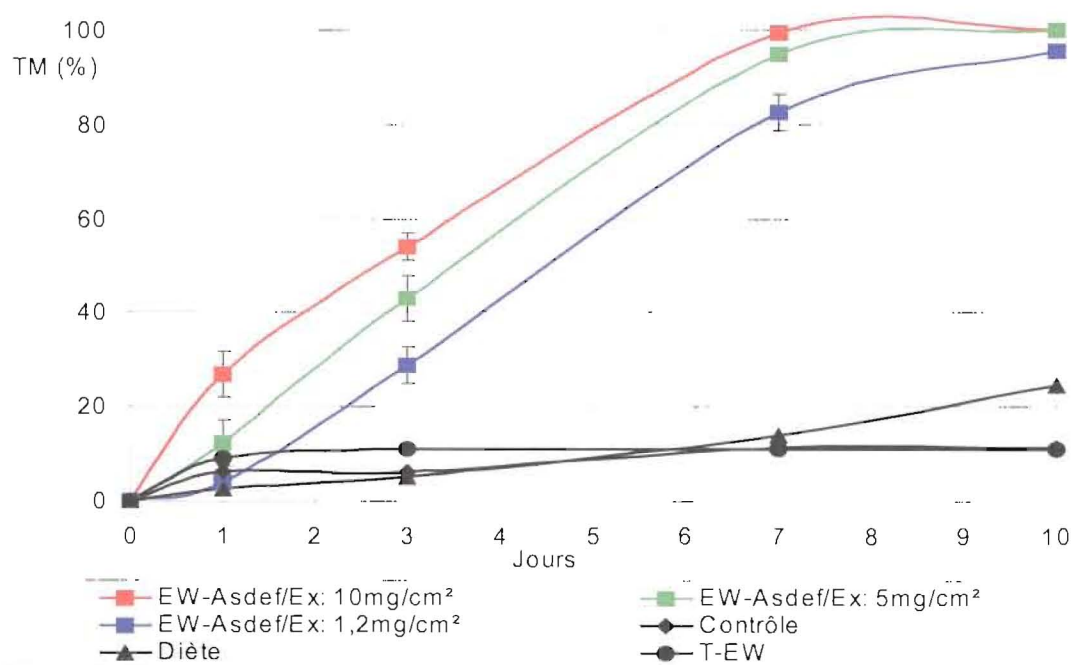


Figure 58 : Activité termicide d'extraits hydroéthanoliques sur amandes délipidées (EW-Asdef/Ex) (Conc : 1,2 ; 5 ; 10 mg/cm²)

IX.3.4 Activité termicide de fractions dérivées d'extraits d'amande de *A. squamosa*.

Il était donc intéressant de chercher à obtenir des extraits plus concentrés. Cette démarche a permis de débiter un premier travail d'identification des molécules actives exposées au chapitre VIII et de disposer d'extraits plus actifs.

Deux voies basées sur des protocoles expérimentaux de la littérature (Fang-Rong *et al.*, 1999; Shajnah *et al.*, 2003) concernant les graines de *A. squamosa* ont été expérimentées :

- l'une consiste à appliquer séquentiellement plusieurs solvants en partant de l'amande broyée, la dernière étape consistant en une partition entre deux solvants de polarités différentes (hexane, éther de pétrole, chloroforme, méthanol),
- l'autre est basée sur le fractionnement (colonne de silice) de la P-MeOH.

Ces deux protocoles sont détaillés en partie Matériels et Méthodes (§ Chapitre V).

Les rendements pondéraux notamment ont été exposés au chapitre VIII précédent.

IX.3.4.1 Activité termicide des phases obtenues par partition liquide-liquide de l'extrait hydroéthanolique sur amande de *A. squamosa*

Sur la Figure 59, les concentrats à 50 % m/m obtenus dans les deux phases éther de pétrole (P-PE) et chloroforme (P-CHCl₃) présentent une évolution similaire du TM en fonction du temps (64 % en 10 jours). Il faut remarquer que l'activité de la phase P-EP est semblable à celle de l'extrait hexanique à 20 °C Hx-As/Ex (TM 68 %) (§ IX.2.3.2). A polarité semblable (hexane ; éther de pétrole), l'activité termicide est donc la même ce qui montre la répétabilité des résultats. Cela montre aussi que les molécules supposées actives auraient un caractère amphiphile car elles se sont solubilisées de façon équivalente (TM 64 %) à la fois dans une phase apolaire (éther de pétrole) et dans une phase plus polaire (chloroforme). Cette méthode a permis à Shajnah *et al.* (2003) d'enrichir la phase P - CHCl₃ en acétogénines et de procéder par fractionnement à l'isolation de Annotemoyin – 1.

Mais dans le cas présent, le taux de mortalité causé par l'ensemble des acétogénines de la phase P-CHCl₃ en 10 jours n'étant que de 64 % pour une dose appliquée de 10 mg/cm², nous pouvons conclure que ces acétogénines présentent une activité termicide assez faible. Nous avons alors cherché un autre protocole permettant de purifier cette phase de chloroforme (Fang-Rong *et al.*, 1999).

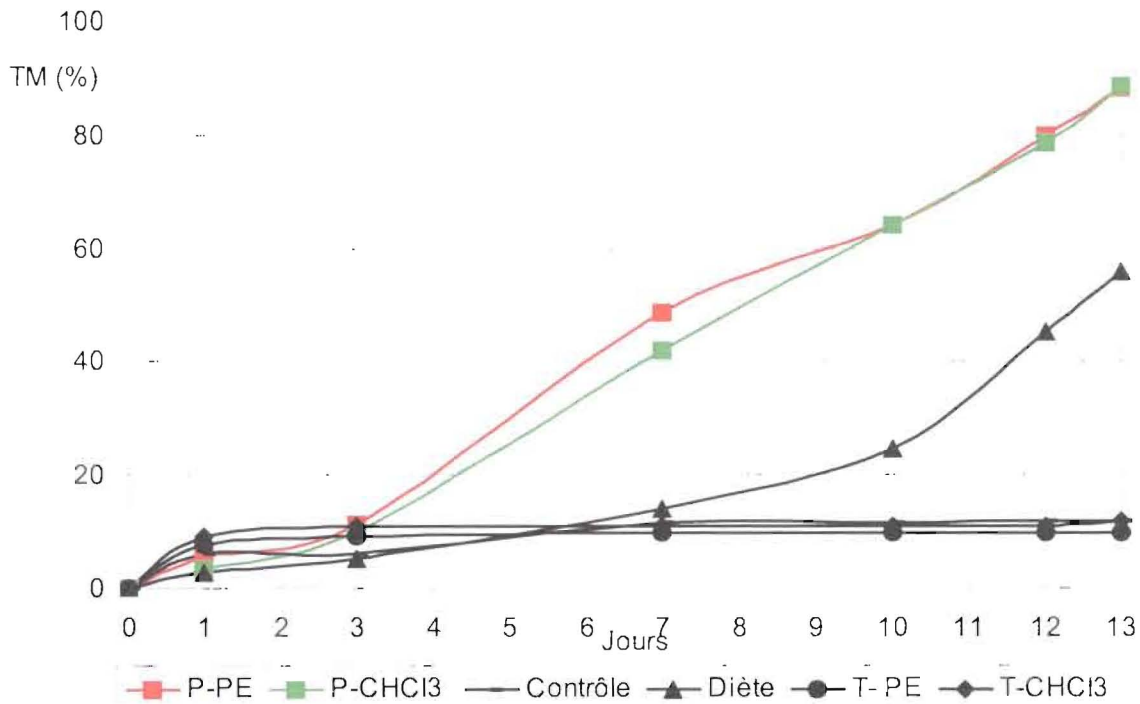


Figure 59 : Activité termicide des phases (P-CHCl₃, P-EP), obtenues par partition liquide-liquide de l'extrait hydroéthanolique sur amande de *A. squamosa* (Conc : 10 mg/cm²).

IX.3.4.2 Activité termicide des phases issues de la partition dans le méthanol et l'hexane de la phase chloroformique de *A. squamosa*

Trois concentrations ont été testées pour P-MeOH (1,2 ; 5 ; 10 mg/cm²) afin de déterminer le seuil d'efficacité de cette fraction et de comparer ensuite avec celui de l'extrait hydroéthanolique de départ (EW-As/Ex et EW-Asdef/Ex). La phase enrichie en acétogénines (P-MeOH) a donné un TM de 100 % et 80 %, en 3 jours respectivement pour les doses de 10 mg/cm² et 5 mg/cm². Il est donc clair que la phase méthanolique comporte le plus de composés termicides et le seuil d'efficacité est situé entre 1,2 – 5 mg/cm² (Figure 60). Par contre l'activité de la phase appauvrie en acétogénines P-Hx à 5 mg/cm² présente un taux de mortalité en 3 jours de 35 % (Figure 61). Le seuil d'efficacité est donc largement supérieur à 1,2 – 5 mg/cm². Mais cette activité résiduelle est cependant notable au dixième jour (TM 74 %) et serait à relier au caractère amphiphile des composés termicides capables de se partager entre les deux phases (§ IX.3.4.1).

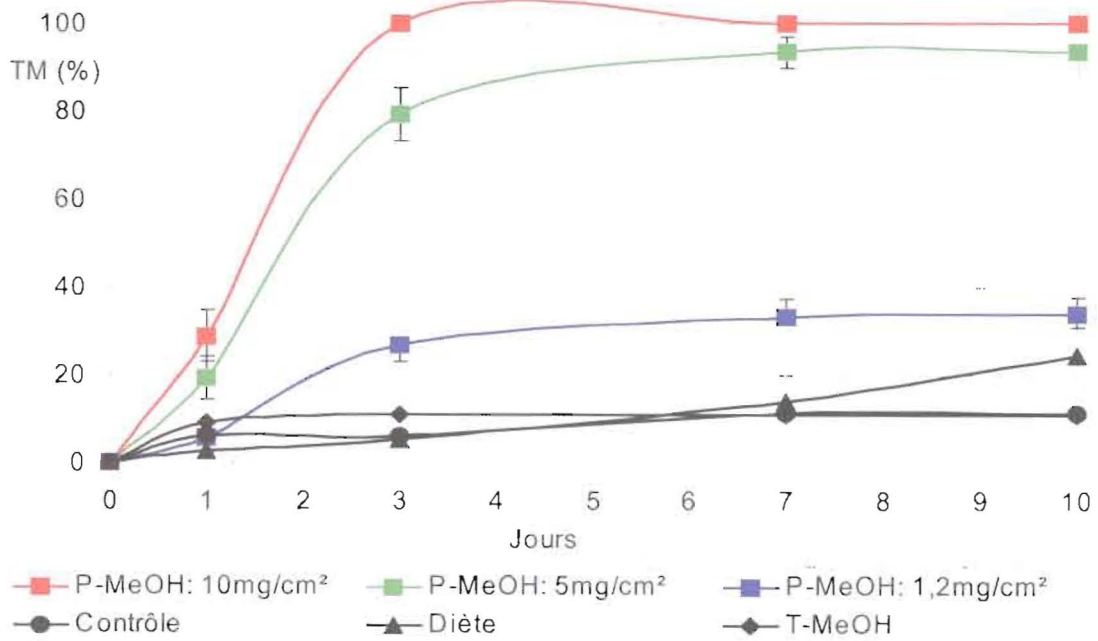


Figure 60 Activité termicide de la phase (P-MeOH) enrichie en acétogénines d'extraits d'amande de *A. squamosa* (Conc : 1,2 ; 5 ; 10 mg/cm²).

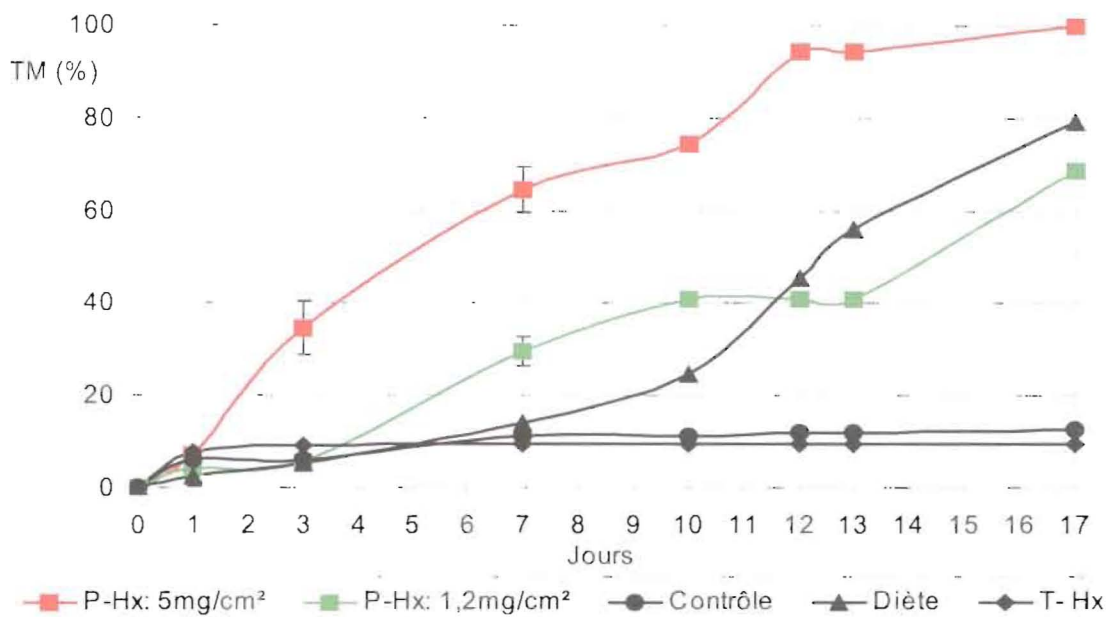


Figure 61 : Activité termicide de la phase (P-Hx) appauvrie en acétogénines d'extraits d'amande de *A. squamosa* (Conc : 1,2 ; 5 mg/cm²).

IX.3.4.3 Activité termicide de fractions issues de chromatographie sur colonne de la phase enrichie en acétogénines (P-MeOH)

Tout d'abord, il faut noter l'activité termicide de la phase enrichie en acétogénines (P-MeOH) étudiée au paragraphe précédent et qui a été à nouveau incluse à la présente série de tests, afin de pouvoir conclure avec certitude à propos de l'activité des fractions de chromatographie. Le présent test donne un TM de 87 % en 5 jours, voisin de celui trouvé précédemment de 100 % en 5 jours à la dose de 10 mg/cm².

La Figure 62 révèle que les composés de la fraction F-13 à la dose de 2 mg/cm² ont donné un TM de 93 % en 5 jours et 100 % en 7 jours. La fraction F-19 à la dose de 1 mg/cm² possède une activité plus faible (TM 31 % en 5 jours et 100 % en 10 jours).

Bien que la quantité mise en jeu pour F-19 soit faible (seulement 1mg/cm²), en raison des difficultés pratiques relatives aux quantités disponibles pour les tests et pour les analyses, il est évident d'après la Figure 62 que cette fraction est moins active que F-13. Nous avons vu par exemple (Figure 52) que EW-As/Ex (à 0,4 mg/cm²) qui a induit une mortalité faible en 7 jours (TM 25 %), nécessitait un dépôt dix fois supérieur (< 5 mg/cm²) pour atteindre un TM de 80 %. Ces observations montrent donc l'efficacité du fractionnement effectué.

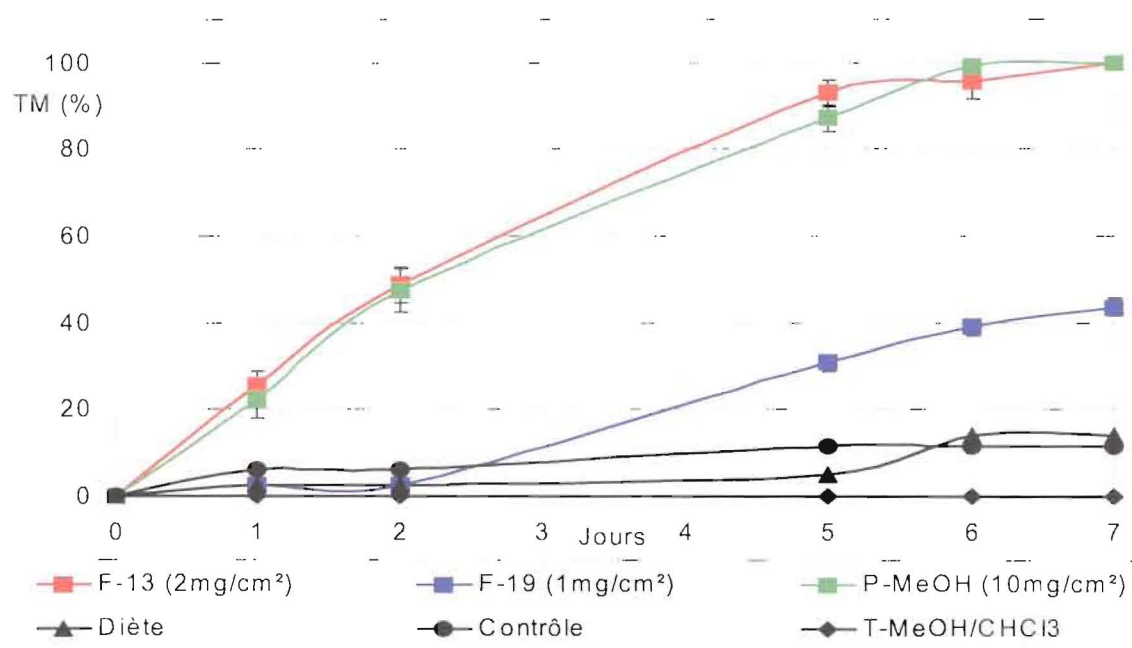


Figure 62 : Activité termicide des fractions issues de chromatographie sur colonne de la phase enrichie en acétogénines (P-MeOH)

(Conc : 2 ; 1 ; 10 mg/cm², respectivement pour F-13, F-19 et P-MeOH)

IX.3.4.4 Comparaison de l'activité termicide des différents extraits les plus actifs (P-MeOH, EW-Asdef/Ex, EW-As/Ex, Hx-As/Ex)

Le présent chapitre rend compte des résultats de l'activité termicide d'extraits d'amande des quatre graines oléagineuses sélectionnées pour cette étude, dont une vingtaine concerne l'espèce *A. squamosa* sur laquelle porte l'essentiel de l'étude termicide. Afin de parvenir à une conclusion quant à l'intérêt de cette espèce, il convient de comparer les extraits les plus actifs obtenus par tests de screening (test de non choix).

La Figure 63 rassemble les résultats pour les extraits les plus intéressants et permet de noter que les deux extraits les plus actifs d'après ces séries de tests sont :

- l'extrait hydroéthanolique (éthanol/eau, 80/20 v/v) sur amande délipidée (EW-Asdef/Ex) à 1,2 - 5 mg/cm²,
- la phase enrichie en acétogénines par partition liquide-liquide (P-MeOH) à 1,2 - 5 mg/cm².

Les performances paraissent meilleures pour le premier extrait que celles de la fraction obtenue sur amande non délipidée mais la différence est faible. Pour le second, le TM provoqué par ce dernier est de 100 % dès le 3^{ème} jour pour la même dose de 10 mg/cm². Ce dernier est indiscutablement l'extrait le plus actif. On pourrait espérer atteindre dans des conditions et avec des systèmes de solvants optimisés plus finement que ce qu'il a été possible de réaliser au cours de ces travaux de thèse, un niveau d'activité bien supérieur, comparable à celui obtenu après chromatographie préparative. L'activité de la fraction F-13 est voisine de la précédente (P-MeOH) mais pour une dose 5 fois plus faible (2 mg/cm²).

Nous venons donc de montrer qu'au-delà des effets cytotoxiques (Londershausen, 1991 ; Saxena, 1993 ; Pardhasaradhi *et al.*, 2005) et insecticides (Saluja, 1989 et 1994 ; Dales, 1999 ; Gilbert, 1999 ; dos Santos, 2001) déjà décrits, les extraits de *A. squamosa* ont bien une activité termicide ; c'est la première fois, sur la base de la littérature consultée, qu'une telle activité est révélée pour *A. squamosa*.

Nos propres travaux de mise en relation de l'activité termicide avec les structures moléculaires, laissent penser que, comme Hopp *et al.*, (1996) l'ont écrit, l'activité insecticide des extraits de *A. squamosa* est causée par les acétogénines de type squamocine. Selon ces auteurs, ces dernières agissent sur le système respiratoire des insectes qui meurent par asphyxie (§ Chapitre I).

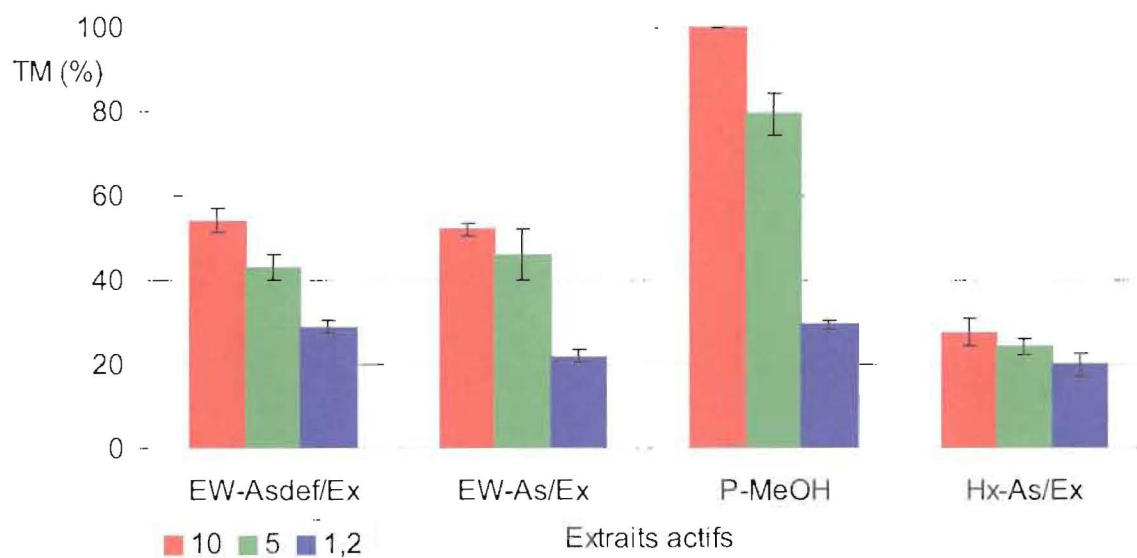


Figure 63 : Activité termicide par test de non choix des extraits les plus actifs de *A. squamosa* en 3 jours (P-MeOH, EW-Asdef/Ex, EW-As/Ex, Hx-As/Ex) (Conc : 1,2 ; 5 ; 10 mg/cm²)

Les résultats qui ont conduit à ces observations étant obtenus par test de non choix, il convient maintenant de soumettre les extraits les plus actifs au test normalisé EN 118.

IX.3.5 Efficacité préventive sur bois des extraits les plus actifs (EW-Asdef/Ex et P-MeOH) de *A. squamosa* par essai EN118.

Le test de non choix ne suffit pas à lui seul pour apprécier l'efficacité préventive sur bois. Il faut nécessairement confirmer cette efficacité par un essai normalisé sur bois. On a donc effectué cet essai avec les deux extraits les plus actifs d'après les tests de non choix que sont :

- l'extrait hydroéthanolique sur amande délipidée (EW-Asdef/Ex) à 10 mg/cm²
- la phase enrichie en acétogénines (P - MeOH) à 10 mg/cm².

La fraction F-13 quant à elle n'a pas été soumise à ce test car elle a été obtenue par une méthode de laboratoire qui ne serait probablement pas applicable pour une production à grande échelle pour des raisons économiques.

On s'est limité à une seule concentration (10 mg/cm²) à cause de la disponibilité en termites.

La Figure 64 montre que les cotations des attaques sur le bois traité par les extraits (EW-Asdef/Ex et EW-As/Ex sont toutes égales à 0 selon l'essai EN 118 (aucune attaque du bois). Selon la norme EN 599-1 (classe d'emploi 1, § chapitre VI), ces extraits pourraient être utilisés comme produits de traitement préventif du bois. D'après les tests de screening (test de non choix), on peut penser que l'extrait P-MeOH conserverait ce niveau d'activité à une dose bien inférieure par comparaison à l'autre extrait mais il n'a pas été possible de le vérifier pour des raisons pratiques.

Nous venons de montrer par deux voies différentes d'extraction susceptibles de conduire à deux procédés qui ne seraient pas équivalents du point de vue de l'impact environnemental et du développement durable, l'intérêt d'extraits d'amande de *A. squamosa* :

- l'une risquée du point de vue environnemental, l'extrait P-MeOH utilisant des solvants problématiques du point de vue écologique comme le chloroforme, le méthanol (William et Hron, 1996 ; Wan et Wakelyn, 1997),
- l'autre basée sur un solvant d'origine renouvelable, constitué d'éthanol et d'eau ; l'éthanol d'origine fermentaire étant de plus en plus disponible, avec le développement des biocarburants (Ragauskas *et al.*, 2006).

La facilité de mise en œuvre du procédé éthanologique qui ne nécessiterait qu'un petit nombre d'étapes ouvre des perspectives d'application pour une production à un coût compatible avec sa mise en œuvre au Bénin.



64-a : Etat en fin d'essai de l'éprouvette imprégné (EW-Asdef/Ex) : Cotation 0



64-b : Etat en fin d'essai de l'éprouvette imprégné (P-MeOH) : Cotation 0



64-c : Etat en fin d'essai de l'éprouvette non imprégné (témoin) : Cotation 4

Figure 64 : Efficacité préventive sur bois des extraits les plus actifs (EW-Asdef/Ex et P-MeOH) par essai EN118 : Cotations (Conc : = 10 mg/cm²)

IX.4 Synthèse des résultats : Efficacité - Applications

Les données du Tableau 30 témoignent de la possibilité d'utilisation des dérivés (huile, extraits) d'amande de *A. squamosa* sous diverses formes dans le domaine de la préservation du bois (Norme EN 559-1). Sous réserve de confirmation par des tests plus approfondis que ceux des essais préliminaires effectués au cours de cette étude, nous pouvons entrevoir des applications pour deux autres oléagineux considérés. Les huiles de *A. indica* (H-Ai) et *C. procera* (H-Cp) accessibles *via* un procédé simple par pression étant donnée la teneur élevée en huile des amandes, pourraient servir comme répulsif de termites. L'huile de *A. squamosa* extraite avec l'hexane à froid laisse espérer un intérêt en traitement préventif du bois pour une huile extraite par simple pression (sous réserve de vérification de l'activité de ce produit). Les extraits hydroéthanoliques EW-Asdef/Ex et leurs dérivés, P-MeOH, F-13, peuvent servir comme produits de préservation du bois selon les prescriptions de la norme EN 118 dans la classe d'emploi 1.

Tableau 30 : Synthèse des principaux résultats relatifs à l'activité termicide des extraits des quatre oléagineux sélectionnés

Espèces	Extraits	Méthode d'obtention	Taux de mortalité test de non choix (%)	Cotation EN118	Durée d'efficacité (jours)	Seuil d'efficacité (mg/cm ²)	Complexité et impact écologique probables du procédé	Applications potentielles
<i>A. indica</i>	H-Ai	Huile (Soxhlet, 69 °C)	65	3	13	20	Moyen	Répulsif
<i>C. procera</i>	H – Cp	Huile (Soxhlet, 69 °C)	21	3	13	> 20	Moyen	Répulsif
<i>P. biglobosa</i>	H – Pb	Huile (Soxhlet, 69 °C)	17	Indét.	13	> 20	Moyen	-
<i>A. squamosa</i>	H-As	Huile (Soxhlet, 69 °C)	69	2	13	20	Moyen	Répulsif
	Hx-As/Ex	Extrait (batch) hexanique à froid sur amande non délipidée (20°C)	68	Indét.	10	5 - 10	Faible	Termicide
	EW-As/ Ex	Extrait (batch) (EtOH/H ₂ O, 80/20) sur amande non délipidée (20°C)	100	Indét.	10	1,2 – 5	Faible	Termicide
	EW-Asdef/Ex	Extrait (batch) (EtOH/H ₂ O, 80/20) sur amande délipidée (20°C)	100	0	7	1,2 – 5	Faible	Préservation du bois
	P – MeOH	Phase (Partition Liq - Liq) enrichie en acétogénines	100	0	3	1,2 – 5	Elevé	Préservation du bois
	P – Hx	Phase appauvrie en acétogénines	74	Indét.	10	> 5	Elevé	Répulsif
	F – 13	Fraction d'acétogénines	93	Indét.	En 3 jours	2	Elevé	Préservation du bois
	F – 19	Fraction d'acétogénines	44	Indét.	En 7 jours	> 1	Elevé	-

IX.5 Conclusion

Si les propriétés insecticides en général de ces espèces avaient été rapportées dans la littérature scientifique, surtout pour *A. indica* (neem), il n'en était pas de même pour l'activité termicide en particulier. A l'exception de *P. biglobosa*, les trois autres amandes paraissent intéressantes. Seule cette partie de la graine a en effet été étudiée et nous avons de plus été contraints de focaliser le travail sur *A. squamosa*, l'espèce pour laquelle les essais d'orientation paraissaient les plus prometteurs.

Il faut donc souligner le fait que d'autres parties de la biomasse collectée sont aussi susceptibles de présenter une activité dans le domaine de la préservation du bois. Par exemple, la partie écailleuse de *A. squamosa* n'a pas été considérée dans cette thèse et si la coque elle-même n'a pas montré une activité termicide, il est tout à fait envisageable qu'elle renferme des composés dont l'activité n'a pu être révélée, mais qui seraient extractibles par ailleurs.

Ce chapitre rassemble les résultats relatifs à l'étude de plus de trente échantillons, amandes, tourteaux, extraits. Bien qu'appelant des tests complémentaires selon la norme EN 559-1, il permet de tirer plusieurs conclusions relatives à l'activité termicide d'extraits des amandes des quatre graines oléagineuses :

- l'activité termicide dépend largement du solvant d'extraction (polarité, température d'extraction) et évidemment de la concentration de l'extrait.
- pour *A. squamosa*, les composés termicides se retrouvent préférentiellement dans les phases plutôt polaires (éthanol/eau, chloroforme, méthanol), même si leur comportement dénote un caractère amphiphile. Pour *A. indica* et *C. procera*, il semble que ce soit l'inverse. Ainsi la préférence donnée au solvant hydroéthanolique favorable à *A. squamosa*, n'a pas permis de révéler le potentiel de *A. indica*,
- le binaire éthanol/eau, 80/20 v/v constitue un mélange convenable pour la mise en place d'un procédé d'extraction de composés termicides à partir d'amandes de *A. squamosa*.
- les composés chimiques responsables de l'activité termicide dans les amandes de *A. squamosa* (acétogénines de type squamocine) confèrent à l'une des fractions chromatographiques l'activité la plus élevée de la série, montrant ainsi le niveau qui pourrait être atteint *via* un procédé bien adapté.

Les seuils d'efficacité sont de l'ordre de 5 – 10 mg/cm² (pour les extraits hexaniques) et de 1,2 – 5 mg/cm² voire inférieurs pour les extraits alcooliques. Bien que faisables, les doses à appliquer restent supérieures à celles des produits de synthèse.

Dans une perspective d'applications des résultats pour la production, la voie serait encore longue afin de disposer des éléments indispensables avant une décision d'exploitation :

- vérification de la résistance du produit (tests d'évaporation-oxydation de 4 semaines), indispensable pour classer un extrait en classe d'emploi 1,
- essais normalisés complémentaires (EN 46 ; EN 49-1 ; EN 20-1 et 2 ; EN 73 ; EN 47 ; EN 49-2) spécifiques des classes d'usage supérieures, incluant d'autres agents de dégradation du bois (*Hylotrupes bajulus*, *Anobium punctatum*, *Lyctus brunneus*),
- mise en formulation des extraits, coût et propriétés finales des produits formulés.

Les résultats obtenus permettront néanmoins d'orienter la réflexion à propos des choix technologiques en vue de l'optimisation d'un procédé d'extraction ; l'éthanol qui peut être d'origine fermentaire paraît présenter un avantage. Mais il ne faut pas oublier le CO₂ SC dont les avantages en termes de « technologie propre » et de sélectivité laissent espérer une voie vers des extraits ayant une concentration élevée en composés actifs.

Le procédé ébauché au cours de ce travail pourrait fournir des extraits pour d'autres applications, au-delà de la protection du bois, vers le domaine phytosanitaire et celui de la santé humaine, compte-tenu des multiples activités recensées pour *A. squamosa*.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

L'étude bibliographique et les informations recueillies sur le terrain relatives à des espèces végétales connues mais peu exploitées (hors bois d'oeuvre) ont permis de sélectionner quatre espèces oléagineuses du Bénin : *Annona squamosa*, *Azadirachta indica*, *Carapa procera* et *Parkia biglobosa* ; à l'exception de *A. indica*, ces espèces sont mieux connues du point de vue forestier et de celui des utilisations traditionnelles qu'au plan de la composition chimique des graines.

Le travail de laboratoire a donc nécessairement commencé par la caractérisation chimique des différentes parties des graines collectées -coque, tourteau d'extraction, huile- via l'analyse des lipides, des protéines, des glucides, des minéraux, de la lignocellulose, en CCM, CPG, CLHP et par des méthodes de dosage normalisées. Il a permis de compléter les données de la littérature et de faire progresser la connaissance de la composition et des propriétés de ces graines. L'étude montre l'intérêt en nutrition de l'huile de *P. biglobosa* de par sa richesse en tocophérols et en phytostérols, mais aussi l'intérêt du tourteau d'extraction (acides aminés essentiels, lysine et leucine notamment). Ces résultats justifient l'usage traditionnel de *P. biglobosa* pour la préparation du condiment « *afitin* ». Les autres huiles sont de type oléique, avec jusqu'à 60 % de cet acide pour *C. procera*.

En fait, dans l'optique du développement durable qui implique l'utilisation de l'ensemble de la biomasse collectée, ces données permettent de montrer des voies de valorisation des co-produits de la graine après l'extraction de fractions possédant une activité insecticide, ce dernier domaine ayant constitué l'axe principal de la thèse.

Les tests d'orientation de la deuxième partie du travail ont conduit à désigner *A. squamosa* pour l'étude plus approfondie de son activité anti-termites, cette espèce ayant montré un niveau supérieur aux autres dans les conditions expérimentales choisies. Cela ne signifie nullement que les trois autres espèces végétales sont dénuées d'intérêt pour cette application -des essais complémentaires seraient utiles pour mieux évaluer leur activité- mais le choix d'une seule espèce végétale s'imposait pour des raisons pratiques. De plus *A. indica* ayant fait l'objet d'une grande attention de la part des chercheurs, le choix d'*A. squamosa* paraissait plus vecteur d'innovation.

Lors de l'étude du procédé d'extraction des composés termiticides, la gamme de solvants testés couvre l'ensemble du domaine de polarité (hexane, éthanol, acétone/eau, éthanol/eau, eau). Les composés responsables de cette activité termiticide s'étant montrés plus solubles dans des solvants polaires, nous nous sommes intéressés au mélange binaire éthanol/eau, solvant qui présente l'avantage d'un impact environnemental réduit par rapport à ses concurrents (acétone, méthanol). Les courbes d'équilibre établies à partir des essais d'épuisement des extractibles en quatre étapes successives d'extraction en milieu hydroéthanolique ont permis de tracer les droites opératoires et de révéler les bonnes performances du binaire éthanol/eau 80/20v/v du point de vue de l'efficacité du transfert solide-liquide (facilité d'extraction), mais aussi de l'activité termiticide de l'extrait.

Des essais exploratoires en milieu CO₂ supercritique laissent espérer la sélectivité attendue de ce solvant et la nécessité d'un co-solvant tel l'éthanol a été notée pour ce qui est du rendement d'extraction ; cet axe de recherche devrait à notre avis être prioritaire lors de la poursuite des travaux, compte-tenu de la possibilité offerte par ce milieu d'extraire séquentiellement les différentes classes de composés présents dans les graines, ceci afin d'élargir la gamme de composés accessibles par un tel procédé s'il était mis en œuvre.

Les performances termiticides encourageantes des extraits hydroéthanoliques ont conduit ensuite à rechercher des fractions présentant une activité plus élevée, en combinant partition liquide-liquide et chromatographie préparative sur colonne, d'après des protocoles de laboratoire adaptés de la littérature. Le test de détection en solution avec les réactifs de Kedde a montré la présence d'acétogénines dans des fractions issues de la chromatographie préparative. La microanalyse élémentaire C,H,O, puis l'analyse par CLHP/SM et en RMN ont montré la présence d'acétogénines comme composants principaux de la fraction la plus active ; sous réserve d'une élucidation complète de ces structures complexes, ces acétogénines paraissent être de type squamocine.

Cette activité termiticide des extraits a été évaluée par des tests rapides de non choix et les plus actifs ont passé avec succès l'essai normalisé EN118 relatif à la prévention de l'attaque du bois. Pour *A. squamosa* qui a montré l'activité la plus élevée de la série, les seuils d'efficacité et la cotation de l'attaque sur bois ont confirmé l'aptitude à la préservation du bois des extraits obtenus avec un solvant polaire.

Les principaux objectifs du programme de thèse ont donc été atteints :

- faire progresser la connaissance de la composition chimique de la biomasse collectée en vue de sa valorisation indépendamment d'une exploitation comme source d'insecticide;
- mettre en évidence une activité anti-termites intéressante pour l'une des espèces au moins : l'activité termicide révélée n'avait jamais été décrite auparavant ;
- jeter les bases d'un procédé à faible impact environnemental transposable à l'échelle de la production ;
- le quatrième et dernier objectif, l'exploration des composés responsables de l'activité, a été suffisamment effleuré pour établir un lien avec les résultats de la littérature.

D'une façon générale cette étude a révélé ou rappelé l'intérêt des graines de plusieurs espèces, dont *P. biglobosa* et *A. squamosa*, pour des applications diverses (alimentation humaine, alimentation du bétail, préservation du bois), d'autres applications nécessiteraient des études complémentaires (substitut de bois de feu, amendement du sol, protection des cultures). Elles sont toutes susceptibles d'améliorer les conditions de vie des populations locales.

Notre souhait est que cette étude et les développements qui la suivront contribuent à la relance de la régénération de *C. procera* qui est une espèce menacée au Bénin et au reboisement avec *P. biglobosa* du parc néré du plateau d'Abomey. Ainsi les populations de la région, rurales à plus de 80 %, pourront continuer et élargir l'usage traditionnel des fruits, feuilles et autres dérivés des espèces forestières pour satisfaire une partie au moins de leurs besoins, alimentation, énergie, mais aussi produits à usage phytosanitaire ou pour la préservation du bois et des récoltes.

RERERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abidi, S. L. (2000).** “Chromatographic analysis of tocol derived lipids antioxidants”, *Journal of Chromatography A* 881, 197-216.
- Adjanohoun, E. J., Ahyi, M. R. A., Ake, A. (1986).** “Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo”, Rapport présenté à l’ACCT, 161.
- AFNOR. (1990).** EN 118 standard X41-539, “Wood preservatives, Determination of the Preventive Action Against *Reticulitermes santonensis* of Feytaud (Laboratory method)”, 17.
- Agbahungba, G., Depommier, D. (1989).** “Aspects du parc à karité-néré (*Vitellaria paradoxa* Gaertn. f. Jacq. Benth.) dans le sud du Borgou (Bénin)”, *Bois et Forêts des Tropiques* 222, 41-54.
- Ahmed, M., Naveed, M. (1996).** “Lipid studies of *Annona squamosa*”, *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* 39(9-12), 186-188.
- Akintayo, E.T. (2004).** “Characterisation and composition of *Parkia biglobosa* and *Jatropha curcas* oils and cakes”, *Bioresource Technology* 92, 307-310.
- Al Lawati, H. T., Azam, K. M., Deadman, M. L. (2002).** “Insecticidal and Repellent Properties of Subtropical Plant Extracts Against Pulse Beetle, *Callosobruchus chinensis*” *Agricultural Sciences* 7(1), 37-45.
- Alali, F. Q., Liu, X.-X., McLaughlin, J. L. (1999).** “Annonaceous acetogenins, recent progress”, *Journal of Natural Products* 62, 504–540.
- Ambe, G. A. (2001).** “Les fruits sauvages comestibles des savanes guinéennes de Côte-d’Ivoire, état de la connaissance par une population locale, les Malinké”, *Biotechnology Agronomic Society Environnement* 5(1), 43–58.
- Amundsen, A. L. O., Leiv. Nenseter, Marit, S. (2002).** “Plant Sterol Ester-enriched Spread Lowers Plasma Total and LDL Cholesterol in Children With Familial Hypercholesterolemia 1, 2”, *American Journal of Clinical Nutrition* 76(2), 338-344.
- Andrade, A. H. E., Zoghbi, M., das Graças, B., Guilherme, S. M. (2001).** “Chemical Characterization of the Fruit of *Annona squamosa* L. Occuring in the Amazon”, *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 227-232.
- Andrich, G., Balzini, S., Zinnai, A. (2001).** “Supercritical Fluid Extraction in Sunflower Seed technology”, *European Journal of Lipids Science Technology* 103, 151-157.
- AOAC. (1995).** “Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA., 4, 1-45.
- Awad, A. B., Chan, K. C., Downie, A. C., Fink, C. S. (2000).** “Peanuts as a Source of β -sitosterol, a Sterol with Anticancer Properties”, *Nutrition and Cancer* 36, 238–241.
- Awad, A. B., Chen, Y. C., Fink, C. S., Hennessey, T. (1996).** “ β -sitosterol Inhibits HT-29 Human Cancer Colon Cell Growth and Alters Membrane Lipids”, *Anticancer Research* 16, 2797–2804.
- Bada, J. C., Camacho, M. L., Prieto, M., Alonso, L. (2004).** “Characterization of Oils of Hazelnuts from Asturias, Spain”, *European Journal of Lipid Science and Technology* 106, 294–300.

- Bender, D. A. (1997).** "Introduction to Nutrition and Metabolism", second Ed. Taylor & Francis, London 278–280.
- Boelhouwer, C. (1983).** "Trends in Chemistry and Technology of Lipids", *Journal of American Oil Chemists' Society* 60 (2), 457-462.
- Bouic, P., Lamprecht, J. H. (1999).** "Plant Sterol and Sterolins, a Review of their Immunomodulating Properties", *Alternative Medical Revue* 4(3), 170-177.
- Bozan, B., Temelli F. (2002).** "Supercritical Fluid Extraction of Flaxseed", *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72, 231.
- Bravi M., Bubbico R., Manna F., Verdone N. (2002).** "Process Optimisation in Sunflower Oil Extraction by Supercritical CO₂", *Chemical Engineering Science* 57, 2753-2764.
- Brian L. R. (1999).** "Progress in Essential Oils" Perfumer and Flavorist 24, Allured Published Corp.
- Bruni, R., Muzzoli, M., Ballero, M., Loi, M. C., (2004).** "Tocopherols, Fatty Acids and Sterols in Seeds of Four Sardinian wild Euphorbiaceae species", *Fitoterapia* 75, 50-61.
- Byrdwell, W. C. (2005).** "Moderns Methods for Lipids Analysis by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy and Related Techniques", Ed. William Craig Byrdwell, AOCS Press Champaign, III., USA, 580.
- Calvo, L., Cocero, M. T. (1998).** "Extraction of Oil from Oil-Bearing Materials", Ed. Mamata Mukhopadhyay. In: Natural Extract Using Supercritical Carbon Dioxide, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C., CRC Press.
- Catchpole, O. J., Grey, J. B., Noermark, K. A. (2000).** "Fractionation of Fish Oils Using Supercritical CO₂ and CO₂ + Ethanol Mixtures", *Journal of Supercritical Fluids* 19, 25–37.
- Carrere, A., Simmonin, P. (2002).** "Les huiles essentielles de bois de rose : matières actives potentielles pour la protection du bois", Rapport de projet ENSTIB3, Bordeaux, 66.
- Chandel, R. S., Chander, R., Verma, T. D. (1996).** "Evaluation of Insecticidal Properties of some Oil Cakes Against *Brahmina coriacea* (Hope) White Grubs", *Crops Research* 11(3), 391-393.
- Chang, S –T., Cheng, S-S. (2002).** "Antitermitic activity of Leaf essential Oils and Components from *Cinnamomun osmopheum*", *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50, 1389-1392.
- Chang, S. T., S. S. Cheng and J.-H. Wang (2001).** "Antitermitic activity of essential oils and components from *Tawania (Tawania cryptomerioides)*", *Journal of Chemical Ecology*. 27, (4), 717-724.
- Christie, W. W. (1989).** "Fatty Acids and Lipids, Structures, Extraction and Fractionation into Classes", In: Gas Chromatography and Lipids, The Oily Press, Ayr, Scotland, 11-42.
- Christie, W. W. (1989).** "Gas Chromatography, Theoretical Aspects and Instrumentation", In : Gas Chromatography And Lipids , The Oily Press Ayr, Scotland, 43-62.
- Cocero, M. J., Garcia, J. (2001).** "Mathematical Model of Supercritical Extraction Applied to Oil Seed Extraction by CO₂ + Saturated Alcohol. Part I. Desorption model", *Journal of Supercritical Fluids* 20, 229–243.

- Cocero, M. T., Calvo, L. (1996).** "Supercritical-Fluid Extraction of Sunflower Seed oil with CO₂-Ethanol Mixtures." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 11(73), 1573-1578.
- Codex Alimentarius Commission. (1993).** "Graisses et huiles végétales, division 11, Version abrégée FAO/WHO." Codex stan 20-1981, 23-1981.
- Codjia, T. C. C., Assogba, A. E., Mensah, E. M. R. (2003).** "Diversité et valorisation au niveau local des ressources végétales forestières alimentaires du Bénin" *Cahiers d'études et de recherches francophones/Agricultures* 12(5), 321-331.
- Comes, F., Farines, M., Aumelas, A., Soulier, J. (1991).** "Fatty Acids and triacylglycerols of Cherry Seed Oil." *Journal of American Oil Chemists' Society* 69, 1224-1227.
- Connemann, J. (1994).** "Biodiesel in Europ." *Fat Science Technology*, 96, 536-550.
- Cook, J. A., Vanderjagt, D. J., Pastuszyn, A., Mounkaïla, G., Glew, R. H. (1998).** "Nurtient content of two indigenous plant foods of the western sahel: *Balanites aegyptiaca* and *Maerua crassifolia*", *Journal of Food Composition and analysis*, 11, 221-230.
- Cortes, O., Figaclere, B., Care, A. (1993).** "Bis-tetrahydrofuran Acetogenins from Annonaceae", *Phytochemistry* 32(6), 1467-1473.
- Crane, S., Guylène, A., Henry, J., Mouloungui, Z., Bourgeois, P. (2005).** "Composition of Fatty Acids Triacylglycerols and Unsaponifiable Matter in *Callophyllum calabra L.* oil from Guadeloupe", *Phytochemistry* 66, 1825-1831.
- Cuvelier, C, Dottrepe, O, Istasse, L. (2003).** "Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E" *Annal of Medecine Veterinary* 143, 315-324.
- Dales, M. J. (1996).** "A Review of Plant Material Used for Controlling Insect Pests of Stored Products", *Bulletin of Natural Ressources Institute* 65, 1-84.
- Dave, O. B., Dumon, D., Cardador, M., Anaberta, D. (2006).** "Characteristic of Echinaeaceae Seed Oil", *Food Chemistry* 96, 304-312.
- De Greyt, W., Kellens, M. (2000).** "Refining Practice, Edible Oil Processing", Eds. W. Hamm, et Hamilton, Richard J. London, 281.
- Del Valle, J. M. et Aguilera, J. M. (1988).** "An Improved Equation for Predicting Solubility of Vegetable Oils in Supercritical CO₂", *Industrial and Engineering Chemistry Research* 27, 1551-1553.
- Delorme, M., Mauchamp, B. (1987).** "Mode d'action des insecticides", *Défenses des végétaux* 247, 25-32.
- Delwaule, J. C. (1987).** "Plantations forestières en Afrique tropicale sèche", Nogent-sur-Marne, GERDAT-CTFT, 178.
- Demirbas, A. (2001).** "Supercritical Fluid Extraction and Chemicals from Biomass with Supercritical Fluids", *Energy Conversion and Management* 42, 279-294.
- Detienne, P., Jacquet, P. (1983).** "Atlas d'identification des bois de l'Amazonie et des régions voisines", Centre Technique Forestier Tropical, Nogent sur Marne, 640.
- Dirol, D., Deglise, X. (2001).** "Durabilité des bois et problèmes associés", Hermes Science Europe Ltd. 415.

- Doligez, A. (1996).** “Evolution de la diversité génétique intra-population et de sa structure, Etude d’un modèle de simulation spatialisée en vue de la gestion des ressources génétiques forestières tropicale”, Thèse de doctorat de l’Institut National Agronomique Paris-Grignon (INA-PG), 273.
- dos Santos A. F., Sant’Ana, A. E. G. (2001).** “Molluscicidal Properties of some Species of *Annona*”, *Phytomedicine* 8(2), 115-120
- Dunford, N. T., Teelb, J. A., King, J. W. (2002).** “A continuous Countercurrent Supercritical Fluid Deacidification Process for Phytosterol Ester Fortification in Rice Bran Oil”, *Food Research International* 36(2), 175-181.
- Dunford, N. T., Temelli, F. (1995).** “Extraction of Phospholipids from Canola with Supercritical Carbon Dioxide and Ethanol”, *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 72(9), 1009-1015.
- Duret, P., Hocquemiller, R., Laurens, A., Cave, A. (1995).** *Natural Product Letters* 5, 295.
- Eloy, L. (2001).** “Production et amélioration de la qualité des huiles végétales dans la réserve extractiviste du Moyen Juruà (Amazonas, Brésil), une option pour le développement durable”, Rapport Cirad-Université Fédérale de l’Etat d’Amazonas, 74.
- Ermel, K. (1995).** “Azadirachtin Content of Neem Seed Kernels from Different Regions of the World”, In: Schmutterer, H. (Ed.), *The Neem Tree, Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes*. VCH, Weinheim, 89–92.
- Esquivel, M. M., Bernardo-Gil, M. G., King, M. B. (1999).** “Mathematical Model of Supercritical Extraction of Olive Husk Oil”, *Journal of Supercritical Fluids* 16, 4–58.
- Farschid, F. (2005).** “Etude de la durabilité d’un composé multicouche en mélange de plaçages de durabilités variables” Thèse de doctorat de l’ENGREF. Sciences Forestières du Bois, 246.
- Fon Kimbu, S., Foyer Ayafor, J., Sondengam, B. L., Tsamo, E., Connoly, J. D. (1984).** “Carapolides A, a Novel Hexanortriterpenoid and Carapolide B, and C, Novel Tetranortriterpenoid”, *Tetrahedron Letters* 25(15), 1613-1616.
- Forget, P. M., Baraloto, C., Blanc, L., Petronelli, P., Gourlet-Fleury, S. (2004).** “Sustainable Harvesting of Crabwood (*Carapa procera*) Seeds, Dispersal, Predation and Regeneration”, In: Report of the Technical Workshop on Crabwood, Iwokrama, Georgetown, Guyana.
- Forget, P. M., Hammond, D. (2005).** “Rainforest Vertebrates and Food Plant Diversity in the Guiana Shield”, in, *Tropical Forests of the Guiana Shield, Ancien Forests in a Modern World* CABI publishing, Wallingford, 233-294.
- Franck, X., Figadere, B. (1996).** “Synthesis of (+)-squamosanal-A, A Bioactive Acetogenin of Annonaceae”, *Tetrahedron Letters* 37(10), 1593-1594.
- Fujimoto, Y., Murasaki, C. Mui Asaki, C., Shimada, H., Nishioka, S., Kakinuma, K., Singh, S., Singh, M., Gupta, Y. and Sahai, M. (1994).** “Annonaceous Acetogenins from the Seeds of *Annona squamosa*, Non-adjacent bis-tetrahydrofuranic Acetogenins”, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin Tokyo* 42(6), 1175-1184.
- Fujimoto, Y., Murasaki, C., Kakinuma, K., Eguchi, T. (1990).** “Squamosatin-A, Unprecedented Bis-tetrahydrofuran Acetogenin from *Annona squamosa*”, *Tetrahedron Letters* 31, 535–538.
- Fullbrook, P.D. (1983).** “The Use of Enzymes in the Processing of Oilseeds”, *Journal of American Oil Chemists’ Society* 60, 428-430.

- Garcia, A., de Lucas, A., Rincon, J., Alvarez, A. (1996).** "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Fatty and Waxy Material from Rice Bran", *Journal of American Oil Chemists' Society* 73(9), 1127-1130.
- Ge, Y., Yan, H., Hui, B., NI, B. (2002).** "Extraction of Natural Vitamin E from Wheat Germ by Supercritical Carbon Dioxide", *Journal of the agricultural and food chemistry* 50, 685-689.
- Gérard, J., Miller, R. B., Ter Welle, B. J. H. (1996).** "Major Timber Trees of Guyana. Timber Characteristics and Utilization", Tropenbos Series 15, Backhuys publishers, Leiden, 224.
- Ghaleb-Pelissier, M. L. (1990).** "Composition chimique de quelques huiles des graines de curcubitaceae (citrouille, courge et melon)", Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 156.
- Giacometti, J. (2001).** "Determination of Aliphatic Alcohols, Squalene, α -Tocopherol and Sterols in Olive Oils, Direct Method Involving Gas Chromatography of the Unsaponifiable Fraction Following Silylation", *Analyst* 126, 472-475.
- Gilbert, B. (1999).** "Activities of Medicinal, Insecticidal and Insect Repellent Plants", *An. Acad. Bras. Cienc.* 71 (2), 265-271.
- Govindachari, T. R., Geetha G. (1997).** "13, 14 Desepoxy Azadirachtin-A, A tetraterpenoid from", *Phytochemistry* 45(2), 397-399.
- Guinda, A., Albi T., Pérez-Camino C., Lanzon, A. (2004).** "Supplementation of Oils with Oleanolic Acid from the Olive Leaf (*olea europea*)", *European Journal of Lipids Science and Technology* 106, 22-26.
- Gunstone, F. D. (1993).** "High Resolution ^{13}C NMR Spectroscopy of Lipids", In: *Advances in Lipid Methodology Two*, Ed. Christie, W. W., The Oily Press Dundee, Scotland, 1-68.
- Gunstone, F. D., Harwood, P. (1986).** "The lipid Handbook" London New York. Chapman and Hall. 25-47.
- Gutierrez, M. L. (2000).** "La graine de néré et les enjeux de la valorisation d'une ressource agroalimentaire" fiche d'expérience n°2, Cirad-Tera.
- Gypser, A., Bülow, C., Scharf, H - D. (1995).** "Determination of the Absolute Configuration of Annonin I, a Bioactive Natural Acetogen from *Annona squamosa*" *Tetrahedron* 51(7), 1921-1930.
- Hamilton, R. J., Roussel, J. B. (1986).** "Analysis of Oils and Fats", Elsevier Applied Sciences publishers, London and New York. 441.
- Harwood, J. L. (1986).** "The lipid Hand Book", London New York. Chapman and Hall. 25-47.
- Hawthorne, S. B. (1990).** "Analytical-scale Supercritical Fluid Extraction", *Analytic Chemical*, 62, 633A-642A.
- Hemlata, K. M., Pnashant, M. S. (2001).** "Antimicrobial and Pesticidal Activity of Partially Purified Flavonoïds of *Annona squamosa*", *Pest Management Science* 58, 33-37.
- Iroshi, A. (2002).** "Squamocin-O₁ and Squamotin-O₂ New Adjacent Bis-tetrahydrofuran Acetogens from the Seeds of *Annona squamosa*", *Phytochemistry* 61, 999-1004.

- Hirsch, R. (2002).** “Les filères oléagineuses d’Afrique de l’Ouest, Quelles perspectives face à l’intégration et à la mondialisation?” Rapport AFD, 53.
- Hoglen, N. C., Waller, S. C., Sipes, I. G., Liebler, D. C. (1997).** “Reactions of Peroxynitrite with γ -Tocopherol”, *Chemical Research in Toxicology* 10(4), 401–407.
- Höller, U., Wolter, D., Hofmann, P., Spitzer, V. (2003).** “Microwaveassisted Rapid Determination of Vitamins A and E in Beverages”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(6), 1539–1542.
- Hopp, D. C., Alali F. Q. (1998).** “Mono-THF Ring Annonaceous Acetogenins from *Annona squamosa*”, *Phytochemistry* 47(5), 803-809.
- Hopp, D. C., Conway, W. D. (1999).** “Using Countercurrent Chromatography to Assist in the Purification of New Annonaceous Acetogenins from *Annona squamosa*”, *PhytoChemical Analysis* 10(6), 339-347.
- Hopp, D. C., Zeng, L., Gu, Z., Mc Laughlin, J. L. (1996).** “Squamotacin an Annonaceous Acetogenin with Citotoxic Selectivity for the Human Prostate Tumor Cell Lin (PC-3)”, *Journal of Natural Products* 59(2), 97-99.
- Huber, W., Molero, A., Pereyra, C., Martinez de la Ossa. (1996).** “Dynamic Supercritical CO₂ Extraction for Removal of Cholesterol from Anhydrous Milk Fat”, *International Journal of Food Science and Technology* 31, 143-151.
- Ibanez, E., Hurtado Benavides, A. M., Senorans, F. J., Reglero, G. (2002).** “Concentration of Sterols and Tocopherols from Olive Oil with Supercritical Carbon Dioxide”, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79(12), 1255-1260.
- Ingawale, U. V., Mote, U. N., Tambe, A. B. (2005).** “Field Efficacy of Natural and Conventional Insecticides Against *Lucerne aphids* and their Impact on Predators”, *Journal of Maharashtra Agricultural Universities* 30(1), 46-49.
- Isman, M. B., Koul, P., Luczynski, A., Kaminski, J. (1990).** “Insecticidal and Antifeedant Bioactivities of Neem Oils and their Relationship to Azadirachtine Contact” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1406-1411.
- IUPAC. (1987).** “Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives” International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell, Oxford, 7th Ed, Method, 2432.
- Iwai, Y. U., Nagano, M., Arai, Y. (2004).** “Measurement of Solubilities of Palmitic Acid in Supercritical Carbon Dioxide and Entrainer Effect of Water by FTIR Spectroscopy”, *Journal of Supercritical Fluids* 28(2-3), 193-200.
- Iwata, H., Tanabe, S., Sakal, N., Tatsukawa, R. (1993).** “Distribution of Persistent Organochlorines in the Oceanic Air and Surface Seawater and the Role of the Ocean on their Global Transport and Fate”, *Environmental Science and Technology* 27(6), 1880-1897.
- Jacobson, M. (1989).** “Botanical Pesticides. Past, Present, and Future”, ACS Symp. Ser. 387 Se. American Chemical Society, Washington DC., 1-10.
- Jarvis, A. P., Morgan, E. D., Edwards, C. (1999).** “Rapid Separation of Triterpenoids from Neem Seed Extracts”, *Phytochemistry Analis* 10, 39–43.
- Jiang, R. W., Lu, Y., Zheng, Q. T. (2003).** “Molecular Structure and Pseudopolymorphism of Squamotin A from *Annona squamosa* seeds”, *Journal of Molecular Structure* 665, 157-162.

- Jimménez, B., Gonzalez, A. D. V. (1996).** "Determination of Sterols by Capillary Column Gas Chromatography. Differentiation Among Different Types of Olive Oil, Virgin, Refined, and Solvent-Extracted", *Journal of American Oil Chemists' Society* 73, 1685-1689.
- Johansson, A., Appelquist, L. (1978).** "The Content and Composition of Sterols and Sterol Esters in Low Erucic Rapeseed (*Brassica napus*)", *Lipids* 13(10), 658-665.
- Jones, P., Howell, T., MacDougall, D. E., Feng, J. Y., Parsons, W. (1998).** "Short-term Administration of Tall Oil Phytosterols Improves Plasma Lipid Profiles in Subjects with Different Cholesterol Levels", *Metabolism* 47(6), 751-756.
- Kabele Ngiefu, C., Paquot, C., Vieux, A. S. (1976).** "Les plantes à huiles du Zaïre", *Oléagineux*, 31(7),
- Kamal-Eldin, A., Anderson, R. (1997).** "A Multivariate Study of the Correlation Between Tocopherol Content and Fatty Acid in Vegetable Oils", *Journal of American Oil Chemists' Society* 74, 375-376.
- Kang, H. Y., Matsushima, N., Sameshima, K., Takamura, N. (1990).** "Termite Resistance Tests of Hardwoods of Kochi Growth I. The Strong Termiticidal Activity of Kagonoki (*Litsea coreana* Léveillé)", *Mokusai Gakkaishi* 36, 78-83.
- Kapseu, C., Mbofung, C. M., Kayem, G. J. (1997).** "Acides gras et triglycérides des huiles de *Cyperus esculentus* et *Balanites aegyptiaca*", *Sciences des aliments* 17 (5), 531-537.
- Kapseu, C., Nono, Y. J., Parmentier, M. (1999).** "Fruits de l'aïélé (*Canarium schweinfurthii* Engl.): olives d'Afrique sub-saharienne." *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 76(4), 181-183.
- Kapseu, C., Parmentier, M. (1999).** "Composition en acides gras de quelques huiles végétales du Cameroun", *Sciences des aliments* 17 (3), 325-331.
- Karleskind, A. (2000).** "Manuels des Corps gras", Techniques et documentation, Ed. Lavoisier Paris.
- Katsanidis, E., Addis, P. B. (1999).** "Novel HPLC Analysis of Tocopherol, Tocotrienols and Cholesterol in Tissue", *Free Radical Biology and Medicine* 27 (11-12), 1137-1140.
- Kaushik, N., Vir, S. (2000).** "Variations in Fatty Acid Composition of Neem Seeds Collected from the Rajasthan State of India", *BioChemical Society Transaction* 28, 880-882.
- Kenneth, Grace J. (1997).** "Influence of Tree Extractives on Foraging Preference of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera, Rhinotermitidae)", *Sociobiology* 30(1), 35-42.
- Khatri, L.M.; Nasir, M.K.A. (1994).** "Studies on Chemical Composition of *Annona squamosa* Seed Oil", *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*; 37(4); p 162.
- Kheraro, J. (1974).** "La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle Plantes Médicinales et Toxiques." Editions Vigot Frères. Paris, 579p.
- King, J. W., List, G.R. (1996).** "Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipids Chemistry", Champaign Ill, AOCS PRESS.
- Konan, Y.L., Sylla, M.S., Doannio, J.M.C., Traoré, S. (2003).** "Comparison of the Effect of two Excipients (karit nut butter and vaseline) on the Efficacy of *Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis* and *Carapa procera* Oil-based Repellents Formulations Against Mosquitoes Biting in Ivory Coast", *Parasite* 10(2), 181-184.

- Koul, O., Isman, M. B., Ketkar, K. M. (1990).** "Properties and Uses of Neem, *Azadirachta indica*", *Canadian Journal of Botany* 68, 1-11.
- Kraus, W. (1995).** "Biologically Active Ingredients-Azadirachtin and other Triterpenoids", In: H. Schmutterer (Ed.), *The Neem Tree Azadirachta indica A. Juss. And Other Meliaceae Plants*, Weinheim, New York, 35-88.
- Kurth, E. F. (1944).** "Wood chemistry. Chapter 12, Extraneous Components of Wood", Reinhold Publishing Corporation, New York, USA, 385-448.
- Largueze, C. 1997.** "Raffinage des huiles végétales par microfiltration- Interaction milieu hydrophobe/membrane", *Thèse de Doctorat; Université de Montpellier II-France*; 217p.
- Latum, I. B. J. V. (1985).** "Neem Tree in Agriculture- Its use in Low-input Pest Management."
- Leatemia, A., Murray, J., Isman, B. (2004).** "Insecticidal Activity of Crude Seed Extracts of *Annona spp.*, *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* Against Lepidopteran Larvae", *Phytoparasitica* 32(1), 30-37.
- Li C - M., Tan N-H., Mu Q., Zeng H-L., Hao X - J., Wu Y., Zhon J. (1997).** "Cyclopeptide from the Seeds of *Annona squamosa*.", *Phytochemistry* 45(3), 521-523.
- López, O. C. M., Prats, M. M. S., Navarro, B. V. (2006).** "A rapid Method Chromatographic, Method for Simultaneous Determination of β - sitosterol and Tocopherol Homologues in Vegetable Oils", *Journal of Foods Composition and analysis* 19, 141-149.
- Maïga, A. A. (1997).** "Influence du karité, du néré et d'*Acacia albida* sur le sorgho et le mil, cas de la province du Bazega au Burkina Faso", International Symposium on the Parkland Systems of the Sahel. Ouagadougou (Burkina Faso), 25-27 Octobre.
- Malek, M. A., Wilkins, R. M. (1995).** Effects of *Annona squamosa L.* seed oil on the Larvae of *Tribolium castaricum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae)", *Bangladesh Journal of Zoology* 23(1), 65-70.
- Mallet, B. (2001).** "Connaître et conserver le bois de rose." Cirad Info 111, 6.
- Manzi, P., Panfili, G., Pizzoferrato, L. (1996).** "Normal and Reversed Phase HPLC for more Complete Evaluation of Tocopherol, Retinols, Carotenes and Sterols in Dairy Products", *Chromatographia* 43, 89-93.
- Marouzé, C. (1994).** "Identification et valorisation des ressources techniques locales, la filière néré au Sénégal." Synthèse du projet MRD, Montpellier (France). Cirad-Sar, 25.
- Marouzé, C. (1994).** "Mise au point du décortiqueur à néré." Rapport de mission en Casamance (Sénégal), Montpellier (France), Cirad-Sar, 14.
- Mendes, M. F., Pessoa, F. L. P., Uller, A. M. C. (2001).** "An Economic Evaluation Based on an Experimental Study of the Vitamin E Concentration Present in Deodorizer Distillate of Soybean Oil Using Supercritical CO₂", *Journal of the American Oil Chemists' Society* 23(3), 257-265.
- Mikolajczak, K. L. (1988).** "A Limonoïd Antifeedant from Seed of *Carapa procera*", *Journal of Natural Products* 51(3), 606-610.
- Miralles, J. (1983).** "Recherche de nouvelles ressources en huiles végétales", *Oléagineux* 38(12), 665-667.

- Morita, H., Sato, Y. (1999).** Cyclosquamosins A-G, Cyclic Peptides from the Seeds of *Annona squamosa*", *Tetrahedron* 55(24), 7509-7518.
- MPRI. (1999).** "Medicinal Plant Research Institute, Departement of Medical Science, Ministry of Public Health. Standard of Thai Herbal Medicine, *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees", The War Veterans Organization Press, Bangkok. 66.
- Mst. Shahnaj P., Md. Ekramul I., Md. Motiur R., Md. Ekramul, H. (2003).** "Pesticidal Activity of Pure Compound Annotemoyin-1 Isolated from Chloroform Extract of the Plant *Annona squamosa* Linn. Against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae)", *Pakistan Journal of Biological Sciences* 6(12), 1088-1091.
- Naiyana, T. (2002).** "Effects of *Andrographis paniculata* (BURM. F.) Nees on Performance, Mortality and Coccidiosis in Broiler chickens", PHD of Agricultural Sciences, Institute of Animal Physiology and Animal Nutrition, Thailand, 114.
- Nakanashi, K. (1975).** "Structure of the Insect Antifeedant Azadirachtin. Recent Advance", *Phytochemistry* 9, 283.
- Nayar, S.L. (1955).** "Vegetable", In: scticides. *Bulletin Inst. Science* 4, 137-145.
- Nesaretnam, K., Dorasamy, S., Darbre, P. D. (2001).** "Tocotrienols Inhibit Growth of ZR-75-1 Breast Cancer Cells", *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 51, 95-103.
- Nikiema, A. (2005).** "Agroforestry Parkland Species Diversity, Uses and Management in Semi-arid West Africa (Burkina-faso)." Thesis Wageningen Universiteit, 102.
- Nilsson, W. B., Gauglitz, E. J., Hundson, J. K. (1991).** "Solubilities of Methyl Oleate, Oleic Acid, Oleoyl Glycerols, and Oleyl Glycerol Mixtures in Supercritical Carbon Dioxide", *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68(2), 87-90.
- Nirulaini, N. A., MD Zaidul, I. S., Anuar, O., Mohd. Omar, A. K. (2004).** "Supercritical Enhancement for Separation of Lauric Acid and Oleic Acid in Palm Kernel Oil (PKO)", *Separation and Purification Technology* 35, 55-60.
- Nyanzi, S. A., Carstensen, B., Schwack, W. (2005).** "A Comparative Study of Fatty Acids Profiles of Passiflora seed oils from Ouganda", *Journal of American Oil Chemists' Society* 82(1), 41-44.
- Ouedraogo, A. S. (1995).** "*Parkia biglobosa* (Leguminosae) en Afrique de l'Ouest, biosystématique et amélioration", Institute for Forestry and Nature Research. IBN-DLO, Wageningen, The Netherlands, 205 p.
- Ouoba, L. I., Diawara, B., Amoa-Awua, W. K., Traoré, S. A., Møller, P. L. (2004).** "Genotyping of Starter Cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for Fermentation of African Locust Bean (*Parkia biglobosa*) to Produce Soumbala", *International Journal of Food Microbiology* 90, 197-205.
- PAN (Pesticide Action Network). (1995).** "Elimination de la « bande des douze » pesticides", In: *Global Campaigner* 5(3), 8-11.
- Panfilì, G., Manzi, P., Pizzoferrato, L. (1994).** High Performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Tocopherols, Carotenes, and Retinol and its Geometric Isomers in Italian Cheeses", *Analyst* 119, 1161-1165.
- Pappamichail, I., Louli, V., Magoulas, K. (2000).** "Supercritical Fluid Extraction of Celery Seed Oil." *Journal of Supercritical Fluids* 18, 213-226.

- Parcerisa, J., Richardson, D. G., Rafecas, M., Codony, R., Boatella, J. (1998).** “Fatty acid, Tocopherol and Sterol Content of some Hazelnut Varieties Harvested in Oregon (USA)”, *Journal of Chromatography A* 805, 259–268.
- Pardhasaradhi, B. V. V., Madhurima, R., Mubarak, A., Leela, K., Ashok, K. (2005).** “Differential Cytotoxic effects of *Annona squamosa* Seed Extracts on Human Tumour Cell Lines, Role of Reactive Oxygen Species and Glutathione”, *Journal of Biosciences* 30, 237–244.
- Pathak, S., Saroj, P.L. (1991).** “Studies on Rooting Potentiality of Custard Apple (*Annona squamosa* L.) through Stool Layering”, *Narendra Deva Journal of Agricultural Research* 6(1), 85-87.
- Phan Tai, H. (2003).** “Fractionation of Functional Lipids from Sunflower Oil Refining By-products Under Supercritical Conditions”, Master Thesis ENSIA-SIARC -France, 67.
- Plat, J., Kerckhoffs, D. A., Mensink, R. P. (2000).** “Therapeutic Potential of Plant Sterols and Stanols”, *Current Opinion in Lipidology* 11(6), 571-576.
- Pontbriand, G. (1971).** “Les bois précieux de l’antiquité à nos jours.” Mémoire de fin d’études. Conservatoire des arts et métiers. Institut National des Techniques de la Documentation, Paris, 82.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M., Boskou, D. (2000).** “ α -Tocopherol Content of Greek Virgin Olive Oils.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1770–1775.
- Raicht, R., Cohen, B. I., Fazzini, E. P, Sarval, A. N., Takahashi, M. (1980).** “Protective Effect of Plant Sterol Against Chemically Induced Colon Tumors in Rat”, *Cancer research* 40(2), 403-405.
- Ramadan M. F., Sharanabasappa G., Seetharam Y. N., Seshagiri M., Moersel, J. T. (2006).** “Characterization of Fatty Acids and Bioactive Compounds of Kachnar (*Brauhinia purpurea* L.) Seed Oil.” *Food Chemistry* 98, 359-365.
- Rao, P. U. (1987).** “Chemical Composition of déffated and debitterer cake of *Azadirachta indica*”, *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 64(9), 1348-1351.
- Raysal, M. (1998).** “Guide de la preservation du bois”, Centre Technique du Bois et de l’Ameublement, Paris.
- Regnault-Roger, C. (1999).** “Diversifications des stratégies de protections des plantes intérêts des monoterpènes”, *Acta botanica gallica*. 1999, (146), 35-43.
- Regnault-Roger, C., B. J. R. Philogène and C. Vincent (2003).** “Biopesticides d'origine végétale”, Techniques Documentaire, Paris Lavoisier.
- French, J.R., P.J. Robinson, Y. Yazaki et W.E. Hillis. (1979).** “Bioassays Extracts from White Cypress Pine (*Callistris collumellaris* F. Muell) Against Subterranean Termites.” *Holzforshung*, 33 (5), 144 - 148.
- Reverchon, E., Daghero, J., Marrone, C., Mattea, M., Poletto, M. (1999).** “Supercritical Fractional of Fenned Seed Oil and Essential Oil, Experiments and Mathematical Modelling”, *Industrial Engineering and Chemical Research* 38, 3069.
- Reverchon, E., Marrone, C. (2001).** “Modeling and Simulation of the Supercritical CO₂ Extraction of Vegetable Oils”, *Journal of Supercritical Fluids* 19, 161–175.
- Riba, C., Silvy, C. (1989).** “Combattre les ravageurs des cultures, enjeux et perspectives”, INRA, Paris, 1-27.

- Rodas, B., Morema, S., Castellote, A. I., Lopez, S. M. C. (2003).** "Rapid Determination by Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography of Vitamins A and E in Infant Formulas", *Journal of Chromatography A* 1018, 197-202.
- Ronyai, E., Simandi, B., Tomoskozi, S., Deak, A., Vigh, L., Weinbrenner, Z. (1998).** "Supercritical Fluid Extraction of Corn Germ with Carbon Dioxide Ethyl Alcohol Mixture", *Journal of Supercritical Fluids* 1(14), 75-81.
- Ruperez, F. J., Martin, D., Herrera, E., Barbas, C. (2001).** "Review Chromatographic Analysis of α -Tocopherol and Related Compounds in Various Matrices", *Journal of Chromatography A* 935, 45-69.
- Sahai, M., Singh, M., Gupta, Y. K., Akashi, S., Yuji, R., (1994).** "Annonaceous Acetogenins from the Seeds of *Annona squamosa*. Adjacent bis-tetrahydrofuranic Acetogenins", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 42, 1163-1174.
- Sahpaz, S., Laurens, A., Hocquemiller, R., Cave, A., Cortes, D. (1994).** "Sénégalène, une nouvelle acétogénine oléfinique non-tétrahydrofuranique des graines d'*Annona senegalensis*", *Canadian Journal of Chemistry* 72, 1533-1536.
- Saleem, K., Sultana, V. (1997).** "Nematicidal Activity of some Medicinal Plants", *Pakistan Journal of Nematology* 15(1-2), 101-105.
- Saluja, A. K., Santani, D. D. (1994).** "Pharmacological Screening of an Ethanol Extract of Defatted Seeds of *Annona squamosa*", *International Journal of Pharmacognosy* 32(2), 154-162.
- Saluja, A.K., Santani, D. D. (1989).** "PhytoChemical Study of *Annona squamosa*", *Fitoterapia* 64(4), 359-360.
- Santos, D. Y. A. C. (2000).** "Foliar Flavonoïd of Annonaceae from Brasil Taxonomic Significance", *Phytochemistry* 55, 567-573.
- Savage, G. P., Dutta, P. C. (2001).** "Desmethylsterol Composition of some Common Nuts", *Proceedings of the Nutrition Society of New Zealand* 26, 87-91.
- Saxena, R. C., Harshan, V. (1993).** "Larvicidal and Chemosterilant Activity of *Annona squamosa* Alkaloids Against *Anopheles Stephensi*", *Journal of the American Mosquito Control Association* 9(1), 84-87.
- Saxena, R. S., Epino, P. B., Tu C-W., Puma, B. C. (1984).** In: Natural Pesticides from Neem Tree and Other Tropical Plants. *Proceedings 2nd International Neem Conference, Rauschholzhausen*, 403-402.
- Schmutterer, H. (1995).** "The Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss.) and other Meliaceae Plants Sources", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, FRG, 696.
- Schmutterer, H. (1995).** "The Neem Tree, Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and other Purposes", VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 696.
- Seignot, P., Guyon, P., Hasselot, N., Angel, G., Kindelberger, P., Coursange, F., Aubert, M. (1991).** "Une brûlure cutanée profonde provoquée par l'application locale d'un ongunet huileux traditionnel (*Carapa procera*)" *Medicine Tropical* 51(1), 91-92.

- Sentelhas, P. C., Piza, J. C. T. (1996).** “Freezing Points of Various Tropical Fruits”, *Bragantia* 55(2), 231-235.
- Sharma, R. K. (1993).** “Phytosterols, Wide-spectrum Antibacterial Agents.” *Bioorganic Chemistry* 21(1), 49-60.
- Shukla, V. K. S. (1995).** “Thin Layer Chromatography.” In: New trends in Lipid and Lipoprotein Analyses, Eds. Sebedio, J.L., Perkins, E.G., AOCS Press Champaign, III., USA, 17-23.
- Sidhu, O. P. Vishal, K., Hari M. B. (2004).** “Variability in Triterpenoids (nimbin and salanin) Composition of Neem among Different Provenances of India”, *Industrial Crops and Products* 19, 69-75.
- Singh, S., Gupta, Y. K., Sahai, M. (1994).** “Annonaceous Acetogenins from the Seeds of *Annona squamosa*. Non-adjacent bis-tetrahydrofuranic Acetogenins.” *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 42, 1175–1184.
- Smith, C. R. J. (1971).** “Occurrence of Unusual fatty Acids in Plants”, In : The Chemistry of Fats and others Lipids, Ed. Holman, R.T., Pergamon Press, Oxford 11, 137-177.
- Snyder, J. M., King, J. W., Taylor, S. L., Neese, A. L. (1999).** “Concentration of Phytosterols for Analysis by Supercritical Fluid Extraction”, *Journal of the American oil chemists' society* 76(3), 717-721.
- Sogabe, A., Kinjo, K., Abe, F., Yamauchi, T., Yaga, S. (2000).** “Termiticidal Substances from the Wood and Bark of *Wikstroemia retusa* A. Gray”, *Mokuzai Gakkaishi* 46, 47-53.
- Sondengam, B. L., Kamga, C. S., Connoly, J. D. (1979).** “Evoludone, a new tetranortriterpenoid from *Carapa procera*.” *Tetrahedron Letter* 15, 1357-1358.
- Sondengam, B. L., Kamga, C. S., Connoly, J. D. (1980).** “Proceranolide, a Novel Tetranortriterpenoid from *Carapa procera*”, *Phytochemistry* 19(11), 2488.
- Sondengam, B. L., Kamga, C. S., Kimbu, S. F., Connoly, J. D. (1981).** “Proceranone, a New Tetranortriterpenoid from *Carapa procera*.” *Phytochemistry*, 20(1), 173-174.
- Sontakke, B. K., Panda, S. K., Satapathy, C. R., Samal, T. (1994).** “Effect of Neem Oil, Certain Sprayable Insecticides and their Mixture of the Incidence of White Backed Planthopper *Sogatella fuscifera* (Horvath) (Delphacidae, Homoptera)”, *Orissa Journal of Agricultural Research* 7, 89-91.
- Sopade, P. A. Ajisegiri, E. S., Adebayo, B. A. (1996).** “Moisture Sorption Isotherms of Dawadawa, a Fermented African Locust Bean *Parkia biglobosa* Jacq. Benth”, *Food Control* 1(3), 153-156.
- Starmans, D. A. J., Baysal, T. (1999).** “Supercritical carbon dioxide extraction of carvone and limonene from caraway seed”, *Journal of Supercritical Fluids* 14, 225–234.
- Stavros, L., Tsaknis, J. (2002).** Characterization of *Moringa oleifera* Seed Oil Variety “Periyakulam 1”, *Journal of Foods Composition and analysis* 15, 65-77.
- Tellez, M., R. Estell, E. Fredrikson, J. Powell, D. Wedge, K. Schrader and M. Kobaisy (2001).** “Extracts of *Flourensia cernua* (L): Volatile Constituents and Antifungal, Antialgal and Antitermite Bioactivities”, *Journal of Chemical Ecology*. 27 (11), 2263-2273.

Titanji, V. P., Eveche, M. S., Ayafor, J. F., Kimbu, S. F. (1990). “Novel *Onchocerca volvulus* Filaricides from *Carapa procera*, *Polyalthia suaveolens* and *Pachypodanthium Standt*”, *Acta Leiden* 59(1-2), 337-382.

Tomlinson, H., Traore, A., Teklehaimanot, Z. (1998). An Investigation of the Root Distribution of *Parkia biglobosa* in Burkina Faso, West Africa, using a Logarithmic Spiral Trench”, *Forest Ecology and Management* 107, 173–182.

Tonthubthimthong, P., Chuaprasert, S., Douglas, P., Luewisutthichat, W. (2001). “Supercritical Fluid Extraction of Nimbin from Neem Seed, An Experimental Study”, *Journal of Food Engineering* 47, 289–293.

Tonthubthimthong, P., Douglas, P. L. Douglas, S., Luewisutthichat, W. Teppaitoon, W., Pongsopa L-E. (2004). “Extraction of Nimbin from Neem Seeds using Supercritical CO₂ and a Supercritical CO₂–Methanol Mixture”, *Journal of Supercritical Fluids* 30, 287–301

Touchstone, J. C. (1995). “Thin Layer Chromatography Procedures for Lipids Separation” *Journal of Chromatography B* 671, 169-195.

Traber, M. G., Packer, L. (1995). “Vitamin E, Beyond Antioxidant Function”, *American Journal of Clinical Nutrition* 62, 1501.

Tran, G., Skiba, F. (2005). “Variabilité inter et intra matière première de la teneur en phosphore total et phytique et de l’activité phytasique.” *INRA Prod. Anim.* 18(3), 159-168..

Tringali, C., Spatafora, C., Onofrio, D. L. (2000). “Bioactives Constituents of the Bark of *Parkia biglobosa*”, *Fitoterapia* 71, 118-125.

Tsunoda, K. (1993). “Termiticidal efficacy of synthetic pyrethrynoids 2. Effect of accelerated ageing on their termiticidal performance”, *Wood Protection* 2 (2), 67-73.

Tuani, G. K., Cobbinah, J. K., Agbodaze, P. K. (1994). “Bioactivity and PhytoChemical Studies on Extractives from some Ghanaian Plants”, *Ghana Journal of Forestry* 1, 44-48

Udayasekhara, P. R. (1987). “Chemical Composition and Biological Evaluation of Debitterized and Deffated Neem (*Azadirachta indica*)”, *Journal of the American Oil Chemist s’ Society* 64(9), 78-93.

USDA National Nutrient Database. (2002). “US Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 15”, Retrieved August 2002 from the Nutrient Data Laboratory Home Page.

Verleyen, T., Verhe, R., Garcia, L., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., De Greyt, W. (2001). “Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization distillate”, *Journal of Chromatography A* 921(2), 277-285.

Viera, L. S. (1992). “Fitoterapia da Amazonia, Manual das Plantas Medicinaiis”, Editora Agronomica Ceres Ltd, Sao Paulo, 347p.

Vieux, A. S., Kabele, Ngiefu, C. (1970). “Etude de quelques espèces oléagineuses de la République Démocratique du Congo”, *Oléagineux* 25(7).

Volkers, S. (1999). “Screening analysis of unknown seed oils”, *Lipids* 101(1), 2-19.

- Von Maydell, H. J. (1983).** “Arbres et arbustes du sahel leurs caractéristiques et leurs utilisations”, *Eschborn*, 313p.
- Wakako, O., Shuichi, D., Masakazu, A., Seiji, O. (1999).** “Components of Steamed and Non-Steamed Japanese Larch (*Larix leptolpis* (Sieb. Et Zucc.) Gord) Heartwood Affecting the Feeding behaviour of the Subterranean Termite, *Coptotermes formosamus* Shiraki (Isoptera, Rhinotermitidae)”, *Holzforschung* 53, 569-574.
- Wakelyn, P. J. (1997).** “Regulatory Considerations for Extraction Solvents for Oilseeds and Other Nonpetroleum Oils, in, Technology and Solvents for Extraction Oilseeds and Nonpetroleum Oils”, Ed. Wan J. Peter, and Wakelyn P. J., AOCS Press Champaign, III., USA, 353p.
- Walsh, L., Winters, L., Gonzalez, G. (1998).** “Optimizing Deodorizer Distillate Tocopherol Yields is the Objective of Henkel Corporation”, *INFORM. Illinois, AOCS PRESS*, 9, 1-124.
- Wan, J. P., Wakelyn, P. J. (1997).** “Technology and Solvents for Extraction Oilseeds and Nonpetroleum Oils”, Ed. Wan J. Peter, and Wakelyn P. J., AOCS Press Champaign, III., USA, 353p.
- Wan, P. J., Hron, R. J., Dowd, M. K., Kuk, M. S., Conkerton, E. J. (1995).** “Alternance Hydrocarbon Solvents for Cottonseed Extraction, Plant Trials”, *Journal of American Oil Chemists' Society* 72, 661-664.
- William, M. A., Hron, R. J. (1996).** In: *Baileys Industrial Oil and Fat Products*, 5th edn., vol. 4, Edible Oil and Fat Products, Processing Technology, Hui, Y.H, John Wiley and Sons, Inc., 119p.
- Wu, Y. C., Chang, F. R. (1994).** “Bioactive Alkaloids from *Annona squamosa*”, *Chinese Pharmaceutical Journal* 46(5), 438-446.
- Yang, R. Z., Zheng, X. C. (2000).** “Studies on the Chemical Constituents of *Annona squamosa*”, *Acta Botanica Yunnanica* 22(1), 71-74.
- Yasutaka, W., Rie, M., Tohru, M., Tsuyoshi, Y. (2005).** “Termite Repellent sesquiterpenoids from *Callitris glaucophylla* heartwood”, *Journal of Wood Science* 51, 514-519.
- Yaw, J., Owusu, A. (1997).** “Enzyme-Assisted Extraction, in, Technology and Solvents for Extraction Oilseeds and Nonpetroleum Oils”, Ed. Wan J. Peter, and Wakelyn P. J., AOCS Press Champaign, III., USA, 353p.
- Yazaki, Y. (1982).** “Termiticidal Extracts from the Wood of *Ganophyllum falcatum* Bl”, *Holzforschung* 36, 249-253.
- Zheng, X. C., Yang, R. Z. (1995).** “Three Novel Chemical Compounds of Annonaceous Acetogenins from the Seeds of *Annona squamosa*”, *Acta Botanica Sinica* 37(3), 238-243.

ANNEXES

Annexe 1 : Production mondiale d'oléagineux (www.epobio.net/workshop0605.htm)

Graines oléagineuses	Production en 2005	Pourcentage (%)
	Tonnage	Huile
Soja	209 531 558	20
Noix de palme	173 261 199	17 - 27
Coco	55 037 524	30-40
Colza and mustard seed	45 950 786	40
Coton	41 132 246	28 - 40
Arachide (aves coques)	36 492 147	
Huile de palme	32 814 436	
Tournesol	30 674 534	
Olive	14 511 779	
Palmiste	8 771 591	
Sésame	3 321 458	
Lin	2 710 986	
Autres graines*	1 892 327	
Ricin	1 393 812	
Tallowtree seeds	870 000	
Safflower	773 427	
Sheanuts	693 000	
Mustard	621 023	
Melon	586 605	
Tung Nuts (Aleurites)	516 480	
Kapok	392 967	
Poppy seeds	60 135	
Hempseed	31 680	
Jojoba	400	
Total	662 042 100	

* Incluant: beech nut (*Fagus sylvatica*);(*Aleurites moluccana*);(*Carapa guineensis*);(*Croton tiglium*);(*Bassia latifolia*);(*Guizotia abyssinica*);(*Licania rigida*);(*Perilla frutescens*) (*Jatropha curcas*);(*Shorea robusta*);(*Pongamia glabra*);(*Astrocaryum spp.*)

* Source, FAOSTAT data, 2006

Annexe 2 Accroissement des productions d'huiles végétales nécessaires d'ici à 2020 dans les pays de l'UEMOA, à ration alimentaire constante

PAYS	BESOINS 97/99	BESOINS 2020	ACCROISSEMENT	ACCROISSEMENT
	Tonnes	Tonnes	Tonnes	%
BENIN	28 097	49 206	21 109	+ 75%
BURKINA	51 732	99 668	47 936	+ 93%
R.C.I.	180 378	268 560	88 182	+ 49%
GUINEE BISSAU	13 372	22 116	8 744	+ 65%
MALI	72 857	134 567	61 710	+ 85%
NIGER	36 593	76 486	39 893	+ 109%
SENEGAL	158 883	259 898	101 015	+ 64%
TOGO	29 400	49 466	20 066	+ 68%
UEMOA	571 311	959 967	422 656	+ 74%
non UEMOA	2 147 993	3 592 507	1 444 514	+ 67%
CEDEAO	2 719 304	4 552 474	1 833 170	+ 67%

* Source Hirsch, 2002

Annexe 3: Composition en acides gras de quelques huiles végétales commercialisées

	C8 :0	C10 :0	C12 :0	C14 :0	C16 :0	C18 :0	C18 :1	C18 :2	C18 :3	C20 :1	C22 :0
Soja					14	4	21	55	9		
Palme				5	36	2	50	8			
Colza					5	3	60	20	8	2	
Tournesol					6	5	22	65			
Arachide					10	3	56	30			
Coton					25	2	15	57			
Coco	9	7	50	16	8	2	7	1			
Palmiste		4	48	16	9	4	15	5			
Olive					16	2	65	16	1		

* Source FAO data

Annexe 4 : Rendement d'extraction (REX) en fonction de la pression et de la température (20 Min d'extraction)

Rendement d'extraction (%)	Pression (bars)			
	200	300	500	700
40	13	31	62	74
60	8	28	75	96
80	3	24	90	100

* Favati *et al.*, 1994 ; Kiriamiti *et al.*, 2001 ; Andrich *et al.*, 2001

Annexe 5 : Pouvoir solvant du CO₂ SC en fonction de la température et de la densité réduite du CO₂ SC

Pouvoir solvant du CO ₂ SC (g/Kg CO ₂)	Densité réduite du CO ₂ SC*		
	1,7	1,8	1,9
35	2,3	4,5	9,5
60	9,8	20,2	40,2
85	33,6	72,6	135,3

* Densité réduite = densité réelle/densité au point critique

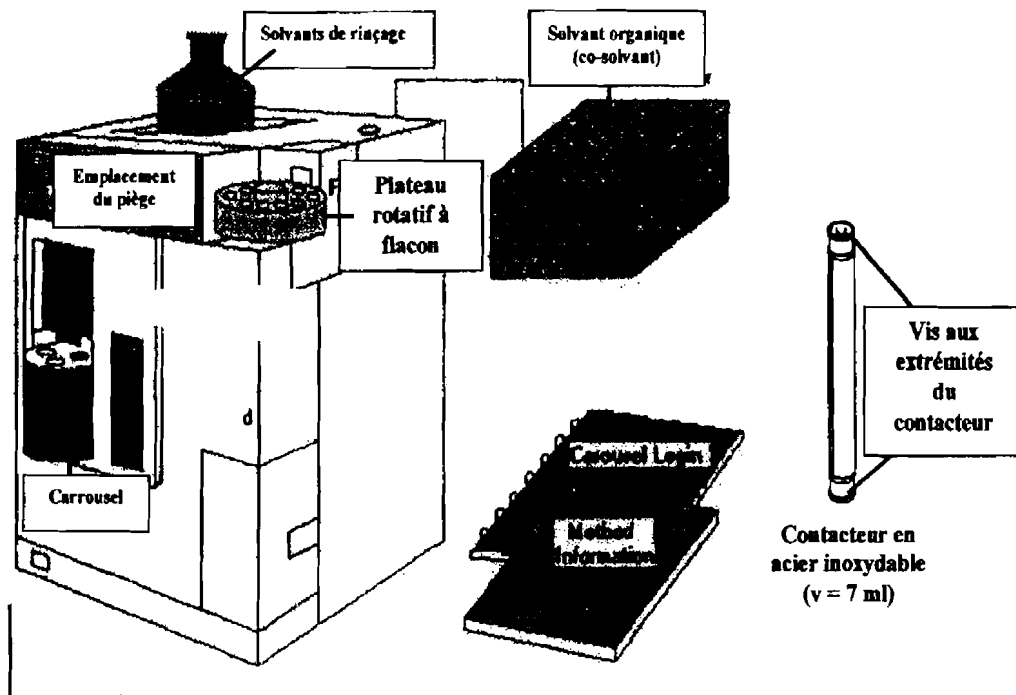
* Favati *et al.*, 1994 ; Kiriamiti *et al.*, 2001 ; Andrich *et al.*, 2001

Annexe 6 : Rendement d'extraction en fonction du type de prétraitement mécanique

Type de prétraitement mécanique	Aucun	(1)	(1) + (2)	(1) + (2) + (3)
Rendement d'extraction (%p)	5	92	94	96

(1) : Broyage avec broyeur type moulin à café, (2) : Ecrasement avec mortier et pilon, (3) tranches (épaisseurs < 0,3 mm) après pressage mécanique.

* Favati *et al.*, 1994 ; Kiriamiti *et al.*, 2001 ; Andrich *et al.*, 2001

Annexe 7-a : Schéma du pilote à solvant CO₂ supercritique

* Modèle Hewlett Packard 7680 T

Le pilote à solvant supercritique (modèle Hewlett Packard 7680 T) mis à la disposition du CIRAD-AMIS par l'entreprise Phytatec permet l'utilisation de CO₂ en présence ou non de co-solvant, pour la préparation d'échantillons à des fins analytiques.

Annexe 7-b Principe de fonctionnement de l'appareil.

L'extraction en milieu supercritique se fait en plusieurs étapes :

- Dépôt de l'échantillon de graine dans le contacteur :

On dépose une masse d'environ 500mg de graines dans le contacteur en acier inoxydable. Le pilote peut recevoir jusqu'à 8 contacteurs dans son carrousel.

- Extraction de composés d'intérêt présents dans l'échantillon par le fluide supercritique :

L'extraction utilise deux types de CO₂ à l'état liquide, l'un pur (CO₂ « scientifique », Linde Gas, Réf B20, 15 kg pureté : 99,9%) pour extraire le ou les solutés d'intérêt et l'autre de pureté inférieure (Linde Gas, Réf B47, 35 kg) car utilisé comme cryogène pour le système de compression. Avant extraction des composants, le CO₂ est porté à la pression et à la température désirées respectivement par une pompe haute pression et un échangeur thermique. Une fois la densité désirée atteinte (P et T), le CO₂ supercritique entre en contact avec l'échantillon présent dans le contacteur. Le pilote permet de mener une extraction en mode statique et/ou en mode dynamique. En mode statique (étape de conditionnement de l'échantillon à extraire) un volume fixé de fluide supercritique interagit avec l'échantillon pendant un temps donné, alors qu'en mode dynamique (étape d'extraction), le fluide au contact de l'échantillon est renouvelé continuellement. En fin d'extraction, le CO₂ SC est transvasé vers une chambre de dépressurisation et le soluté est condensé sur les parois

- Récupération des composants par un solvant organique :

Après transfert des extraits dans le piège, la pompe à solvant y fait circuler de l'hexane afin de récupérer le ou les composants dans des flacons. A l'hexane, on peut ajouter un autre solvant de rinçage, le chloroforme afin de s'assurer que tous les composants sont bien extraits et d'assurer aussi une maintenance permanente de la trappe.

Annexe 8 : Mise en marche du pilote à solvant supercritique

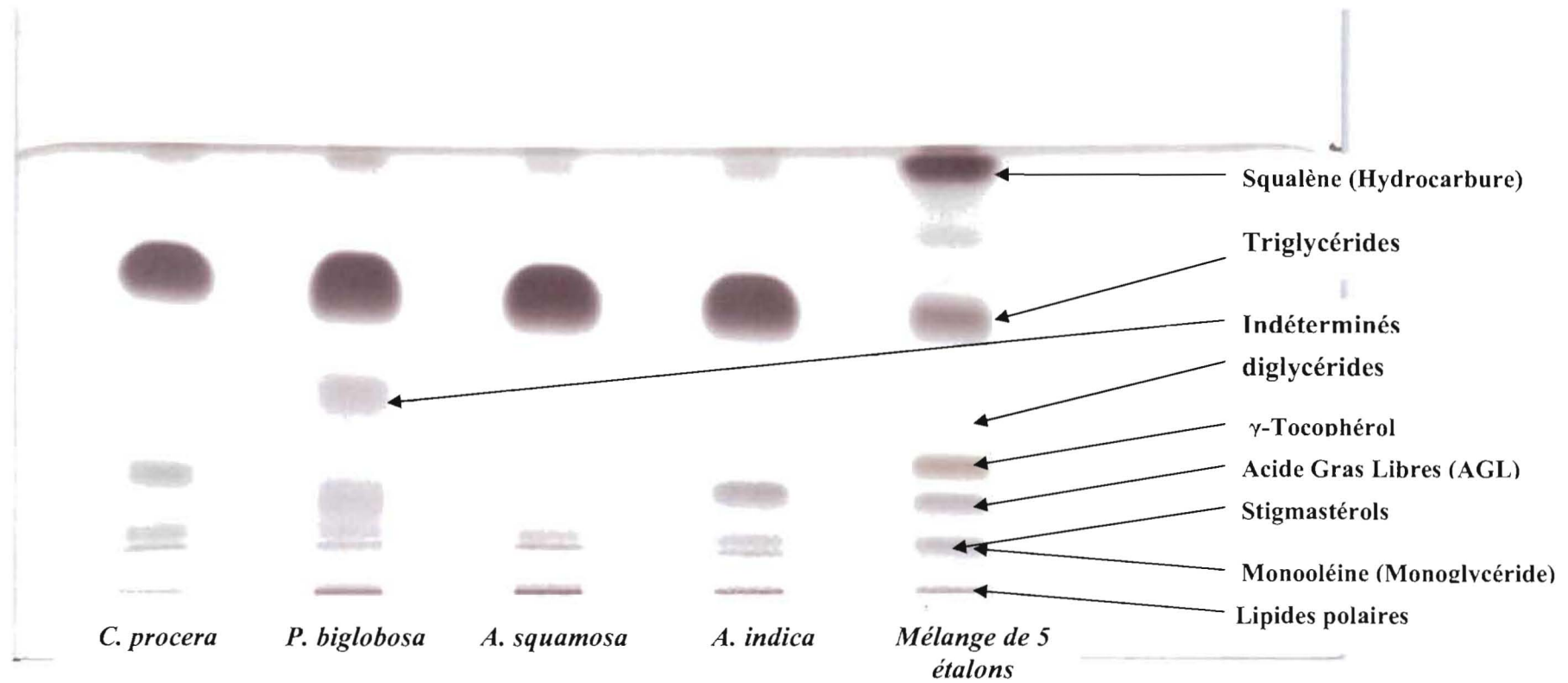
La procédure de fonctionnement de l'appareil est la suivante en mode d'extraction sans co-solvant :

- Sélectionner le logiciel HP ChemStation.
- Cliquer Start, sélectionner SFE2 puis OK.
- Aller dans Method puis New Method. Sélectionner le nom du fichier puis OK.
- Aller dans Extract puis Setpoints.
- Cliquer dans Extraction Condition et modifier les paramètres P et le temps d'extraction.
- Cliquer dans Fraction Output, puis mettre pour Rinse Solvent 1 *n-hexane*, OK.
- Pour ajouter un autre solvant aller dans Rinse puis Rinse solvent :
 - Mettre dans Rinse solvent 1, le premier solvant choisit par exemple *n-hexane*.
 - Mettre dans Rinse solvent 2, le second solvant choisit par exemple *chloroforme*.
- Cliquer sur Fraction Output, mettre le nom du deuxième solvant et changer le numéro du flacon (vial) pour le second solvant. Cliquer sur Add substep puis OK.
- Ensuite, on retourne dans Method, Save Method OK puis Oui.
- Aller dans Sequence, Build Sequence, Clear All puis sur Add et OK.
- Retourner dans Save Sequence puis OK et Oui.
- Aller dans Run, Keyboard et cliquer sur Start.
- Puis Run à nouveau et Instrument Status.

Pour effectuer l'extraction à l'aide d'un co-solvant, la procédure est la suivante :

On reprend les sept premiers points précédents, puis après Rinse et Rinse solvents,

- Aller dans Extract puis Modifiers, Modifier choices : sélectionner le co-solvant de notre choix, ici l'éthanol, Select et OK.
- Toujours dans Extract, aller dans Setpoints puis cliquer dans :
 - *Extraction conditions*, puis modifiers et mettre le volume d'éthanol souhaité, cliquer sur Replace et OK.
 - *Analyte Trap*, Trap temperature et OK.



Annexe 9 : Plaque de CCM des quatre huiles végétales (analyse qualitative)

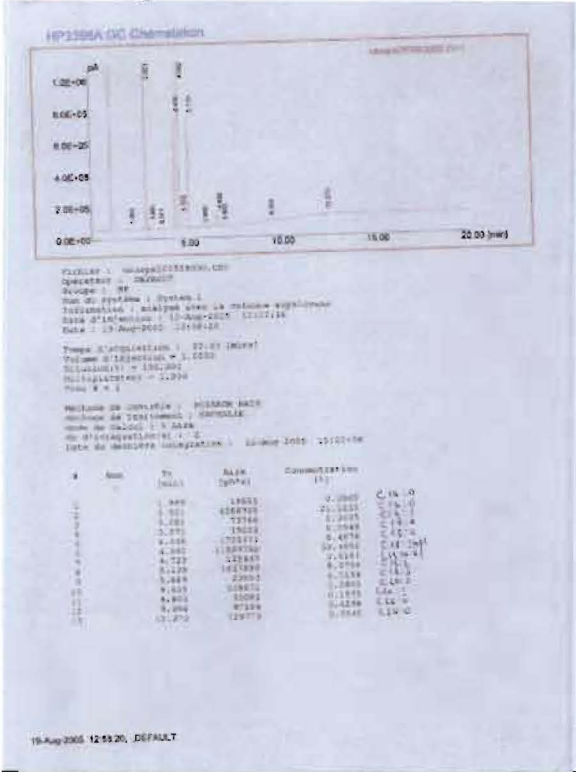
Annexe 10 : Chromatogrammes des acides gras



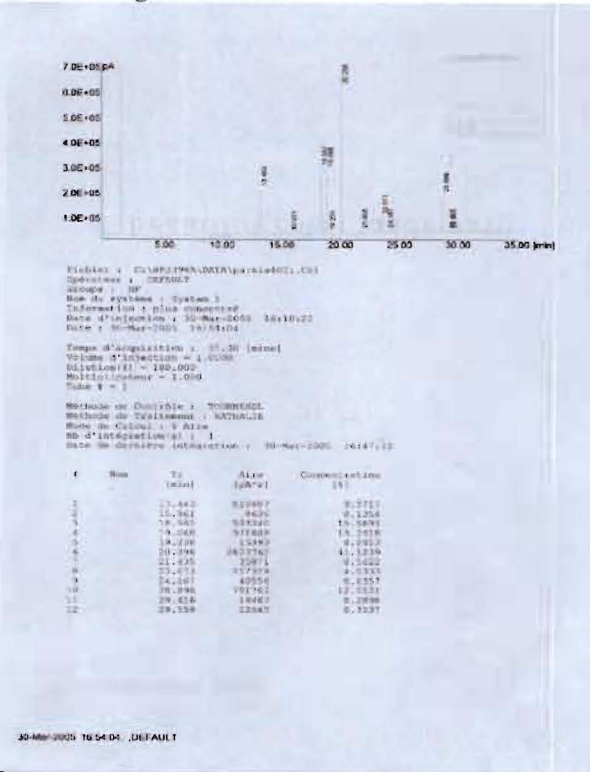
10-a Acides gras de H-Az



10-b Acides gras de H-As



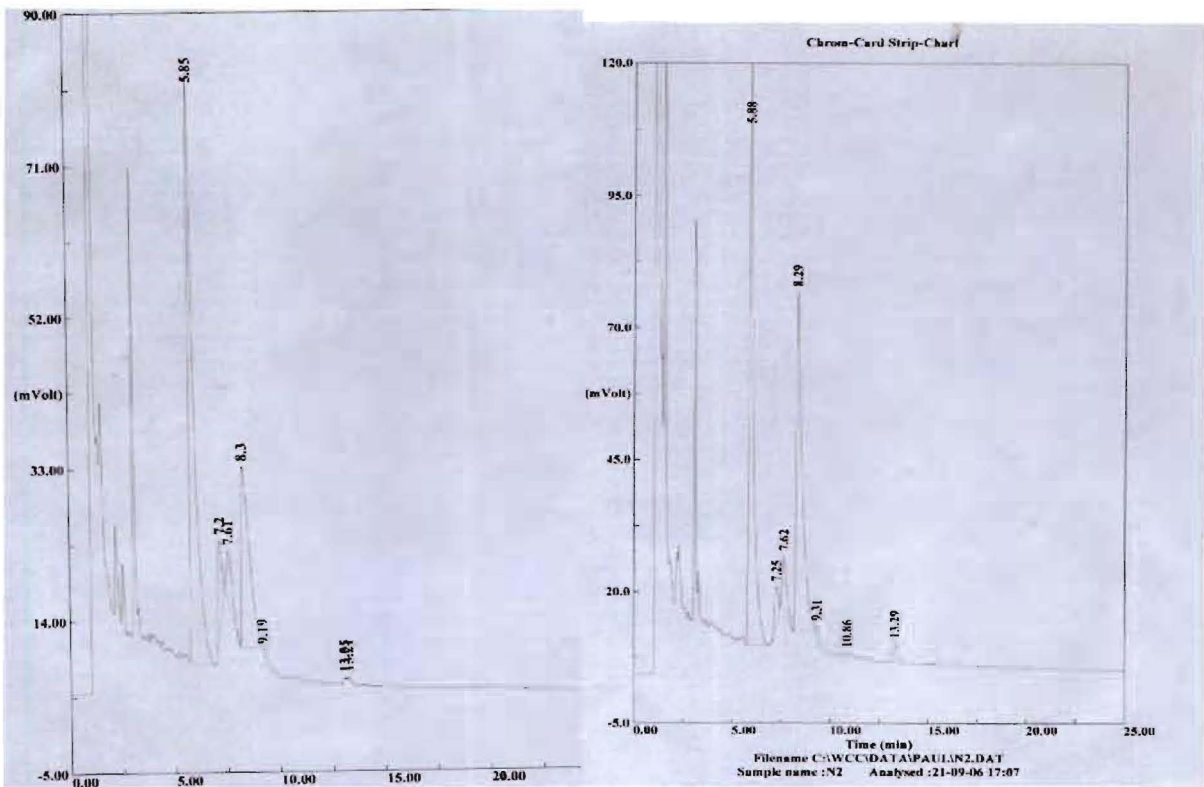
10-c Figure 1 Acides gras H-Cp



10-d Acides gras H-Pb

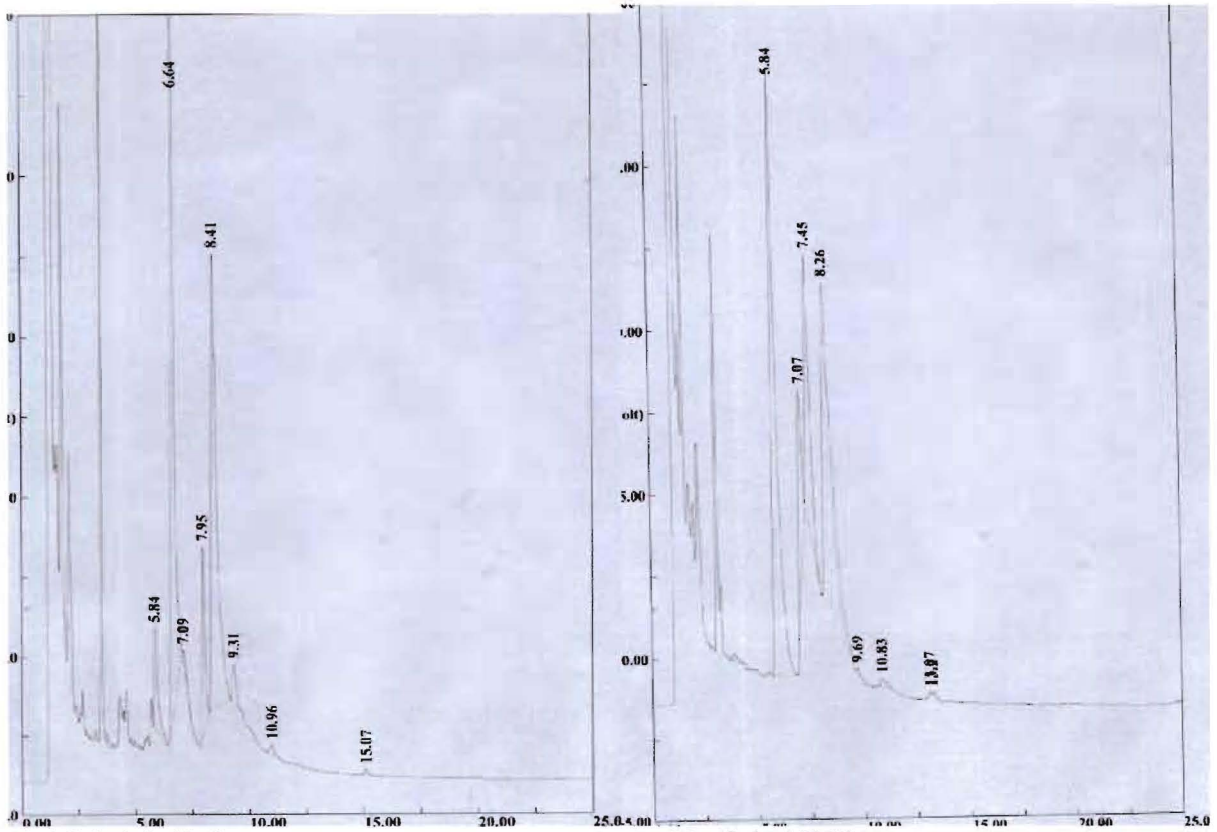
* CPG Agilent 6890 HP series (Agilent, USA) colonne Innovax Injecteur 250 °C, Détecteur 270 °C programmation de température.

Annexe 11 : Chromatogrammes des stérols



11-a Stérol de H-As

11-b Stérol de H-Az

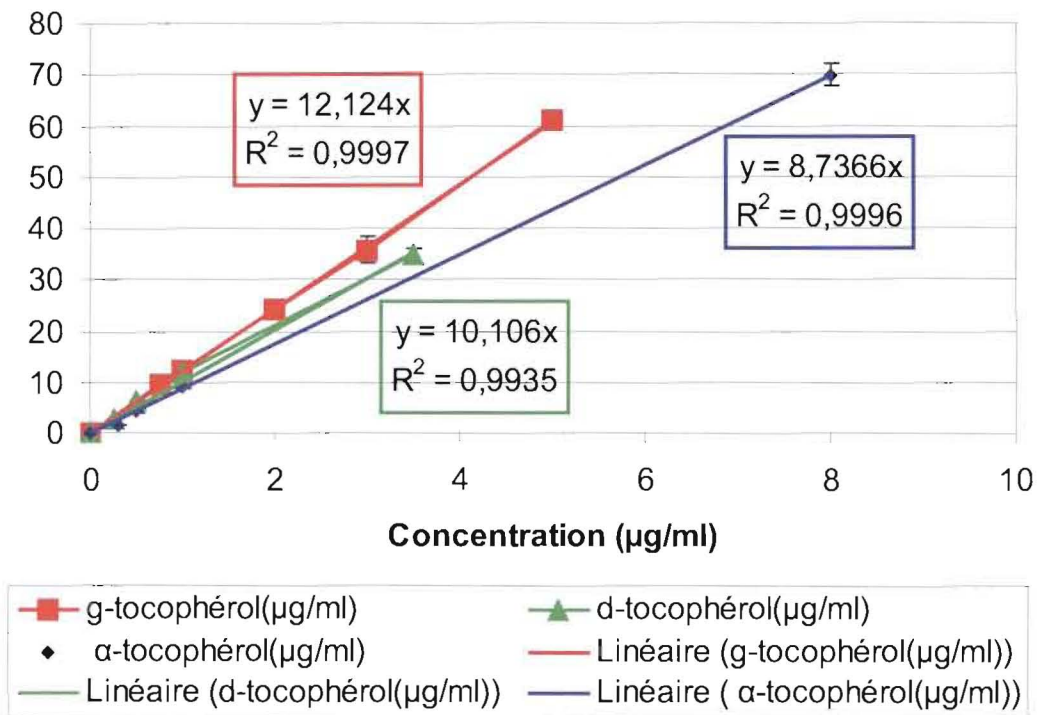


11-d Stérol de H-Cp

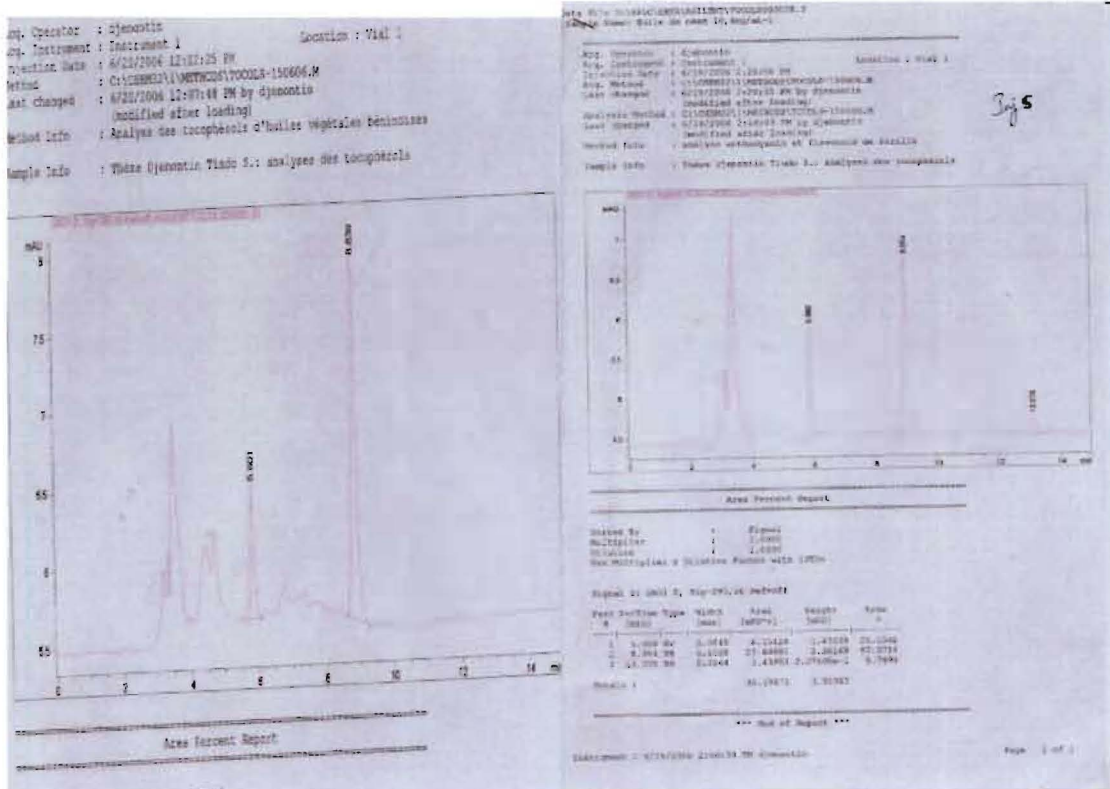
11-c Stérol H-Pb

* GC 8000 Fisons Instruments, colonne Supelcowax, conditions isothermes à 280 °C, détecteur 300 °C

Annexe 12 : Courbes d'étalonnage des tocophérols (CLHP)

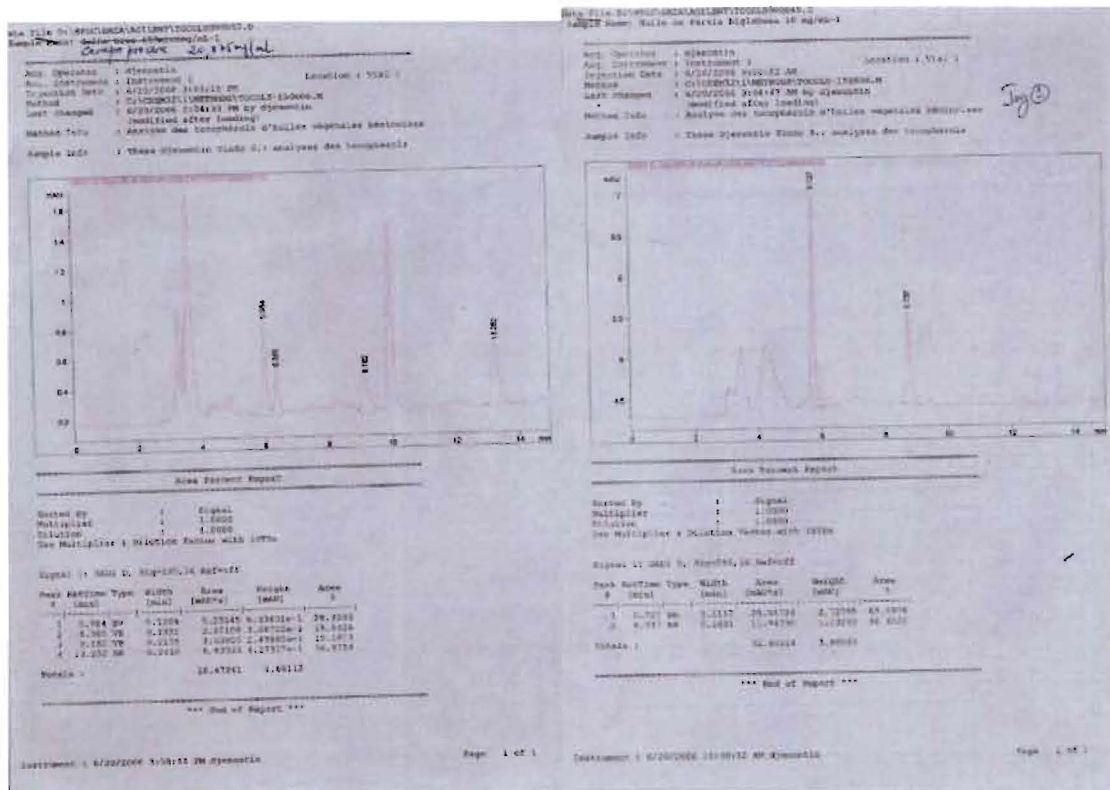


Annexe 13 : Chromatogrammes des tocophérols



13-a Tocophérol de H-As

13-b Tocophérol de H-Az



13-c Tocophérol de H-Cp

13-d Tocophérol de H-Pb

* CLHP, Agilent Series 1100, colonne Luna Silica, Detecteur DAD $\lambda = 295$ nm, Pression = 33 bars

Annexe 14 : Caractérisation du tourteau d'extraction de quelques graines d'importance économique au Bénin

(% MS, graines)	Arachide	Coton	Soja
Humidité	3 - 7	3 - 10	3 - 10
Cendres	3 - 7	4 - 7	5 - 7
Matières grasses	3,3	4 - 5	0,6 - 0,7
Protéines	26 - 42	28 - 50	36 - 53

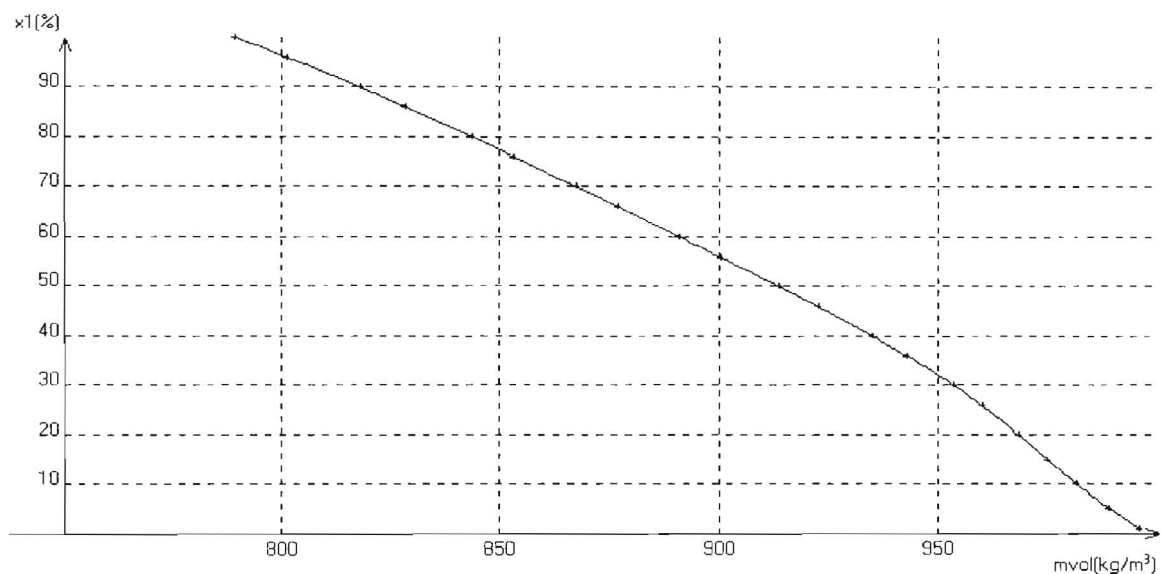
* Lusas and Hernandez, 1997

Annexe 15 : Composition en acides aminés de tourteaux de soja délipidés à l'hexane

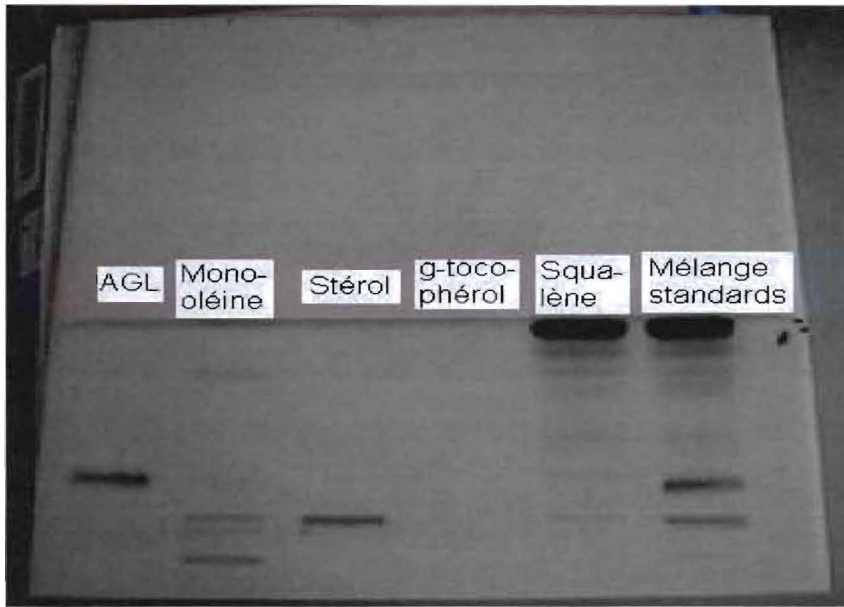
Acides aminés	%
Arginine	3,6
Histidine	1,3
Isoleucine	2,4
Leucine	3,8
Lysine	3,1
Méthionine	0,8
Phénylalanine	2,5
Thréonine	1,9
Valine	2,5
Alanine	2,1
Acide aspartique	5,7
Acide glutamique	9,3
Glycine	2,0
Serine	2,6
Tyrosine	1,9

* Lusas and Hernandez, 1997

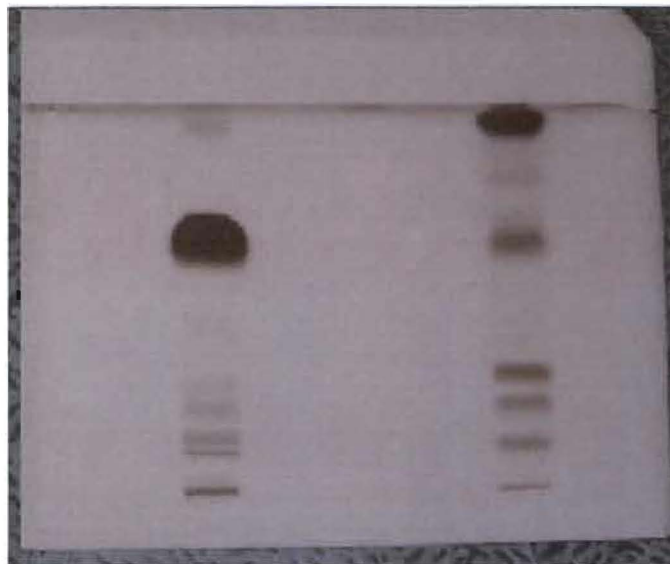
Annexe 16 : Masse volumique des binaires éthanol/eau



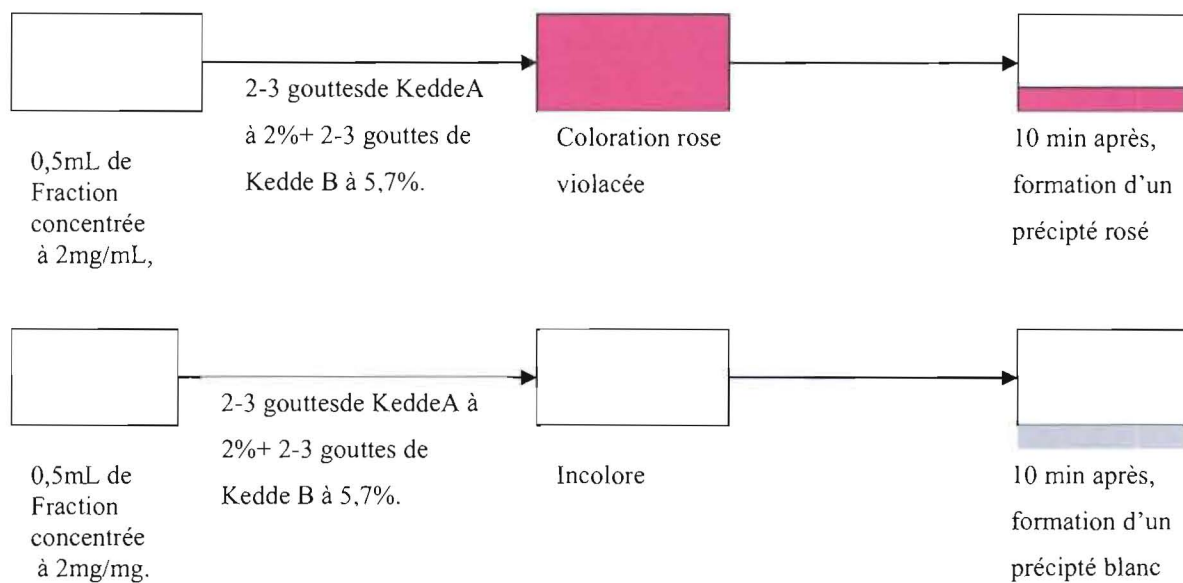
* <http://nicole.cortial.net>

Annexe 17 : Plaque de CCM des étalons**Annexe 18 : Plaque de CCM des lipides présents dans les extraits**

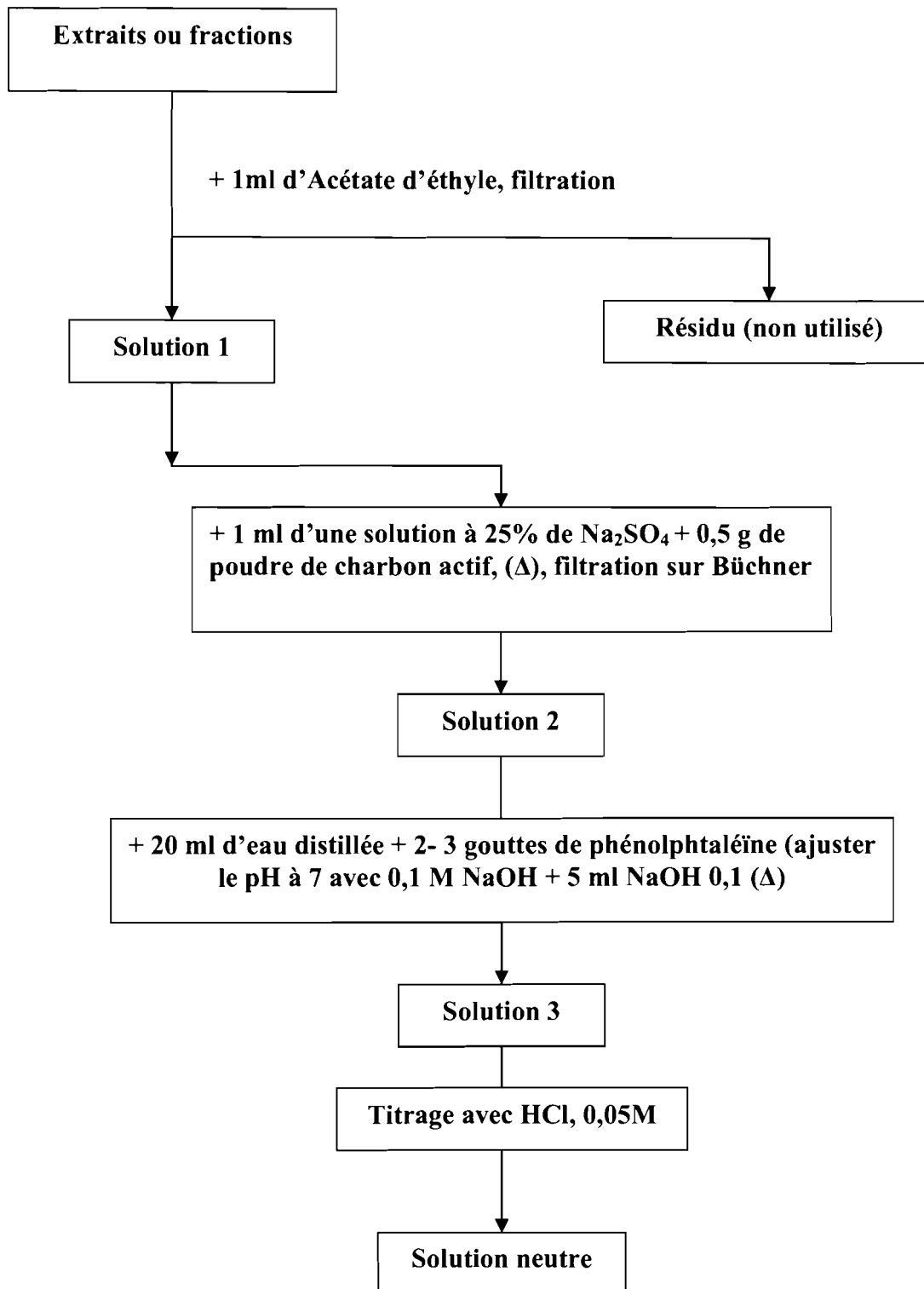
Annexe 19 : Plaque de CCM de l'huile d'*A. Squamosa*



Annexe 20 : Test colorimétrique des acétogénines avec les réactifs de Kedde (MPRI, 1999 ; Naiyana, 2002)



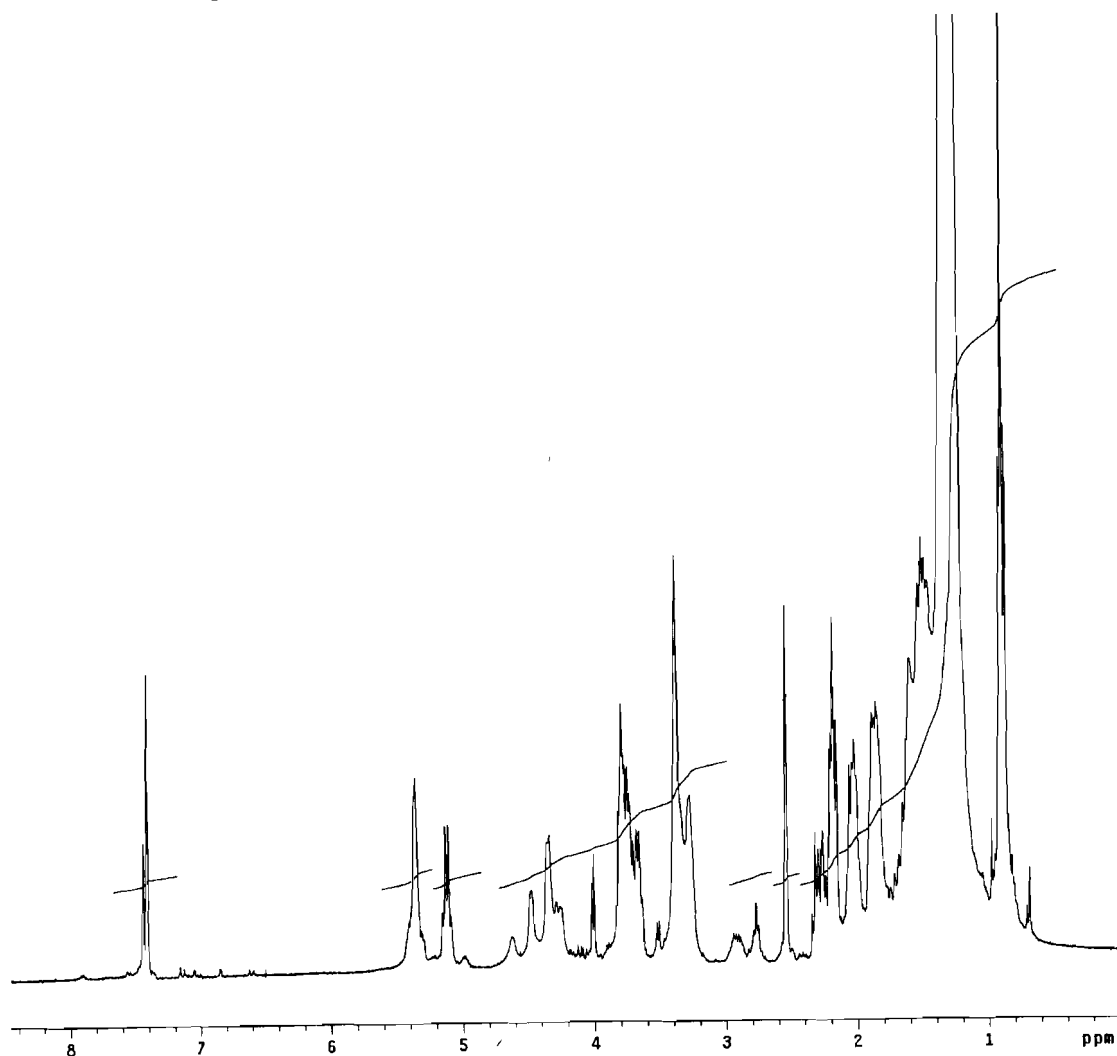
- test positif pour les fractions F12-F19
- négatif pour les fractions F0-F11 et F20-F29 et pour les témoins solvants

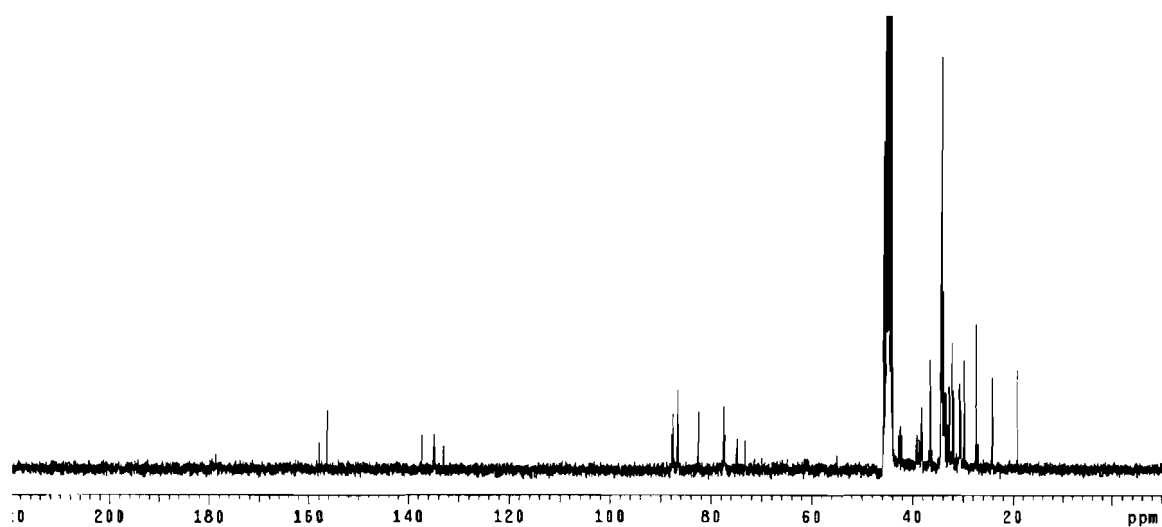
Annexe 21 : Méthode de dosage des acétogénines par titrimétrie acidobasique

* MPRI, 1999 ; Naiyana, 2002

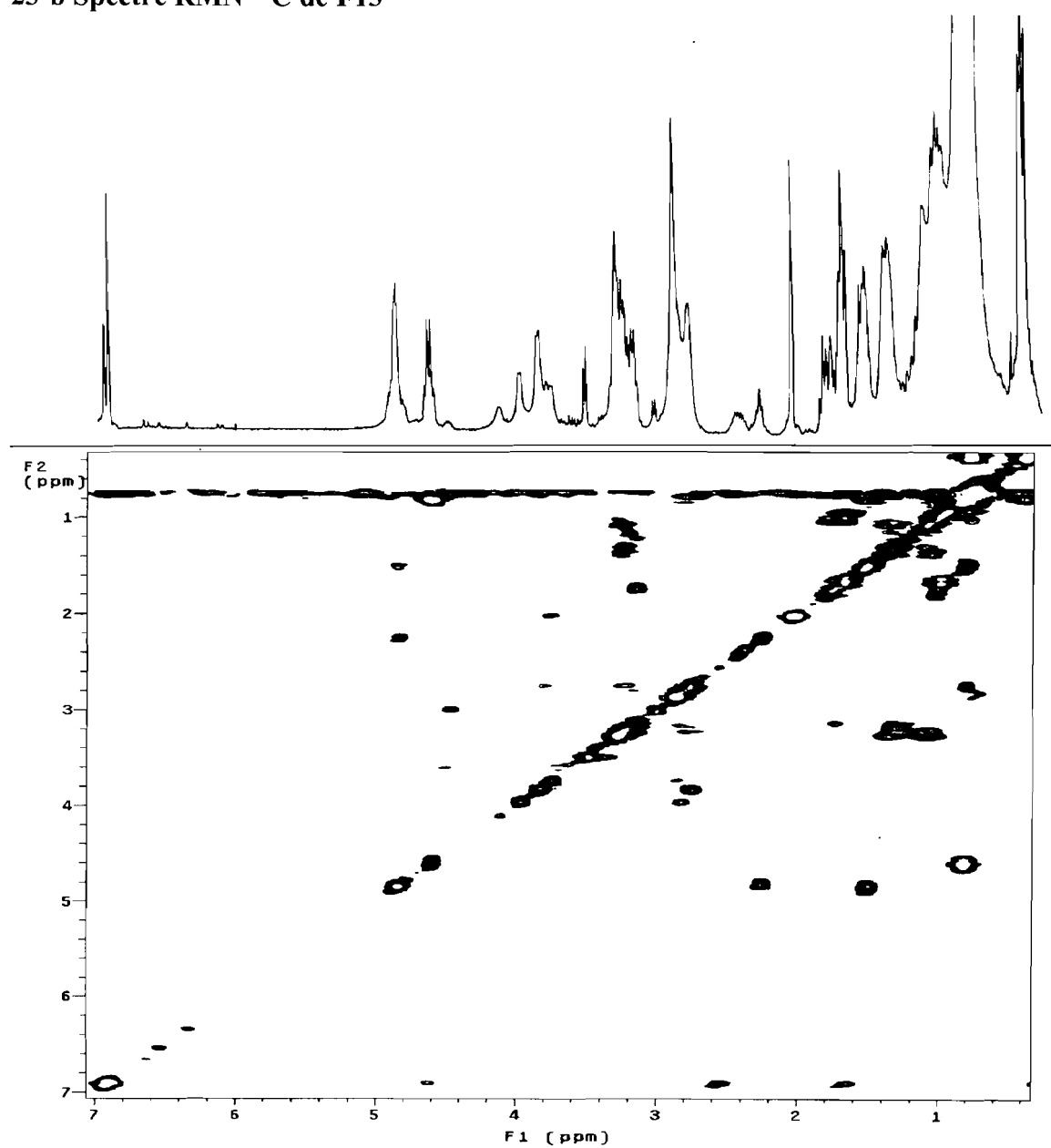
Annexe 22 : Microanalyse élémentaire des extraits

Extraits	C	H	O	N
100/0	64,84	10,92	18,30	1,57
80/20	35,88	9,35	21,04	1,94
50/50	11,27	7,69	18,93	0,78
20/80	16,93	8,62	38,84	1,25
0/100	13,61	6,49	35,52	1,9
Hx-Ex	76,56	11,86	11,22	0,09
P-MeOH	73,43	11,43	14,5	0,22

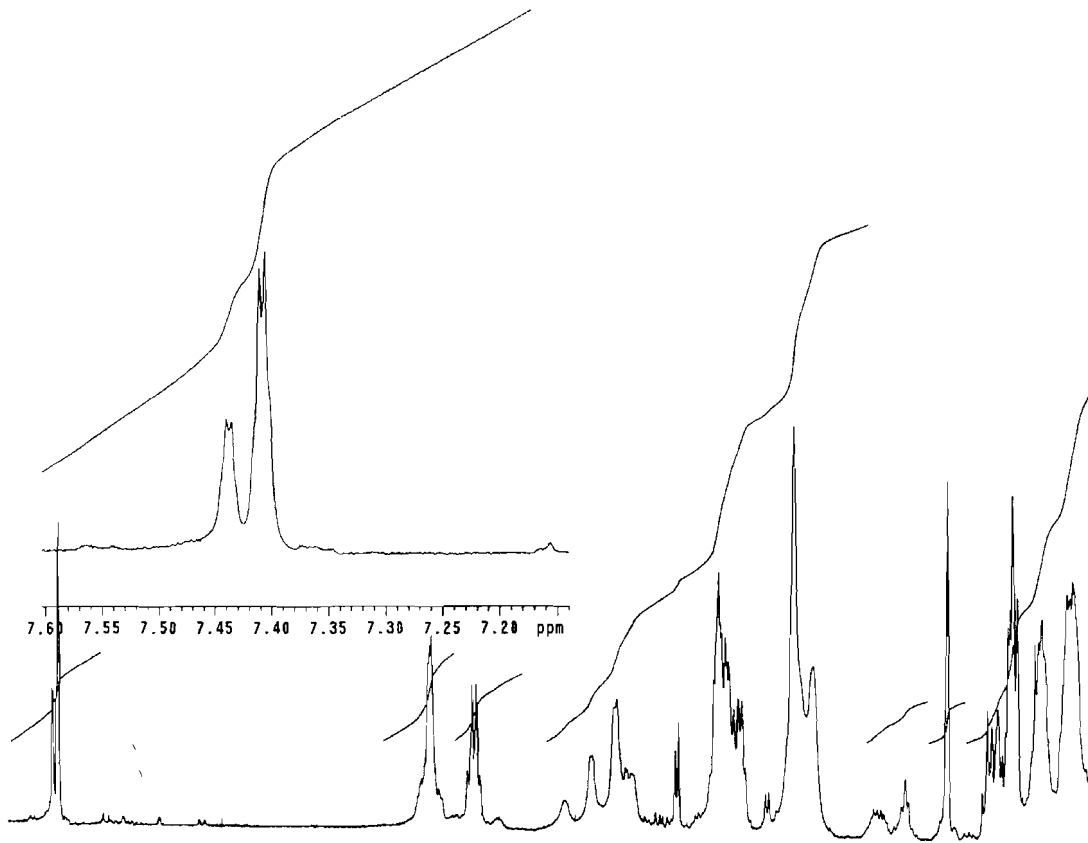
Annexe 23 : Spectres de RMN de la fraction F-13**23-a Spectre RMN ¹H de F13**



23-b Spectre RMN ^{13}C de F13



23-c Spectre COSY de F13 (corrélations proton-proton)



23-d Agrandissement du spectre proton

RESUME

Quatre espèces oléagineuses du Bénin ont été sélectionnées en fonction de leur intérêt potentiel en tant que biocides à partir de la bibliographie et d'informations de terrain : *Annona squamosa*, *Azadirachta indica*, *Carapa procera*, *Parkia biglobosa*. La caractérisation chimique des principaux composants des graines -coque, tourteau, huile- (lipides, protéines, glucides, minéraux, lignocellulose) a permis de compléter les données de la littérature. Cette étude montre l'intérêt en nutrition de l'huile de *P. biglobosa* grâce à sa composition en acides gras équilibrée, à sa richesse en phytostérols (2.700 ppm) et tocophérols (880 ppm), mais aussi celui du tourteau d'extraction riche en acides aminés essentiels. Les autres huiles sont de type oléique (59 % d'acide oléique pour *C. procera*).

Ces données montrent des voies de valorisation (aliments du bétail, engrais) des co-produits résultant de l'extraction de fractions biocides, laquelle a constitué une part importante du travail. L'extraction a été étudiée avec des solvants couvrant une large gamme de polarité (hexane, éther de pétrole, CO₂ supercritique, acétone/eau, éthanol/eau, méthanol) et *via* trois méthodes (contacteur liquide-solide discontinu, partition liquide-liquide, chromatographie préparative). Les courbes d'équilibre établies pour une série d'étapes d'extraction en milieu éthanol/eau ont permis de tracer les droites opératoires et de révéler les bonnes performances du binaire 80/20 v/v, solvant peu agressif pour l'environnement. Le CO₂ supercritique avec l'éthanol comme co-solvant laisse espérer une sélectivité intéressante comme alternative au mélange hydroalcoolique.

A. squamosa a révélé l'activité biocide la plus importante des quatre graines, avec des seuils d'efficacité plus bas dans le cas d'un solvant d'extraction polaire.

Un test de dérivatisation, la microanalyse C, H, O, le couplage CLHP/SM et la RMN du proton ont permis d'identifier des composants de la fraction la plus active.

Mots clés : Graines oléagineuses, Activité biocide, Bénin.

SUMMARY

Four oilseeds from Benin have been selected on the basis of their potential biocide activity, from literature and field informations: *Annona squamosa*, *Azadirachta indica*, *Carapa procera*, *Parkia biglobosa*. Chemical analysis of seeds –nut, oil, cake- main components (lipids, proteins, sugars, minerals, lignocellulose) helped completing literature data. This study shows the nutritional interest of *P. biglobosa* oil, thanks to its well balanced fatty acid composition, high phytosterols and tocopherols contents (2.700 ; 870ppm respectively) and that of the cake having a noticeable content of essential aminoacids. Other oils are of oleic type, the highest content of this acid -59%- being for *C. procera*.

These data show possible ways for valorising by-products resulting from extraction of fractions having an anti-termite activity, this last field being the main objective of the present work. The extraction step has been investigated with solvents covering a wide range of polarity (hexane, petroleum ether, supercritical CO₂, acetone/water, ethanol/water, methanol) using 3 experimental methods (solid-liquid batch extraction, liquid-liquid extraction, preparative chromatography). Equilibrium curves for stepwise extraction with ethanol/water mixtures led to computed operation lines and pointed the interesting score of the 80/20v/v mixture, a solvent having a low environment impact compared to others in the series. Supercritical CO₂ with ethanol as co-solvent could be an alternative highly selective solvent.

A. squamosa showed the highest biocide activity among the four species, especially in the case of polar solvents. A derivatization step, elemental analysis C,H,O, HPLC/MS and proton NMR showed the chemical structure of several components of the most active fraction.

Key-words : Oil bearing seeds, Biocide activity, Benin.