



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

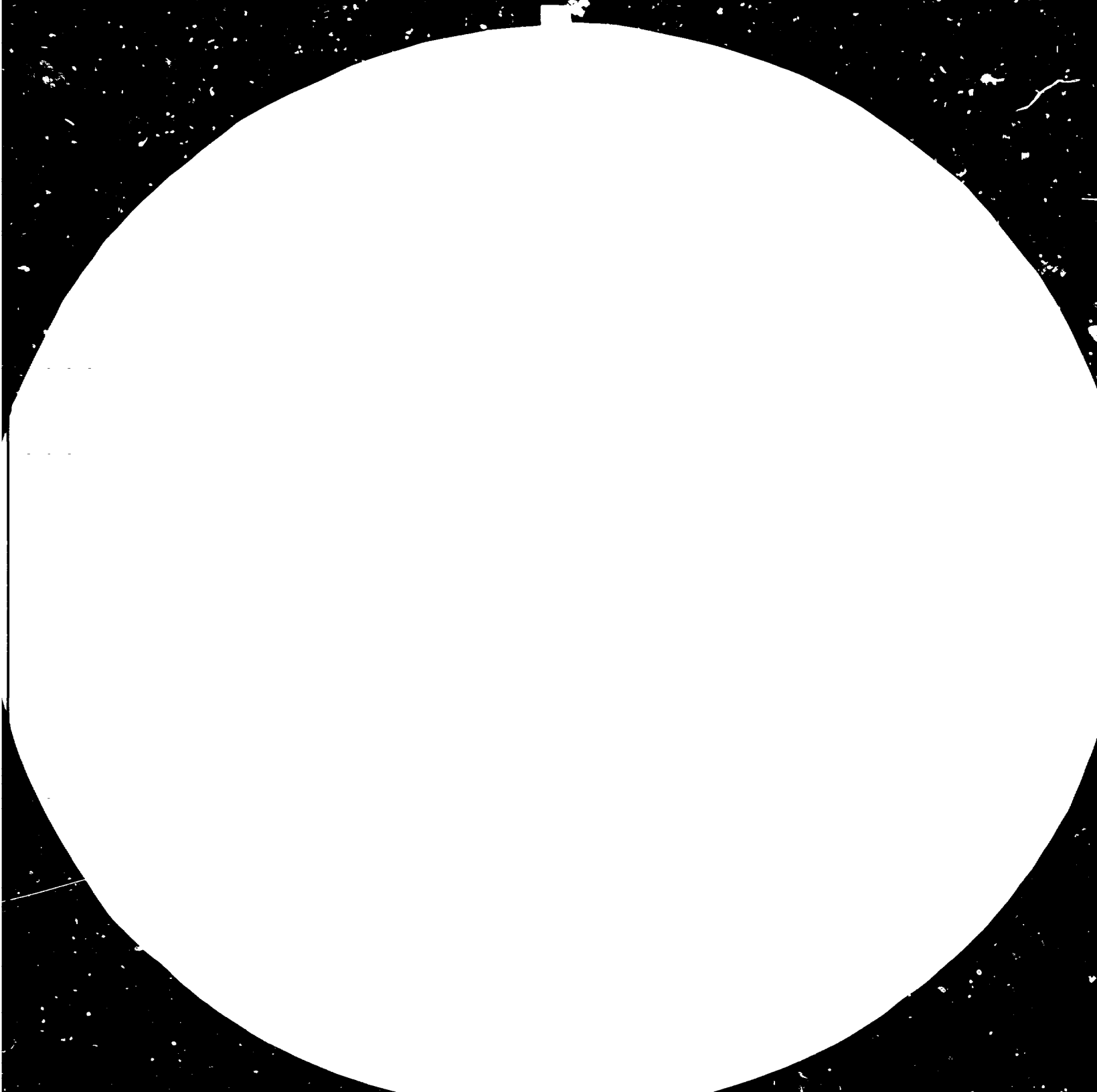
FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org





32

36

4



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART

NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010A
APR 1963 EDITION TEST CHART #1-10

P
13618

Distr.: LIMITEE

UNIDO/IO.578
14 mars 1984

ORGANISATION DES NATIONS UNIES
POUR LE DEVELOPPEMENT INDUSTRIEL

FRANÇAIS

PROGRAMME DE FORMATION DANS LE
DOMAINE DE CULTIVATION ET UTILI-
SATION INDUSTRIELLE DES PLANTES
MEDICINALES

Bucharest, Roumanie

7 juin - 10 juillet 1982

PLANTES MEDICINALES ET AROMATIQUES :
IMPORTANCE, CULTURE, INDUSTRIALISATION ET ANALYSE *

Document établi par le
Centre Commun ONUDI-Roumanie

Le document n'a pas fait l'objet d'une mise au point rédactionnelle.

V.84-83334

P R E F A C E

Il est un fait bien connu que de nombreux pays possèdent une flore riche en plantes médicinales et aromatiques, qui, dans la plupart des pays en développement, ne pousse encore qu'à l'état spontané.

Employer cette richesse, dans ces derniers pays, en vue d'en extraire les principes actifs pour produire des médicaments ou des huiles volatiles, créer, par conséquent, une industrie pharmaceutique ce n'est non seulement satisfaire aux besoins qu'exigent les soins de la santé des populations de ces pays c'est encore y créer une industrie, offrir des emplois à de jeunes travailleurs que cette industrie peut embaucher ainsi qu'à des techniciens qu'une pareille industrie nécessite et finalement, obtenir des marchandises - plantes conditionnées et vendues telles quelles ou médicaments et huiles volatiles pouvant être valorisées sur les marchés intérieurs et sur ceux d'autres pays.

Ayant en vue ces multiples objectifs, l'Organisation des Nations Unies pour le développement industriel - l'ONUDI -, en collaboration avec le Centre commun ONUDI-Roumanie, a initié un programme complexe tendant à mettre en valeur les plantes médicinales et aromatiques d'un certain nombre de pays en développement: missions exploratoires de spécialistes roumains dans ces pays, suivies d'unités mobiles pourvues de laboratoires et qu'accompagnaient des spécialistes se sont déplacées dans plusieurs pays d'Asie et d'Afrique. Une partie de la flore spontanée de ces pays a pu être évaluée et identifiée et des propositions de projets ont été avancées à l'attention des gouvernements de ces pays et de l'ONUDI. Des premiers résultats tangibles ont déjà pu être enregistrés dans quelques pays ainsi visités tels que Népal, Rwanda et Tanzanie, où des installations de transformation des plantes médicinales sont en voie d'être réalisées.

L'un des aspects les plus importants de ce vaste programme est la formation de spécialistes pour les différents compartiments de valorisation des plantes médicinales allant des cultures des plantes à leur industrialisation. Dans ce but, un plan d'édition de manuels a été élaboré dont un premier volume, "Methodology for Analysis of Vegetable Drugs", écrit par le professeur Ioan Ciulei, de la Faculté de Pharmacie de Bucarest, a déjà paru.

Toujours dans le but d'initier le perfectionnement de spécialistes, et tenant compte de l'expérience, riche de dizaines d'années d'activité dans ce domaine, que possède la Roumanie, l'ONUDI, en collaboration avec le Centre commun ONUDI-Roumanie, a démarré un programme de formation destiné aux pays en développement. Ce programme, conçu d'être tenu alternativement en anglais et en français, a débuté en 1980 en anglais suivi en 1982 du même cours en français et continué en 1983 en anglais.

Le programme a été organisé avec l'aide financière et organisationnelle de l'ONUDI.

Du côté roumain, le programme a été organisé par l'Office de Bucarest du Centre commun ONUDI-Roumanie, en collaboration avec le Centre de perfectionnement de l'industrie chimique, l'Institut pour le contrôle d'Etat des médicaments et de recherches pharmaceutiques, l'Institut de recherches chimiques-pharmaceutiques, les Facultés de pharmacie de Bucarest, Iași et Tîrgu Mureș, les entreprises de culture des plantes médicinales "Plafar" de Bucarest et Orăștie, la Station expérimentale de plantes médicinales et aromatiques de Fundulea, la Centrale industrielle de médicaments et ses entreprises de Bucarest, Iași et de Brașov.

La coordination directe du programme a été assumée par un collectif dirigé par Mme Maria Anghelescu de l'Office du Centre commun ONUDI-Roumanie, et formé de M. Octavian Contz et Mlle Mihaela Georgescu de l'Institut pour le contrôle d'Etat des médicaments et de recherches pharmaceutiques, de Mme Ecaterina Nichiforescu, de l'Institut de recherches chimiques-pharmaceutiques et de M. Călin Polovrăgeanu, du Centre de perfectionnement de l'industrie chimique.

Le programme comportait des exposés, des travaux pratiques et des démonstrations en laboratoire ainsi que des visites d'installations industrielles et de champs de culture.

Etant donné le succès remporté par ce programme et sur suggestions venant de l'ONUUDI et des participants au programme, il a été décidé de réunir en volume les conférences présentées au programme français en 1982. Une édition en anglais suivra.

Les exposés présentés dans le volume ont été groupés en quatre parties - sans qu'on y fasse expressément une séparation nette - selon les étapes de parcours des plantes à teneur en principes actifs jusqu'à leur valorisation industrielle.

Dans une première partie sont inclus les exposés d'ordre général concernant l'importance en thérapie des plantes médicinales, les bases biogénétiques de la formation des principes actifs dans les plantes et en y incluant également un exposé sur la méthodologie suivie en Roumanie pour introduire des médicaments nouveaux d'origine végétale.

La deuxième partie comprend les exposés se rapportant aux matières premières et notamment aux cultures des plantes médicinales en partant de la méthodologie appliquée à inventorier et établir les cartes des plantes médicinales d'une zone géographique donnée, continuant par la culture proprement dite et l'amélioration des plantes, leurs récolte, séchage et transformation primaire et terminant par des exposés sur la culture de cellules et tissus.

Les méthodes d'extraction et de séparation des principes actifs des plantes en vue de leur transformation industrielle y inclus l'élaboration d'études pour une installation industrielle et le fonctionnement de celle-ci forment la troisième partie.

La dernière partie groupe les exposés sur les contrôles pharmacognostique, phytochimique et pharmacologique des plantes médicinales ainsi que des produits pharmaceutiques obtenus à partir des plantes médicinales.

Les 32 conférences réunies dans le présent volume représentent les textes exposés par les conférenciers; elles peuvent

comporter certaines répétitions, n'ont, forcément, pas de liaison de succession entre elles et le volume dans son ensemble ne saurait être conçu comme un manuel intégré en la matière.

Il pourra, par conséquent, être complété et amélioré dans une prochaine réédition. Ce sera le résultat des éditions prochaines du programme et des observations que les participants à ce programme et les lecteurs voudraient bien faire.

A l'occasion de la publication, nous nous faisons un devoir d'exprimer nos remerciements à tous ceux qui ont oeuvré pour qu'il puisse paraître: à la Section des industries pharmaceutiques de l'ONUDI et tout spécialement à Mme A. Tcheknavorian-Asenbauer et à M. R.C.B. Wijesekera, à la Section de perfectionnement que dirige Mme I. Lorenzo, aux dirigeants de différentes facultés de pharmacie, d'instituts de recherches, d'entreprises agricoles et industrielles de Roumanie, ainsi qu'aux conférenciers eux-mêmes qui, sans ménager leurs efforts, se sont appliqués à transmettre aux participants au programme de formation leurs connaissances et leur expérience.

Ion Marinescu,

Directeur de l'Office de Bucarest
du Centre commun ONUDI-Roumanie

S O M M A I R E

1) L'importance thérapeutique des plantes médicinales et de leurs principes actifs - CORNELIU BALOESCU	1
2) Problèmes de perspective dans le domaine des plantes médicinales - GABRIEL RÁCZ	12
3) Les bases biogénétiques de la formation des principes actifs dans les plantes - EMANOIL GRIGORESCU	23
4) Introduction de nouveaux médicaments d'origine végétale en thérapeutique - CORNELIU BALOESCU	41
5) Inventaire économique et cartographie des plantes médicinales dans une zone géographique - OVIDIU BOJOR	44
6) Cueillette, dessiccation, conditionnement primaire et conservation des plantes médicinales: Techniques et aspects économiques - MIRCEA ALEXAN	62
7) Principes fondamentaux pour établir et appliquer les technologies de culture aux plantes médicinales et aromatiques - FLORENTIN CRACIUN, CONSTANTIN DUMITRESCU	86
8) Méthodes de culture des plantes médicinales et aromatiques - EMIL PAUN, ȘTEFANIA MALE, MARIA MIRCEA	114
9) Amélioration et production des semences pour plantes médicinales et aromatiques - ANELA DUMITRESCU, AUREL MIHALEA, EMIL PAUN	144
10) Cultures de cellules et de tissus végétaux. I. Les techniques - BRÎNDUȘA TESIO	174
11) Cultures de cellules et de tissus végétaux. II. Aspects pratiques - BRÎNDUȘA TESIO, ELENA BADEA	195
12) Méthodes d'extraction solide-liquide pour l'obtention des principes actifs de plantes médicinales - VALENTIN MĂȘCOV	221
13) L'extraction liquide-liquide - VILA ȘTEFAN	250

- 14) Utilisation de la chromatographie sur colonne pour isoler les substances actives des plantes médicinales - VALENTINA CRISTEA 270
- 15) La séparation et l'isolation de substances naturelles à l'aide d'échangeurs d'ions - GABRIELA PINTILIE 289
- 16) Obtention à l'échelle industrielle des teintures, extraits et autres composants intermédiaires - ADRIAN IUGANU 308
- 17) Préparation de poudres actives solubles à partir d'extraits végétaux - ILEANA POPESCU 320
- 18) Alcaloïdes dérivant du tropane - CONSTANȚA RIZESCU 337
- 19) Claviceps purpurea, matière première pour obtenir des alcaloïdes naturels et de semi-synthèse. Valorisation thérapeutique - LELLYA ROȘCA, VALENTIN MĂȘCOV, ECATERINA NICHIFORESCU 353
- 20) Les stéroïdes végétaux - source de matières premières pour la semi-synthèse des hormones stéroïdiques - LUDMILA POPA 378
- 21) Pseudoguaïanolides des plantes - COSTIN ȘTEFANESCU 407
- 22) Mise en valeur à l'échelle industrielle des plantes médicinales - ADRIAN IUGANU, OCTAVIAN CONTZ 427
- 23) Considérations sur l'élaboration de l'étude pour une installation-pilote d'extraction et de séparation des produits dérivés des plantes médicinales - CONSTANTIN TURBATU, MIHAIL DIACONESCU 437
- 24) Considérations concernant une installation pour l'extraction d'huiles essentielles - GHEORGHE RADOIAȘ, TRAIAN CADARIU 458
- 25) Méthodologie d'analyse des produits végétaux - IOAN CIULEI 481
- 26) Identification des produits végétaux médicinaux - ELENA TARPO 517
- 27) Dosage des alcaloïdes de Secale cornutum, le sclérote du Claviceps purpurea - SILVIA GRUIA 533

- 28) Dosage des polyphénols présents dans les feuilles
d'artichaut (Cynara scolymus L.) - ELENA TARPO,
VENERA POPESCU 541
- 29) Contrôle analytique des hétérosides digitaliques -
VASILE CALCANDI 549
- 30) Contrôle phytobiologique de l'activité des
cytostatiques alkylants (radiomimétiques) et
des antifusoriaux - DUMITRU GRIGORE CONSTANTINESCU 558
- 31) Le screening pharmacologique - SAVA DUMITRESCU 582
- 32) Méthodes utilisées pour l'étude pharmacologique
des médicaments - ALINA MANOLESCU 597

PART I

L'IMPORTANCE THERAPEUTIQUE DES PLANTES
MEDICINALES ET DE LEURS PRINCIPES ACTIFS

Corneliu Baloescu +)

+) Docteur en Pharmacie, professeur à la Faculté de Pharmacie,
Directeur de l'Institut pour le Contrôle d'Etat des Médica-
ments et de Recherches Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

L'utilisation des plantes ou d'autres remèdes naturels, à des fins thérapeutiques, remonte à la préhistoire. Transmis d'une génération à l'autre, l'art de guérir les maladies à l'aide de plantes est consigné depuis l'époque des premiers documents écrits, chez les Sumériens, les Babyloniens, les Egyptiens et les Chinois. Ceux-ci nous ont laissé leur expérience concernant l'utilisation des plantes dans les affections les plus variées (2,3,7).

Lorsque Hippocrate, considéré comme le père de la médecine, disait, il y a 2 300 ans, que "la nécessité a appris à l'homme l'art de guérir les maladies", il pensait surtout à l'utilisation des plantes dans ce but.

Dans l'antiquité, aussi bien la médecine qui se trouvait sous des influences mystico-religieuses que la thérapeutique, accompagnée d'incantations, de prières et d'hymnes adressés aux divinités, étaient pratiquées par le même individu, le guérisseur, qui occupait une importante fonction sociale. La médecine elle-même a été divinisée, par Esculape ou Asclépios, sous la forme d'une figure mystérieuse, le serpent, qui représente aujourd'hui encore l'emblème de la médecine et de la pharmacie, symbolisant la prudence et la vigilance.

Des dizaines de milliers d'espèces végétales qui peuplent la terre, l'instinct, l'intelligence et l'expérience de l'homme lui ont appris à choisir les plantes les plus indiquées à combattre certaines maladies ou à combiner d'une manière heureuse les espèces dont l'action est apparentée.

Grâce aux données écrites remontant à la plus haute antiquité nous connaissons aujourd'hui des centaines d'espèces végétales qui justifient pleinement leur action thérapeutique.

Ainsi, à la suite de fouilles archéologiques en Mésopotamie, on a trouvé 22.000 tablettes d'argile, vieilles de plus de 4.000 ans, dont 33 représentent un véritable dictionnaire de plantes médicinales. L'existence d'un jardin de plantes médicinales à Minive, capitale de l'Assyrie, témoigne également de l'importance qu'on y attachait aux remèdes d'origine végétale.

Les papyrus égyptiens, vieux de milliers d'années - dont celui trouvé à Ebers datant de l'an 1550 avant notre ère décrit 200 espèces végétales - démontrent également que les plantes

étaient largement utilisées à des fins curatives.

La médecine grecque qui utilisait elle aussi les plantes médicinales vendues par des marchands ambulants, appelés "farmacopoli", a beaucoup influencé la médecine pratiquée par les Romains. C'est ainsi que Pline l'Ancien, dans son "Historia naturalis", mentionne certains produits végétaux et animaux, utilisés comme remèdes.

Selon certains documents, les Arabes sont les premiers à s'être occupés des préparations pharmaceutiques à base de plantes: pilules, sirops, cataplasmes, eaux aromatiques et bien d'autres qui sont employées de nos jours encore.

Un monumental ouvrage chinois, "Pentsao-Kangmu" de l'an 2700 avant notre ère cite plus de 1000 espèces végétales utilisées dans le traitement de diverses maladies.

Vers l'année 3000 avant notre ère l'empereur chinois Sen Nung s'attaquait au problème des plantes médicinales, ce qui lui a valu la réputation de fondateur de la médecine chinoise. C'est toujours en Chine qu'on a découvert un livre écrit il y a 2600 ans avant notre ère et qui porte sur l'utilisation des plantes médicinales à de fins thérapeutiques.

En Europe, où à travers les siècles l'arsenal thérapeutique s'est continuellement enrichi de produits végétaux, exotiques pour la plupart, venant d'Afrique, d'Inde ou d'Amérique, les guérisseurs tout d'abord et puis les médecins se sont surtout préoccupés de trouver de bons remèdes d'origine végétale et moins de connaître les facteurs responsables de leur action thérapeutique.

Au Moyen Age, les alchimistes, ces "philosophes du feu", ont introduit dans la thérapeutique les eaux aromatiques et les huiles essentielles obtenues des plantes aromatiques.

Au début du XVI-ème siècle, le Suisse Paracelse, médecin et alchimiste à la fois, abordant le problème des facteurs responsables de l'action thérapeutique des plantes médicinales, arrivait à la conclusion que chaque espèce doit ses vertus à l'existence, dans son corps, d'une âme, d'un secret (arcanum) qu'il a nommé par un terme général la "quinta essentia". Il attribue à cette quintessence des plantes une origine matérielle,

car elle pouvait être extraite des plantes à l'aide de l'alcool; de cette manière, il jetait les bases scientifiques de l'emploi, en médecine, des extraits et des teintures préparés à base d'alcool. S'inspirant de certaines conceptions grecques, Paracelse soutenait qu'à chaque maladie correspondait dans la nature un remède distinct dont les caractéristiques permettraient à l'homme de le reconnaître aisément. Selon sa conception, l'aspect, la couleur, le goût et l'odeur des plantes indiquent leurs propriétés médicinales. Ainsi, Chelidonium majus, grâce au suc jaune qu'elle contient et qui ressemble par sa couleur à la bile, était un remède dans les affections hépatiques; Pulmonaria officinalis, à cause de ses feuilles tachées de blanc et ressemblant au tissu pulmonaire, donnerait de bons résultats dans les maladies du poumon, alors que les capsules de pavot (Papaver somniferum), qui ont la forme d'une tête humaine, pourraient calmer les migraines. Cette conception de Paracelse concernant la ressemblance entre une plante, ou un organe de plante, avec un organe humain malade est connue dans l'histoire de la science sous le nom de "signatura".

A la fin du XVIII-ème siècle, le suédois Scheele, pharmacien et chimiste, obtenait - en chauffant dans certaines conditions les plantes ou leurs produits - les premiers acides organiques à l'état cristallisé: les acides oxalique, tartrique et benzoïque.

Les résultats obtenus par Scheele ont ouvert la voie aux recherches effectuées au début du XIX-ème siècle et par la suite, recherches qui ont montré et qui montrent encore, d'une façon convaincante, que ce n'est pas à des forces divines, à leurs forme, couleur, goût ou odeur que les plantes doivent leur activité thérapeutique, mais à des produits chimiques élaborés par la cellule végétale; ces produits ont des actions précises, spécifiques, sur l'organisme humain et sont connus sous le nom de principes actifs végétaux.

Une phase vraiment nouvelle de la chimie végétale - la phytochimie - débute en 1806, lorsque le pharmacien belge Sertürner isole, pour la première fois, l'alcaloïde appelé morphine du latex du pavot.

Nous pensons qu'il est utile de préciser que les recherches dans cette direction prirent un grand essor au XIXe siècle grâce aux remarquables études faites par le grand savant français Claude Bernard, qui a initié et développé les expérimentations sur des animaux vivants. Ceci a permis depuis, et permet encore à présent, de vérifier l'action de nombreuses plantes employées longtemps dans la médecine populaire et de découvrir de nouvelles plantes ayant des propriétés thérapeutiques.

Parallèlement à la séparation des principes actifs des plantes, les hommes de science ont réussi également à établir leur structure chimique et à démontrer que cette structure diffère et varie avec l'activité thérapeutique.

Il n'y a pas de doute que la découverte de nouvelles méthodes d'investigation scientifique, au cours des dernières décennies, à savoir la chromatographie dans toutes ses variantes, l'extraction liquide-liquide, les échangeurs d'ions, la spectroscopie de masse, etc., méthodes beaucoup plus précises, plus sensibles, plus sélectives et, parfois, plus rapides, a représenté, et représente encore, l'un des facteurs les plus décisifs dans la réussite de ces réalisations. On peut affirmer à juste titre que sans la chromatographie sur colonne, il aurait été impossible de séparer les alcaloïdes des espèces de Rauwolfia ou de Voacanga, les glycosides cardiotoniques de Scilla maritima, etc., et que sans la chromatographie sur papier, la composition des feuilles des diverses espèces de Digitalis serait encore inconnue.

La découverte des réactions microbiennes à action sélective, appliquées à l'échelle industrielle dans la semi-synthèse des hormones sexuelles et des corticostéroïdes en partant des saponines stéroliques et des glycoalcaloïdes, aussi bien que la semi-synthèse de l'éphédrine à partir du benzaldéhyde, ont donné une grande impulsion aux recherches de phytochimie dans ce domaine également.

En effet, les études faites pendant les toutes dernières années ont montré que de nombreux microorganismes sont capables - par leurs systèmes enzymatiques - de catalyser sélectivement et quantitativement, très vite, les réactions d'oxydo-réduction, de méthylation, d'estérification, d'amination, de désamination, etc.

En dehors des saponines stéroliques et des glycoalcaloïdes, ces réactions sont expérimentées à présent également sur des cardenolides, des bufanolides, des terpènes, des phénols, des alcaloïdes (colchicine) etc., dans le but d'obtenir de nouveaux produits à action thérapeutique ou pour diminuer les effets toxiques et renforcer les effets curatifs.

Il semble que dans un avenir proche la synthèse micro-biologique prendra, en bonne partie, la place de la synthèse chimique, beaucoup trop coûteuse pour une série de médicaments.

L'élaboration récente de certains procédés industriels de cultures de cellules des plantes supérieures, tout comme on cultive certains micro-organismes pour en obtenir surtout des antibiotiques, a permis aux spécialistes d'étudier, avec des résultats positifs, la biogenèse des alcaloïdes à noyau tropanique. Avec la même méthode on a pu apporter des précisions sur les processus biogénétiques de quelques sapogénines stéroliques.

Le développement rapide au cours des dernières décennies, de l'industrie de synthèse chimique a fait orienter les recherches de nouveaux médicaments vers leur obtention par la voie de la synthèse chimique.

D'importants médicaments, tels que glycosides cardiotoniques, certains alcaloïdes et antibiotiques, vitamines, etc. n'ont toutefois pu être reproduits par la chimie de synthèse, étant toujours obtenus par voie extractive ou fermentative à partir du règne végétal.

A présent, plus d'un tiers des médicaments utilisés en thérapeutique moderne est d'origine végétale et le nombre des produits ayant dans leur composition des principes actifs provenant des plantes, aux côtés des produits de synthèse, est encore plus grand, étant le résultat de l'intensification, au niveau mondial, des recherches dans ce domaine.

La recherche et la mise en valeur des plantes médicinales ont connu au cours des deux dernières décennies, un développement remarquable dans beaucoup de pays, tels que R.F. d'Allemagne, Suisse, France, URSS, Bulgarie, Pologne.

Beaucoup de produits médicamenteux utilisés dans le passé ont complètement disparu, leur nom se trouvant seulement dans les

documents de l'époque; d'autres produits ont apparu récemment, comme résultats des travaux de recherche. Ce qui est intéressant c'est qu'une partie des remèdes tombés en désuétude ont été réconsidérés grâce à la découverte de nouvelles qualités qu'ils renfermaient. Parmi ceux-ci une place importante est occupée par les plantes (1,4,5,6).

Au commencement il n'y avait pas de critères de sélection des plantes utilisées à guérir certaines maladies; c'est pourquoi beaucoup d'entre elles ne possédaient aucune action et leur élimination de la thérapie a été la conclusion logique d'une longue pratique médicale.

Pour nous, sont importantes les plantes qui ont résisté au temps et aux divers essais prouvant leurs qualités thérapeutiques.

Les principes actifs obtenus à l'état pur par synthèse ne présentaient pas la même action que l'extrait de plante. Cela veut dire que dans les plantes les différentes principes actifs se trouvent inclus dans des complexes biologiques actifs, à côté d'autres substances avec lesquelles ils établissent une action synergique. Par conséquent, d'autres études ont été faites pour établir les constituents des drogues dont il faut tenir compte dans l'élaboration des formes pharmaceutiques.

Pour ces raisons, les extraits totaux des plantes sont utilisés comme tels ou associés à d'autres extraits de plantes. Nous mentionnons qu'on peut obtenir, par exemple, des sédatifs de bonne qualité en utilisant les extraits de Humulus lupulus, Arnica montana, Crataegus monogyna, Valeriana officinalis, Melissa off. etc. Ces extraits entrent dans la composition de nombreuses spécialités roumaines ou étrangères.

Dans la composition de nombreux diurétiques entrent des extraits de Herniaria glabra, Ononis spinosa, Chelidonium majus, Betula verrucosa, Adonis vernalis, Juniperus communis, etc.

Pour les affections hépatiques et en vue de leurs activités antispasmodique, cholérétique et cholagogue, on prépare à présent plusieurs produits pharmaceutiques en y incluant des extraits de Chelidonium majus, Berberis vulgaris, Matricaria chamomilla, Gentiana sp., Artemisia absinthium, Achillea millefolium, Mentha piperita, Lavandula vera, etc.

Pour ses propriétés spasmolytiques, désinfectantes et épithélisantes on emploie sur une grande échelle la forme hydro-soluble de l'azulène (1,4-diméthyl-7-isopropyl-azulène), surtout dans l'ulcère gastrique et duodéal. Dans la même affection on utilise l'extrait de Glycyrrhiza glabra.

A présent, le nombre des sédatifs utilisés dans le monde dans les dystonies végétatives, qui ont à leur base des alcaloïdes de l'ergot de seigle, d'Atropa belladonna, des extraits de Humulus lupulus, Valeriana off., etc., en association avec des dérivés barbituriques ou d'autres produits de synthèse, est très grand.

Dans la composition de nombreux produits pharmaceutiques utilisés contre la migraine et la céphalée entrent des alcaloïdes naturels, extraits de l'ergot de seigle, particulièrement l'ergotamine, associée à la caféine ou à d'autres produits de synthèse.

La morphine et les autres alcaloïdes de l'opium ont à présent une utilisation thérapeutique plus restreinte que dans le passé; on a obtenu des dérivés de semi-synthèse à partir de la morphine, comme l'acétyldihydrocodéine, qui a une action quatre fois plus puissante que la codéine et, de plus, elle est dépourvue d'action constipante.

Les dérivés dihydrogénés de l'ergot de seigle et certains produits de semi-synthèse, ayant à leur base l'acide lysergique, ont acquis, pendant la dernière décennie, une plus large application thérapeutique. Parmi ceux-là une série de dérivés, comme le méthanesulfonate ou l'étanesulfonate d'ergotamine, le méthanesulfonate de dihydroergotamine, le dihydroergocornine-ergocryptine et l'ergocristine sont utilisés dans un grand nombre de préparations pharmaceutiques.

En Roumanie, les plantes médicinales sont connues depuis très longtemps, car nous avons une longue tradition dans l'emploi des plantes médicinales, qui remonte aux Daco-Gètes qui peuplaient le territoire de la Roumanie il y a des milliers d'années.

Se référant à des données certaines, le médecin grec Dioscoridès (I siècle avant notre ère), dans son ouvrage célèbre, "Materia medica", signalait une série de plantes utilisées sur le territoire de la Dacie. Hérodote mentionnait les fumigations

de chanvre des Géo-Daces pour calmer les douleurs et provoquer le sommeil.

Des documents du XIII^e siècle montrent qu'à cette époque les barbiers traitaient les malades avec des plantes.

En 1578 apparaît à Cluj l'un des premiers livres sur les plantes médicinales, appelé "Herbarium".

De nombreux documents ultérieurs attestent l'utilisation des plantes médicinales, dans toutes les régions de la Roumanie, comme principaux remèdes dans le traitement des maladies. En effet, les conditions géographiques, climatiques et de relief y ont favorisé l'apparition d'une végétation très riche et variée.

En Roumanie, particulièrement pendant les deux dernières décennies, on a enregistré des progrès remarquables dans l'obtention de médicaments à partir des plantes, tenant compte de l'existence d'importantes sources de matière première végétale dans la flore spontanée et de grandes possibilités de culture des plantes médicinales.

A présent, les recherches scientifiques destinées à mettre en valeur ce trésor thérapeutique que nous possédons sont effectuées par plusieurs équipes de spécialistes.

Dans le domaine des glycosides cardiotoniques obtenus des espèces Digitalis lanata L. et Digitalis purpurea L., des contributions importantes ont été apportées à l'élucidation de la composition chimique de 14 unités systématiques, dont plusieurs n'avaient été étudiées nulle part dans le monde. L'industrie pharmaceutique roumaine a fait valoir cette matière première en préparant des produits très appréciés partout dans le monde: digitoxine, digoxine, lanatoside C, acétyldigitoxine.

Les semences de Colchicum autumnale ont servi à préparer la colchicine, un alcaloïde qui se trouve à la base de médicaments antigoutteux. On a également obtenu un extrait total d'oxyméthylantraquinones des racines de Rumex alpinus, plante très répandue dans la flore spontanée des montagnes de la Roumanie; l'extrait a une action laxativo-purgative, le produit étant bien toléré par l'organisme.

De Herba Sarothamni, obtenue de Sarothamnus scoparius, on

a préparé, par un procédé original, la spartéine sous forme de sulfate.

La rutine a été isolée à de bons rendements de Sophora japonica.

Des semences d'Aesculus hippocastanum on a obtenu un extrait total triterpénique saponinique, qui représente la matière première pour obtenir des produits pharmaceutiques utilisés dans le traitement des varices.

Des fruits d'Anni visnoga, espèce originaire d'Afrique du Nord et acclimatée en Roumanie, on a isolé la khelline, substance qui exerce une forte action antispastique sur les muscles lisses, les bronches et les artères coronaires.

Les études effectuées sur les polyphénols isolés des feuilles de Cynara scolymus ont démontré la présence de la cynarine, de l'acide caféique, de l'acide chlorogénique et de six flavonoïdes, principes actifs présents dans le produit roumain Anghirol, utilisé dans certaines affections hépatiques.

Des fleurs de Tagetes patula, plante qui embellit les parcs et les jardins des villes et des villages, on a isolé l'héliénène, substance très utile pour améliorer l'adaptation de l'oeil à l'obscurité et l'héméralopie aiguë.

Un progrès remarquable a été obtenu en ennoblissant les souches de Claviceps purpurea et en créant des souches avec des groupes spéciaux d'alcaloïdes du type ergotoxinique et ergotaminique, qui ont une large application en obstétrique et certaines maladies de la circulation. Ces souches permettent de diriger la production et présentent un avantage particulier dans l'extraction des alcaloïdes purs. Ceci a déterminé une équipe de chercheurs à mettre au point l'extraction de l'ergotamine et de l'ergotoxine.

Des études entreprises sur la composition chimique de Valeriana officinalis ont conduit à la découverte d'un nouvel alcaloïde, la valérianonine, qui semble être responsable de l'action sédative des produits pharmaceutiques à base de valériane.

De l'écorce de l'arbuste Rhamnus frangula on a obtenu un extrait total d'oxyméthylanthraquinones, produit à action laxative

et purgative.

On a également mis au point un procédé original pour obtenir l'extrait total d'anthocyanes des fruits de Vaccinium myrtillus. plante qui pousse abondamment dans les régions montagneuses.

Des semences de Silybum marianum on a isolé - par un procédé original - la silimarine, un mélange de flavonoïdes utilisé avec de bons résultats dans les affections hépatiques.

Malgré le développement qu'a connu ces dernières années l'industrie de médicaments de synthèse, les produits d'origine végétale occupent une place très importante dans la thérapeutique moderne.

Les principes actifs des plantes médicinales présentent l'avantage d'être mieux tolérés par l'organisme humain; ils ont constitué et constitueront le modèle et la base matérielle de la synthèse d'un grand nombre de médicaments.

Si l'on ajoute que leur transformation en produits semi-fabriqués et/ou finis représente une source de nouveaux médicaments, la tendance nouvelle sur le plan mondial d'élargir les recherches dans ce domaine est normale et vise à mettre mieux en valeur les plantes médicinales.

B I B L I O G R A P H I E

1. Benigni R., Capra C., Cattorini P.E. (1964) - Piante medicinali - Chimica, Farmacologia e Terapia. Ed. Invernizzi e Della Boffa, Milano
2. Ciulei I., Sommer Lia, Istudor Viorica (1979) - Farmacognozie, Institut de Médecine et Pharmacie, Bucarest
3. Cucu Viorica (1978) - Farmacognozie, Institut de Médecine et Pharmacie, Cluj-Napoca
4. Frerichs G., Arends G., Zörnig H. (1930) - Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Ed. Springer, Berlin
5. Hegnauer R. (1973) - Chemotaxonomie der Pflanzen, Ed. Birkhäuser, Basel und Stuttgart
6. Madaus G. (1938) - Lehrbuch der biologischen Heilmittel. Ed. Georg Thieme, Leipzig
7. Planchon L., Bretin Ph. (1946) - Précis de matière médicale. Ed. Maloine, Paris

PROBLEMES DE PERSPECTIVE
DANS LE DOMAINE DES PLANTES MEDICINALES

Gabriel Rácz⁺)

⁺) Professeur Docteur, Faculté de Pharmacie de l'Institut
de Médecine et Pharmacie, Tîrgu Mureş, Roumanie

Le rôle de l'alimentation dans l'interdépendance de l'état de santé de la population et du milieu environnant est bien connu (1). Les plantes utilisées en tant qu'agents thérapeutiques ont un rôle bien défini dans l'écologie humaine. L'importance écologique de l'apport des substances végétales, intéressantes du point de vue thérapeutique, devrait être étudiée et pourrait même jeter les bases d'une nouvelle vision biologique dans l'analyse des écosystèmes humains.

I. TENDANCES DE L'EVOLUTION EN PHYTOTHERAPIE

L'utilisation des plantes médicinales a accompagné toute l'évolution de l'homme, jouant un rôle prépondérant et ininterrompu en ethnoïatrie, en médecine populaire, et un rôle bien défini, de même presque permanent, dans la médecine enseignée à la faculté. En Antiquité, le nombre des espèces considérées comme ayant des vertus curatives était de 300 à 600 en Europe, chiffre qui a augmenté continuellement, dans la mesure où les connaissances géographiques et les échanges commerciaux ont élargi l'horizon initial. Au Moyen Age, le nombre des espèces de plantes médicinales (environ 1500) a atteint son apogée, ce nombre restant presque le même jusqu'au milieu du XIX^e siècle.

L'apparition et le développement de l'industrie chimique a apporté les plus profondes transformations dans la thérapeutique médicamenteuse. On a introduit des substances médicamenteuses entièrement nouvelles, représentées par des molécules étrangères aux structures des organismes vivants, inconnues dans la nature. Depuis un peu plus de cent ans et d'une manière plus prononcée depuis les débuts du XX^e siècle, l'organisme humain a été de plus en plus envahi par des molécules étrangères, représentant souvent de véritables chocs pour la matière vivante, qui ne disposait pas toujours des enzymes nécessaires à métaboliser (transformer, décomposer, éliminer) ces substances. Ces molécules se caractérisent par une action prompte, énergique, mais - à peu d'exceptions près -

aux conséquences indésirables. La puissance de l'action étant le critérium majeur de sélection de toutes les substances synthétisées on a choisi les plus actives.

Les conséquences négatives ont pu être prévues et ont conduit à l'adoption de quelques mesures de précaution: limitation de la durée du traitement, précision des contre-indications. Toujours plus fréquemment les conséquences indésirables sont devenues imprévisibles et ont réclamé l'institution de réseaux de pharmaco-vigilance dans le monde entier. Par la force des circonstances, pour la plupart des médicaments introduits en thérapeutique au cours des deux dernières décennies, on a observé des réactions adverses sur la génération actuelle; les éventuelles répercussions sur le génome, sur les descendants, ne peuvent être prévues, car elles ne sont que partiellement concluantes lorsqu'elles se rapportent à l'homme (13). Même si tous les médicaments nouveaux introduits en thérapeutique sont obligatoirement testés pour un éventuel effet tératogène, cette mesure ne représente pas une garantie absolue que la substance en question n'a d'effet mutagène sur les descendants, surtout quand les deux parents ont suivi le traitement en cause.

Simultanément avec l'utilisation de plus en plus large de médicaments basés sur des structures étrangères au métabolisme des êtres, mais pourvus d'une action puissante, le nombre des anciens médicaments fabriqués à partir de matières premières végétales et, les plus souvent, à l'action plus douce a commencé à baisser. Les produits qui ont gardé encore toute leur importance ont été ceux qui avaient une action énergique qui s'installait vite, comme, par exemple, la plupart des alcaloïdes, les glycosides cardiotoniques, etc. En définitive, le changement radical, survenu dans la période 1870-1970, peut se caractériser par deux éléments diamétralement opposés:

1. d'une part, l'emploi généralisé à des fins thérapeutiques de substances inexistantes dans la nature;
2. d'autre part, la diminution de l'apport de molécules naturelles.

Dans les deux cas il s'agit de relations écologiques, de modifications survenues dans l'interdépendance homme-milieu.

L'introduction en thérapeutique de nouveaux médicaments dans le sens de structures moléculaires différentes par rapport aux structures connues antérieurement, a commencé à baisser dans la 7ème décennie du XX^e siècle. Si dans les années 1960 et 1971 on a introduit en thérapeutique sur le plan mondial 93 et, respectivement 90 substances nouvelles, en 1977 le chiffre a baissé à 61 (20). Aujourd'hui, à l'échelle mondiale, une seule substance sur 8000 nouveaux produits, obtenus par synthèse, a la chance de devenir un médicament. Il faut préciser qu'il ne s'agit pas de molécules synthétisées au hasard, mais de structures qu'on suppose être biologiquement actives et relativement peu nocives.

De même que l'introduction sur une large échelle de médicaments ayant des structures différentes des substances naturelles, mais très actifs, a conduit à une baisse du poids des médicaments d'origine végétale, ces dernières années le ralentissement du rythme d'introduction en thérapeutique de molécules nouvelles a eu pour conséquence une hausse dans l'appréciation des médicaments naturels. Dans la plupart des groupes de produits naturels, le nombre de substances connues dans la période 1960-1980 est de 5 à 30 fois plus grand rapporté au nombre total des substances décrites jusqu'alors (3). Des résultats remarquables ont été également obtenus ces deux dernières décennies dans l'appréciation de la valeur systématique des produits chimiques, la chémotaxonomie devenant un domaine prioritaire de recherche à la frontière des deux préoccupations: botaniques et chimiques (2). Mais, ainsi que nous avons montré lors de l'introduction de la notion de "Pharmacotaxonomie" (12), la position taxonomique des plantes peut être mise en corrélation - par l'intermédiaire de la chémotaxonomie - avec la phytothérapeutique expérimentale.

L'orientation écologique dans la prospection thérapeutique est basée aussi sur une interrelation très claire entre l'homme et la biosphère.

II. PHENOMENES DE CARENCE

Depuis la fin du XIX^e siècle, respectivement depuis les premières décennies de notre siècle, on connaît la notion de "maladie de carence": des dérèglements survenus, dus à l'absence de certaines substances exogènes, qui ne peuvent se former dans l'organisme humain, substances appelées essentielles, car leur apport est indispensable. On connaît très bien le rôle de diverses substances minérales, des amino-acides essentiels, des acides gras essentiels, des structures chimiques les plus variées appartenant à la classe hétérogène des vitamines. En dépassant le domaine de l'alimentation, beaucoup de ces substances sont devenues des médicaments utilisés parfois non seulement pour assurer un apport physiologique, pour prévenir les carences, mais également pour leurs propriétés thérapeutiques qui dépassent le rôle proprement-dit des vitamines.

C'est un domaine de frontière entre le "physiologique" et le "pathologique", entre les deux catégories de substances exogènes: alimentaires et médicamenteuses. La limite en est difficile à préciser, à l'exception de quelques situations extrêmes. L'acide ascorbique (Vitamine C) est un exemple de substance naturelle essentielle, pour laquelle les phénomènes de carence sont bien connus. Dans le cas de la vitamine P, la situation est différente. Après sa découverte, en 1936, il y a eu de nombreuses controverses concernant la qualité de vitamine des flavonoïdes végétaux. Chez l'homme on n'a pu constater des phénomènes de carence, c'est-à-dire l'un des critères utilisés pour faire figurer une substance dans la catégorie des vitamines. L'action de certains médicaments basés sur ces substances peut être évaluée chez certains groupes de personnes, mais jamais chez ceux qui mangent régulièrement des fruits, surtout des agrumes, contenant de grandes quantités de ces substances. Dans la classe des flavonoïdes on a décrit plus de 30 actions bien définies. À une première vue il s'agit de trop d'actions pour qu'on leur accorde l'attention qu'elles méritent. En réalité, la classe des flavonoïdes comprend environ 1500 molécules (6), ce qui

signifie qu'ils n'ont pas une structure bien définie, mais qu'une série de structures similaires présentent ce nombre si grand d'actions. Le terme de "vitamine P" a été abandonné ou est encore employé en vertu de la tradition, les flavonoïdes biologiquement actifs étant appelés bioflavonoïdes. Parmi leurs actions les plus importantes citons l'action exercée par certaines proanthocyanidines sur le flux sanguin coronarien (13), qui est amélioré chez l'homme et chez l'animal d'expérience après l'administration de doses de quelques milligrammes; des surdosages de dizaines ou de centaines de fois supérieurs ne présentant quand même pas d'inconvénient (10).

Dans l'alimentation d'aujourd'hui l'apport en bioflavonoïdes est petit. L'utilisation de médicaments d'origine végétale à teneur titrée en proanthocyanidines présente quelques ressemblances avec le traitement des maladies de carence; ils apportent à l'organisme l'une des substances exogènes qui manquent, surtout lorsqu'il s'agit de facteurs de risque dans la pathologie cardiovasculaire. Non moins important est le rôle radioprotecteur ou de sensibilisation à l'action des radiations (7), dans le cas où l'intensité des radiations augmente (8).

L'acceptation de l'appellation de vitamine est encore controversée pour deux types de substances naturelles, les deux décrites dans les noyaux des amandiers, pêchers et abricotiers (14). Le nom de vitamine B₁₅ a été donné au pangamate de calcium, utilisé dans certains pays pour prévenir et traiter l'athérosclérose (9). Sous l'appellation de vitamine B₁₇, on a introduit en thérapeutique l'amygdalose, l'un des premiers glycosides connus, dont la structure a été élucidée par Liebig et Berzelius il y a 150 ans. Pendant les années '70, certains l'ont considéré être un agent cytostatique, supposition infirmée dans les modèles expérimentaux utilisés. On lui a encore attribué le nom de "facteur d'antimalignité", non pas dans le sens qu'il préviendrait la formation du néoplasme, mais qu'il ralentirait (voire même inhiberait) l'apparition des métastases. Le raisonnement qui a été à la base du

lancement de médicaments contenant de la vitamine B₁₇ mérite d'être pris en considération même dans la situation où sa valeur réelle paraît douteuse: chez les populations (tribus) qui consomment des aliments à base d'amygdaloside, de prunasine et d'autres glycosides cyanogéniques les tumeurs sont rares; les populations (tribus) où l'incidence du cancer augmente ont consommé elles aussi dans le passé des produits riches en ces substances, mais les ont presque abandonnées au cours des dernières décennies.

Un raisonnement similaire a été à la base de l'introduction en thérapeutique de certains produits végétaux dans le traitement de l'adénome de prostate. Dans les régions où la consommation des semences de citrouille représente une habitude très répandue, cette maladie apparaît rarement. Après l'observation de cette relation, peut-être illusoire, on a introduit en thérapeutique des produits obtenus des semences de citrouille (16). Récemment on a communiqué des résultats cliniques significatifs (4) chez les malades traités à une stérine végétale (un phytostérol), substance largement répandue dans la nature, s'accumulant surtout dans les semences oléagineuses.

Les exemples donnés présentent moins d'intérêt que les relations écologiques qui se trouvent à la base du raisonnement. Ces exemples peuvent être complétés avec d'autres se référant aux éléments minéraux, tenant compte de la capacité (caractéristique) des différentes espèces de plantes d'accumuler des quantités très diverses de substances inorganiques, même dans des conditions écologiques similaires (11) et ayant en vue leur rôle biochimique (5) et physiologique (17).

III. PROGNOSE EN PHYTOTHERAPIE

L'orientation écologique en thérapeutique, basée sur les connaissances des dernières années et sur les tendances de l'évolution, permet de présenter quelques éléments de prognose:

- (a) La matière première végétale a le rôle d'assurer l'apport

de certaines molécules dont l'organisme humain a besoin et qui ne se trouvent pas en quantités satisfaisantes dans les aliments. C'est la catégorie des plantes utilisées depuis des millénaires, respectivement des molécules arrivées dans l'organisme par l'alimentation (produits végétaux, ou par l'intermédiaire d'aliments d'origine animale).

(b) Pour les plantes à forte action, il n'y a pas eu un apport continu de molécules responsables de l'action respective. Chez ces plantes, la valeur du principe thérapeutique actif ne peut être interprétée comme apport de substances nécessaires (plusieurs produits appartenant aux glycosides, saponines et alcaloïdes). Dans ce cas pourtant les structures ne sont pas complètement étrangères à l'organisme humain, qui entre en contact avec elles soit accidentellement - en doses sublétales - soit, en petites doses, par l'alimentation.

(c) Le médicament de l'avenir présentera certaines ressemblances avec l'aliment en ce qui concerne la régularité de son emploi et l'absence d'effets indésirables. Tout comme l'alimentation rationnelle tient compte de l'absence ou de la présence de certains produits, surtout de leur quantité, en thérapeutique on pourra diriger l'apport de substances nécessaires pour assurer les fonctions physiologiques et prévenir certains troubles.

(d) Le médicament végétal assurera un traitement dépourvu de risque (ou avec des risques minimaux) dans la vie intra-utérine et en pédiatrie. Le médicament végétal assurera aussi un traitement de longue durée dans diverses maladies chroniques qui deviennent fréquentes, parallèlement avec l'augmentation de la durée moyenne de vie.

(e) Afin d'assurer un apport de diverses molécules naturelles, il est nécessaire d'élargir l'utilisation des produits végétaux d'intérêt thérapeutique. Les espèces de plantes utilisées à présent (environ 200) quelque importantes ou appréciées qu'elles soient, ne comprennent pas toutes les substances nécessaires. Le tapis végétal a besoin d'être protégé en qualité de génofond, car il représente les ressources de l'avenir, beaucoup de leurs possibles valences thérapeutiques étant encore inconnues.

(f) Le nombre de substances chimiques isolées des plantes a augmenté d'une façon spectaculaire pendant les derniers 20 ans (15), (certains exemples sont donnés aux tableaux 1 et 2), mais la composition chimique des plantes est encore à élucider. Par rapport au nombre de produits connus et aux structures qui seront élucidées jusqu'à la fin du millénum, la connaissance des actions pharmaco-thérapeutiques et, en général, de la valeur biologique est restée en retard. Il va de soi qu'il faut continuer à élucider les structures chimiques des végétaux, mais particulièrement à rechercher systématiquement leur rôle biologique, en assurant ainsi l'enrichissement continu de leurs possibilités thérapeutiques.

Tableau 1

Nombre de terpenoïdes connus

Classe	Nombre de composants connus jusqu'en 1980
Monoterpènes (C ₁₀)	500
Sesquiterpènes (C ₁₅)	1200 ⁺)
Diterpènes (C ₂₀)	1000 ⁺⁺)
Sesterpènes (C ₂₅)	15
Triterpènes (C ₃₀)	750
Tétraterpènes (C ₄₀)	135
	<hr/>
	Total 3600
Dérivés terpénoïdiques	3400
	<hr/>
	Total général 12000 ⁺⁺⁺)

+) 18 fois plus nombreux qu'en 1960

++) 31 fois plus nombreux qu'en 1960

+++) 0,8% sont utilisés en thérapeutique

Tableau 2

Nombre de flavonoïdes connus

Classe	Nombre des composants connus en 1980
Anthocyanines	250
Calcones	60
Aurones	20
Flavones	350
Flavonols	350
Flavonones	150
Proanthocyanidines	50
Isoflavonoïdes	150
Biflavonoïdes	65
Total	1445 ^{+))}

+) 4,5 fois plus nombreux qu'en 1960; 2% sont utilisés en thérapeutique.

B I B L I O G R A P H I E

1. Barnea M. et collab. - Ecologie umană, Editura Medicală, București, 1979
2. Bendz G., Santesson J. - Chemistry in Botanical Classification. Nobel Foundation, Stockholm. Academic Press, New York and London, 1974
3. Devon T.K., Scott A.I. - Handbook of Naturally Occurring Compounds. Academic Press, New York and London, vol. I, 1975
4. Ebbinghaus K.D., Baur M.P. - Zeitschrift für Allgemeinmedizin, vol. 53, 1977, 1054
5. Eichhorn G.L. - Inorganic Biochemistry. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford and New York, 1975

6. Harborne J.B., Mabry T.J., Mabry H. - The Flavonoids. Chapman and Hall, London, 1975
7. Kabiev O.K., Balmuhanov S.B. - Prirodnye fenoly - perspektivnyi klass protivopuholevnyh i radiopotentsiiruch-tchik soedinenii. Meditsina, Moscou, 1975
8. Kamshilov M.M. - Evolution of the Biosphere. Mir Publishers, Moscou, 1976
9. Machkovski M.D. - Lekarstvennie sredstva. Meditsina, Moscou, 1977
10. Rácz-Kotilla E., Józsa J., Rácz G. - Note Botanice, vol. 15, 1979, 77
11. Rácz G., Bodon I., Tölgyessi G. - Herba Hungarica, vol. 17, 1978, 43
12. Rácz G., Rácz-Kotilla E., Józsa J. - Planta Medica, Abstracts International Meeting on Medicinal Plant Research, vol. 36, 1979, 259
13. Roddewig C., Hensel H. - Arzneim.-Forsch./Drug Res., vol. 27, 1977, 1407
14. Roth C. Die Naturstoffliste, ed. 7, Karlsruhe, 1977
15. Wagner H., Wolff P. (Ed.) - New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977
16. Weiss R.F. Lehrbuch der Phytotherapie. Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1974
17. + + + Les oligo-éléments en nutrition humaine. Rapport d'un Comité d'Experts de l'OMS. Rapp. tech. Genève, no.532, 1973
18. + + + Farmakoghenetika. Doklad nauchnoi gruppy BOZ. Seria tehn. dokl., Genève, no.524, 1975
19. + + + Farmacovigilența. Editura Medicală, Bucarest, 1979
20. + + + Pharma-Daten 1978. Frankfurt a.M., 1978

LES BASES BIOGENETIQUES DE LA FORMATION
DES PRINCIPES ACTIFS DANS LES PLANTES

Emanoil Grigorescu⁺)

⁺) Professeur, chef de la chaire de Pharmacognosie à la
Faculté de Pharmacie de l'Université de Jassy, Roumanie

Le problème de la biosynthèse des substances dotées d'action pharmacodynamique et se trouvant dans la composition de certaines drogues végétales a été évoqué dès la fin du siècle dernier par le père de la pharmacognosie moderne, Alfred Tschirch (59).

La formation de ces substances qui représentent les principes actifs des produits végétaux constitue, ces derniers temps, une préoccupation pour les spécialistes en pharmacognosie qui ont entrepris des études de phytochimie. Ces recherches partent de l'observation que les substances chimiques des plantes ont souvent une évolution assez compliquée.

La découverte de toutes les transformations qu'une substance active subit depuis son apparition dans le métabolisme de la plante et jusqu'à sa dégradation catabolique, donne des indications précieuses pour le côté pratique de la pharmacognosie.

La connaissance des voies de formation des principes actifs et des processus chimiques qui conduisent à leur dégradation dans le cadre du métabolisme de la plante donne la possibilité d'élaborer une méthodologie générale de traitement des plantes médicinales, afin d'obtenir des produits de qualité qui gardent intacte leur action pendant la conservation.

Les études de biochimie végétale effectuées ont réussi à montrer, avec assez de certitude, les voies de formation de plusieurs principes actifs ou groupes de principes actifs comme partie intégrante du métabolisme végétal.

Dans certains cas, on connaît les précurseurs biochimiques des substances que nous étudions, leur transformation dans des métabolites terminaux, avec toutes les étapes intermédiaires et les systèmes enzymatiques afférents, aussi bien que les mécanismes biochimiques auxquels ces substances participent. Dans d'autres cas, on connaît seulement quelques séquences métaboliques et alors, pour compléter le processus, on a recours à des explications hypothétiques. Il existe, enfin, quelques substances qui constituent des principes

actifs et dont nous ignorons encore le sort.

Néanmoins, le tableau général des liaisons biogénétiques naturelles entre les principes actifs et la marche de leur biosynthèse est, au moins pour les repères principaux, bien précisé.

La connaissance de tous ces aspects a une grande importance tant pour la base théorique de la pharmacognosie moderne que pour la pratique pharmacognostique.

Dans les pages qui suivent nous présentons schématiquement et d'une façon plus ou moins conventionnelle, le mode de formation des principaux principes actifs utilisés en thérapeutique.

+

+ +

L'origine de toutes les substances du monde végétal se trouve dans la synthèse primaire, la "photosynthèse", qui, avec l'aide de l'énergie solaire et de l'équipement enzymatique adéquat, transforme en substance organique le carbone, mis à la disposition sous forme de CO_2 . Nous nous référons seulement à l'assimilation chlorophyllienne, au mode de nutrition des plantes vertes, laissant de côté la chimiosynthèse, qui est limitée à quelques bactéries, ainsi que les plantes saprophytes, qui utilisent de la matière organique déjà préparée.

Les recherches des dernières années ont amené beaucoup de précisions à ce processus extrêmement compliqué et comprenant un grand nombre de phases qu'est la photosynthèse. Les vieilles conceptions ont été définitivement infirmées, on a défini les plus importantes réactions chimiques qui y ont lieu, mais on discute encore sur les mécanismes de transport électronique et d'énergie (60).

Une série de principes actifs formés d'oses simples, d'osides ayant un degré réduit de polymérisation, de polyholosides comme l'amidon, l'inuline, ou de polyuronides comme les gommes, les mucilages, les pectines, sont formés dans les plantes par cette voie. Schématiquement, ces inter-

dépendances biogénétiques sont présentées en figure 1 (15).

L'un des intermédiaires les plus importants dans le cycle de la photosynthèse est l'acide pyruvique, sous sa forme énolique. Celui-ci résulte d'une chaîne de réactions dans lesquelles, par plusieurs phases intermédiaires et à l'aide des liaisons phosphoriques macroergiques, l'acide glycérique phosphorilé passe en acide pyruvique et ensuite en acide phosphoénol-pyruvique.

Par sa condensation avec une molécule de d-érythrose-4-phosphate, prend naissance un produit à sept atomes de carbone, à savoir l'acide 2-céto-3-désoxy-D-araboheptan-7-phosphorique, qui joue un rôle particulier dans la biosynthèse des composés aromatiques. Il a la faculté de cycliser et de former un cycle à six atomes, précurseur de nombreuses substances à structure aromatique (50): l'acide shikimique.

Cet acide, en se couplant avec une autre molécule d'acide pyruvique et après une série de réactions d'oxydo-réduction et de transamination mène à la formation de la phénylalanine, le premier corps à structure aromatique, résultat de cette lignée de métabolisme, comme en voit en figure 2.

D'autre part, la phénylalanine, par ses neuf atomes de carbone, est un dérivé du phénylpropane, une unité biogénétique C_6-C_3 , structure fréquemment rencontrée dans les composants chimiques des organismes végétaux, dont plusieurs représentent de valeureux principes actifs (les acides p-coumarique, coféique et sinapique, les tannins galliques, la cinnarine, les acides lichéniques etc.).

Dans une autre lignée de métabolisme, l'unité phénylpropane sous forme de phénylalanine, ou même de thyrosine peut conduire à la fermeture d'un cycle pyranique, voie par laquelle prennent naissance toutes les coumarines (53). Le cycle se ferme par l'intermédiaire de l'acide O-oxy-coumarique glycosidé.

On a découvert dernièrement que les coumarines ont d'importantes propriétés thérapeutiques, surtout antispasmodiques, anticoagulantes, analgésiques; elles sont des

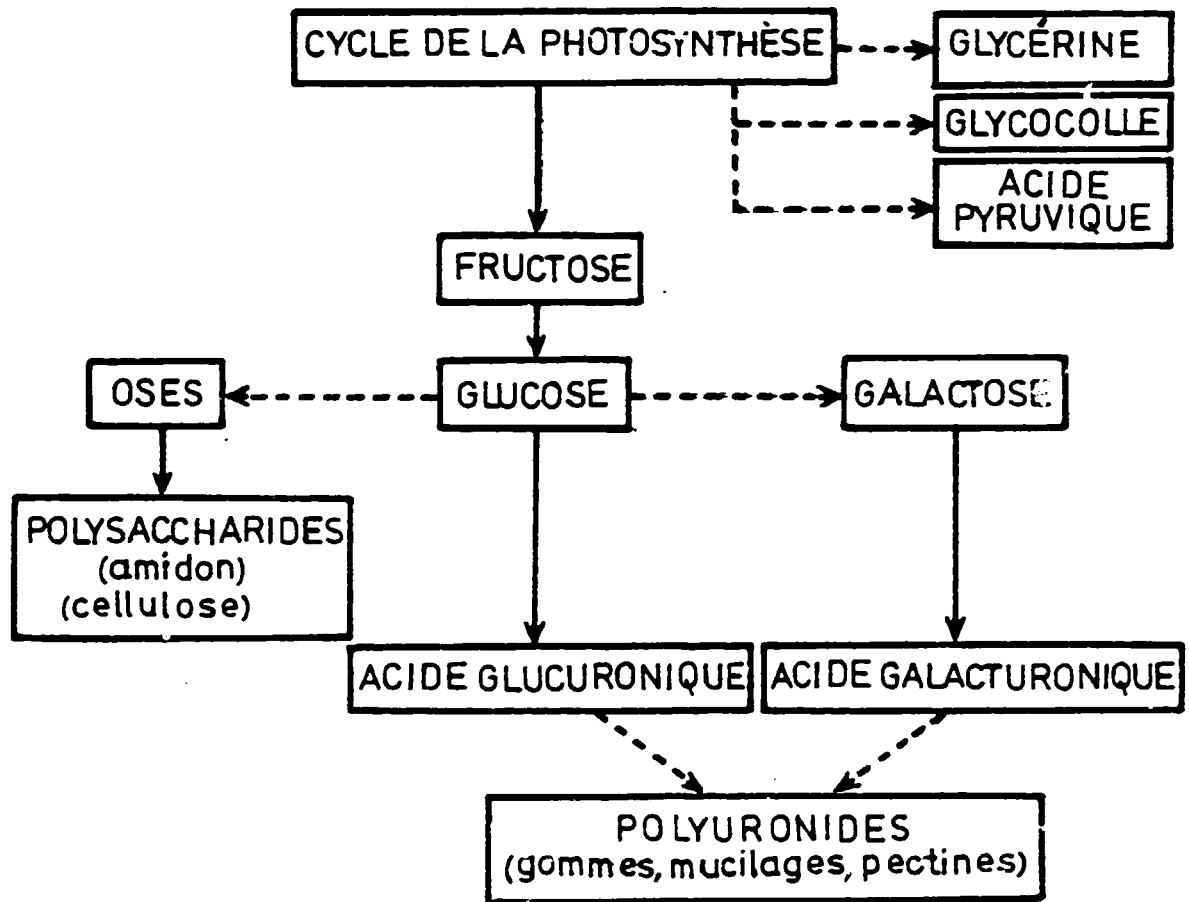


Fig. 1. Interdépendance biogénétique des glucides

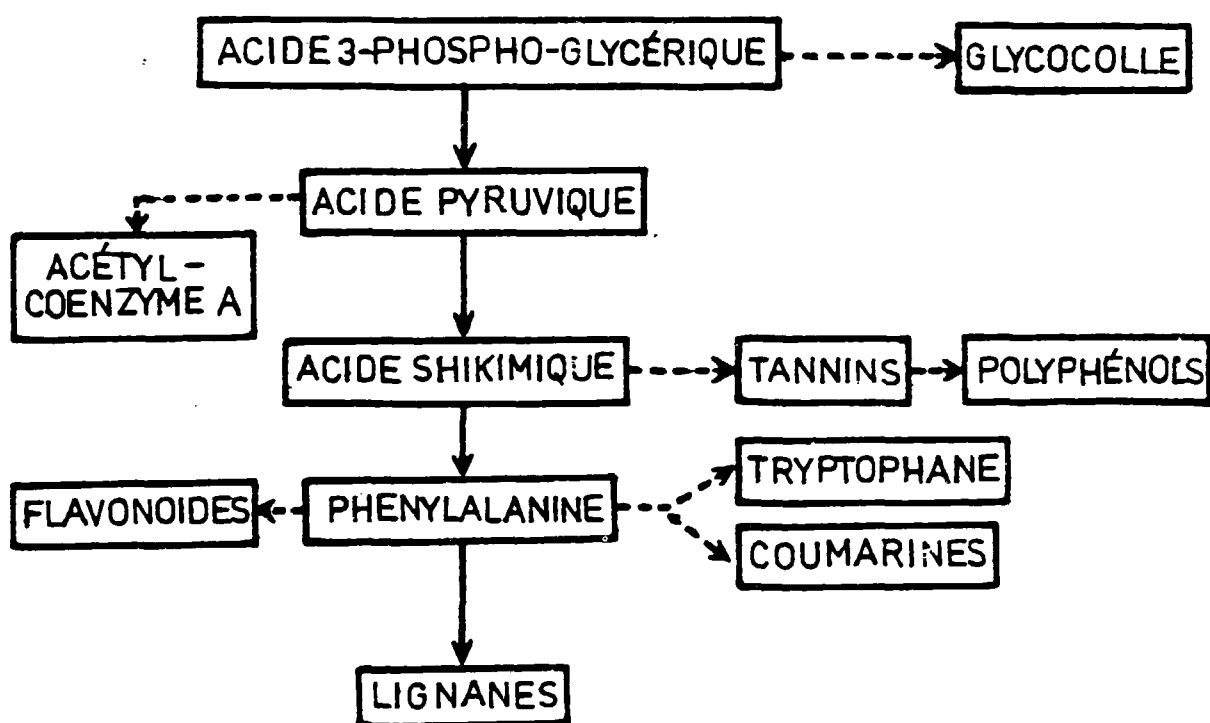


Fig. 2. Schéma biogénétique des composés naturels à structure aromatique

photosensibilisateurs du derme et, en agriculture, des herbicides (21).

Un dérivé phénylpropanique, très important pour le métabolisme des plantes supérieures, prenant également naissance de la phénylalanine, est l'alcool coniférylique. Il est à la base de certains composants utilisés intensivement par les plantes à la formation de la paroi cellulaire, composants qui ont trouvé également des utilisations médicales.

Sous l'action d'une enzyme oxydante, la lacase, qui se trouve dans les tissus du cambium, l'alcool coniférylique fournit un dimère ayant une grande labilité stérique. Grâce à une orientation différente dans l'espace, la combinaison biconiférylique a la possibilité de conduire à la fermeture de structures souvent rencontrées dans le matériau d'incrustation de la paroi cellulaire (9, 7, 38).

Un composant à structure lignanique du type condénine est la podophyllotoxine et ses dérivés, dont on a préparé des produits de semi-synthèse à action cytostatique.

Les corps à structure aromatique que nous avons vu jusqu'à présent provenaient de la cyclisation d'une chaîne d'atomes, la structure cyclique représentative qui en résultait étant considérée l'acide shikimique. Si l'on ajoute à celui-ci un autre type d'aromatisation, par condensation acylique, on assistera à la biogenèse mixte de produits très répandus dans le monde végétal et fournissant en même temps des médicaments précieux.

Trois molécules de malonylcoenzyme A et une molécule d'acide caféique donnent la structure du quercétol, représentant typique des flavonosides (18, 17).

Les flavonosides comprennent les flavones et les flavonols qui donnent la coloration jaune aux fleurs et qui ont des propriétés vitaminiques P, diurétiques, spasmolytiques, hypotensives. La même classe comprend aussi les anthocyanes, pigments rouges, violets et bleus, qui ornent l'habit multicolore des fleurs et les catéchines, substances indispensables des tannins.

Dans la cellule végétale a lieu, en fonction de l'évolution du métabolisme, un passage permanent d'un type de substance à un autre, appartenant à l'une des catégories ci-dessus mentionnées (52, 19).

Les principes actifs dont nous avons parlé se caractérisent comme des substances ternaires, mais les corps qui contiennent de l'azote ne sont pas moins importants.

Dans la biogenèse des principes actifs, un rôle particulier est celui des amino-acides, qui, outre leur contribution essentielle à la synthèse des substances protéiques, peuvent être précurseurs de quelques principes actifs très importants, tels que les alcaloïdes, et dont l'interdépendance biogénétique est présentée en Figure 3.

Pour illustrer cette assertion, prenons l'acide phosphoglycérique; comme précurseur de la sérine, par décarboxylation il donne le glycolle. Sous forme de glycinamide, le glycolle se condense avec la phosphoriboxylamine, pour former le complexe phosphoriboxylglycinamide. Le dernier, par une série de réactions chimiques, conduit à la formation d'alcaloïdes puriniques du type caféine et imidasoliques du type pilocarpine(34).

Un autre amino-acide ayant un rôle de précurseur, lui-même étant un amino-acide essentiel, formé à partir de l'acide shikimique, est le tryptophane. Par son noyau indolique, il est le précurseur de tous les alcaloïdes à noyau indolique et carbolinique (57, 47, 56).

Par décarboxylation, le tryptophane est réduit à la tryptamine, qui, par quelques transformations simples, peut fournir une série d'alcaloïdes importants pour leurs propriétés hallucinogènes (8).

Si à côté du tryptophane dans le processus de biosynthèse prend aussi part l'un des dérivés de l'acide shikimique, on arrive à la formation de structures d'alcaloïdes très compliquées comme la strychnine, la réserpine, la yohimbine, la serpentine, l'ajmaline etc.

Le tryptophane est aussi le précurseur des alcaloïdes à noyau quinoléinique, du type de la quinine, suivant une voie

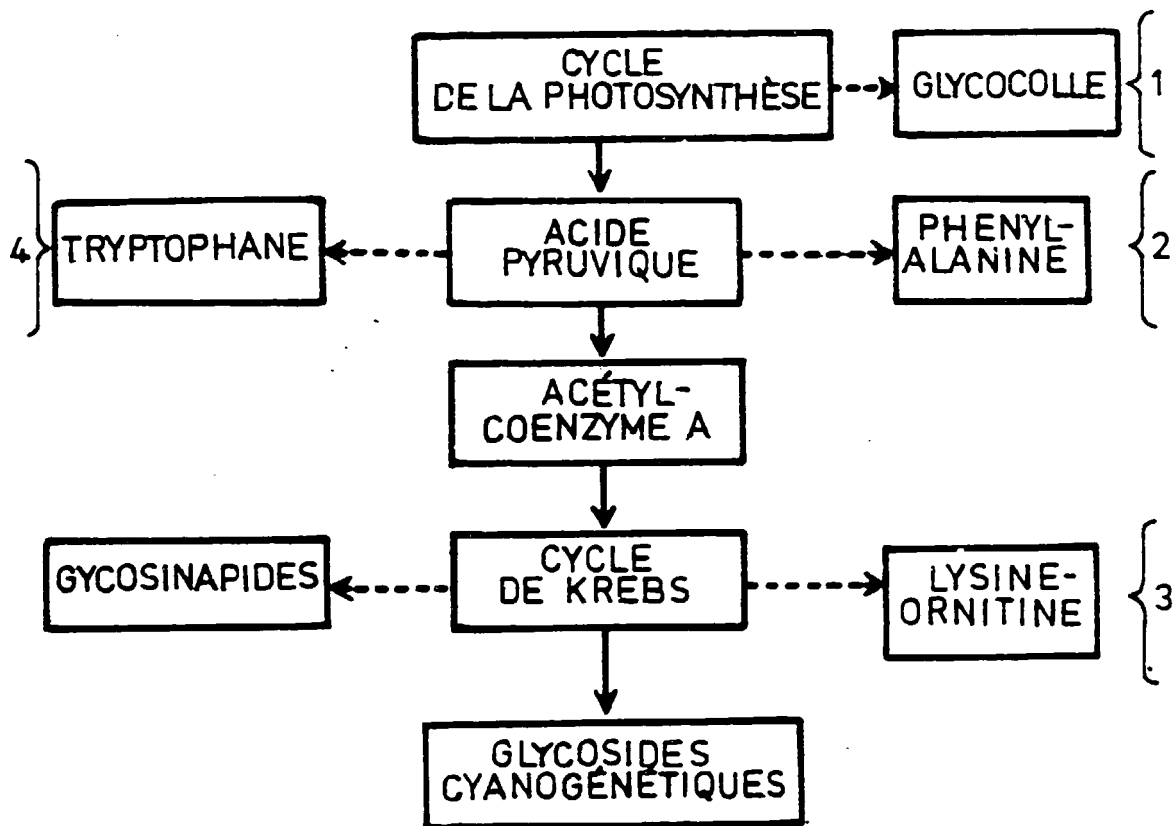
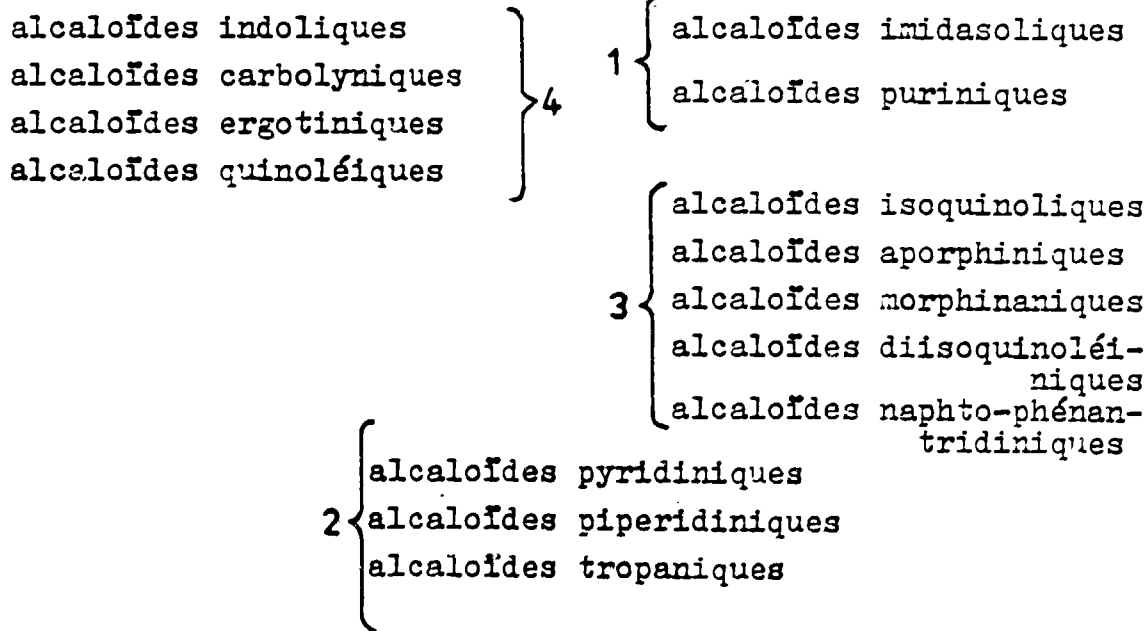


Fig. 3. Formation et liaisons biogénétiques des alcaloïdes



biogénétique, qui, par une intéressante transposition, mène à la cyclisation du noyau quinoléinique (35).

Enfin, c'est toujours le tryptophane qui contribue d'une façon décisive à la biogenèse des alcaloïdes de l'ergot de seigle, quand il est couplé avec un autre composant qui est l'isopentenylpyrophosphate (25, 5, 20, 58).

Un autre amino-acide qui conduit, par des voies biogénétiques, à la formation d'un des plus importants alcaloïdes utilisés en thérapeutique est la phénylalanine. À la cyclisation de la nouvelle ligne biogénétique prennent part la phénylalanine et une série de dérivés de métabolisation ou de dégradation comme la thyrosine, la DOPA, la phényléthylamine, les acides oxy- et dioxypyruvique, l'acide phénylacétique etc.

Le premier produit de condensation de ces métabolites est un dérivé de la benzylisoquinoléine (39, 43, 55).

Des recherches récentes ont montré que ce dernier dérivé peut être le précurseur direct de quelques alcaloïdes comme la papavérine et l'hydrastine, aussi bien que le produit de base pour la biogenèse de beaucoup d'autres alcaloïdes (22, 4, 41), tel les noyaux aporphinique, morphinanique, berbérinique. Toutes ces structures engendrent autant de séries d'alcaloïdes de grande importance que ceux contenus dans Peumus boldus, dans l'Opium mais, cette fois-ci, seulement les alcaloïdes de type morphinanique, ainsi que la berbérine et ses dérivés, existant dans de nombreuses espèces des familles Ranunculaceae et Berberidaceae.

Ce dérivé a été identifié chez la norlaudanosoline, produit présent chaque fois qu'a lieu la biosynthèse des alcaloïdes que nous présenterons plus bas.

Le groupement méthylène du radical benzyl, ayant une grande mobilité, en fonction de l'arrangement pseudocyclique des deux noyaux dans l'espace, vis-à-vis de ce radical, peut donner également naissance à d'autres structures.

Le noyau dibenzylisoquinoléinique du type de la berbérine peut subir lui aussi diverses modifications, menant à une autre série d'alcaloïdes existant dans l'opium, l'écorce de

Berberis et dans tous les organes de Chelidonium majus.

La norlaudanosoline, dans une série de réactions où ont lieu plusieurs ouvertures de cycles et de couplages avec la thyrosine, peut conduire aussi aux alcaloïdes d'Ipeca, qui s'inscriront donc dans la même lignée biogénétique (4, 54, 41, 1).

Les corps ayant une structure phénylpropanique, dérivés de la phénylalanine, du type DOCA, peuvent se condenser avec un noyau aromatique polyhydroxylé, comportant en même temps un intéressant élargissement du cycle, ce qui conduit finalement à la formation d'alcaloïdes de Colchicum autumnale (51, 3, 27).

Un problème longtemps débattu dans la biogenèse des alcaloïdes a été celui de l'origine du noyau pyridinique. Pour les organismes animaux on savait depuis longtemps que l'acide nicotinique, par exemple, provient de la dégradation du tryptophane. Dans les plantes, il se forme néanmoins de la condensation de la glycérine avec l'acide aspartique (42, 50, 7, 10, 13, 26).

L'acide nicotinique est le précurseur immédiat de la trigonelline, de la nicotinamide, de la ricinine etc. Plus importants encore sont les processus où il participe à côté des amino-acides, comme l'ornithine ou la lysine, à la synthèse des alcaloïdes du tabac ou Anabasis aphila (11, 14, 28).

D'une façon analogue, à partir de la lysine se forment le cycle pipéridinique de l'anabasine et le cycle des alcaloïdes de Conium maculatum, Lobelia inflata ou Punica granatum.

Nous sommes pourtant intéressés au plus haut degré par la participation de la lysine et de l'ornithine dans la biosynthèse des alcaloïdes à noyau tropanique, existants dans diverses solanacées, dans Erythroxylon coca ou dans beaucoup d'espèces de Convolvulus.

Dans les nombreuses séquences de cette voie biogénétique se formeront, tour à tour, le noyau pyrrolidinique, le noyau tropanique (ergonine), le tropane et l'acide tropique (22, 36, 23). L'estérification des deux dernières substances donne finalement l'hyoscyamine (29, 30, 24, 32, 33, 31).

Les amino-acides, surtout ceux qui résultent des métabolites du cycle de Krebs, peuvent être précurseurs d'autres principes actifs que les alcaloïdes. De tels principes actifs qui ont l'origine biogénétique dans le métabolisme des amino-acides sont les glycosinapides et les glycosides cyanogénétiques. Bien que certaines soient des substances qui contiennent du soufre dans leur molécule et d'autres uniquement de l'azote, elles ont une voie de formation presque identique.

Dans la première partie de cet exposé nous avons montré que l'acide pyruvique joue un rôle particulièrement important dans la biogenèse d'un grand nombre de principes actifs.

Par décarboxylation de l'acide pyruvique, son oxydation et le couplage avec la coenzyme A, on obtient l'acétyl-coenzyme A.

L'acétylcoenzyme A est un corps ayant une importance immense par le rôle qu'elle joue dans le biochimisme des organismes animaux et végétaux. Ses interdépendances biogénétiques sont présentées en Figure 4 (40,6).

L'acétylcoenzyme A prend part d'abord à la cyclisation de quelques noyaux aromatiques qui ne se forment pas par l'intermédiaire de l'acide shikimique. Ceci est possible grâce à la cyclisation des chaînes polycétométhylènes, que l'acétylcoenzyme A forme d'abord par acyl-condensation (7).

En gagnant un carbone, sous forme de malonyl-coenzyme A, l'acétyl-coenzyme A prend part intégralement à la synthèse des acides gras qui diffèrent entre eux d'après le niveau où s'arrête l'auto-condensation des chaînes polycétomésiléniques. Par estérification avec la glycérine, se forment ensuite tous les glycérides, liquides ou solides, qui trouvent un champ d'application étendu dans la pratique pharmaceutique.

L'un des plus intéressants produits d'auto-condensation de l'acétyl-coenzyme A est un corps à cinq atomes de carbone, une unité biogénétique (C₅), à savoir l'isopenténylpyrophosphate (45, 16, 44).

La biosynthèse de l'isopenténylpyrophosphate a lieu dans tous les organismes vivants.

L'isopenténylpyrophosphate représente le précurseur de

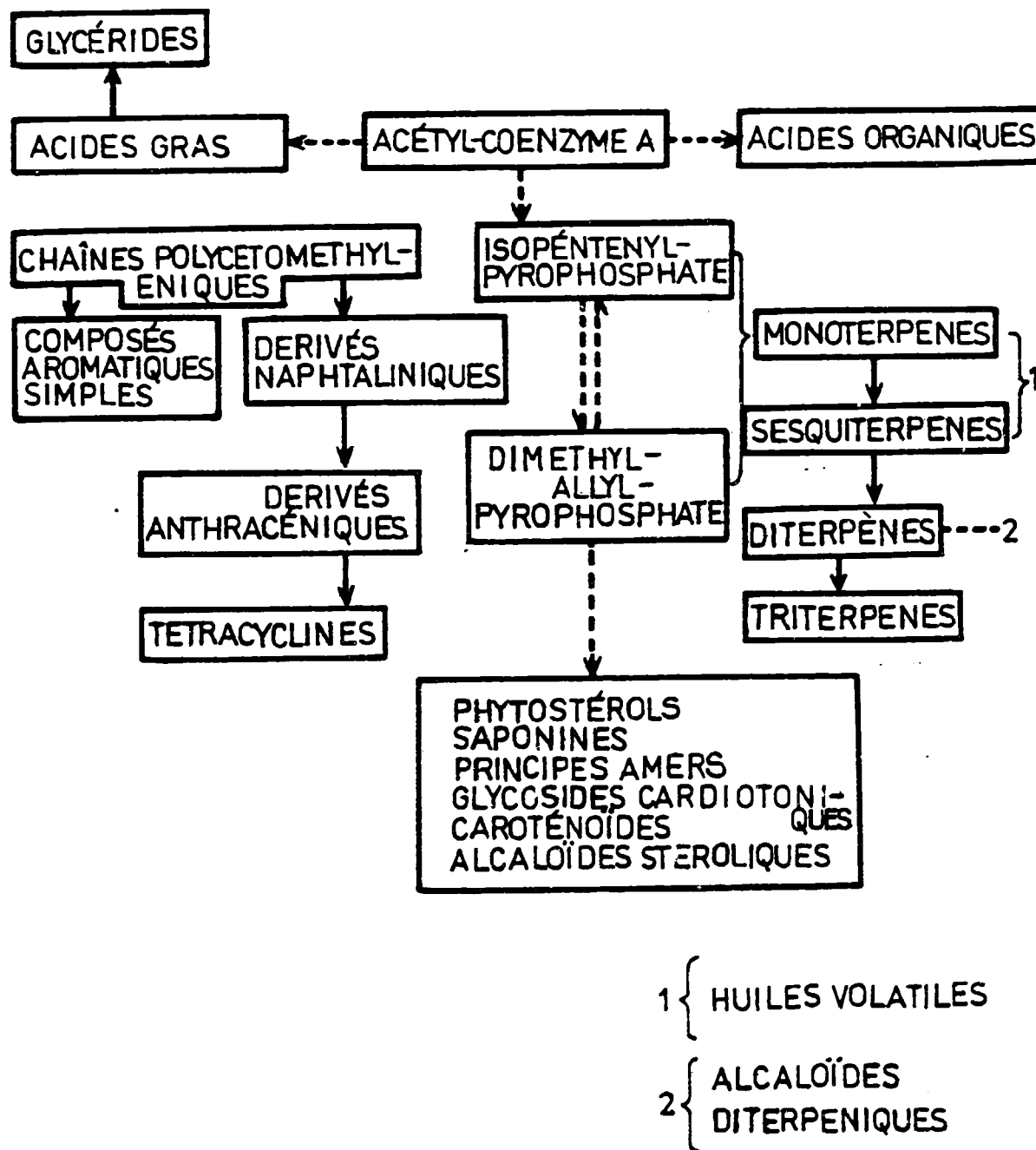


Fig. 4. Schéma des relations de l'acétyl-coenzyme A avec diverses groupes de principes actifs

tous les terpénoïdes connus dans la nature (45, 37, 48).

Par cette voie donc prennent naissance toutes les huiles volatiles, aussi bien qu'une série de substances à structure terpénoïdique, capables des plus diverses actions pharmacodynamiques. Aussi, le squalène pouvant adopter plusieurs configurations stériques a-t-il la possibilité de fournir par cyclisation soit des corps à noyau triterpénique pentacyclique (saponines triterpéniques), soit toute la classe des stéroïdes (49).

À la suite de la cyclisation du squalène pour fermer le noyau cyclopentano-perhydro-phénanthrène, le premier produit qui peut être considéré comme précurseur de tous les corps stéroliques est le lanostérol, identifié pour la première fois dans la lanoline. À partir de lui, par de légères modifications chimiques, dans le métabolisme des plantes, peuvent ensuite prendre naissance les plus divers principes actifs à structure stérolique.

+
+ +

Dans ce qui précède nous avons essayé de présenter succinctement une partie du peu qu'on connaît de nos jours sur la biogenèse de quelques métabolites du règne végétal, à savoir ceux qui, grâce à leurs vertus thérapeutiques, sont considérés comme principes actifs.

Bien que dans notre exposé nous ayons présenté la formation de différentes substances par des voies biogénétiques dans un certain ordre, ce qui implique leur apparition successive dans l'organisme des plantes, il faut quand même nous rappeler que le métabolisme représente une unité. Diverses réactions biochimiques ont lieu simultanément et à grande vitesse, ce qui donne du métabolisme l'image d'un squelette multi-étagé, à liaisons multiples entre les étages. Il est donc difficile d'établir un ordre dans l'apparition de diverses substances dans le cadre du métabolisme, bien que la logique chimique nous l'impose.

La plupart des schémas sont assez incomplets et délibérément abrégés, ne représentant pas le dernier mot dans les problèmes respectifs.

Certaines lignées de métabolisme, par rapport à la biogenèse de quelques principes actifs, ont été définitivement établies: L'avenir peut y apporter seulement quelques changements de structure, de détails.

Dans d'autres cas, on devra déterminer une série de phases intermédiaires qui assurent une continuité dans l'illustration structurale de la biosynthèse de différents corps. L'analyse, même superficielle, des schémas présentés peut montrer facilement que certaines étapes du métabolisme des corps respectifs sont présentées ex abrupto et que justement y manquent les phases intermédiaires pouvant expliquer l'apparition des structures ultérieures. C'est pourquoi nous avons indiqué uniquement les points nodaux, montrant les directions de formation des principes actifs. D'ailleurs, il n'est pas possible de présenter dans un bref exposé le métabolisme dans toute son ampleur et complexité.

C'est donc à ceux d'entre vous qui avez des préoccupations dans ce beau domaine de la phytochimie et de la biochimie végétale, en employant des moyens et des techniques toujours plus perfectionnés, à établir le contenu de toutes les taches blanches sur la carte du métabolisme végétal.

En ce qui nous concerne, nous nous sommes efforcés à présenter d'une manière aussi condensée que possible les connaissances actuelles dans le domaine de la biogenèse des principes actifs et nous espérons avoir ainsi apporté une modeste contribution à la compréhension de la pharmacognosie moderne.

N.B. L'exposé a été illustré par la projection de 35 diapositives sur divers détails de la biosynthèse et du métabolisme des principes actifs.

B I B L I O G R A P H I E

1. Albright J.D., Van Meter J.C., Goldman E. - Lloydia, 1965, 28, 212
2. Barton D.H.R., Hesse R.H., Kirby G.W. - Proc. Chem. Soc., 1963, 267; J. Chem. Soc., 1965, 6379
3. Battersby A.R., Binks R., Reynolds J.J., Yeowell D.A. - J. Chem. Soc., 1964, 4257
4. Battersby A.R., Binks R., Lawrie W., Parry L.V., Webster B.R. - Proc. Chem. Soc., 1965, 7459
5. Baxter R.M., Kandel S.I., Okany J. - Chem. and Ind., London, 1961, 1453; J. Am. Chem. Soc. 1962, 84, 2997; Tetrahedron Lett., 1961, 596
6. Benn H.H. Chem. and Ind., 1962, 1907
7. Bernfeld P. Biogenesis of natural compounds, Oxford-London-New York-Paris, 1967
8. Brack A., Hofmann A., Kalberer F., Kobel H., Ruschmann J. Arch. Pharm., 1961, 292, 230
9. Brown S.A. Ann. rev. plant. physiol., 1966, 17, 223
10. Christman D.R., Dawson R.F. - Biochemistry, 1962, 1, 336
11. Dawson R.F., Christman D.R. - J. Am. Chem. Soc., 1965, 87, 4187
12. Gear J.R., Spenser I.D. - Can. J. Chem., 1963, 41, 783
13. Griffith T., Hellman K.P., Byerrum R.V. - Biochemistry, 1962, 1, 336
14. Griffith T., Griffith G.D. - Phytochemistry, 1966, 5, 1175
15. Grigorescu E., Stănescu U. - Farmacognozie, Iași, 1964, vol. 1, p. 77
16. Goodwin T.A. Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry, Academic Press, London-New York, 1971
17. Grisebach H., Brandner G.Z. - Naturforsch., 1961, 16, 2
18. Grisebach H. Planta Med., 1962, 10, 385
19. Grisebach H. en: "Biosynthetic pathways in high plants", J.B. Pridham, T. Swain, London-New York, 1965
20. Gröger D., Mothes K., Simon H., Floss H.G., Weygand F. - Z. Naturforsch., 1960, 15 b; 1961, 16 b, 432
21. Hodak K., Jakešová V., Dadak V. - Českoslov. farm., 1967, 13, 248

22. Jindra A. Acta Facultatis pharmaceutica bohemoslovenica, 1966, 13, 7
23. Kaczkowski J., Schütte H.R., Mothes K. - Naturwiss., 1960, 47, 304
24. Kaczkowski J., Marion L. - Can. J. Chem., 1963, 41, 2651
25. Klaus E.P. Pharmakognosie, Philadelphia, 1965
26. Leete E. Chem. and Ind., 1958, 465
27. Leete E. J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 3666
28. Leete E., Gross E., Gilbertson T.J. - J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 3907
29. Leete E. J. Am. Chem. Soc., 1962, 84, 55
30. Leete E. Tetrahedron Lett., 1964, 1619
31. Leete E. Planta Med., 1979, 36, 97
32. Liebisch H.W., Ramin H., Schöfinius I., Schütte H.R. - Z. Naturforsch., 1965, 20 b, 1183
33. Liebisch H.W., Schütte H.R., Mothes K. - Annalen, 1963, 668, 139
34. Luckner M. Die Pharmazie, 1966, 21, 142
35. Luckner M. Die Pharmazie, 1963, 18, 93
36. Luckner M. Die Pharmazie, 1964, 19, 1
37. Lynen F., Eggerer H., Henning M., Kessel I. - Angew. Chem., 1958, 70, 738
38. Mentzer C., Fatianoff O. - Actualités de phytochimie fondamentale, Paris, 1964
39. Mentzer C. Bull. Soc. Chim., 1960, 1270
40. Mentzer C., Favre-Bonvin J., Massias M. - Bull. soc. chim. biol., 1963, 45, 749
41. Mothes K. Lloydia, 1966, 29, 157
42. Mothes K. Dtsch. Apoth. Ztg., 1966, 40, 1409
43. Neubauer D. Arch. Pharm., 1965, 298, 737
44. Pridham J.B. Terpenoids in Plants, Academic Press, New York, 1967
45. Richards J.H., Hendrickson J.B. - The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins, Academic Press, New York-Amsterdam, 1964
46. Monkovic I., Spenser I.D. - Proc. Chem. Soc., 1964, 223
47. Schütte H.R. en: "Progress in Botany", 39, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1977

48. Schütte H.R. en: "Progress in Botany", 38, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1976,129
49. Schütte H.R. en: "Progress in Botany", 37, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1974,135
50. Schmidt H. Die Pharmazie, 1963, 18, 445
51. Scott A.J. Nature, 1960, 186, 556
52. Seshadri T.R. Tetrahedron, 1959, 6, 169
53. Soine T.O. Pharm. Sciences, 1964, 53, 231
54. Spenser I.D. Lloydia, 1966, 28, 71
55. Steinegger E., Hänsel R.
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg,
1968
56. Stöckigt I. Phytochemistry, 1979, 18, 975
57. Taxler W.I. Lloydia, 1964, 27, 368
58. Taylor E.W., Ramstad A. - Nature, 1960, 188, 484
59. Tschirch A. Handbuch der Pharmakognosie, Leipzig, 1933
60. Zelitch I. Chemical & Engineering, 1979, 57 (6), 28

INTRODUCTION DE NOUVEAUX MEDICAMENTS
D'ORIGINE VEGETALE EN THERAPEUTIQUE

Corneliu Baloescu⁺⁾

⁺⁾ Professeur à la Faculté de Pharmacie de Bucarest, Directeur de l'Institut pour le Contrôle d'Etat des Médicaments et de Recherches Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

En Roumanie, l'introduction de nouveaux médicaments en thérapeutique est réglementée par le Ministère de la Santé.

En vue d'introduire en thérapeutique des médicaments nouveaux (substances et formes pharmaceutiques) conformément à la méthodologie du Ministère de la Santé, il est nécessaire d'obtenir, par étapes, les avis suivants: l'avis de nécessité, l'avis thérapeutique et l'avis de fabrication et d'enregistrement. Tous ces avis sont sollicités à la Commission du Médicament, qui est subordonnée au Ministère de la Santé et dont le secrétariat est assuré par les spécialistes de l'Institut pour le Contrôle d'Etat des Médicaments et de Recherches Pharmaceutiques.

La Commission du Médicament est constituée, pour la plupart, de cliniciens de valeur, de différentes spécialités médicales.

Hormis ceux-ci, de la Commission du Médicament font également partie des représentants de l'Institut ci-dessus nommé, de l'industrie des médicaments et du Ministère de la Santé.

Afin de recevoir l'avis de nécessité, l'auteur qui propose un médicament nouveau adresse à la Commission du Médicament la demande d'obtention de l'avis en question, accompagnée de quelques données indispensables, telles que: dénomination de la substance ou de la préparation pharmaceutique, formule et poids moléculaire pour les substances, composition (substances et excipients) pour les formes pharmaceutiques, indications thérapeutiques et avantages que la nouvelle substance ou le nouveau produit présentent par rapport à la médication déjà existante.

La Commission du Médicament donne l'avis de nécessité en fonction des données présentées par l'auteur et de l'intérêt que la demande suscite du point de vue thérapeutique.

En donnant l'avis de nécessité, la Commission du Médicament sollicite, en même temps, de la partie intéressée, d'envoyer les échantillons nécessaires aux vérifications de laboratoire et d'ajouter à la documentation la Fiche analytique,

la stabilité de la substance, la description des étapes principales du processus technologique (pour les substances), le mode d'administration et la posologie, les recherches de pharmacologie et de toxicologie.

La Commission du Médicament envoie les échantillons à l'Institut pour le Contrôle d'Etat des Médicaments et de Recherches Pharmaceutiques, qui procède au contrôle complexe de laboratoire et à l'approbation de la Fiche analytique.

Les vérifications pharmacologiques et toxicologiques se sont effectuées seulement dans les cas où la Commission du Médicament considère comme insuffisante l'expérimentation de l'auteur.

Si les résultats des vérifications de laboratoire sont bons, l'équipe de pharmacologues de la Commission du Médicament dresse le protocole d'expérimentation clinique, la liste des cliniques où le produit sera expérimenté et demande à l'auteur les quantités de produits nécessaires à cette expérimentation.

Si les conclusions qui se dégagent de l'expérimentation du produit en cliniques sont favorables, la Commission du Médicament donne son deuxième avis, l'avis thérapeutique. Par la suite, l'auteur et la fabrique où le produit pharmaceutique est obtenu présentent à la Commission du Médicament des échantillons du lot obtenu par la fabrique en question, désigné sous le nom de "lot O", le projet du prospectus et le projet de la Norme Interne.

L'Institut pour le Contrôle d'Etat des Médicaments et de Recherches Pharmaceutiques vérifie les échantillons reçus et rend définitifs le projet de Norme Interne et le projet du prospectus.

Si les résultats des vérifications sont satisfaisants, la Commission du Médicament donne l'avis de fabrication (pour les substances) et l'avis de fabrication et d'enregistrement (pour les formes pharmaceutiques).

Le dossier contenant les données qui portent sur les vérifications cliniques et de laboratoire est présenté au Ministère de la Santé, qui délivre l'autorisation de fabrication et, selon le cas, le certificat d'enregistrement également.

PART II

INVENTAIRE ECONOMIQUE ET CARTOGRAPHIE
DES PLANTES MEDICINALES DANS UNE ZONE
GEOGRAPHIQUE

Ovidiu Bojor +)

+) Docteur en Pharmacie, Institut pour le Contrôle d'Etat
des Médicaments et de Recherches Pharmaceutiques,
Bucarest, Roumanie

I. INTRODUCTION

Il ne peut y avoir, à présent, une industrie pharmaceutique à base de plantes médicinales et aromatiques, sans une évaluation préalable, aussi exacte que possible, des matières premières dont dispose un pays.

La matière première provient de deux sources importantes: flore spontanée et cultures. La matière première peut être obtenue des ressources propres d'un pays ou bien de l'importation. Comme la plupart des pays en développement dispose de quantités appréciables de plantes médicinales et aromatiques dans leur flore spontanée il est utile de présenter la méthodologie adéquate aux pays qui désirent mettre en valeur ces richesses naturelles.

Il convient de souligner, dès le début, qu'une mise en valeur rationnelle de la flore médicinale et aromatique d'une certaine zone est étroitement reliée à la protection de la nature, au fonds génétique dont dispose la zone ou le pays concernés.

Une activité industrielle ininterrompue basée sur les plantes mentionnées est possible à condition d'évaluer le potentiel économique et de programmer l'exploitation rationnelle des plantes de manière à assurer en permanence la matière première nécessaire au processus de transformation industrielle. Parallèlement à l'exploitation, il faut également remplacer les espèces récoltées par des ensemencements supplémentaires avec un matériau génétiquement supérieur. Si l'on tiendra compte de ces observations, les zones de plantes médicinales ne seront pas appauvries, mais au contraire leur potentiel augmentera chaque année.

Par l'inventaire économique de la flore médicinale spontanée on comprend l'identification, l'enregistrement et l'appréciation quantitative et qualitative des plantes médicinales et aromatiques sur des cartes topographiques, à l'aide de signes conventionnels, des quantités des espèces qu'on recommande à récolter, tout en tenant compte des lois de pro-

tection de la nature.

Simultanément on a en vue l'évaluation des vertus thérapeutiques des plantes médicinales du point de vue de leur teneur en substances actives.

A cette fin, on fait des analyses sur le terrain pour identifier les substances actives, on récolte le matériau pour déterminer au laboratoire la quantité de substances actives que l'espèce inventoriée contient.

Le but de l'inventaire économique est donc de connaître quantitativement et qualitativement les ressources naturelles en plantes médicinales et aromatiques d'une certaine zone géographique, pour exploiter d'une manière rationnelle son potentiel.

Les données obtenues par l'inventaire économique permettent de programmer l'exploitation, organiser les centres de récolte, trier, sécher le matériau végétal et prendre des décisions quant à l'emplacement des unités de transformation industrielle des plantes médicinales et aromatiques.

II. INVENTAIRE ECONOMIQUE

A. Délimitation du territoire et étude géographique

La surface du territoire à inventorier s'étendra aux unités territoriales - administratives (région, département, commune, etc.), bassins hydrographiques, massifs montagneux, îles, etc., qui - par la nature du relief ou l'emplacement géographique - permettront une délimitation très précise exprimée en km².

L'étude géographique notera la description, en grandes lignes, des formes du relief, des rivières, des lacs, la nature et la structure du sol, l'exposition par rapport aux points cardinaux (versants nord, sud, sud-est, etc.) et la délimitation des zones cultivées.

La flore spontanée la plus riche se trouve, normalement, dans les bassins hydrographiques, dans la zone des bois, des forêts en coupe, des plantations, des clairières, des bords

des lacs, des côtes abruptes incultes, des pâturages et des alpages.

• Une petite réserve de plantes médicinales spontanées se trouve également parmi les plantations d'arbres fruitiers ou d'espèces vivrières ornementales ou techniques (bananiers, caféiers, etc.).

On n'inventoriera pas les zones polluées, les bordures des chemins et des routes (à l'exception de quelques espèces arborescentes), les réserves naturelles (des plantes protégées par la loi), les parcs nationaux, les jardins publics.

A ces données à caractère général on ajoutera des informations météorologiques et pédo-climatiques, en indiquant suivant le cas, les saisons de pluies, de sécheresse ou la succession des saisons.

B. Documentation bibliographique

Avant de commencer les travaux d'inventaire de la flore médicinale, il est nécessaire de connaître les travaux antérieurs sur la flore et la végétation de l'unité géographique à inventorier. Bien que nombre d'ouvrages publiés sur la flore et la végétation ne donnent pas toujours les éléments nécessaires pour estimer les quantités de plantes médicinales et aromatiques et encore moins des informations sur la teneur en principes actifs de ces plantes, ces ouvrages peuvent fournir une information utile sur la propagation des espèces médicinales. Ils mentionnent normalement les espèces et souvent indiquent avec exactitude les phyto-cénoses, les écosystèmes et d'autres éléments utiles pour l'inventaire de la flore.

Au cas où existent des herbiers de la zone soumise à l'inventaire, ils devront être consultés, car ils fournissent des indications documentaires de valeur; outre les indications concernant la localisation des espèces, les herbiers peuvent fournir aussi les noms populaires régionaux des plantes, le stade végétatif de la plante au moment où elle a été herborisée, etc.

Les informations tirées des ouvrages consultés et des herbiers serviront à dresser un index des plantes médicinales

et aromatiques, index qui s'enrichira lors des travaux de l'inventaire.

C. Programmation et durée. Constitution de l'équipe

Pour utiliser aussi judicieusement que possible le temps affecté au travail sur terrain, il convient de faire une bonne programmation.

En zones tempérées, continentale et subméditerranéenne, les travaux de l'inventaire seront programmés en tenant compte du relief et de la saison.

Dans les régions de plaine, les travaux peuvent commencer dans la deuxième moitié du mois d'avril, d'abord dans les bois de la plaine, où le tapis végétal est plus riche jusqu'en mai.

Au cours des deux mois qui suivent, on dressera l'inventaire des zones collinaires et sub-montagneuses, et à partir du mois de juillet, on peut commencer les travaux dans la zone alpine, jusqu'à l'altitude de 1500-2000 m.

Aux mois d'août et de septembre (voire même d'octobre si les conditions météorologiques le permettent), on dresse l'inventaire de la zone comprise entre 2000-4000 m.

Dans les zones équatoriales, tropicales et subtropicales où, d'ordinaire, il n'y a que deux saisons, la saison des pluies et celle de la sécheresse, les travaux de l'inventaire seront programmés tenant compte de la saison. Dans les régions géographiques soumises aux pluies de la mousson, on prendra en considération le fait que la végétation herbacée se développe très rapidement dès les premières semaines de pluies. Bien qu'il soit difficile de travailler pendant la mousson, on ne peut interrompre complètement l'inventaire car il existe des espèces qui ont une période de végétation relativement courte. Le stade de végétation des plantes présente une importance particulière, surtout du point de vue phytochimique, c'est-à-dire de la teneur en principes actifs.

Pour inventorier la flore d'une zone ayant une superficie de 8000-10.000 km², un relief varié, des chemins d'accès

difficile, avec 50% seulement de la surface cultivée (ou impossible à inventorier), 5 à 6 déplacements, chacun de 20 jours, sont nécessaires, en utilisant 3 équipes, chacune formée de 2-3 personnes. Les équipes se déplaceront, à tour de rôle, pendant des périodes de temps programmées à l'avance, sur des trajets précis, établis par le chef du groupe des chercheurs. Cette programmation est absolument nécessaire pour ne pas omettre certaines surfaces ou bien inventorier deux fois la même aire.

Ces données à caractère informatif ont été calculées en tenant compte de l'existence d'une bonne base matérielle et des moyens de transport autonomes nécessaires pour effectuer les travaux de l'inventaire. Lorsque existent des voies d'accès ou des chemins qui peuvent être parcourus par des autolaboratoires à double traction et que les formes de relief ne présentent pas de trop grandes différences d'altitude, le temps nécessaire pour inventorier une zone est plus réduit; par contre, lorsque les voies d'accès sont limitées ou inexistantes, la durée de l'inventaire sera plus longue.

Quant à la constitution de l'équipe qui effectue l'inventaire, il faut prendre en considération surtout deux aspects principaux : la condition physique de ses membres et leur formation professionnelle.

L'équipe de l'inventaire comprendra des chercheurs qui connaissent bien les plantes médicinales et aromatiques du point de vue botanique et phytochimique (pharmaciens, biologistes, techniciens). Dans une équipe de 8 à 11 personnes, 4-5 personnes à formation théorique supérieure et 4-5 techniciens suffisent; sur 5 techniciens, 4 au moins doivent savoir conduire un véhicule automobile dans des conditions de terrain très difficiles. L'un des techniciens sera également mécanicien d'auto.

Le chef de l'équipe est responsable du déroulement des travaux sur le terrain, des formalités requises par les autorités locales, de l'observation du trajet programmé et du cantonnement.

D. Moyens de transport, équipement, cantonnement,
bases d'approvisionnement

Pour un déroulement normal des travaux visant à inventorier la flore médicinale spontanée, la meilleure solution est de doter l'équipe de moyens de transport propres.

Une microcaravane est formée de 4 voitures de tourisme, dont la première transporte 4 membres de l'équipe et un chauffeur et les autres trois, un membre de l'équipe et un chauffeur, chacune.

Toutes les voitures devront avoir une traction double. Nous recommandons une caravane formée d'une voiture de tourisme du type ARO-244 et trois autolaboratoires du type ARO-243, fabriqués en Roumanie.

La première voiture ARO-244 est destinée au chef de l'équipe, à 3 coéquipiers et au chauffeur.

Deux autolaboratoires spécialement aménagés (ARO-243) comprendront l'installation de laboratoire et les réactifs pour les déterminations rapides sur le terrain.

Le dernier autolaboratoire (ARO-243) doté d'un réfrigérateur est destiné à l'herbier, aux échantillons qui doivent être analysés et aux aliments. Chaque autolaboratoire aura un réservoir d'eau et des bidons remplis de carburant. De cette manière on peut assurer une indépendance de transport de 800 km environ.

Outre les vêtements personnels (habits adéquats à la zone où l'on travaille), il y aura également des tentes pour l'équipe. Avant de commencer les travaux sur le terrain, on prendra toutes les mesures techniques nécessaires pour un bon fonctionnement des voitures.

L'expérience pratique du travail sur terrain a montré qu'on peut obtenir une efficacité maximale des travaux si l'on fait l'inventaire en circuit. Ceci signifie que le trajet sera établi sans que des localités pour logement et nourriture soient nécessaires.

On travaille d'habitude dès le matin jusqu'à 16-17 h., avec une pause d'une heure pour le déjeuner.

Le lendemain, les travaux sont continués à partir de l'endroit où ils avaient été arrêtés la veille. De cette manière l'efficiencia des travaux d'inventaire et l'économie en carburant augmentent.

Il faut préciser, dès le début, que l'inventaire des plantes se fait en allant surtout à pied. Les véhicules servent uniquement à parcourir les distances longues entre "les zones à inventorier", et à transporter l'équipement et les aliments. Les analyses sur terrain seront effectuées dans les autolaboratoires spécialement aménagés.

E. Matériel nécessaire

1. des cartes topographiques à l'échelle 1:50.000 ou au maximum 1:100.000; pour les zones difficiles, alpines, des cartes à l'échelle 1:25.000 ou 1:10.000 sont indiquées;
2. un déterminateur de plantes (livre-guide servant à identifier les espèces);
3. boussole, altimètre, jumelles, loupe, appareil photo;
4. piquets et corde pour les cadres du relèvement;
5. carnets pour prendre des notes, faire des esquisses, crayons de graphite et de couleur;
6. deux pioches, deux petites baches et deux sécateurs;
7. un bateau pneumatique (quand on travaille dans la zone des lacs, des grandes rivières et du delta);
8. trousse à réactifs et appareils nécessaires pour identifier les alcaloïdes, les glucosides, les tannins, les dérivés d'antraquinone, etc.;
9. presses pour l'herbier, papier, sacs en papier, corde;
10. bouteilles à gaz liquéfié ou lampes spéciales à essence
11. une pharmacie de premier secours.

Avant de commencer les travaux, il convient de contacter les autorités locales qui peuvent fournir des données récentes sur l'état des chemins et sur leur sûreté. Il convient égale-

ment d'engager un guide local qui connaît le terrain et les dialectes locaux.

Toute information concernant les zones riches en plantes et l'utilisation de ces dernières en médecine traditionnelle contribuera à obtenir un meilleur inventaire.

F. Méthodes utilisées pour évaluer quantitativement la flore médicinale

Il existe deux manières principales de travail :

1. inventorier un nombre restreint d'espèces destinées à être industrialisées;
2. inventorier toute la flore médicinale spontanée.

Dans le premier cas on peut travailler plus vite que dans le second, tenant compte que dans ce dernier cas il faut évaluer un grand nombre d'espèces.

D'autre part, il est difficile de délimiter exactement les plantes médicinales des plantes banales, d'autant plus qu'à la suite de recherches qualitatives et d'analyses de laboratoire, beaucoup de plantes banales s'avèrent médicinales.

Nous considérons qu'avant de commencer l'inventaire, il est nécessaire de dresser une liste minimale d'espèces médicinales; ces espèces représentent une priorité pour toutes les équipes sur terrain. La liste pourra être complétée d'autres plantes sur terrain. Il s'agit de plantes utilisées empiriquement comme remèdes et de plantes qui s'avèrent médicinales ou aromatiques à la suite d'analyses phytochimiques.

Pour une évaluation quantitative il faut observer les critères suivants :

- (a) identifier l'espèce suivant les caractères botaniques pendant différentes périodes de végétation;
- (b) déterminer aussi exactement que possible la matière première recommandée à être évaluée quantitativement sur une certaine surface, d'une certaine localité, par exemple : pour cette détermination, il est nécessaire d'établir très exacte-

ment la quantité de matière première sèche qu'on peut obtenir d'une plante.

Tenant compte que les espèces médicinales sont très différentes du point de vue de leur habitat, avant de commencer les travaux de l'inventaire économique, il faut dresser un tableau mentionnant pour chaque plante les quantités de matière première sèche escomptées. Quand la littérature n'offre pas la possibilité de faire ces évaluations, il faut recourir à des déterminations spéciales.

Exemple : un exemplaire (individu) d'Atropa belladonna, au stade de floraison, peut donner 4-6 g de feuilles sèches; le même exemplaire (individu) peut donner 20-25 g de racines sèches. Si l'on a identifié 600 individus d'Atropa belladonna (une plante pour 15 mètres carrés environ) sur une surface de 1 hectare, on recommande de mettre en valeur 1,5-2 kg de feuilles sèches et 3,9-4,8 kg de racines sèches d'Atropa belladonna sur la surface mentionnée. Pour des raisons relevant de la protection de l'espèce, dans le calcul présenté ci-dessus, on a pris en considération seulement 50% de la quantité de feuilles et 30% de la quantité de racines obtenues. Ces pourcentages représentent un inventaire rationnel des matières disponibles. Nous soulignons donc que les quantités enrégistrées ne représentent pas toute la quantité de matière première fournie par l'espèce mentionnée, sur une surface déterminée, mais une partie seulement. Cette partie représente pour les racines 30% du total, pour les feuilles et les parties aériennes de la plante 50% et pour les fleurs, les fruits et les graines 60%, au maximum, du total récoltable. De cette manière on assure la perpétuation de l'espèce dans les années à venir.

(c) la détermination de la densité d'une ou de plusieurs espèces sur une unité de surface s'effectue par des méthodes classiques (la méthode Braun-Blanquet ou Emberger).

Dans nos travaux d'inventaire de la végétation herbacée nous avons utilisé des châssis carrés en bois ayant les côtés de 50 ou 100 cm.

(d) pour uniformiser les travaux d'inventaire de la flore médicinale et aromatique, toutes les équipes utiliseront la

même méthodologie.

(e) la localisation très exacte de l'aire inventoriée exige la précision de l'endroit, de la surface, des coordonnées géographiques, du nom local et de la dénomination topographique du territoire soumis à l'inventaire. Pour préciser correctement la localité inventoriée on dessine un croquis pour chaque localité et l'on donne comme points de repère stables les distances entre l'endroit présenté et une rivière, une route, un roc, etc., faciles à identifier.

Il faut tenir compte que les données recueillies sur terrain représentent la base des cartes économiques qui, à leur tour, sont à la base des travaux d'exploitation.

G. Notation des données sur terrain

Il est utile que l'enregistrement des données sur terrain soit fait en double exemplaire, par deux membres de l'équipe, tenant compte des détails présentés au point antérieur (F). Si un cahier, où l'on note ces données, est perdu, il reste encore un autre, car reconstituer les données de mémoire est une chose pratiquement impossible.

Les quantités de matières premières pour chaque espèce séparément seront exprimées en chiffres mis entre parenthèses, représentant les kilos de matière première qu'on recommande de récolter sur la surface mentionnée.

Un exemple de notation des données sur le terrain est présenté en Annexe 1.

H. Méthodes utilisées pour les analyses qualitatives sur terrain

Au cours des travaux d'inventaire, 1-2 chercheurs de l'équipe effectueront dans les autolaboratoires des analyses simples visant à identifier rapidement les principes actifs, surtout pour les espèces considérées comme plantes dépourvues d'activité médicinale. Il s'agit d'identifier qualitativement

certains grands groupes de substances actives : alcaloïdes, glucosides, saponosides, etc.

Il y a de nombreuses méthodes et schémas d'identification des principes actifs; les méthodes sont présentées largement dans d'autres conférences de ce cours.

Un aspect à souligner : si l'on identifie des substances actives dans une plante considérée jusqu'alors comme dépourvue d'activité médicinale, l'espèce sera identifiée selon les critères botaniques, sera pressée dans l'herbier, codifiée, tout en mentionnant avec exactitude l'endroit où elle a été découverte et en prélevant une quantité suffisante pour les recherches ultérieures de laboratoire.

I. Prélèvement des plantes sur terrain

Pour répondre au second objectif important de l'inventaire économique de la flore, on prélèvera des plantes sur terrain pour établir leur qualité par des analyses de laboratoire. Il est absolument nécessaire que chaque plante soit récoltée en quantité suffisante pour les analyses, voire même pour des recherches.

Les quantités prélevées seront séchées au soleil ou à l'ombre, suivant le cas. Les sacs en papier contenant les plantes porteront mention sur toutes les données permettant leur identification.

Dans le cadre de la même opération on pressera aussi les plantes pour l'herbier.

On prêtera une attention particulière aux plantes pour éviter leur dégradation en raison de l'humidité. Comme la dynamique de l'accumulation des substances actives dans les plantes diffère d'après le stade végétatif de la plante, ces informations seront également notées.

J. Collection de données de la médecine traditionnelle

Parallèlement aux travaux d'inventaire, aux microanalyses qualitatives, à l'herborisation et au prélèvement des plantes

sur terrain, 1-2 membres du groupe des chercheurs s'occuperont à noter les données concernant l'utilisation des plantes en médecine traditionnelle locale. Loïn d'être négligeable, cette préoccupation exige beaucoup d'adresse et de tact de la part du chercheur, car il devra trouver les meilleurs moyens pour obtenir ces informations.

Les éléments principaux que doit comprendre une fiche de terrain, à ce sujet, sont présentés en Annexe 2.

K. Travaux de laboratoire

Les travaux sur terrain terminés, on commencera, immédiatement après le retour de l'équipe, les travaux de laboratoire pour établir la qualité des plantes médicinales qui venaient d'être cueillies. Les échantillons apportés seront soumis à la dessiccation effectuée selon les règles et les plantes herborisées seront systématisées.

Les échantillons cueillis serviront à déterminer leur teneur en principes actifs et seront étudiés des points de vue pharmacognostique, phytochimique, microbiologique, pharmacodynamique. On fera aussi le screening préliminaire concernant l'action cytostatique de certains extraits des plantes.

III. CARTOGRAPHIE. CENTRALISATION DES DONNÉES OBTENUES SUR TERRAIN

Après la fin des travaux sur terrain dans un district ou autre unité territoriale, on dressera une fiche pour chaque espèce inventoriée. La fiche devra comprendre les éléments principaux suivants :

1. nom scientifique de l'espèce médicinale;
2. nom populaire local de la plante;
3. partie de la plante qui doit être évaluée (Radix, Folium, etc.);
4. mention exacte de la localité où la plante a été évaluée, pour qu'elle puisse être facile à identifier;
5. quantité de matière première sèche, exprimée en kilos ou

tonnes, qu'on recommande de mettre en valeur pour l'espèce respective.

L'opération suivante est la cartographie proprement-dite. Elle consiste à inscrire les fiches sur une carte à l'échelle 1:50.000 ou 1:100.000 sous forme de cercles de différents diamètres. A l'intérieur des cercles, qui peuvent être divisés en secteurs, on notera les quantités de matière première évaluée, en utilisant des symboles qui dérivent des initiales du genre et de l'espèce, des signes conventionnels ou des chiffres.

En Annexe 3 on donne quelques exemples d'une carte économique portant ces notations.

Après avoir terminé l'inventaire économique d'un pays ou d'une zone géographique plus étendue et exactement délimitée, on dessinera une carte du pays ou de la zone géographique pour chaque espèce, en notant par symboles la fréquence (fréquent, rare ou intermédiaire) de l'espèce respective. Nous recommandons d'élaborer ces cartes suivant la projection U.T.M. (Universal Transverse Mercator) connue aussi sous le nom de Gauss-Küger. Ce système offre de nombreux avantages parmi lesquels la possibilité de raccorder les cartes élaborées avec la carte du continent et du globe.

IV. IMPORTANCE THEORIQUE ET PRATIQUE DE L'INVENTAIRE ECONOMIQUE

Deux aspects principaux se détachent de notre exposé. Un premier aspect est d'ordre théorique et est représenté par la notation exacte de la propagation des plantes dans une zone géographique strictement délimitée (la notation figure sur les cartes élaborées et le texte qui accompagne les travaux de l'inventaire). Outre la localisation des plantes sur les cartes, on peut également étudier les associations végétales. Les données obtenues par les analyses de laboratoire permettent de caractériser les individus (différents du point de vue chimique, "chemotaxons") dans le cadre d'une espèce. Toutes ces données permettent d'élaborer une banque génétique des variétés de

plantes médicinales et aromatiques très précieuses.

Le deuxième aspect est d'ordre pratique. Les informations qui ont servi à effectuer l'inventaire et la cartographie économique peuvent également être utilisées pour programmer une mise en valeur rationnelle des ressources naturelles de plantes médicinales et aromatiques. Ceci permet l'implantation d'unités industrielles d'extraction des substances actives ou aromatiques des plantes. Dans ce sens nous soulignons que pour une unité industrielle, petite ou moyenne, il faut assurer la matière première pour 10 ans au moins.

Les données de l'inventaire économique représentent aussi des indications utiles pour l'emplacement futur des cultures de plantes médicinales, tenant compte des conditions pédo-climatiques requises par certaines plantes. Grâce aux informations analytiques obtenues sur la flore spontanée, on peut récolter un matériel de multiplication de valeur, destiné aux futures cultures de plantes médicinales.

En concluant, nous désirons souligner que l'inventaire et la cartographie de la flore médicinale spontanée a pour but surtout la protection des espèces, la protection de la nature. Ce but ne peut être atteint qu'étayé par les données fournies par ce travail, car le sens véritable de la mise en valeur de la flore d'un pays consiste en la protection et l'exploitation rationnelle de cette richesse naturelle.

Exemples de notation des données concernant
les plantes médicinales sur un terrain de
Roumanie

POLYPODIACEAE

Dryopteris filix-mas (L.) Schott - Rhizoma = 1125 Kg
Vallée de Porcu (50). Vallée de Hărăbaru (25). Vallée
de Sușiței (200). Vallée de Suseni (200). Vallée de Sohodol
(50). Chemin forestier Bîlta-Arcanu et ramifications (150).
Vallée de Bistrița, vallée de Bistricioara (350). Vallée de
Pocruia (100).

Pteridium aquilinum (L.) Kuhn - Radix = 22.050 Kg
Vallée de Jiu, rive droite (250). Vallée de Porcu (100).
Vallée de Vîjoaia, vallée de Viezuroiu, vallée de Hărăbaru
(1550). Chemin Schela-Vîlcan, jusqu'au sommet Zănoaga (10.000).
Vallée de Sușița (500). Vallée de Suseni, chemin forestier
Igirosu-Fîntîna Plaiului (500). Chemin forestier Bîlta-Arcanu
(5000). Vallée de Bistricioara (50). Colline Rotocol, sommet
Piscuri, colline Gura Plaiului (1100). Vallée de Pocruia (700).
Vallée de Motru, rive gauche (300).

BETULACEAE

Corylus avellana L. - Folium = 28.150 Kg
Vallée de Jiu, rive droite, vallée de Brațcu (1600).
Vallée de Porcu (750). Vallée de Sușița (2500). Vallée de
Suseni, chemin forestier Igirosu-Fîntîna Plaiului (2450).
Vallée de Sohodol (1250). Chemin forestier Bîlta-Arcana et
ramifications (750). Vallée de Bistrița, vallée de Bistri-
cioara (4700). Vallée de Piscuri, colline Gura Plaiului (500).
Vallée de Tismana (8000). Vallée de Pocruia (1500). Vallée
de Alun, vallée de Motru, rive gauche (4150).

Betula verrucosa Ehrh. - Folium = 19.000 Kg
Vallée de Jiu, rive droite, vallée de Brațcu (2000).
Vallée de Porcu, jusqu'au sommet Zănoaga (1500). Vallée de
Sușița (13.750). Vallée de Sohodol (1000).

FICHE MODELE

pour noter les informations de la médecine traditionnelle

No. du code	Nom scientifique de la plante et de la famille	Noms populaires communs	Partie utilisée de la plante	Dans quelle affection elle est recommandée	Mode d'emploi empirique	Nom de la personne qui a fourni l'information	Nom du chercheur qui a recueilli l'information	Endroit exact où pousse la plante	Autres observations
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

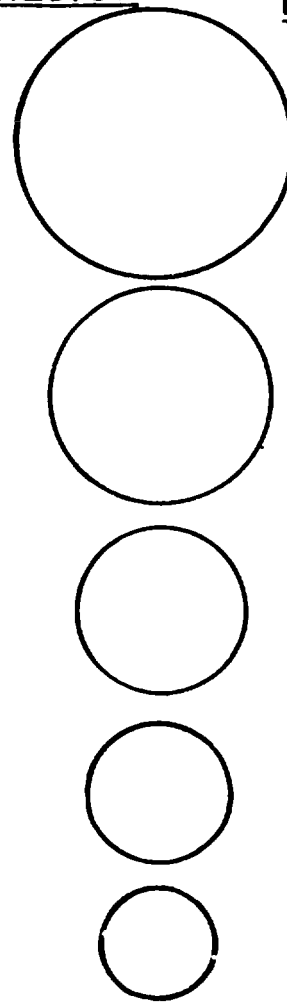
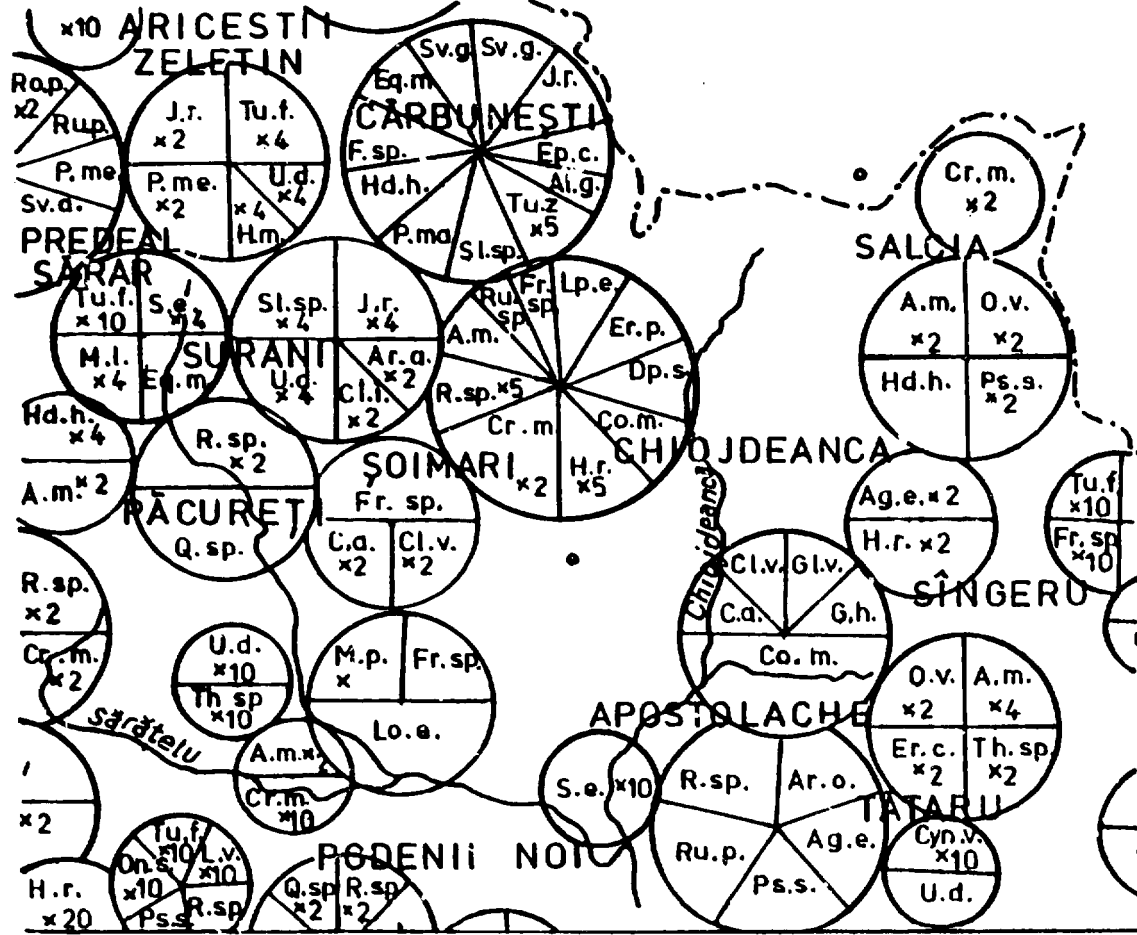
Indication pour compléter la fiche :

1. Chaque espèce portera un numéro de code qui sera aussi mentionné sur la planche de l'herbier et sur l'échantillon prélevé pour être étudié.
2. Le nom scientifique sera donné aussi complètement que possible. En cas de synonymes, ils seront aussi mentionnés. Si l'espèce n'a pu être identifiée sur le terrain, on écrira seulement le numéro du code, l'identification botanique étant effectuée ultérieurement au laboratoire. On spécifie si elle appartient à la flore cultivée ou spontanée.
3. Noms de la plante dans le dialecte local .
4. Racine, tige, feuilles, etc., et stage végétatif de la plante au moment où elle est récoltée pour être utilisée.
5. Toutes les informations, tenant compte du nom local, de l'affection et de l'organe affecté.
6. Infusion, décoction, usage externe, etc., et mode d'emploi.
7. Nom, prénom et adresse exacte.
8. Détermination très précise de la zone où pousse l'espèce, éventuellement en ajoutant un croquis de la localité.

CARTE ÉCONOMIQUE D'UNE RÉGION

Légende des cercles

Quantité de matière première sèche qu'on recommande de mettre en valeur.



Légende des codes utilisés:

Ud = Urtica dioica
 R.sp. = Rosa species
 Ru.p. = Rubus plicatus
 Tu.f. = Tussilago farfara
 etc...

CUEILLETTE, DESSICCATION, CONDITIONNEMENT PRIMAIRE
ET CONSERVATION DES PLANTES MEDICINALES: TECHNIQUES
ET ASPECTS ECONOMIQUES

Mircea Alexan⁺)

⁺) Biologiste, chef du Département Flore spontanée
au Trust "Plafar", Bucarest, Roumanie

I. PRINCIPES D'ORGANISATION

La mise en valeur des plantes médicinales représente une alternative thérapeutique très importante pour les pays en développement, car les médicaments de synthèse importés ont, le plus souvent, des prix prohibitifs pour la majorité de la population. Dans ce but, on commence par évaluer les quantités de plantes médicinales ou de préparations simples nécessaires à la population du pays. Sans exiger une dotation technique prétentieuse, cette activité peut procurer un apport important de devises étrangères, d'autant plus que la demande de plantes médicinales et aromatiques augmente d'une façon continue sur le marché international.

En organisant cette activité, on contribue également à résoudre d'importants désidérata de nature sociale, c'est-à-dire assurer des emplois permanents ou temporaires même à des personnes sans qualification professionnelle, ou ayant un pouvoir physique réduit (personnes âgées).

L'organisation pratique de cette activité exige quelques actions préliminaires visant à déterminer quels espèces, produits et quantités de plantes médicinales sont nécessaires, quel potentiel présente une zone donnée, comment recruter et instruire le personnel, comment assurer une base matérielle minimale; il faut élaborer en même temps les conditions techniques de réception qui indiquent comment chaque produit doit se présenter pour pouvoir être mis en valeur.

A. Détermination des quantités nécessaires de plantes médicinales

1. Quantités nécessaires pour la consommation interne

En examinant sur des bases scientifiques les connaissances de la médecine traditionnelle locale et en faisant appel à la bibliographie de spécialité des pays à riche tradition, il est nécessaire de faire d'abord une liste de spécialités réclamant certaines plantes médicinales. La forme la plus simple par laquelle on peut débiter sont les tisanes ou décoctions contenant

une seule espèce, en passant ensuite aux breuvages basés sur des combinaisons de plusieurs plantes à actions synergiques ou complémentaires et, dans une phase plus avancée, aux formes pharmaceutiques simples (teintures, extraits, sirops, extraits d'huiles essentielles). Avec le temps, à mesure que l'industrie pharmaceutique se développe, les plantes peuvent devenir matière première pour cette industrie.

On fixe ensuite les quantités nécessaires, en passant des contrats avec le réseau qui vend ces produits pharmaceutiques, ou même avec les grands magasins alimentaires etc., et l'on peut envisager la création de magasins spécialisés qui vendent ces produits.

On fait des offres à certaines branches industrielles qui peuvent utiliser ces produits.

En Roumanie, les quantités nécessaires pour la consommation interne représentent:

- (a) les quantités nécessaires à l'industrie pharmaceutique en plein essor, qui en a la priorité, car elle met le mieux en valeur les plantes médicinales;
- (b) les quantités utilisées dans d'autres branches industrielles (cosmétique, parfumerie, aliments etc.);
- (c) les quantités vendues par le réseau pharmaceutique (chaque pharmacie a un rayon de plantes médicinales, ayant subies une opération primaire, pour préparer les tisanes ou decoctions simples ou mixtes);
- (d) les quantités vendues par un réseau spécialisé, qui avait seulement douze magasins il y a 15 ans, dans les grands centres et qui s'est développé depuis pour compter actuellement quelques 55 magasins; pour les petites localités on pratique le commerce par colis postaux.

2. Evaluation des exportations possibles

Les grandes firmes des pays ayant un commerce développé de plantes médicinales (la R.F. d'Allemagne d'abord, qui a les plus importantes maisons de commerce en gros et qui réexportent dans d'autres pays, constituant une véritable "plaque tournante";

ensuite la France, l'Italie, la Suisse, l'Autriche, l'Angleterre, les Etats Unis etc.) sont sollicitées à envoyer des listes avec des plantes dont elles ont besoin pour analyser les possibilités de les satisfaire.

A cause de la stricte spécialisation, du grand nombre de firmes à contacter, de la variété des assortiments, les problèmes concernant le placement des produits ne peuvent être résolus par les représentations commerciales du pays producteur; c'est pourquoi nous optons pour la prise de contact avec des agents spécialisés du pays importateur.

A mesure qu'on pénètre sur les marchés respectifs, on peut apprécier quels sont les produits à demande constante, qui n'impliquent pas de risques commerciaux et quels sont les produits de conjoncture, qui ne seront préparés que sur demande.

En additionnant les quantités nécessaires dans le pays et les quantités destinées à l'exportation, on obtient des données permettant de constituer autant de portefeuilles de commandes (ou possibilités de placement) que d'espèces.

B. Comment obtenir les données sur le potentiel d'exploitation de la flore spontanée

Les premières sources d'information sont les publications sur la flore de la région respective, l'expérience de certaines organisations, les réponses à des questions exactes de certains habitants de différentes zones d'une région. On fait ensuite des explorations pour dépister les endroits où se trouvent les plantes qui présentent de l'intérêt et l'on prend en considération seulement les endroits qui peuvent fournir des quantités importantes et qui constitueront des "bassins de récolte".

Dans une deuxième étape, plus complexe, exigeant des spécialistes (biologistes, pharmaciens), on dresse la carte du territoire, en y mentionnant l'évaluation quantitative du potentiel pour toutes les espèces intéressantes, les noms exacts des localités où se trouve le bassin et les quantités qu'on estime pouvoir récolter. C'est une opération laborieuse, qui devra être exécutée par étapes, en divisant le territoire respectif en régions qui peuvent être parcourues plusieurs

fois par l'équipe de chercheurs scientifiques, dans diverses périodes de l'année, pour surprendre la végétation sous tous ses aspects.

On commence depuis les régions d'intérêt maximum, plus accessibles, ayant disponible la main d'oeuvre nécessaire pour la cueillette, et l'on passe, au cours des années, à d'autres régions, de sorte que, finalement, tout le potentiel de la zone soit inventorié. Après certains intervalles, on revoit les cartes pour certaines espèces très intéressantes, dont le potentiel d'exploitation peut se modifier à cause du changement des conditions écologiques, qui exercent une influence sur la végétation, soit à cause d'une exploitation excessive.

Parallèlement à l'appréciation quantitative du potentiel des bassins, on prélève des échantillons pour analyser la teneur en principes actifs, de sorte que l'exploitation soit prioritaire dans les bassins où les plantes sont les plus riches en ces principes.

C. Organisation d'un réseau de cueillette

1. Personnel nécessaire

Ce personnel comprend trois catégories: le personnel technique de coordination, les collecteurs et les cueilleurs. Du point de vue de leur nombre, ils représentent une pyramide ayant une base large (les cueilleurs), se rétrécissant beaucoup pour les collecteurs (un collecteur ramasse les produits de quelques centaines de cueilleurs), le sommet étant formé d'un nombre réduit de personnel de coordination.

(a) Le personnel technique de coordination comprend des cadres à formation supérieure (biologistes, botanistes, pharmaciens) ou moyenne.

Quant aux attributions, ils

- . mettent d'accord les sollicitations internes et externes avec les possibilités réelles d'exploitation et transmettent aux collecteurs le nécessaire;
- . dépistent les bassins de cueillette;
- . établissent les méthodes de la cueillette;

- . déclenchent les campagnes de cueillette au moment le plus propice;
- . établissent les conditions de réception des plantes;
- . établissent des instructions pour les collecteurs et cueilleurs, rédigent des matériaux documentaires de spécialité et instruisent pratiquement les collecteurs;
- . surveillent la qualité et la quantité des produits obtenus.

(b) Les collecteurs représentent un personnel à double fonction: technique - parce qu'ils guident les cueilleurs- et économique, car ils ont la tâche d'acquitter aux cueilleurs la contre-valeur des produits cueillis. Les collecteurs doivent avoir un minimum d'instruction, à savoir la connaissance des quatre opérations arithmétiques.

Les collecteurs peuvent être stables, recrutés parmi la population locale des zones où se trouvent d'importants bassins, ou bien itinérants, qui sont envoyés pour organiser, en fonction des nécessités, la cueillette de diverses espèces dans différents bassins.

Leur rémunération peut être représentée par une somme fixe, ou par un pourcentage sur la valeur du produit cueilli, de sorte qu'ils soient stimulés à fournir des quantités toujours plus grandes.

Attributions:

- . en fonction des tâches transmises par le personnel technique de spécialité, ils organisent des équipes de cueilleurs pour certaines plantes;
- . décident quel est le moment optimum pour la cueillette;
- . dirigent les cueilleurs à utiliser les méthodes les plus adéquates pour cueillir, de sorte à obtenir des produits de bonne qualité;
- . organisent et surveillent la dessiccation des produits par voie naturelle;
- . effectuent la réception des produits apportés par les cueilleurs, tout en surveillant la qualité et la quantité conformément aux conditions techniques;
- . font des opérations bancaires: reçoivent l'argent que

la firme envoie pour acheter les plantes aux cueilleurs, paient ceux-ci pour les produits livrés, justifient les fonds reçus et retournent l'argent non dépensé.

(c) Les cueilleurs représentent la masse qui se trouve à la base de l'activité. Pour leur travail ils ont besoin d'une instruction leur permettant de reconnaître les produits cueillis, les méthodes de cueillette, de préconditionnement et de dessiccation par voie naturelle, les conditions requises lors de la livraison des plantes, etc. Un grand avantage de l'activité visant à cueillir les plantes médicinales c'est qu'elle sollicite des efforts physiques modérés, ce qui permet d'employer comme main d'oeuvre non seulement des hommes, mais aussi des femmes, des enfants et des personnes âgées.

Au fur et à mesure que l'activité se développe, il est nécessaire de créer un petit groupe de cueilleurs permanents, pour qui la cueillette des plantes médicinales soit l'occupation principale et qui puissent être envoyés, au besoin, pour certains intervalles de temps, dans d'autres bassins pour effectuer la cueillette.

La plupart des cueilleurs sont toutefois des journaliers, qui cueillent seulement dans des bassins se trouvant dans le stricte voisinage de leur domicile, cette activité étant auxiliaire pour eux, une source de gains supplémentaires.

2. La base matérielle nécessaire pour organiser la cueillette des plantes médicinales

(a) Les centres de collecte peuvent se trouver dans la maison du collecteur ou dans des pièces qui appartiennent à la firme, ou sont louées par celle-ci. Le centre doit avoir une pièce propre, bien aérée, dépourvue d'humidité et d'animaux nuisibles, pièce destinée à entreposer les plantes. La dotation comprendra:

- . des balances (pour des poids entre 0,1 et 100 kg);
- . des emballages spécifiques pour les plantes livrées (caisses, corbeilles, sacs en toile ou en papier);
- . quelques outils simples à cueillir, ou destinés à des travaux auxiliaires (sécateurs, bêches, échelles, etc.);
- . des châssis, ou autres dotations pour sécher naturellement les plantes;

- . des formules pour tenir l'évidence des quantités reçues, de l'argent dépensé, etc.;
- . certains matériaux de réclame (affiches, dépliants, brochures sur les plantes qu'on récolte).

(b) L'entrepôt central de la firme sert à centraliser les produits qui viennent des centres de collecte, à conditionner les produits, à les préparer, emballer, marquer et expédier aux bénéficiaires. Avec le temps, auprès de ces entrepôts, pourront se développer des unités de transformation, où l'on préparera les plantes pour obtenir des produits peu complexes (tisanes, ou décoctions simples ou complexes emballées, sirops, huiles volatiles). Un tel entrepôt doit avoir la dotation suivante:

- . des balances (pour des poids entre 0,5 et 1000 kg et, si possible, des bascules);
- . des tables, servant à manipuler les plantes;
- . des outils à couper, car la plupart des produits seront réduits en menus morceaux. Lorsque les morceaux ont 6 à 10 mm de longueur, la valeur du produit respectif augmente de 20 à 30%. De tels outillages de grande capacité étant chers se trouveront seulement dans les grands entrepôts;
- . des châssis, ou autres moyens pour la dessiccation naturelle du produit;
- . séchoirs pour dessiccation artificielle;
- . presses mécaniques ou manuelles pour faire des ballots;
- . emballages spécifiques (caisses, sacs en toile ou en papier);
- . moyens de transport pour les personnes ou les marchandises. Les moyens de transport servant à dépister de nouveaux bassins, à relier les centres de collecte, à collecter les plantes, etc. sont la propriété de la firme ou sont louées par celle-ci.

3. L'expérience roumaine dans l'organisation d'un réseau d'acquisition

La Roumanie a une vieille tradition dans la cueillette organisée des plantes médicinales, datant des années d'après

la première guerre mondiale, période où se sont constituées les premières firmes spécialisées.

À partir de 1948, depuis que cette activité a été étatisée, elle s'est beaucoup développée, de sorte qu'à présent la Roumanie figure parmi les premiers huit pays du monde, d'après la quantité mise en valeur et parmi les premiers cinq, d'après le nombre d'espèces qu'on y exploite. Outre quelques conditions naturelles qui ont favorisé cette action (flore particulièrement riche, grâce à un relief très varié), une organisation unitaire dans ce domaine a joué un rôle important, car elle offre de nombreux avantages sur les petites firmes dispersées un peu partout et qui agissent indépendamment. Ces principaux avantages sont les suivants:

- . possibilité d'obtenir par la coopération un grand nombre d'espèces et des quantités suffisantes pour intéresser l'industrie autochtone et les clients étrangers, tandis que les petites firmes d'autrefois travaillaient sur des territoires réduits, obtenaient un nombre réduit d'espèces et en quantités réduites;
- . obtention, grâce à la coopération entre plusieurs unités, des mêmes produits;
- . utilisation plus judicieuse et plus économique de la base matérielle, des équipements complexes;
- . possibilité de concentrer un personnel hautement qualifié à continuer le développement et la diversification des espèces exploitées.

L'organisation spécialisée - appelée le Trust "Plafar" - coordonne l'activité de 10 entreprises, qui couvrent tout le territoire du pays; chaque entreprise rayonne sur 2 à 6 départements⁺) et s'occupe simultanément à cueillir la flore spontanée, à cultiver certaines espèces et à lancer des produits sur le marché.

Le secteur spécifique pour la cueillette des plantes de la flore spontanée est coordonné par un département spécialisé du Trust, formé par des biologistes, botanistes et pharmaciens. Ceux-ci, basés sur les quantités des produits qu'on demande

+) La Roumanie est divisée en 41 départements (M.A.)

et connaissant le potentiel de toutes les zones, transmettent les commandes à chaque entreprise séparément (certaines plantes très sollicitées peuvent être cueillies en quantités illimitées, au-dessus des prévisions planifiées).

Les entreprises comprennent aussi un compartiment spécialisé, ayant un rôle de coordination, avec un personnel technique réduit en nombre. Il y a ensuite les techniciens qui guident directement sur terrain les collecteurs sous tous les aspects techniques que ceux-ci peuvent rencontrer et vérifient leur activité.

Les collecteurs sont au nombre de 7 à 25 pour chaque département, en fonction de la richesse en plantes de la flore respective, couvrant ainsi virtuellement toutes les localités du département. De plus en plus de collecteurs s'occupent en dehors de la cueillette, de la dessiccation naturelle quand les cueilleurs livrent les produits à l'état frais. Ceci est très important, surtout dans la conjoncture mondiale actuelle qui exige une grande économie de combustible. Les collecteurs organisent des équipes de cueilleurs qui représentent des milliers de personnes en période de pointe.

Notre expérience a montré qu'il est possible d'entraîner les enfants des écoles dans cette activité éducative et économique à la fois, l'argent obtenu de cette manière étant employé à procurer des accessoires de sport, à organiser des excursions, etc.

Pour toute son activité "Plafar" maintient des relations étroites avec l'Institut pour le Contrôle d'Etat des Médicaments et de Recherches Pharmaceutiques, car en Roumanie les plantes médicinales sont soumises aux mêmes règlements que les médicaments de synthèse. L'institut donne son concours à la mise en valeur de la flore spontanée, par les cartes que ses chercheurs dressent, l'analyse de la teneur des plantes en principes actifs, etc. "Plafar" est aussi en contact avec les facultés de biologie, pharmacie, agronomie etc. du pays.

D. Elaboration des conditions techniques de réception

En organisant la cueillette des plantes médicinales de la flore spontanée, une étape obligatoire est l'élaboration de certaines normes de qualité, qui doivent être connues par tout le personnel, y inclus par les cueilleurs, pour pouvoir apprécier la qualité du produit fourni et payer le produit pour ce qu'il vaut réellement.

Les normes devront spécifier:

- . le nom populaire du produit;
- . le nom scientifique (latin), aussi bien que l'espèce, ce qui est très important, car les noms populaires peuvent être différents dans chaque zone;
- . la description du produit, pour pouvoir être identifié et distingué d'autres plantes similaires;
- . la teneur maxima en impuretés (impuretés étant considérées les parties de mauvaise qualité, ou celles qui ne sont pas utilisées à des fins médicales);
- . la teneur maxima en matières organiques étrangères (parties provenant d'autres plantes que celles qui font l'objet de la cueillette);
- . la teneur maxima en matières minérales (poussière, cailloux etc.);
- . l'humidité maxima admise.

Voici, pour exemplifier, une fiche de conditions techniques:

<u>Absinthii Herba</u> Absinthe	ARTEMISIA ABSINTHIUM L.
Aspect: le bout des tiges a des fleurs jaunes et des ramifications latérales grosses de 4 mm au plus; la tige a une couleur gris-argentée, les feuilles veloutées à nervures grises sur la face supérieure et argentées sur la face inférieure. Odeur caractéristique. Saveur aromatique, très amère.	
Impuretés: feuilles brunies ou jaunies.....	max. 2%
tiges plus grosses que 4 mm	max. 4%
Corps étrangers - minéraux	max. 0,5%
- organiques	max. 1%
Humidité	max. 13%

Pour établir ces conditions on tient compte des spécifications des Pharmacopées et des prétentions des bénéficiaires.

En règle générale, la manière dont on instruit et dirige continuellement les cueilleurs fait que les produits apportés répondent aux conditions admises et les cueilleurs reçoivent, en ce cas, le prix maximum pour la plante respective.

Si toutefois le produit ne correspond pas aux exigences, le cueilleur doit préparer (conditionner) encore une fois le produit, ou bien il reçoit un prix dont on déduira un pourcentage proportionnel aux défauts que le produit présente.

Le collecteur fait des appréciations organoleptiques ou des appréciations basées sur son expérience.

Lorsqu'il y a des doutes sur un produit, on pèse un échantillon moyen de 1 kg, on sépare ensuite les impuretés et les corps étrangers, que l'on pèse séparément; on fait ensuite les déductions respectives.

Pour apprécier si un produit est suffisamment sec, on plie la plante: si elle a perdu son élasticité et casse aisément, avec un petit bruit sec, on considère qu'elle est suffisamment sèche.

Chaque paramètre sera vérifié et pour chaque défaut on fait des déductions qui s'accroissent finalement.

Nous soulignons toutefois qu'il est préférable d'imposer une grande exigence aux cueilleurs, ce qui aidera ensuite le conditionnement du produit dans l'entrepôt.

Les produits qui ont de grands écarts par rapport aux conditions requises, ou qui contiennent de corps étrangers formés des plantes toxiques seront repoussés.

II. TECHNIQUES DE CUEILLETTE DES PLANTES MEDICINALES DE LA FLORE SPONTANEE

Les plantes médicinales sont cueillies pour les parties suivantes:

- . fleurs (flores ou flos);
- . feuilles (folium);
- . partie aérienne (herba) ou seulement le sommet de la plante (summitates);
- . racines et rhizomes (radix et rhizoma);
- . fruits (fructus);
- . semences (semen);
- . écorce (cortex);
- . bourgeons (turiones ou gemmae).

A. Moment opportun pour commencer la cueillette

La teneur du produit en principes actifs est grandement influencée par la période de la cueillette, car en période optima dans l'organe respectif de la plante il y a une accumulation maxima de principes actifs. Les variations de la teneur en principes actifs sont grandes, tant pendant la période de végétation, qu'au cours d'une même journée: il y a donc deux catégories de moments opportuns, en fonction du stade de la végétation de la plante et de la période de la journée.

Les plantes cueillies avant le moment opportun n'ont pas encore atteint le potential optimum de l'espèce respective et, si le moment est dépassé de quelques jours seulement, les produits ne répondent plus aux exigences (fleurs qui préparent des fruits, feuilles tachées, racines sèches), l'aspect respectif étant en étroite corrélation avec une teneur réduite en principes actifs. Parfois on peut manquer complètement la possibilité de cueillir une plante (qui a perdu ses feuilles ou ses graines etc.).

L'une des principales tâches du personnel technique et des collecteurs est de savoir quels sont les moments opportuns pour la cueillette de chaque espèce.

1. Moment opportun au cours de la période de végétation

Ce moment dépend des facteurs suivants:

(a) Conditions atmosphériques. À cause des différences qui existent d'une année à l'autre, la croissance d'une espèce donnée découle différemment, les diverses phénophases se produisant à des dates variées. En Roumanie, par exemple, la

floraison de quelques espèces peut avoir lieu en retard de 15 à 20 jours, si la température est basse et les jours ensoleillés moins nombreux que d'habitude. Les conditions atmosphériques font également que les périodes de cueillette soient différentes, pour la même espèce dans les différentes zones du pays.

(b) La latitude influence elle aussi, car plus au Sud les températures moyennes plus hautes accélèrent la végétation. En Roumanie même, pays à surface relativement petite (entre ses extrémités sud et nord il y a 4° de latitude), il y a pour la même espèce une différence de 2 à 3 semaines environ pour atteindre la même phénophas.

(c) L'altitude: les différences d'altitude ont le même effet que les différences de latitude.

(d) L'exposition influe par le fait que les pentes exposées au soleil ont une végétation plus avancée, car elles reçoivent une plus grande quantité d'énergie calorifique et lumineuse.

(e) Les conditions de sol sont importantes, car les terres légères, ameublées, sablonneuses s'échauffent plus facilement et permettent une croissance plus rapide que les terres lourdes, compactes.

Pour chaque groupe de produits il existe un certain stade optimum pour la cueillette:

(a) Le groupe flores (fleurs) doit être cueilli au début de la floraison (un nombre de fleurs étant encore à l'état de bourgeon), ou quand la floraison atteint son maximum. Ce groupe exige une grande attention, car chez certaines espèces la floraison dure quelques jours seulement.

(b) Le groupe folium (feuilles) est cueilli quand les feuilles sont mûres, c'est-à-dire quand elles atteignent la forme, la couleur et la dimension normales. La période de cueillette est plus longue, mais lorsqu'on la dépasse les feuilles prennent des taches ou changent de couleur (brunissement).

(c) Le groupe herba (parties aériennes) est cueilli, en règle générale, pendant la floraison, avant les fruits.

— — —

(d) Le groupe radix et rhizoma (racines et rhizomes) est cueilli pour les plantes qui ont un repos végétatif annuel pendant deux périodes: soit avant le début de la végétation, soit après la fin de celle-ci et la chute des feuilles, c'est-à-dire quand les substances de réserve (substances actives y compris) sont accumulées dans les organes souterrains. S'il est cueilli en pleine végétation, il est sec, car les substances de réserve ont migré dans les parties aériennes.

(e) Le groupe cortex (écorce), tout comme pour les plantes au repos végétatif, est cueilli quand le processus végétatif démarre, car la sève circule alors abondamment et permet aisément de séparer l'écorce du bois.

(f) Le groupe turiones ou gemmae (bourgeons) est aussi cueilli au début de la période de végétation, avant que les bourgeons ne s'ouvrent, lorsqu'ils sont encore gluants à cause des substances résineuses.

(g) Le groupe fructus (fruits) est récolté quand les fruits sont complètement mûrs, ayant la couleur et l'arôme caractéristiques. En dépassant ce moment, on obtient des produits inadéquats, trop mûrs; parfois, la récolte est obtenue en secouant les arbres. Pour certains fruits, qui restent encore attachés aux branches, après leur mûrissement, on peut retarder la récolte, pour permettre aux fruits de perdre une partie de leur humidité.

Quand il est possible, on peut suivre la dynamique de l'accumulation des principes actifs en faisant au laboratoire des analyses répétées des parties à récolter et en déclenchant le moment de la cueillette en fonction des résultats des analyses.

2. Moment optimum au cours de la journée

On cueille de règle après la disparition de la rosée, par temps sec, l'humidité pouvant détériorer les produits.

La teneur en alcaloïdes et surtout en huiles volatiles varie beaucoup suivant les espèces; ce facteur doit être étudié, afin de fournir des indications sur la période optimale de cueillette.

3. Méthodes de cueillette

Les méthodes utilisées pour cueillir sont, en général, manuelles.

1. Flores

- (a) Par pincage, c'est-à-dire la séparation de chaque fleur ou inflorescence autant que possible sans queue;
- (b) par secouement ou battage, pour les fleurs qui se séparent aisément de leurs branches;
- (c) par coupe au couteau ou aux cisailles ordinaires, pour les inflorescences qui se détachent difficilement et ont un pédoncule plus gros;
- (d) à l'aide d'un sécateur attaché au bout d'une longue perche, pour les inflorescences des arbres;
- (e) à l'aide de "peignes" spéciaux, pour les plantes qui poussent en masse, ayant un grand nombre de branches et de fleurs.

2. Folium

- (a) Par pincage, en détachant chaque feuille avec une portion de pétiole aussi réduite que possible. C'est une méthode moins productive, mais qui permet d'obtenir des produits de très bonne qualité, car on choisit uniquement les feuilles adéquates, bien développées, qui n'ont pas été attaquées par des insectes nuisibles;
- (b) par égrenage, c'est-à-dire par le passage rapide de la main serrée le long d'une branche à feuilles (la main peut être protégée par un gant).

Cette méthode a l'avantage d'être rapide, mais aussi l'inconvénient de ramasser toutes les feuilles, celles inadéquates comprises.

3. Herba

On la coupe avec un couteau ou une faucille aux dimensions prévues dans les normes de réception. Chez les plantes ayant la tige lignifiée, on récolte les ramifications uniquement. Le produit est d'autant plus précieux qu'il a plus de fleurs.

4. Radix et rhizoma

On déterre les racines et rhizomes à l'aide d'une bêche ou d'une pioche. Si les plantes poussent en masse, dans un terrain qui n'est pas utilisé à d'autres fins, on déterre à l'aide de la charrue, les racines étant ramassées dans les sillons.

5. Fructus et semen

- (a) Les fruits charnus seront cueillis chacun séparément;
- (b) secouement ou battage, pour les fruits qui se détachent facilement;
- (c) coupe des inflorescences, pour les fruits qui poussent en grappes, ou autres formes d'inflorescences à fruits nombreux.

6. Cortex

- (a) On entaille l'écorce avec un canif, tout autour de la tige - en anneau - à 20 - 25 cm distance et ensuite on fait des entailles longitudinales, qui unissent les entailles circulaires. On en obtient des fragments en forme de tube ou de gouttière. La taille par copeaux est à déconseiller, car on peut entraîner des fragments de bois;
- (b) enlèvement des écorces qui se détachent très facilement. On cueille seulement les écorces lisses, sans fissures, des branches jeunes.

7. Gemmae (turiones)

On les cueillit par pinçage, en détachant exclusivement les bourgeons fermés.

C. Mesures spécifiques pour cueillir les plantes toxiques

Les cueilleurs seront instruits d'une manière spéciale quand on cueille des plantes toxiques, opération dont on excluera les femmes enceintes et les enfants.

On insistera sur le fait qu'il faut bien laver les mains au savon et à l'eau, après le travail et que c'est seulement après qu'il sera permis de fumer, manger etc.; on évitera de même de toucher avec des mains non-lavées les yeux, la bouche, le nez.

Pour certaines plantes particulièrement toxiques, on portera au nez des masques simples de gaze couvrant le nez.

On ne cueillira pas en même temps les plantes toxiques et ordinaires, pour éviter leur mélange (les ballots de plantes ordinaires dans lesquels on trouvera des plantes toxiques seront refusés et ensuite brûlés).

D. Problèmes concernant la conservation et le rétablissement du potentiel des bassins

L'exploitation des plantes médicinales doit se faire de telle manière que l'équilibre des écosystèmes ne soit pas troublé. À cette fin, on prendra une série de mesures pour maintenir le potentiel des bassins, pour le rétablir ou même l'augmenter. La plupart des problèmes concernent l'exploitation des parties souterraines (rhizomes, racines), car leur prélèvement signifie en même temps la disparition des plantes respectives; dans une certaine mesure seront affectées également les plantes dont on cueille les fleurs, fruits ou graines, ce qui réduit leur capacité de reproduction sexuée, lorsqu'on prélève les parties aériennes qui portent les fleurs et les écorces; par contre, la cueillette des feuilles et même des bourgeons affecte moins les plantes.

1. Mesures pour maintenir le potentiel des bassins

On recommande de:

- (a) cueillir par rotation les différents bassins;
- (b) laisser des plantes non-cueillies dans le bassin respectif;
- (c) laisser intacte à chaque plante une partie de ses fleurs et fruits;
- (d) enterrer immédiatement sur place le collet avec les bourgeons, quand on cueille les parties souterraines.

2. Mesures pour refaire ou augmenter le potentiel

Au cas où certains bassins sont affectés à cause d'une exploitation intensive, on cueillera les graines de l'espèce affectée, à la rigueur les plantes de la même espèce appartenant à d'autres bassins et on fera un sureensemencement dans le bassin en danger. On peut également faire des travaux

légers pour ameublir la terre, ce qui favorise la germination des graines.

S'il s'agit d'une espèce particulièrement importante, on peut répandre le matériel de reproduction sexuée ou végétative dans d'autres terrains, ayant des conditions écologiques similaires au bassin où la plante pousse spontanément.

III. TECHNIQUE DE DESSICCATION DES PLANTES MEDICINALES

A. Préparation des plantes médicinales avant dessiccation

Pendant la période de cueillette, les plantes sont mises dans des corbeilles ou des sacs textiles (on évitera de garder les plantes dans des emballages en plastique, dans lesquels les produits se dégradent rapidement). Avant dessiccation, on fait un préconditionnement du produit, car après l'opération s'avère plus difficile.

Le préconditionnement consiste à exécuter les opérations suivantes:

1. Pour les fleurs: on écarte les fleurs brunies ou décolorées, détachées ou avariées, les restes de fleurs ou de branches, ou d'autres plantes. Pour des quantités plus grandes, on peut utiliser des trieuses ou des tarares.
2. Pour les feuilles: on écarte les feuilles brunies ou avariées et les restes de branches.
3. Pour les parties aériennes: on détache les feuilles inadéquates, les fruits, les tiges sans feuilles, ligneuses, et l'on écarte les plantes étrangères.
4. Pour les racines et les rhizomes: on les lave obligatoirement et immédiatement à l'eau courante, pour écarter la terre, ensuite on coupe le collet et on éloigne les racines sèches ou avariées.
5. Pour les fruits et les graines: on éloigne les exemplaires avariés, ou ceux qui ne sont pas suffisamment mûrs, les feuilles et les restes des branches.

6. Pour les écorces: on écarte les exemplaires vieux et fissurés, on détache les fragments de bois.

3. Dessiccation des plantes médicinales

La forme la plus économique, surtout pour les pays au climat chaud, est la dessiccation naturelle; exécutée correctement, elle conduit à des produits de bonne qualité, particulièrement pour les plantes qui contiennent des huiles volatiles. La dessiccation artificielle est justifiée seulement pour les produits qui perdent les substances actives par dessiccation lente, ayant besoin de températures de 60 à 80° C ou même de 100° C, pour fixer les substances utiles et rendre inactives certaines enzymes qui ont une action dégradante ainsi que certaines substances toxiques; elle est également justifiée dans les situations où il s'agit d'une production particulièrement grande et l'espace disponible est trop réduit pour une dessiccation naturelle.

Par dessiccation on aboutit à une teneur de 10 à 13% d'eau, ce qui empêche le développement de la moisissure et des micro-organismes et permet la conservation du produit. Une bonne dessiccation peut être facilement reconnue, même sans appareils de laboratoire, en examinant le produit qui perd son élasticité et casse avec un petit bruit sec (c'est le cas des parties aériennes, des racines, des écorces).

La dessiccation doit être effectuée le plus vite possible après la cueillette.

1. Dessiccation naturelle

Les principales règles d'une bonne dessiccation naturelle sont les suivantes :

(a) on expose au soleil seulement les fleurs blanches et les racines, tandis que les fleurs colorées, les feuilles et les parties aériennes doivent sécher à l'ombre pour ne pas se décolorer;

(b) les produits sont disposés en couche fine, d'habitude sans les superposer, de sorte que sur 1 m², il y ait de 0,3 à

0,5 kg. de fleurs, 0,5 à 1 kg. de feuilles ou de parties aériennes et 1 à 2 kg. d'écorces ou de racines;

(c) les produits sont retournés tous les jours au commencement du processus de dessiccation et plus rarement, quand ils commencent à sécher pour éviter la fragmentation;

(d) on couvrira les produits par temps humide.

La dessiccation peut avoir lieu en plein air (avec la possibilité de couvrir d'une bâche les produits) ou dans des pièces aérées, propres sans odeurs étrangères qui pourraient imprégner les plantes, sans insectes ou plantes nuisibles; les pièces peuvent être couvertes de tôles en fer-blanc qui se rechauffent facilement et irradiant la chaleur accumulée.

La dessiccation naturelle peut s'effectuer de plusieurs manières :

(a) les plantes sont étalées sur toute la surface de la pièce, après l'avoir bien nettoyée et couverte de papier. C'est la dessiccation la plus simple qui n'implique pas de dotation spéciale, mais les quantités qu'on peut ainsi faire sécher sont très réduites;

(b) les plantes sont mises sur des châssis spéciaux de 1 x 0,70 m pour être faciles à manoeuvrer, à marges en bois plus élevées aux coins pour permettre leur superposition à des distances de 10 à 15 cm. Les châssis seront exécutés en filet de métal inoxydable, en lattes, roseaux et branches fines tressés ensemble, etc. Les châssis seront superposés en nombre de 10 à 15 jusqu'à une hauteur qui permette de les manipuler sans difficulté. Cette disposition permet d'agrandir la surface de dessiccation de 10 à 15 fois.

(c) les grosses feuilles, les racines et l'écorce peuvent être suspendues sur une corde pour sécher (procédé utilisé pour les feuilles de tabac).

2. Dessiccation artificielle

La dessiccation artificielle nécessite des installations spéciales qui utilisent surtout du combustible liquide ou du gaz naturel, plus rarement de l'énergie électrique.

Les principaux types de séchoirs sont :

- (a) le séchoir à l'air. L'air chaud chauffé dans une chaudière spéciale est poussé avec force par un ventilateur et passe par une bouche de ventilation du côté opposé (la simple utilisation d'un ventilateur sans air chauffé peut abréger la période de séchage);
- (b) le séchoir à vapeurs. L'agent de chauffage est la vapeur qui circule par des tuyaux jusqu'à la pièce où l'on fait la dessiccation;
- (c) le séchoir tunnel. L'espace de dessiccation a la forme d'un tunnel où l'on introduit 20-25 châssis superposés sur des charriots sur rails. Les portes du tunnel sont fermées d'une manière étanche et l'on introduit l'air chaud;
- (d) le séchoir à bandes. C'est le type le plus moderne. Le produit à sécher est mis dans une bouche d'alimentation et circule sur un système de bandes superposées, la température et la vitesse des bandes étant calculées de sorte que le produit soit complètement sec à la sortie;
- (e) le séchoir mécanique rotatif à châssis.

En dehors de ces séchoirs qui sont fixes, il y a également des séchoirs mobiles, disposés sur des remorques, qui présentent l'avantage de faire sécher le produit à l'endroit même où il est cueilli, en obtenant ainsi un produit de très bonne qualité.

IV. CONDITIONNEMENT PRIMAIRE DES PLANTES MEDICINALES

Excepté les produits qui sont sollicités comme tels par le marché pour d'autres on exige, après dessiccation certains conditionnements qui augmentent de beaucoup leur valeur.

A. On coupe les parties aériennes, les racines, les écorces et les feuilles en fragments longs de 5 à 15 mm. Si l'opération est faite correctement et uniformément, la valeur du produit augmente de 25 à 30%.

À cette fin, le produit coupé est passé par deux tamis,

un grand tamis dont les mailles ont un diamètre qui dépasse la dimension admise pour le produit; celui qui reste sur le tamis sera coupé de nouveau; un petit tamis dont les mailles ont le diamètre minimal admis. Le produit qui passe par ce tamis est écarté. Les pertes en produit peuvent atteindre approximativement 10 - 15%.

B. Poudres

Les poudres sont obtenues dans des moulins spéciaux, le produit devant être séché au préalable. Le produit passe ensuite par des tamis dont les mailles ont le diamètre de la dimension maxima admise. Ce qui ne passe pas par le tamis est introduit de nouveau dans le moulin. L'opération fait augmenter la valeur du produit de 30 à 40%, les pertes étant d'environ 20%.

C. Obtention de fragments de feuilles

On obtient ces fragments directement des feuilles ou de la partie aérienne; dans ce dernier cas on passe au tamis pour séparer les portions de la tige.

V. EMBALLAGE DES PLANTES MEDICINALES

Tous les produits, conditionnés ou non, destinés à la vente, sont emballés comme suit :

1. en ballots - tous les produits (exceptés les graines, les bourgeons et les plantes réduites en poudre), les plantes étant pressées manuellement ou à la presse mécanique et couvertes d'une toile ou reliées uniquement par un fil métallique. Les ballots sont en général de 50 kg. chacun;
2. en sacs de toile - les fruits et les graines;
3. en sacs de papier - les fleurs, les bourgeons, les fruits et les poudres;
4. en caisses - les fleurs et certaines feuilles qui doivent être livrées aussi intactes que possible.

Les emballages sont marqués par des étiquettes sur lesquelles sont marqués le nom du produit, le fournisseur, le

lot, le poids et autres données demandées par le client. Pour les caisses et les sacs, on peut coller des étiquettes ou inscrire à même leur surface les données respectives (une copie de l'étiquette sera introduite à l'intérieur).

Les emballages contenant des plantes toxiques auront inscrite une "tête de mort" et ne seront plus utilisés pour d'autres produits.

On n'utilisera plus pour d'autres produits les emballages ayant servi à emballer des plantes à odeur pénétrante qui pourrait imprégner d'autres plantes.

VI. CONSERVATION DES PLANTES MEDICINALES

La dessiccation permet de conserver les plantes dans de bonnes conditions. Les règles suivantes devront être observées :

1. les entrepôts doivent être propres, bien aérés et sans infiltrations d'humidité, avec une température basse et constante;
2. des mesures adéquates seront prises pour prévenir et combattre les insectes nuisibles. Dans ce but, l'entrepôt aura une annexe où les plantes peuvent être traitées aux substances chimiques avant d'être introduites dans l'entrepôt.

Les plantes pourront également être mises dans l'annexe si au cours de leur conservation dans l'entrepôt on a dépisté des insectes nuisibles, jusqu'à ce que ceux-ci soient détruits:

3. on conservera séparément, dans des compartiments spéciaux, les plantes toxiques;
4. on prendra des mesures pour prévenir les incendies, car les plantes médicinales sont très inflammables.

PART III

PRINCIPES FONDAMENTAUX POUR ETABLIR ET APPLIQUER
LES TECHNOLOGIES DE CULTURE AUX PLANTES
MEDICINALES ET AROMATIQUES

Florentin Crăciun⁺)

Constantin Dumitrescu⁺⁺)

⁺) Directeur général du Trust "Plafar", Bucarest, Roumanie

⁺⁺) Ingénieur agronome au Service des cultures du Trust
"Plafar", Bucarest, Roumanie

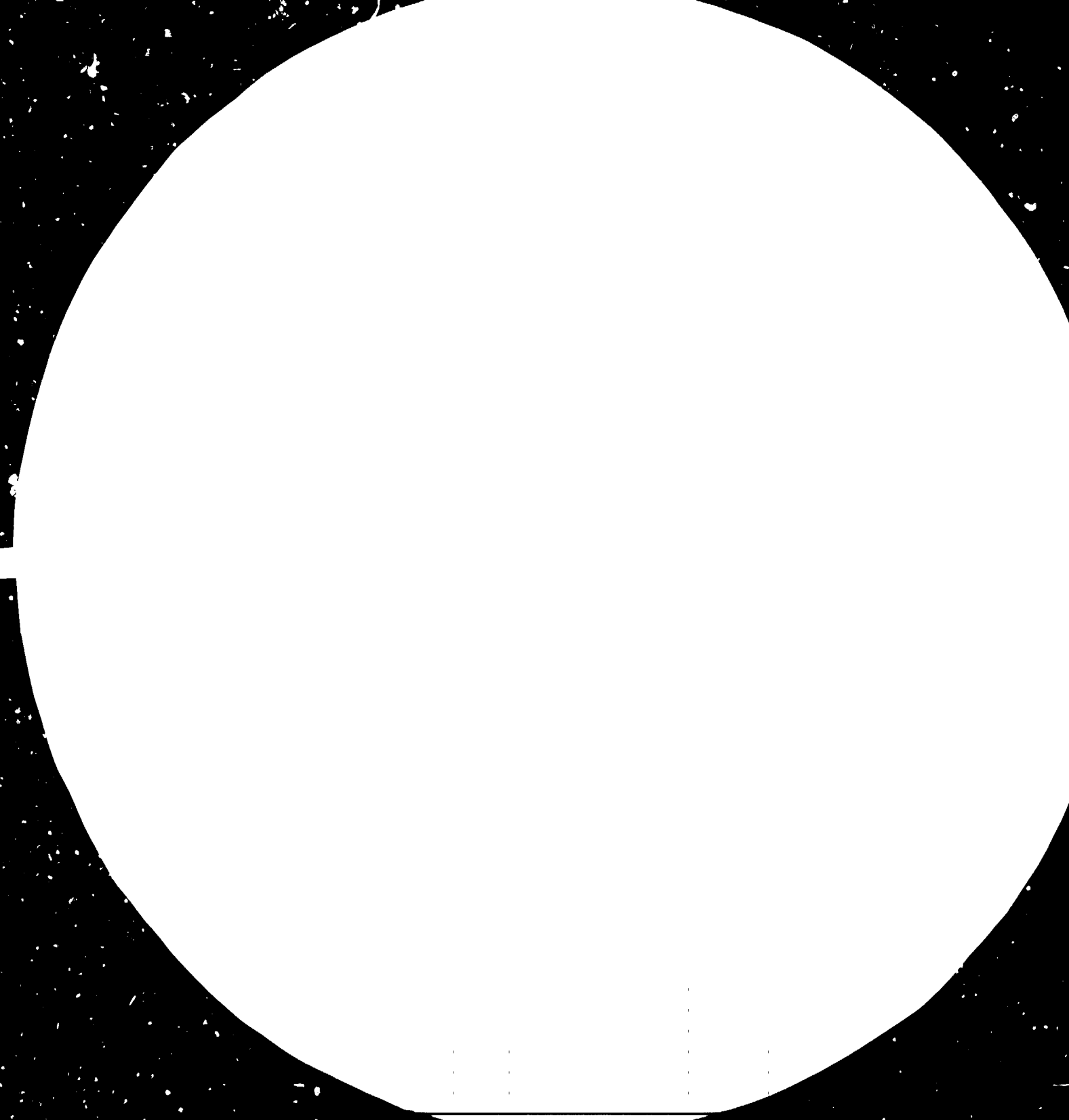
I. Importance des cultures de plantes médicinales
et aromatiques

Les plantes médicinales et aromatiques représentent une importante matière première des industries pharmaceutique, cosmétique et alimentaire. En effet, à partir de ces plantes on obtient une large gamme de médicaments à actions thérapeutiques spécifiques, des produits conditionnés, constituant eux-mêmes des substances médicamenteuses, ainsi que différentes huiles volatiles, ou d'autres produits utilisés en cosmétique ou dans la pratique pharmaceutique. Ces mêmes plantes servent à obtenir des extraits ou macérations utilisés dans l'industrie des boissons alcooliques et non-alcooliques, ainsi qu'une série de produits comme les tisanes ou les décoctions, simples ou combinées, divers condiments, sirops, etc., sollicités par les marchés.

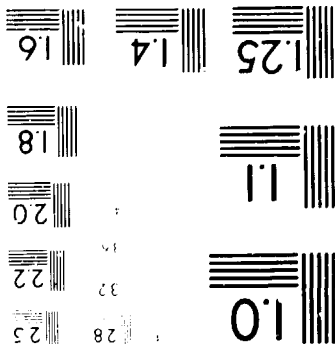
Dans les pays ayant une industrie pharmaceutique développée, la production de médicaments d'origine végétale occupe une place toujours plus importante. Les plantes médicinales et aromatiques, utilisées d'abord empiriquement et ensuite d'une façon scientifique, grâce à la découverte des substances actives qu'elles contiennent, suscitent un intérêt toujours plus grand dans le monde.

Bien qu'à présent l'industrie de synthèse des médicaments connaisse un développement spectaculaire, on assiste à un retour à la médication naturelle, surtout aux remèdes d'origine végétale. L'orientation de la thérapeutique vers des médicaments à base de principes actifs extraits des plantes se justifie par le fait que ceux-ci sont mieux tolérés par l'organisme humain et, qu'administrés correctement, ils ne donnent pas de réactions adverses.

L'importance sociale particulière de ces plantes justifie les efforts faits en Roumanie et ailleurs dans le monde pour promouvoir les plantes médicinales et aromatiques et en cultiver un nombre toujours plus grand. Le fait de cultiver des espèces qui jusqu'à une période assez récente appartenaient



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS-1963-A
U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 1963 O 454747



à la flore spontanée crée de nouvelles obligations mais offre, en même temps, certains avantages, comme par exemple:

- (a) possibilité de concentrer la production dans les zones les plus favorables du point de vue écologique pour les espèces cultivées;
- (b) conditions plus faciles de cueillette, les plantes étant concentrées sur des surfaces compactes;
- (c) possibilité de mécaniser les travaux agricoles;
- (d) obtention d'une production supérieure par unité de surface;
- (e) possibilités d'effectuer des travaux d'amélioration destinés à augmenter la quantité de principes actifs dans les plantes respectives, ainsi que leur masse végétale par hectare.

Un exemple dans ce dernier sens est représenté par les travaux d'amélioration appliqués à Claviceps purpurea; en fonction des sollicitations de l'industrie, qui a besoin de plusieurs types de principes actifs, on produit différentes souches qui contiennent plusieurs principes (ergotamine, ergotoxine, ergocryptine, ergocristine, ergocornine) utilisés dans divers médicaments à base d'ergot de seigle.

Ces avantages sont considérables et donnent la possibilité d'obtenir un volume plus grand de produits par rapport aux conditions offertes par la flore spontanée. De plus, la teneur augmentée en principes actifs, due aux travaux d'amélioration, permet un rendement supérieur des processus industriels, une efficacité économique plus grande de l'industrie.

En même temps, signalons quelques désavantages: on crée des conditions favorables au développement des maladies et des insectes nuisibles et la production coûte plus cher. Ces désavantages peuvent être évités par des mesures prophylactiques et destructives des nuisances et l'augmentation de la production par unité de surface, respectivement la réduction du prix de revient.

II. Travaux nécessaires pour mettre en culture
des plantes médicinales et aromatiques
appartenant à la flore spontanée

Chaque plante a ses exigences spécifiques agropédo-climatiques. Transplantée loin de son milieu naturel, la plante ne se développe plus normalement et perd totalement ou en partie ses caractéristiques productives.

Des recherches effectuées sur terrain sur les plantes de la flore spontanée ont montré que la même espèce peut présenter de grandes différences de productivité et de teneur en principes actifs suivant les zones en fonction de la fertilité naturelle du sol, la quantité de lumière où elle se développe, les régimes thermique et hydrique, etc.

Il faut tenir compte de toutes ces exigences des plantes quand nous décidons de les cultiver; cela veut dire qu'il faut leur assurer des conditions aussi semblables que possible à celles de leur milieu naturel.

Pour cultiver une plante qui a poussé spontanément jusqu'à un moment donné, il faut d'abord étudier attentivement les bassins où elle se développe naturellement et reproduire les conditions respectives sur le terrain où la plante sera cultivée.

Un intérêt particulier devra être accordé au matériel de multiplication, qui sera au commencement prélevé dans la flore spontanée, dans les zones où les plantes ont le plus de vigueur et la plus grande quantité de principes actifs.

Parallèlement aux travaux visant à dresser les cartes des zones respectives, pour une espèce donnée, on procédera également à établir les technologies de la culture, mises au point dans les unités de recherches.

III. Principes actifs des plantes médicinales
et aromatiques

Sont considérées plantes médicinales les plantes qui contiennent des principes actifs à action thérapeutique et

plantes aromatiques celles qui contiennent des huiles volatiles. Certaines plantes aromatiques peuvent aussi avoir des vertus médicinales, comme, par exemple, Mentha sp., Lavandula angustifolia.

Du point de vue pharmacodynamique et thérapeutique, le rôle de principe actif peut être joué par un ou plusieurs éléments actifs. Ils peuvent être extraits, respectivement isolés du produit végétal et employés comme substances chimiques pures pour obtenir des médicaments. La thérapie basée sur des médicaments contenant des substances chimiques pures isolées des plantes est plus indiquée que l'utilisation des plantes sous formes d'extraits ou de tisanes (infusion), où les principes actifs ne peuvent être déterminés quantitativement d'une manière rigoureuse. Après l'administration de telles formes, l'effet est plus lent, insuffisant, ou peut même produire des troubles en cas de surdosage, quand les plantes ont une certaine toxicité.

Le pourcentage de l'accumulation des principes actifs dans les différents organes d'une plante varie entre des limites très larges. Certaines substances se trouvent dans tous les tissus de la plante respective, d'autres sont localisés entièrement dans certains organes ou tissus. Ceci implique, dans certains cas, la cueillette de toute la masse végétative, dans d'autres, celle de certains organes ou tissus uniquement.

Une valorisation rationnelle des plantes médicinales et aromatiques suppose une connaissance exacte de la localisation des principes actifs dans les organes de la plante. La connaissance de la structure histologique des organes végétaux est également nécessaire pour assurer les conditions d'une dessiccation et d'un conditionnement adéquats.

La présence des différentes substances chimiques peut être détectée par des méthodes microchimiques adaptées au niveau cellulaire ou tissulaire (méthodes cytochimiques et hystochimiques). L'étude de la structure microscopique et de la localisation des principes actifs appartient à la pharmacognosie.

Le lieu où un principe actif apparaît dans l'organisme

végétal dépend, d'abord, du rôle que le principe joue dans le métabolisme de la plante. Les substances qui interviennent dans les processus d'oxydoréduction apparaissent d'habitude dans toutes les cellules vivantes, les substances de réserve dans des tissus différenciés à cette fin, les substances immuno-protectrices se trouvent de règle dans les cellules superficielles de l'organisme, etc.

La localisation d'une substance au niveau d'une cellule dépend tout d'abord des propriétés physico-chimiques qu'elle possède. Ainsi, les alcaloïdes sont placés dans le protoplasme, les sels dans le suc des vacuoles, les colorants du groupe des caroténoïdes dans les plastides (chloro et chromoplastides), les pigments flavonoïdes dans le suc cellulaire. Les substances insolubles dans l'eau apparaissent sous la forme d'inclusions solides (granulés d'amidon, cristaux d'oxalate de calcium) et les substances hydrosolubles dans le suc cellulaire (insuline, glucosides, etc.).

Pour pouvoir diriger l'augmentation de la teneur en principes actifs par des travaux d'amélioration, il faut connaître tous les facteurs qui influent la biogenèse des principes actifs. Le problème de la biogenèse des substances végétales a fait l'objet de nombreuses études; on a trouvé de nouvelles méthodes d'investigation, en premier lieu par isotopes radioactifs et par chromatographie, qui ont aidé à éclaircir de nombreux aspects fondamentaux de la chimie des plantes.

Une grande partie des principes actifs est considérée comme étant des "substances secondaires", formées au cours des processus de désassimilation. En principe, chaque cellule vivante peut élaborer différentes substances de ce genre. Dans certains cas, toutefois, la production massive de ces substances a lieu dans des cellules différenciées dans ce but, connues sous le nom de cellules ou tissus sécréteurs.

IV. Facteurs naturels qui conditionnent la quantité et la qualité des plantes médicinales et aromatiques

L'efficience des plantes médicinales et par conséquent leur valeur est d'autant plus grande qu'elles contiennent plus

de principes actifs, le degré d'accumulation de ceux-ci étant en étroite corrélation avec les facteurs de milieu où s'est développée la plante et avec l'agrotechnique utilisée.

Les facteurs naturels qui influencent la croissance et le développement des plantes médicinales et aromatiques et le degré d'accumulation des principes actifs sont les suivants:

A. La température de l'air et du sol est l'un des principaux facteurs déterminant la production de plantes médicinales et aromatiques, qui a une importance immense pour leur développement et surtout pour leur qualité (degré d'accumulation des principes actifs).

Les phénomènes biologiques dans les plantes peuvent avoir lieu normalement seulement dans certaines conditions de température, conditions différentes suivant les espèces.

Sur le territoire de la Roumanie, la température varie beaucoup par rapport à la latitude et l'altitude. Elle représente le facteur décisif dans la division en zones de cultures et dans l'introduction en culture de nouvelles espèces appartenant à la flore spontanée ou provenant d'autres régions du monde.

La quantité totale de chaleur nécessaire au cours de la période de végétation s'exprime par la somme de degrés $^{\circ}\text{C}$ qui est égale au total des températures moyennes quotidiennes, variables d'une espèce à l'autre.

Pour une croissance normale et un développement adéquat, la plante a besoin, dans chaque phase de végétation, de températures optimales, car, en cas contraire, le développement est en retard ou bien la plante ne peut passer d'un stade à l'autre. Digitalis purpurea, par exemple, pousse et produit des familles en rosette tant par températures basses que par températures plus élevées, mais le développement des bourgeons floraux commence uniquement après que la plante ait supporté l'influence de températures plus basses (au-dessous de $+8^{\circ}\text{C}$).

La température joue aussi un rôle décisif dans la germination des graines, car c'est en fonction de ce processus que l'on peut fixer l'époque des semailles. Papaver somniferum, par exemple,

sollicite une température moyenne quotidienne de l'air de 2 à 3°C, Digitalis purpurea - de 3 à 5°C, Coriandrum sativum - de 4 à 6°C, Atropa belladonna - de 5 à 8°C, Datura innoxia - de 10 à 15°C.

On a constaté que chez beaucoup d'espèces de plantes médicinales qui viennent d'être introduites en culture, comme, par exemple, certaines solanacées, pour sortir de terre il faut qu'au préalable les graines aient été soumises à des chocs de basses températures en semant au début de l'hiver, ou en appliquant la jarovisation ou la stratification des graines.

Les espèces qui viennent des régions plus chaudes que celles de Roumanie ont besoin de plus de chaleur. Pour faciliter leur acclimatation aux nouvelles conditions on recommande que la jarovisation ait lieu à plus de 10°C pendant les premières années de culture, ou qu'elles se multiplient par des plants obtenus en serres, ou sur couches chaudes de fumier. Après un certain temps, la plante s'étant adaptée aux nouvelles conditions, on renonce graduellement à certaines mesures indiquées plus haut.

Diverses espèces, parfois même celles appartenant au même genre, réagissent différemment à la température. Pourtant on sait en général que la masse végétale est plus abondante quand les températures sont modérées et lorsque des conditions satisfaisantes d'humidité, de lumière et de nourriture sont réunies.

B. L'humidité représente l'un des principaux facteurs qui décident de la répartition des plantes médicinales et aromatiques par zones, car elle a une grande influence sur le développement végétatif des plantes, sur le degré d'accumulation des principes actifs et même sur la composition de ces derniers.

De toutes les précipitations atmosphériques, les plus importantes sont les pluies. L'influence des pluies est déterminée par leur quantité annuelle et surtout par leur distribution pendant la période de végétation et leur intensité. La quantité d'eau retenue par le sol pendant les semailles influe en grande partie la quantité des cultures.

Pour les plantes à petites graines, comme c'est le cas d'un grand nombre d'espèces médicinales et aromatiques (Papaver somniferum, Digitalis lanata, Thymus vulgaris, Melissa officinalis) seront plus indiquées les pluies à petites gouttes et plus fréquentes depuis les semailles jusqu'au moment où elles sortent de terre et même jusqu'à ce que les jeunes plantes deviennent plus vigoureuses.

Un grand nombre d'espèces se développe très lentement pendant 30 à 40 jours (Datura innoxia, Pimpinella anisum, Matricaria chamomilla etc.).

À ce moment-là, des pluies rapides et à grosses gouttes tassent fortement le sol, en empêchant ou en rendant même impossible l'apparition des plantes, surtout dans les sols compacts, sans structure, qui forment une croûte difficile à percer par les jeunes plantes.

Pendant la phase de croissance intensive, qui précède de règle la floraison, les plantes ont besoin de plus d'humidité. Les pluies tombées pendant la floraison peuvent être nuisibles, si elles se prolongent, car elles empêchent la pollinisation des plantes allogames, dont on récolte les fruits et les graines (Coriandrum sativum, Papaver somniferum, Sinapis sp., Pimpinella anisum, Foeniculum vulgare etc.); pour les plantes dont on récolte les feuilles ou les parties supérieures (Mentha piperita, Digitalis lanata, Datura innoxia), si après l'apparition des boutons suit une longue période de pluies, les principes actifs ne peuvent s'accumuler et la qualité de la production est inférieure. Au contraire, la teneur en principes actifs est plus élevée chez la plupart des espèces pendant les années de faibles précipitations.

Les autres formes de précipitations (neige, rosée, brouillard) ont aussi une importance pour le développement des cultures de plantes médicinales et aromatiques.

Le vent est en général un facteur climatique défavorable surtout dans les régions au régime pluviométrique réduit et pendant les périodes de sécheresse. Son action augmente le coefficient d'évaporation de l'huile volatile et baisse la production par unité de surface. Pourtant, chez les plantes

qui contiennent des alcaloïdes, le vent intensifie la transpiration et la circulation, ce qui favorise la migration des alcaloïdes depuis les racines et les tiges vers les feuilles, de sorte que les jours les plus chauds les feuilles des espèces respectives ont la teneur la plus élevée en alcaloïdes (Datura innoxia, Atropa belladonna etc.).

C. Lumière

Les plantes consomment environ 3% de l'énergie lumineuse qui tombe sur leurs feuilles, pour synthétiser les substances organiques.

L'influence de la lumière se manifeste dès la période de germination des graines. Chez certaines espèces, en l'absence de la lumière, la germination démarre difficilement, tandis que pour d'autres plantes la germination est favorisée par l'obscurité.

La lumière directe, intense et continue inhibe la croissance et son absence produit une croissance anormale, l'étiollement des tiges, la formation de petites feuilles, chlorotiques (pâles) et une faible différenciation des tissus.

La croissance et surtout le développement normal des plantes, la floraison et l'apparition des fruits dépendent du rapport entre la durée de la lumière et l'obscurité pendant 24 heures, c'est-à-dire de la longueur du jour. En fonction du rapport entre l'intervalle lumineux du jour et l'obscurité de la nuit, il y a des plantes de jours long ou court. Dans le cadre d'une même espèce, les diverses variétés réagissent différemment au photopériodisme, selon leur provenance géographique. D'habitude, les plantes venant du Nord sont de jour long, en atteignant le moment où elles fleurissent et forment des fruits d'autant plus vite que le jour est plus long et la nuit plus courte; les plantes du Sud sont de jour court, fleurissant plus vite lorsque le jour est court et la nuit plus longue.

On doit tenir compte de cette réaction des plantes lors de leur répartition par zones. Si les plantes de jour long sont cultivées dans des régions plus au nord, leur développement est accéléré. Les plantes de jour court auront un

développement retardé si elles sont plantées plus au nord, où le jour est plus long.

Elevées loin de leurs conditions normales de lumière, les plantes de jour court transplantées dans des régions de jour long et inversement ont un retard dans leur développement, mais continuent de pousser en donnant des quantités plus grandes de masse verte par unité de surface.

La plupart des recherches concernant l'influence de la lumière sur l'accumulation des principes actifs montrent que l'accumulation des huiles volatiles, des alcaloïdes et des glucosides est plus grande quand la lumière est plus intense et dure davantage.

En analysant la manière dont on pourrait influencer les facteurs naturels agissant sur le développement des plantes médicinales et aromatiques, on est arrivé à la conclusion qu'on peut surtout intervenir sur le facteur humidité. Aussi, des précipitations insuffisantes ou leur absence dans certaines périodes critiques peuvent-elles être compensées par des irrigations, une agrotechnique rationnelle, des rideaux de protection etc. L'effet nuisible de l'excès d'humidité peut être évité par des travaux de drainage ou de dessiccation. Dans les deux cas, il faut s'orienter vers des variétés adéquates, c'est-à-dire résistant à la sécheresse ou à l'excès d'humidité.

Nous pouvons essayer d'influencer l'action de la lumière et de la chaleur en plaçant les cultures sur des surfaces plus ou moins ensoleillées, en tenant compte des besoins de l'espèce et en ménageant des distances suffisantes entre les plantes, afin qu'elles ne se gênent réciproquement.

Par exemple, pour des plantes aux exigences plus grandes de chaleur et de lumière (Lavandula angustifolia, Datura innoxia, Cynara scolymus etc.), on cherchera des terrains au sol léger (qui capte vite la chaleur), situés sur des pentes abritées, sans courants d'air et orientées autant que possible vers le Sud, pour assurer une exposition aussi longue que possible aux rayons du soleil. Dans ces cultures, une attention particulière devra être prêtée à la densité des plantes par

unité de surface et à la destruction des mauvaises herbes, pour que ces dernières ne gênent pas par leur ombre le développement des plantes cultivées.

En étudiant l'influence du milieu, des facteurs climatiques sur les plantes dans différentes régions, on distingue l'influence de types spéciaux de climat suivant l'altitude, la latitude ou la longitude. Les expériences ont démontré que les plantes synthétisent le maximum de principes actifs dans des conditions rapprochées des conditions optimales du milieu naturel d'où provient le matériel de multiplication utilisé.

Plus on avance vers le Nord les cultures des plantes contenant des alcaloïdes ou des huiles volatiles, moins elles ont de principes actifs. Dans les cultures de Papaver somniferum au nord de l'Europe, on obtient environ 8 Kg d'alcaloïdes par hectare, tandis que dans les régions sous-tropicales on obtient environ 20 Kg sur une même superficie. Salvia officinalis cultivée en Dalmatie a 2,5% d'huiles volatiles, tandis qu'au nord de l'Europe elle n'a que 1,4%.

Pour conclure, on peut affirmer que la teneur en substances actives de chaque espèce varie suivant la surface de culture (aux points de vue horizontal et vertical). Les régions du Nord ont la même influence négative sur la formation des huiles volatiles, des alcaloïdes et des glucosides que le climat maritime. La teneur la plus élevée en principes actifs est obtenue dans les zones du sud et du centre de l'Europe.

D. Sol

Les exigences des plantes médicinales et aromatiques envers le sol diffèrent d'une espèce à l'autre; c'est pourquoi on doit essayer de trouver le sol le plus adéquat aux exigences d'une espèce donnée. La plupart des plantes médicinales et aromatiques dont beaucoup ont de très petites graines, exigent des sols de qualité supérieure. Pour assurer les conditions nécessaires au développement rapide et uniforme des petites graines, celles-ci doivent être semées près de la surface du sol; le sol doit maintenir jusqu'aux couches supérieures un rapport favorable entre les quantités d'eau et d'air, pour fournir continuellement aux plantes les éléments nutritifs

nécessaires. Les sols sans structure, pulvérisés forment rapidement une croûte à la surface, précisément au niveau où l'on place les graines, croûte qui empêche les plantes de sortir de terre et peut quelquefois détruire les petits plants. Les cultures obtenues sur de tels sols ne sont pas uniformes, des points de vue du développement et de la densité des plantes.

Les sols trop légers (sablonneux) ou argileux (lourds et compacts) devront être évités pour la plupart des plantes médicinales et aromatiques.

En choisissant le terrain, on devra, tout d'abord, tenir compte de l'espèce cultivée et, particulièrement, des parties utiles de la plante. Les plantes dont on récolte les racines, Valeriana officinalis, V. nigra, Althaea rosea, Glycyrrhiza glabra, Saponaria officinalis, Atropa belladonna etc., seront cultivées sur des terrains situés près des rivières, où le sol est léger et où on peut obtenir une humidité convenable grâce à l'eau de la nappe phréatique. Les plantes dont on cueille les feuilles ou les parties aériennes, comme par exemple quelques solanacées, telle que Mentha piperita etc., seront cultivées sur des sols fertiles, profonds, suffisamment aérés, ayant une grande capacité de retenir l'eau provenant des précipitations ou des irrigations. Les plantes dont on cueille fruits et graines (Coriandrum sativum, Papaver somniferum, Sinapis alba, Foeniculum vulgare, Pimpinella anisum etc.) réussissent mieux sur des terrains fertiles, ayant du phosphore assimilable. Il existe également des espèces qui ont des exigences réduites envers le sol, par exemple Matricaria chamomilla, qui tolère les terrains salés, Plantago sp., qui supporte les terrains sablonneux, mais même ces espèces sont plus productives dans les sols très fertiles.

Pour la plupart des plantes médicinales et aromatiques, le pH du sol doit être légèrement acide vers le neutre, ou légèrement alcalin, les plus grandes récoltes étant obtenues sur les sols à pH entre 6,3 et 7,2, tandis que sur les sols très alcalins ou très acides la production diminue jusqu'à 70%.

Le pH du sol peut être corrigé aisément par des amendements. C'est pourquoi il est nécessaire de déterminer les préférences de chaque forme cultivée, quant au pH du sol et

d'intervenir par des amendements calcaires ou au phosphogypse (pour les sols acides et, respectivement, salés), les doses respectives étant établies à la suite d'analyses agrochimiques.

V. Engrais

Les engrais sont indispensables si l'on désire obtenir des récoltes abondantes pour la plupart des plantes cultivées, y compris les plantes médicinales et aromatiques.

Les engrais déterminent non seulement une augmentation de la quantité, mais aussi une qualité supérieure de la récolte. C'est pourquoi le type et les doses optima d'engrais en vue d'obtenir des plantes contenant le maximum de substances actives est l'une de tâches principales de la recherche agrotechnique.

Pour fertiliser les terrains cultivés avec des plantes médicinales et aromatiques, on utilise des engrais organiques (naturels) et chimiques.

A. Engrais organiques

Le fumier d'étable est une ressource importante pour engraisser tous les types de sols, pour presque toutes les cultures agricoles, y compris les plantes médicinales et aromatiques. Pour ces dernières, on recommande que le fumier d'étable ait bien fermenté, pour détruire la capacité de germination des graines des mauvaises herbes; la meilleure solution est de l'appliquer à la plante précédente, parce que la plupart des plantes médicinales et aromatiques ont de petites graines qui sortent de la terre avec difficulté, certaines 30 à 40 jours après les semailles et, si le terrain n'est pas propre, elles risquent d'être étouffées par les mauvaises herbes qui sortent et poussent plus vite. En raison du coût élevé des travaux de chargement, transport et épandage, il est indiqué que le fumier soit utilisé surtout pour fertiliser les cultures à grande rentabilité, qui peuvent supporter des dépenses plus élevées et qui résistent mieux aux mauvaises herbes provenant des graines existant dans le fumier, ou qui supportent les herbicides.

Le fumier d'étable est particulièrement efficace pour les sols acides, lourds, froids, aux propriétés physico-chimiques médiocres, à activité biologique réduite, grâce à l'apport de l'humus; celui-ci réchauffe le sol, augmente la perméabilité à l'eau et à l'air etc.

Sur les terrains fertilisés avec du fumier d'étable, les doses d'engrais chimiques seront diminuées proportionnellement aux quantités de fumier appliquées.

B. Engrais chimiques

Les éléments nutritifs nécessaires aux plantes cultivées sont fournis par le sol respectif et par des engrais, qui complètent la réserve d'éléments du sol jusqu'au niveau optimum nécessaire pour obtenir des récoltes économiques.

Bien qu'en général, lorsqu'on évalue l'effet des engrais sur la majorité des cultures on ne tienne pas compte des modifications favorables intervenant dans la composition chimique et la qualité de la récolte grâce aux engrais utilisés, cet aspect prend de l'importance dans le cas des plantes médicinales et aromatiques, où l'on a en vue l'accumulation de quantités toujours plus grandes de principes actifs.

Les conclusions des expériences effectuées par la recherche ont montré que les plantes dont on cueille les parties aériennes ou les feuilles (Datura innoxia, Digitalis lanata et purpurea, Cynara scolymus, Mentha piperita, etc.) exigent des doses élevées d'azote, les plantes cultivées pour leurs fleurs et fruits (Calendula officinalis, Malva glabra, Lavandula angustifolia, etc.) exigent plus de phosphore et les plantes dont on utilise les racines ou les tubercules (Atropa belladonna, Glycyrrhiza glabra, Saponaria officinalis, etc.) nécessitent une plus grande proportion de potassium dans la composition des fertilisants. Le rapport entre les trois éléments - N, P, K - représente un facteur déterminant pour la teneur en principes actifs des plantes, qui diffèrent selon les espèces.

Il n'y a pas un rapport de proportionnalité directe entre le développement des plantes et leur teneur en substances nutritives, prélevées au sol, ni entre la masse végétale

récoltée et la quantité d'engrais utilisée. Les expériences ont montré que le surplus spécifique à la croissance des plantes (par exemple, Kg/récolte/unité de substance nutritive du sol) diminue avec l'augmentation de la quantité de substances nutritives du sol, de sorte qu'à un certain degré d'administration au sol de fertilisants, ceux-ci n'ont plus une influence favorable sur la plante cultivée, mais peuvent même avoir une influence négative, en cas de surdosage.

(1) Engrais chimiques à l'azote

Toutes les plantes non-légumineuses prennent l'azote dans le sol, surtout sous forme de nitrates. Les nitrates ne sont pas retenus dans le sol, mais se trouvent tout le temps dans le moût du sol, dans un état de mobilité absolue et d'accessibilité totale pour les plantes. Au cours des périodes de croissance intensive des plantes, qui coïncide avec une forte consommation d'azote, les nitrates des couches supérieures peuvent être utilisés complètement par les plantes et, en cas de pluies abondantes, celles-ci peuvent laver les nitrates au-dessous du niveau où les racines se ramifient. Lorsque le sol a un excès d'humidité pendant une période plus longue, il y a des pertes d'azote nitrique du sol par dénitrification. Les pertes dépendent de la température et sont plus grandes dans les sols neutres ou faiblement alcalins que dans les sols à pH acide.

L'activité des bactéries de nitrification (qui produisent les nitrates du sol) est fortement influencée par le pH, le degré d'humidité et la température du sol.

Les données présentées montrent que les doses optimales d'azote sont fixées en tenant compte des facteurs suivants:

- . les résultats des expériences pratiques sur terrain avec les engrais;
- . l'utilisation du fumier d'étable pendant l'année de culture et au cours des deux années précédentes et l'introduction dans le sol de restes organiques pauvres en azote;
- . l'approvisionnement en eau des cultures (précipitations, nappe phréatique, irrigations);

- . la nature des plantes précédentes, la vertu de la rotation des cultures;
- . la variété de la plante qui est cultivée;
- . l'évolution du temps pendant l'année précédente et au cours de l'année de culture;
- . le niveau de la technologie appliquée;
- . les accidents climatiques.

Les doses moyennes optimales comprennent également l'effet rémanent des engrais à l'azote ajoutés à la culture précédente. Elles dépendent aussi de l'influence spécifique de la culture précédente sur la formation des nitrates et sur le développement d'autres processus biochimiques et physiques du sol.

Lorsque le sol est irrigué, les doses d'azote augmentent et, par voie de conséquence, la récolte qu'on obtient est plus grande. On applique aussi des doses légèrement plus grandes d'azote sur les sols ayant des quantités plus grandes d'eau phréatique ou pendant les années où les précipitations sont supérieures à la moyenne obtenue dans la zone respective.

Au cours des années à précipitations réduites, par rapport à la moyenne de la zone respective de culture, les doses d'azote seront plus petites, car, à cause de la sécheresse, les nitrates du sol ne sont plus "lavés" dans les couches profondes et parce qu'en l'absence de l'eau on obtient des récoltes plus faibles, qui n'exigent pas une forte consommation d'azote.

(2) Engrais au phosphore

Les plantes absorbent le phosphore uniquement sous forme d'ions de l'acide phosphorique, d'autant plus que l'ion monophosphate est le plus accessible.

L'absorption du phosphore est fortement influencée par le pH du sol, car la solubilisation des phosphates minéraux et la dissociation de l'acide phosphorique, aussi bien que d'autres processus physico-chimiques qui ont lieu dans le sol dépendent en grande mesure de l'activité des ions d'hydrogène.

Les fertilisants au phosphore et le fumier d'étable augmentent la réserve de phosphates, qui sont facilement

solubles dans le sol. Les phosphates minéraux de surface, qui sont pratiquement la seule source naturelle de phosphore à la disposition des plantes, ont une très petite mobilité dans le sol, ils ne peuvent se déplacer sur de grandes distances par diffusion libre ou par entraînement à l'eau qui circule dans le sol.

Une bonne structure du sol favorise la pénétration des racines dans le sol et crée des conditions favorables à l'absorption du phosphore par les plantes, à la différence des sols poussiéreux, sans structure, qui ont une influence négative sur la ramification des racines, et l'évolution des phosphates de surface. En raison de la mobilité réduite du phosphore dans le sol, pendant la première année d'application de phosphates, ceux-ci ne sont utilisés par les plantes que dans une proportion de maximum 20% de la substance active (acide phosphorique).

L'absorption du phosphore par les plantes est favorisée par des températures plus élevées, entre +5 et +35°C, dans les conditions d'une humidité normale et de l'utilisation des engrais dans la zone de ramification maximale des racines actives des plantes.

Les phosphates ont un important effet rémanent, grâce à l'accumulation dans le sol des phosphates facilement solubles; la quantité de fertilisants diminue proportionnellement avec la quantité de phosphates solubles existant dans le sol.

(3) Engrais au potassium

Le potassium se trouve dans le sol sous une forme accessible ou conventionnellement interchangeable.

La plus grande quantité de potassium est apportée au sol par les engrais chimiques et le fumier d'étable (la quantité de potassium est directement proportionnelle à la quantité d'engrais administrée).

Quant à la dose moyenne optimale d'engrais de potassium, celle-ci est en fonction de la teneur du sol en potassium, facilement soluble et des exigences des plantes cultivées, déterminées à la suite d'expériences rigoureuses effectuées sur terrain et au laboratoire.

VI. Agrotechnique des plantes médicinales et aromatiques

A. Travaux de base

Les travaux de base doivent commencer dès qu'on a récolté les plantes précédentes, quand on laboure à une profondeur de 25 à 30 cm, suivant le type du sol. Ensuite, le champ labouré sera entretenu en surface au moyen d'un cultivateur et d'une herse, afin de détruire la croûte et les mauvaises herbes; de cette manière, le sol sera bien aéré, nivelé et sans mauvaises herbes. Pour les semailles de printemps, la dernière opération qu'on applique sur le terrain labouré l'été précédent sera effectuée sans herse, pour éviter que la terre se tasse pendant l'hiver.

Les terrains qu'on ensemeince au début du printemps seront préparés dès l'automne, afin qu'on puisse y entrer au printemps avec la semeuse. Ceci est possible si les terrains respectifs ont une bonne structure, ne sont pas trop compacts et ont une perméabilité élevée à l'eau et à l'air. La préparation du terrain en automne n'est pas indiquée pour les sols lourds, compacts, qui retiennent trop d'eau, sèchent difficilement et ne permettent pas aux machines et tracteurs d'exécuter assez tôt au printemps les semailles, en retardant ainsi de beaucoup cette opération.

Si, après avoir récolté la plante précédente, on ne peut exécuter un labourage profond à cause de l'humidité réduite, on labourera à une plus petite profondeur, ou bien on exécutera des travaux répétés avec la herse à disques pour ne pas donner la possibilité aux mauvaises herbes de pousser; on labourera plus en profondeur après la saison des pluies ou après avoir utilisé des irrigations, après avoir administré les engrais de base.

Dans les zones aux précipitations réduites et où il n'y a aucune possibilité d'irrigation, il est bon de broyer dès l'automne le sol avec la herse, aux disques ou d'autres machines, en créant ainsi de meilleures conditions pour accumuler et retenir l'eau dans le sol et la possibilité qu'il soit ensemeincé au début du printemps.

En procédant de telle sorte, il n'est plus besoin de broyer la couche labourée, opération qui favoriserait une forte évaporation de l'eau accumulée pendant l'hiver dans le sol, réserve qui ne peut plus se refaire au printemps et surtout en été dans les zones à précipitations rares.

Pour des plantes comme Lavandula angustifolia, Rosa damascena, etc., il faut défricher le terrain à une profondeur de 40 à 60 cm, à l'aide de charrues spéciales ou de charrues normales pourvues d'outils à défricher.

B. Semailles

Pour les cultures dont les semailles ont lieu en automne ou en début de l'hiver - Artemisia absinthium, Coriandrum sativum, Salvia sclarea, etc -, le terrain sera labouré au combineur à 5-6 cm de profondeur, environ 8-10 jours avant les semailles. Pour les semailles du printemps, les travaux commenceront dès qu'on peut entrer avec les tracteurs dans le terrain et diffèrent suivant les travaux appliqués en automne. Si le labourage d'automne est resté en sillon brut, dès que l'on peut entrer sur le terrain et en fonction du degré de broyage du sol on procèdera ainsi: sur les terrains à gros amas durs de terre on applique le disque, suivi de la barre à aplanir, en répétant l'opération au besoin, pour obtenir ainsi le broyage du sol et son aplanissement. Cette opération n'est pas indiquée dans les zones de sécheresse, car le sol broyé par la herse à disques présente une évaporation intense, en créant ainsi un déficit d'eau qui, dans ces zones, a des répercussions négatives sur la récolte. Au cas où le terrain n'a pas de gros amas durs de terre, ce qui d'habitude arrive dans les sols légers et moyens, on applique une opération à la herse aux disques réglables, pour broyer la croûte, détruire les mauvaises herbes en train de pousser et aplanir le terrain. Dans les deux situations, 8 à 10 jours avant les semailles on exécute une opération à l'aide du combineur et on sème ensuite.

En principe, tous les travaux exécutés au printemps doivent conduire à une bonne préparation du lit germinatif, c'est-à-dire l'ameublissement de la couche superficielle du sol jusqu'à la profondeur où l'on met les graines et la distribution de ces dernières sur une couche assez humide pour

leur permettre de germer et aux plantes de pousser.

Un autre but important des travaux de printemps est d'économiser l'eau dans le sol, eau qui est d'autant plus importante dans une région aux précipitations rares. Nous insistons que dans de telles zones, surtout pour les cultures ensemencées en début du printemps, le terrain doit être préparé en automne, d'abord pour économiser l'eau dans le sol et ensuite pour pouvoir commencer les semailles aussi tôt que possible au printemps.

Un autre principe très important dont il faut tenir compte quand on choisit les travaux agrotechniques est d'éviter le tassement du sol. Dans ce but, il faut que les opérations nécessaires soient exécutées avec un minimum de sollicitations du sol par le passage de machines, pour obtenir ainsi des produits de bonne qualité. On réalise en même temps une économie de carburants.

Le plantage, qui commence au plus tôt, environ un mois après le début de la campagne agricole de printemps, exige plusieurs travaux obligatoires: on creuse le sol plus profondément que pour les semailles et on détruit toutes les mauvaises herbes qui poussent dans cet intervalle. On applique deux ou trois fois le cultivateur avec la herse à dents réglables, à 8-10 jours d'intervalle, au fur et à mesure que les mauvaises herbes poussent et que la croûte se forme.

C. Matériau de multiplication

Les plantes médicinales et aromatiques cultivées peuvent se multiplier de différentes manières par: graines, fruits, boutures, rhizomes, stolons, bulbes ou spores (Claviceps purpurea); la qualité et la quantité de la récolte dépendent de la qualité de ce matériau de multiplication.

Pour les plantes récemment entrées en culture (Vinca minor, Atropa belladonna, Glycyrrhiza glabra, Artemisia absinthium, etc.), on utilise le matériau de multiplication provenant de la flore spontanée, récolté sélectivement dans les zones où la matière première est de la meilleure qualité et cultivé dans des conditions aussi similaires que possible au milieu originaire.

Le matériau de multiplication doit correspondre aux exigences normalisées concernant la pureté, la capacité germinative, l'humidité, le poids absolu.

D. Semailles et plantage

Il existe des plantes médicinales et aromatiques qui ont un système unique de multiplication et d'autres pour lesquelles on peut utiliser plusieurs méthodes. Coriandrum sativum, Foeniculum vulgare, Thymus vulgaris, Malva sp., etc., par exemple, se multiplient seulement par graines, Mentha sp. par rhizomes; Lavandula angustifolia peut se multiplier par des graines ensemencées directement dans le champ, ou dans les couches de fumier, par des boutures enracinées dans les couches de fumier, ou obtenues par la séparation des touffes.

La multiplication par fruits et graines peut se faire par ensemencement direct dans le champ (Coriandrum sativum, Sinapis sp., Foeniculum vulgare, Pimpinella anisum, etc.), ou, dans une première étape, dans des couches de fumier; les plants obtenus sont ensuite repiqués dans le champ, comme c'est le cas pour Thymus vulgaris, Majorana hortensis, etc.

On choisira la méthode la plus avantageuse, en appliquant généralement l'ensemencement direct dans le champ, tout en tenant compte de la quantité et de la qualité obtenues par la méthode respective. La multiplication par plants est pratiquée surtout pour les espèces en provenance d'autres régions du globe, qui exigent une période de végétation plus longue que la période normale.

Quant au temps des semailles, il diffère suivant l'espèce et la zone climatique, la semaison ayant lieu en automne (Coriandrum sativum, Matricaria chamomilla), en début d'hiver (Salvia sclarea, Artemisia absinthium), en début de printemps (Papaver somniferum, Coriandrum sativum, Sinapis sp.), à la fin du printemps (Calendula officinalis, Malva sp.) et quelquefois même en été, comme c'est le cas de Valeriana officinalis, Angelica arangelica. Ces deux dernières espèces donnent toutefois de bonnes récoltes, même si leur semaison a lieu dans d'autres périodes.

Quant à la méthode choisie pour semer, remarquons que la plupart des espèces sont semées par rangées (Papaver somniferum, Coriandrum sativum, Salvia sclarea). Pour certaines espèces de haute taille, qui exigent de grands espaces de nutrition, on laisse des intervalles plus larges entre rangées, pour permettre le binage mécanique, en ménageant des distances entre les plantes de la même rangée (Salvia sclarea, Datura innoxia, Silybum marianum, etc.). Pour les espèces dont on récolte d'une manière répétée les fleurs et les feuilles (Calendula officinalis, Tagetes patula, Malva sp., Melissa officinalis, etc.), on recommande de semer sur larges bandes de 0,71 à 1 m, à distance de 10 à 15 cm entre les rangées et de 60-80 cm entre les bandes, de sorte que sur l'allée ainsi créée entre les bandes on puisse exécuter des travaux d'entretien des cultures et la cueillette des fleurs et des feuilles.

Certaines espèces, comme par exemple Coriandrum sativum et Sinapis sp., peuvent être ensemencées soit en rangées rares quand elles sont binées, soit en rangées serrées, à 12,5 cm de distance, quand on utilise des herbicides, ou quand le terrain n'a pas besoin d'être biné, n'ayant pas de mauvaises herbes.

La profondeur de la semaison dépend de la capacité des graines à pénétrer dans le sol et diffère suivant les espèces. La plupart des plantes médicinales et aromatiques, ayant de petites graines, sont ensemencées plus près de la surface du sol, à la différence des céréales, des légumes, etc. Pour les plantes médicinales, cette profondeur est de 0,5 à 2 cm. Papaver somniferum sera ensemencé à 0,5-1 cm, Coriandrum sativum à 2-2,5 cm et Silybum marianum à 2-3 cm, etc.

Après semailles il est indiqué de faire passer le rouleau, pour aider la graine de venir en contact plus intime avec la couche germinative; c'est surtout le cas des petites graines (Matricaria chamomilla, Papaver somniferum, Digitalis lanata) et pendant les périodes à peu de précipitations. Pendant les périodes de sécheresse, le rouleau devra être appliqué également avant les semailles, opération qui sera évitée sur les terrains lourds, pendant les périodes pluvieuses, car elle

favorise la formation de la croûte. Pour faciliter les plantes à percer à travers la croûte, surtout celles qui mettent plus de temps depuis la semaison jusqu'à la sortie au-dessus du sol, la semaison sera faite avec des plantes-indicateurs; ces dernières poussent plus vite, indiquent les rangées et rendent possible un binage aveugle avant l'apparition de la culture de base.

Pour certaines plantes, comme par exemple Thymus vulgaris, Valeriana officinalis, etc., les cultures sont réalisées à l'aide de plants, obtenus par plusieurs méthodes: en couches froides, en couches chaudes de fumier, en serres chauffées ou non.

Les plants seront repiqués aussi tôt que possible, au moment où toutes les conditions requises par la plante sont présentes. Avant d'être enlevés du sol, les plants doivent être adaptés graduellement aux conditions du champ, complètement différentes de celles des serres, ou des couches de fumier.

Le plantage sera fait de préférence pendant des jours de pluie, peu ensoleillés, ou après une période pluvieuse, le plantage étant alors plus sûr. On plante le matin ou, encore mieux, le soir. Quand on les enfonce dans le sol, les plants seront obligatoirement arrosés, avant et après plantage. Les plants seront enfoncés 1 à 2 cm plus profondément qu'ils n'étaient dans les couches de fumier. La fixation des plants dans le sol dépend de plusieurs facteurs, surtout de la façon dont les racines adhèrent à la terre et de l'humidité du sol. On vérifie si le plantage a réussi 7 à 10 jours plus tard, quand on comblera également les vides. Certaines espèces, comme Atropa belladonna, ne présentent pas de vides au premier contrôle et donnent l'impression d'avoir réussi; c'est seulement après 30 à 35 jours, temps nécessaire aux plants pour s'adapter aux conditions du champ, qu'on peut réellement constater si le plantage a réussi.

E. Travaux d'entretien

L'entretien des cultures comprend les travaux qu'on applique avant ou pendant la végétation des plantes, dans le but de favoriser leur développement. Ces travaux tendent à

détruire les mauvaises herbes, à maintenir l'humidité dans le sol, à ameublir les couches superficielles de la terre et à l'approvisionner en eau par irrigations, quand celles-ci sont nécessaires et possibles.

Tous les travaux d'entretien devront être effectués correctement, au moment optimum, dans le plus bref délai.

Les principaux travaux sont: le hersage, le binage, mécanique et manuel, le sarclage, le démariage, l'irrigation des cultures.

Le hersage s'effectue tôt au printemps pour certaines cultures venant des années antérieures (Mentha sp., Vinca minor, Carum carvi, etc). La herse doit avoir des dents réglables perpendiculaires sur la direction des rangées et inclinées en arrière, pour ne pas arracher les plantes. Le hersage ne devra pas dépasser 2 à 3 cm en profondeur, son rôle étant de briser la croûte et de détruire les mauvaises herbes en train de pousser. Il s'effectue quand le sol a une humidité moyenne qui lui permet d'être facilement brisé.

Les binages mécanique et manuel ont pour but de créer une couche ameublie et correctement broyée à la surface, qui réduit l'évaporation de l'eau accumulée, favorise l'aération des racines, le réchauffement du sol et l'action des micro-organismes. Les binages mécanique et manuel broient la croûte et détruisent les mauvaises herbes, tout en favorisant l'incorporation des fertilisants. L'aération et la destruction des mauvaises herbes contribuent à une bonne hygiène de la culture, en prévenant et en combattant les maladies et les insectes nuisibles.

L'intervalle entre rangées est biné d'habitude par des moyens mécaniques. L'opération s'exécute avant l'apparition des cultures, quand il y a des plantes indicateurs, ou après l'apparition des cultures, pour les cultures qui poussent plus vite.

Quand le binage se fait mécaniquement, le cultivateur devra obligatoirement être pourvu de disques qui protègent les rangées, ayant le rôle de prévenir le recouvrement des plantes par la terre disloquée et jetée des deux côtés par

les outils de la machine.

La destruction des mauvaises herbes dans les rangées s'obtient par binages manuels et sarclage répétés.

Les premiers binages (mécanique et manuel) seront exécutés plus en profondeur et les suivants plus près de la surface, pour prévenir la destruction des racines, peu développées lors du premier binage.

Le sarclage sera fait manuellement, ou au moyen d'une petite pelle, ayant pour but d'enlever les mauvaises herbes ou les plantes appartenant à d'autres espèces ou à d'autres variétés.

Le nombre de binages et de sarclages dépend de la quantité de mauvaises herbes, des précipitations, de la durée de la période de végétation, de l'utilisation d'herbicides.

Le démariage est l'opération par laquelle on obtient une densité optimale des plantes par unité de surface et a une grande influence sur la récolte. Pour le pavot (Papaver somniferum), par exemple, le moment optimum pour exécuter le démariage est lorsque les plantes ont 3 à 4 feuilles. Si cette opération a lieu quand il y a déjà 6-8 feuilles, la récolte baisse de 7%, et quand il y a 8 à 10 feuilles, la production baisse jusqu'à 76% par rapport à ce qu'on récolte si l'opération est exécutée correctement, la plante ayant seulement 3 à 4 feuilles. À présent, on détruit les mauvaises herbes par voie chimique pour la majorité des cultures, y compris les plantes médicinales. Plus le nombre d'espèces et les surfaces où l'on utilise les herbicides augmentent, plus il est nécessaire de savoir les utiliser d'une façon efficace, tout en évitant les dangers dus à une phytotoxicité partielle ou totale des cultures.

Il est intéressant de savoir comment s'effectue l'absorption des herbicides dans les plantes et quelles quantités restent dans les produits récoltés qui sont utilisés, pour la plupart, comme tels.

Cet aspect n'étant pas suffisamment élucidé, les produits provenant des cultures où l'on a utilisé des herbicides ne seront pas consommés sous forme de tisanes, mais employés exclu-

sivement après transformation en industrie.

Nous considérons que pour les plantes médicinales il faut employer des herbicides uniquement dans des cas extrêmes, où les moyens classiques ont échoué; même dans ces cas, il faut faire appel seulement aux substances non-rémanentes.

L'irrigation des cultures, surtout celles qu'on cultive pour les parties aériennes et les feuilles, ou qui ont normalement une grande teneur en eau, représente une opération très importante dans les zones de plaine, caractérisées par peu de précipitations. Les cultures seront irriguées différemment suivant les espèces et les périodes de végétation, les exigences biologiques et le régime des précipitations; on peut effectuer 2 à 4 arrosages, suivant les espèces. Le surplus de récolte obtenu après irrigation, correctement effectuée, atteint pour *Mentha piperita* 50 q/ha, ce qui représente une augmentation de 80% par rapport à la culture non-irriguée. Des quantités supplémentaires peuvent être obtenues en irrigant des espèces comme *Digitalis lanata*, *Solanum laciniatum*, *Valeriana officinalis*, *Datura innoxia*, *Thymus vulgaris*, etc.

VII. Maladies et agents nuisibles des plantes médicinales et aromatiques; méthodes utilisées pour les combattre

Parallèlement à l'extension des superficies cultivées avec des plantes médicinales et aromatiques, on constate l'apparition d'un nombre plus grand de maladies et d'agents nuisibles, une agressivité accrue de l'attaque et l'apparition d'agents pathogènes spécifiques, très peu répandus ou même inaperçus dans la flore spontanée. Les dégâts les plus évidents sont enregistrés dans les cultures qui couvrent de grandes surfaces. C'est ainsi qu'une attaque complexe de bactéries et de champignons peut compromettre totalement une récolte de *Coriandrum sativum*, *Papaver somniferum*, surtout dans les zones où ils sont cultivés sur des surfaces étendues et compactes, comme par exemple en Roumanie du Nord; l'attaque de l'insecte *Centhorrhynchus macula alba* peut compromettre la production dans une grande proportion si l'on n'applique pas de mesures

adéquates pour prévenir et combattre cet agent.

Comme les dégâts augmentent parallèlement à l'extension des cultures, il est obligatoire d'appliquer strictement les règles générales de protection, c'est-à-dire tout le complexe de mesures préventives et curatives. Les mesures préventives sont les plus indiquées, car elles sont les plus efficaces et, quelquefois, les seuls moyens à même de réduire l'attaque des agents nuisibles. Citons quelques-unes de ces mesures: choix du moment opportun pour semer, observation de règles d'assolements adéquates, labourage en profondeur, préparation des graines, destruction des mauvaises herbes, etc.

Les maladies et les agents nuisibles peuvent également être combattus par des substances chimiques utilisées pour d'autres plantes et appliquées par des moyens mécaniques terrestres ou pulvérisées de l'avion.

L'emploi des pesticides en vue de combattre les maladies et les agents nuisibles des plantes médicinales et aromatiques doit se faire strictement selon les indications concernant la rémanence des produits chimiques utilisés, car beaucoup de ces plantes sont utilisées comme telles. Ainsi, la dernière application des substances chimiques devra se faire 25 à 30 jours avant la cueillette, cette restriction étant obligatoire pour les plantes destinées à être utilisées en infusions ou en décoctions. En appliquant des pesticides, il faut respecter également les règles de protection des ouvriers, mesures similaires à d'autres cultures agricoles.

METHODES DE CULTURE DES
PLANTES MEDICINALES ET AROMATIQUES

Emil Păun¹⁾
Stefania Male⁺⁺⁾
Maria Mircea⁺⁺⁾

-
- ¹⁾ Directeur de la Station de recherches des plantes
médicinales et aromatiques, Fundulea, Roumanie
⁺⁺⁾ Chercheur à la Station de recherches des plantes
médicinales et aromatiques, Fundulea, Roumanie

Les méthodes de culture des plantes médicinales et aromatiques ont pour but de satisfaire, dans des conditions optima, les exigences spécifiques de chaque culture.

Leur application correcte conduit à l'obtention de récoltes élevées et de bonne qualité.

Ces méthodes sont nombreuses et nous allons les traiter ci-après.

I. REPARTITION DES CULTURES PAR ZONES

Cette répartition des cultures a pour but d'établir les zones adéquates de culture pour chaque espèce, conformément aux besoins de celle-ci en fonction des conditions agro-pédoclimatiques.

Lors de l'emplacement des espèces médicinales et aromatiques dans un territoire, on a en vue l'obtention des plus grandes quantités de masse végétale, de même que l'accumulation maxima de principes actifs.

La plasticité écologique accentuée, caractéristique de la majorité des espèces de ce groupe, permet de délimiter deux zones principales pour la culture des plantes médicinales et aromatiques, à savoir la zone humide et fraîche et la zone sèche et plus chaude.

Dans le cadre de ces deux grandes zones existent de différenciations de sol, relief, microclimat, qui créent des sous-zones de différents degrés de convenance pour la culture des plantes médicinales et aromatiques (9).

Les facteurs de milieu déterminent des modifications qualitatives et quantitatives dans la composition chimique de la même espèce.

En suivant l'influence du milieu sur les plantes et spécialement l'influence des facteurs de climat dans leur complexité (température, humidité, lumière, sol), on constate que tous ces facteurs ont une influence particulière sur la qualité des plantes médicinales.

L'altitude à laquelle se développe une plante exerce une influence sur sa qualité.

Les productions de feuilles ou herba sont beaucoup plus grandes en région montagneuse, un peu plus petites en sylvo-steppe et les plus petites en plaine; mais la teneur en principes actifs de ces productions va dans l'ordre inverse.

Outre la température, l'humidité est un autre facteur qui influe la répartition territoriale des espèces des plantes médicinales cultivées.

La synthèse et l'accumulation d'huiles volatiles, d'alcaloïdes, de glycosides sont influencées par la quantité totale d'énergie lumineuse.

Ainsi, Atropa belladonna, qui pousse dans des endroits ensoleillés, a les feuilles plus petites, sèche plus rapidement, les feuilles sont plus riches en alcaloïdes et donnent un produit de plus grande valeur. Les plantes qui poussent aux endroits ombragés ont des feuilles plus grandes, mais sont beaucoup plus pauvres en alcaloïdes.

L'influence du sol est importante. Les plantes telles que Althaea officinalis, qui poussent sur sols humides lourds ont un système racinaire formé de plusieurs racines minces, ce qui conduit à un produit qui n'est pas de grande valeur. Les plantes qui poussent dans des terres sablonneuses, perméables, ont la racine principale plus développée, plus grosse et peu de racines minces; on obtient un produit de qualité supérieure.

Le choix du terrain est déterminé par la variété de la plante et spécialement par les parties qui constituent la récolte. Les plantes dont on récolte la racine (Valeriana off., Althaea off.) seront cultivées sur terrains légers, sablonneux. Les plantes dont on récolte la herba (solanacées) seront cultivées sur des terrains gras, avec beaucoup d'humus, tandis que les plantes dont on récolte les fruits (ombellifères) seront cultivées sur terrains riches en éléments nutritifs et spécialement en phosphore assimilable.

II. VARIETE

Beaucoup de variétés de plantes médicinales et aromatiques qui existent en culture sont représentées par des populations qui se caractèrisent par une productivité et une teneur faibles.

L'introduction et la généralisation en culture de nouvelles variétés ont une importante contribution dans l'obtention de productions augmentées.

On tend, dans l'activité d'amélioration des plantes médicinales et aromatiques, de créer des formes caractérisées par une grande capacité de production, des indices qualitatifs supérieurs, une résistance accrue à la sècheresse, à l'hivernage, au secouement, aux maladies etc.

Les maladies produisent d'importants dommages aux cultures et la lutte contre celles-ci par voie chimique est impossible et c'est pourquoi la création d'organismes à résistance génétique représente une importante voie pour éviter les attaques dommageables.

On a réalisé dans ce sens des variétés résistantes à la rouille.

La création de certaines formes, avec des périodes de végétation plus courtes et une capacité de production élevée, constitue un important objectif suivi dans le processus d'amélioration. La précocité permet d'éviter les influences négatives des canicules d'été et de l'attaque intensif de quelques maladies (rouille). Une autre qualité des nouvelles variétés est représentée par la capacité de se prêter à la mécanisation; cela se rapporte à la résistance à la chute des plantes, à l'uniformité de la hauteur d'insertion des ramifications.

III. ASSOLEMENT

L'assolement représente l'alternance dans le temps et dans l'espace des cultures agricoles, en étroite corréla-

tion avec les systèmes de labourage et de fertilisation du sol et avec les mesures de lutte contre l'érosion du sol, les mauvaises herbes, les maladies et les agents nuisibles.

Au cours de l'alternance, les plantes se succèdent dans un certain ordre et dans ce cas l'effet de la plante antérieure acquiert une importance particulière, parce qu'à la récolte elle laisse le sol dans un certain état en ce qui concerne l'approvisionnement en eau et en éléments nutritifs, l'infestation par de mauvaises herbes, d'agents nuisibles et agents pathogènes, certains résidus d'herbicides et d'autres facteurs, qui peuvent influencer la culture suivante.

Parmi les facteurs dont il faut tenir compte lors de l'assolement citons les suivants (9) :

(a) Structure du sol

Cette qualité du sol se dégrade surtout dans le cas des cultures annuelles sarclées, qui nécessitent de nombreuses opérations d'entretien. Pour régénérer le sol, on alternera des plantes annuelles sarclées à de cultures non-sarclées et là, où les conditions le permettent, on administrera des engrais chimiques pour redresser la structure du sol.

(b) Nature du sol

On peut dire avec certitude que chaque espèce médicinale ou aromatique préfère un certain type de sol. C'est pourquoi à la détermination de la rotation des cultures on tiendra compte de ces préférences. Il est important de savoir que certaines variétés sont cultivées pour leurs racines, leurs rhizomes, ce qui impose l'emplacement de celles-ci sur des sols moyens et légers pour pouvoir être récoltées.

(c) Substances nutritives

Chaque variété extrait différemment du sol les substances nutritives. On connaît bien le fait, par exemple, que l'artichaut consomme d'importantes quantités d'azote, en

appauvrissant le sol, tandis que les légumineuses ne le consomment pas, mais, au contraire, enrichissent le sol en azote.

(d) Humidité du sol

L'eau du sol est employée différemment, en fonction des besoins de chaque espèce, de la profondeur et du volume du système racinaire de celle-ci.

(e) Travaux du sol

La profondeur des travaux de base du sol dépend des besoins imposés par la vigueur du système racinaire.

Par exemple, pour l'artichaut, qui possède un système racinaire profond, on fait un labourage de profondeur, tandis que pour la camomille, qui a un système racinaire superficiel, la profondeur du labourage diminue.

De même, certaines espèces ont une période de végétation courte, ce qui permet l'exécution des travaux de base du sol dans de bonnes conditions pour la culture suivante.

(f) Réaction du sol

Chaque type de sol est caractérisé par une certaine réaction du sol, qui peut être influencée par des travaux spéciaux d'amendement et de fertilisation. Cette qualité influe particulièrement le niveau de la production. La majorité des espèces médicinales et aromatiques donnent de grandes productions sur les sols à réaction légèrement acide vers le neutre, et l'assimilation des engrais minéraux administrés est beaucoup influencée par la réaction du sol.

(g) Envahissement par de mauvaises herbes

Il faut tenir compte, lors de la rotation des espèces médicinales et aromatiques, du fait que certaines plantes, grâce au degré prononcé de secouement, envahissent le sol aux côtés des mauvaises herbes et peuvent ainsi devenir des causes sûres de compromission de la culture suivante. Il faut éviter, dans le cas de ces plantes, la monoculture, car, surtout pour les espèces se multipliant par stolons, elles contribuent à l'envahissement du sol par de mauvaises herbes pérennantes, difficiles à combattre.

(h) Erosion du sol

La prévention de l'érosion du sol impose, en dehors d'un système de travaux, une alternance avec des espèces qui forment des massifs compacts, ayant un puissant système racinaire et nécessitant un nombre réduit de travaux. Ainsi, Lavandula angustifolia, Lavandula hybrida, Melissa off., Salvia off. seront cultivées sur des terrains en pente, car ce sont des plantes multiannuelles et qui ont un puissant système racinaire.

(i) Plante

Les facteurs dont on tiendra compte également à l'alternance sont les suivants: la durée de la période de végétation, les dimensions de la plante, ce qui se trouve en rapport avec le degré d'ombrage du sol, la parenté botanique des espèces, de même que la quantité des restes organiques qu'elle laisse sur ou dans le sol.

(j) Maladies et agents nuisibles

Les espèces qui ont des maladies ou des agents nuisibles communs ne doivent pas être cultivées dans un même assolement. De même, certaines espèces médicinales et aromatiques ne peuvent être alternées avec des plantes agricoles de la même famille botanique.

(k) Facteurs économiques et d'organisation

La planification et l'emploi rationnel de la main d'oeuvre et de toutes les capacités de production sont des indices dont il faut tenir compte lors de l'élaboration d'un plan adéquat d'assolement.

L'intégration des plantes médicinales et aromatiques dans l'assolement représente une mesure agro-technique de base pour l'augmentation de la production. Les espèces annuelles s'encaident dans des assolements de champ, tandis que celles bi-annuelles - dans des assolements de champ et fourrager.

Les plantes pérennantes utilisées pendant 3-4 ans cadrent mieux dans les assolements fourragers. Celles à pérennité plus prolongée (Lavandula angustifolia, Salvia off., Melissa off.) sont cultivées sur parcelles.

En fonction des conditions de climat de la Roumanie, quelques schémas de rotation des cultures ont été établis:

Pour la zone sèche:

Assolement mixte

1. Maïs grains
2. Plantes médicinales et aromatiques (Sinapis alba, Coriandrum sativum, Pimpinella anisum, Datura innoxia)
3. Céréales d'automne
4. Plantes médicinales bi-annuelles et à longue période de végétation (Digitalis lanata, Cynara scolymus, etc.)
5. Légumineuses pour graines
6. Mentha piperita
7. Parcelle à cultures pérennes cultivée pendant 2-6 ans avec Matricaria chamomilla, Saponaria officinalis, Thymus vulgaris

Assolement spécial

1. Digitalis lanata
2. Pimpinella anisum, Calendula officinalis, Majorana hortensis, Satureja hortensis
3. Cynara scolymus
4. Sinapis alba
5. Mentha piperita
6. Coriandrum sativum
7. Parcelle à cultures pérennes cultivée 2-3 ans avec Matricaria chamomilla, Saponaria off., Thymus vulgaris, Foeniculum vulgare

Pour la zone humide et fraîche:

Assolement mixte

1. Céréales de printemps
2. Plantes médicinales et aromatiques bi-annuelles et annuelles (Papaver somniferum, Carum carvi)
3. Plantes médicinales et aromatiques bi-annuelles en II-ème année (Carum carvi)
4. Seigle pour l'ergot
5. Plantes médicinales et aromatiques annuelles

Assolement spécial

1. Papaver somniferum et Carum carvi
2. Carum carvi
3. Seigle pour l'ergot
4. Digitalis lanata, ou Valeriana officinalis
5. Papaver somniferum
6. Mentha piperita
7. Parcelle à cultures pérennes cultivée pendant 6-8 ans (Vinca minor)

(Mentha piperita, Digitalis lanata, Valeriana off.)

6. Cultures techniques (pommes de terre, betterave à sucre)
7. Parcelle à cultures pérennes, cultivées pendant 6-8 ans (Vinca minor).

IV. PREPARATION DU SOL

Le labourage du sol contribue à la création de conditions favorables à la croissance des plantes, particulièrement en ce qui concerne l'aération, la chaleur, le régime de l'eau et des éléments nutritifs du sol.

Par les travaux du sol on tend à la réalisation de plusieurs objectifs: ameublissement, destruction des mauvaises herbes, incorporation dans le sol d'engrais et de restes végétaux, nivellement du terrain, création de conditions favorables à l'accumulation et à la conservation de l'eau et à l'activité microbologique.

1. Le labourage de base mobilise le sol en profondeur et il est exécuté par la charrue, le disque, la fraise, ou par la charrue défonceuse.

Le nombre, l'époque, la profondeur d'exécution des travaux de base dépendent du relief, de la nature du sol, de l'humidité de celui-ci, du moment de la libération du terrain par la plante antérieure, du degré d'envahissement par des mauvaises herbes, de la date des semailles de l'espèce qui suit.

En général, la profondeur du labourage est plus grande sur sols argileux, inclinés, sur ceux qui doivent retenir l'eau, sur sols où prédomine une certaine sorte de mauvaises herbes, sur ceux où se succèdent des espèces à système racinaire pivotant, profond etc. (9).

Après des plantes antérieures, dont on libère tôt le terrain, le labourage de base est exécuté directement, à une

profondeur de 25 à 30 cm, dans des conditions d'humidité optimales, à la charrue suivie par la herse et on maintient ensuite le sol ameubli et dépourvu de mauvaises herbes par hersages répétés.

Lorsque l'humidité du sol ne permet pas l'exécution du labourage sans laisser des amas de terre, on exécutera tout d'abord un labourage superficiel à la charrue ou au disque, restant à faire le labourage proprement dit en période à l'humidité adéquate.

Après des plantes antérieures, dont on libère tard le terrain, on effectue le labourage profond, directement à la charrue suivie par la herse.

En fonction des variétés de mauvaises herbes, après des plantes antérieures précoces, on labourera superficiellement le terrain très envahi par de mauvaises herbes, en continuant ensuite la destruction des mauvaises herbes par des travaux répétés aux cultivateur, disque et herse à dents réglables, ou bien on effectuera directement un tard labourage profond, qui expose au froid les racines et les rhizomes des mauvaises herbes.

Le labourage de base pour Lavandula angustifolia, L. hybrida, Rosa sp. réside dans un défoncement effectué à 40-50 cm (9).

2. La préparation du lit germinatif a pour but le nivellement du terrain, la destruction des mauvaises herbes et la formation d'une couche de sol broyé et ameubli, prête à recevoir la semence. Dans leur grande majorité, les plantes médicinales et aromatiques ont des petites ou très petites semences et c'est pourquoi les travaux de préparation du lit germinatif sont déterminants non seulement pour obtenir la production planifiée, mais aussi pour la réussite proprement dite de la culture respective.

Ces travaux tendent à la réalisation d'une couche de sol adéquate pour chaque espèce, pour ce qui est des degrés d'ameublissement, d'émiettement, d'uniformisation, de tassement et ils sont exécutés avec le combineur; là où cet

appareil manque, on emploie le disque combiné avec la herse à dents réglables et à barres niveleuses. Pour les espèces à semences très petites, qu'on sème superficiellement (0,5 - 1,5 cm), on recommande le travail du terrain au rouleau.

Dans des conditions de sécheresse, ce roulage peut être également effectué après semailles (9).

V. FERTILISATION

Dans l'ensemble des mesures technologiques de culture, la fertilisation représente une étape importante, non seulement pour l'augmentation de la quantité de masse végétale, mais aussi pour l'amélioration de la qualité de celle-ci. On sait que chaque espèce extrait du sol des quantités variables d'éléments nutritifs pour la croissance et le développement, mais les informations sont plus pauvres en ce qui concerne l'apport de chaque type d'engrais et la dose optimale nécessaire pour la croissance de la teneur en principes actifs.

L'influence des engrais se manifeste tant directement, en stimulant la formation et l'accumulation des principes actifs, qu'indirectement, par l'augmentation de la production de principes actifs par unité de surface. Dans certains cas, les engrais agissent favorablement aussi bien sur le total de principes actifs, que dans le sens de l'enrichissement de celui-ci en composants de grande valeur.

Des difficultés surviennent dans la conduite d'une fertilisation efficace lorsqu'un certain élément fertilisant contribue dans une mesure particulière à l'augmentation de la masse végétale, mais n'aide pas à l'accumulation des principes actifs. De même, des complications apparaissent en ce qui concerne la manière dont la fertilisation et le rapport entre les éléments nutritifs influent sur la teneur en principes actifs.

On sait que l'azote contribue à l'augmentation de la masse végétative, le phosphore à la formation des fleurs et des fruits et le potassium influence favorablement le développement des racines chez les espèces cultivées dans ce but.

Le mode et l'époque d'application sont, en général, les mêmes que pour les autres variétés de plantes, à savoir: on applique le superphosphate et le sel de potassium en automne, tandis que l'azotate d'ammonium est appliqué d'habitude à la fin de l'hiver. Pour certaines espèces, telles que Papaver somniferum, Datura innoxia, Mentha piperita, on peut les appliquer également par phases.

En général, les plantes médicinales et aromatiques réagissent favorablement aux engrais, sous l'aspect de la quantité, de même qu'en ce qui concerne la teneur en principes actifs. Ainsi, pour l'espèce Calendula officinalis, l'association du phosphore et du potassium est parvenue à influencer sur la teneur en principes actifs et la production à l'hectare. Les éléments fertilisants ont stimulé, par exemple, l'accumulation des flavones en augmentant la teneur de 50%, tandis que la teneur en polyphénols s'est accrue de 93% (3).

On a mis en évidence chez Papaver somniferum l'influence particulière de l'azote sur la production de capsules et de semences, de même que sur la teneur en morphine (5).

Chez Digitalis lanata, le phosphore a une contribution particulière à l'augmentation de la masse végétative, de même qu'à l'amélioration de celle-ci (6).

Les engrais minéraux ont également une influence positive sur la qualité des fleurs chez Matricaria chamomilla. La production d'huile volatile à l'hectare s'est accrue de 46% par l'application de l'azote et du phosphore en doses de 50 Kg substance active par hectare (s.a./ha). Ce système de fertilisation contribue à l'augmentation de la production d'azulènes, le témoin étant dépassé de 32% (cf. Tableau 1) (8).

Tableau 1

Influence des engrais sur la teneur et la production d'huile volatile et d'azulènes

Variante	Huile volatile		Azulènes	
	l/ha	%	g/ha	%
Témoin non-fertilisé	2,59	100	64,39	100
N ₅₀ P ₅₀	3,78	146	85,23	132

On présente aux tableaux 2 et 3 une image générale des doses, des associations d'engrais et des époques d'application recommandées pour différentes espèces, en fonction des parties récoltées.

Tableau 2

Doses et associations d'engrais pour plantes annuelles

Parties utiles des plantes médicinales et aromatiques	I-ère année		II-ème année	
	automne	printemps (Kg s.a./ha)	automne	printemps
Racines	phosphore	azote	-	-
	60-80	35-45		
	potassium		-	-
	60-70			
Feuilles ou parties aériennes	phosphore	azote	-	-
	50-60	50-70 dont la ½ par phases		
Fleurs, inflorescences	phosphore	azote	-	-
	40-60	35-40		
	potassium			
	40-60			

Tableau 3

Doses et associations d'engrais pour plantes pérennes

Parties utiles des plantes médicinales et aromatiques	I-ère année		II-ème année	
	automne	printemps (Kg s.a./ha)	automne	printemps
Fruits et semences	phosphore	azote	-	-
	50-60	35-40		
	potassium			
	40-60			
Fleurs, inflorescences	phosphore	azote	phosphore	azote
	60-80	35-40	50-60	35-40
	potassium		potassium	
	40-60		30-50	

On établit les doses en fonction de la plante antérieure, du type de sol et du degré d'approvisionnement en éléments fertilisants, des réserves d'eau du sol et des possibilités d'irrigation.

La profondeur d'incorporation dépend de la profondeur à laquelle se développe le système racinaire de chaque espèce. Chez les espèces à système racinaire pivotant et profond (Cynara scolymus, Datura innoxia, Coriandrum sativum), on incorporera les engrais sous le champ labouré; chez les espèces à système racinaire superficiel (Digitalis lanata, Matricaria chamomilla, Plantago sp.), les engrais seront appliqués sur la terre labourée et seront incorporés au disque; même manière d'application pour les terrains irrigués.

L'application rationnelle des engrais sur cultures des plantes médicinales et aromatiques assure l'efficacité économique de celles-ci et, en même temps, garantit la production d'une matière première végétale riche en principes actifs, qui peut satisfaire aux exigences de l'industrie.

VI. SEMAILLES

Les plantes médicinales et aromatiques se reproduisent par semences, fruits ou parties végétatives.

1. Le matériau de reproduction joue un rôle très important dans la réalisation des productions sous l'aspect quantitatif et surtout qualitatif.

Il faut que la semence ou le matériau végétatif (racines, bulbes, tubercules, boutures) provienne des cultures saines et des régions ayant des conditions naturelles semblables à celles où l'on applique les semilles.

La généralisation en production de variétés autochtones et de celles importées, vérifiées et autorisées et surtout la production de semences des catégories supérieures ("Columna" pour Mentha piperita et "Mencriis" pour Mentha crispa, "Lanata 1" pour Digitalis lanata, "Zloty" pour Matricaria chamomilla, "Smena" pour Coriandrum sativum, "Plamen" pour Calendula off.) a pour but l'utilisation d'un matériau approprié de reproduction.

Faute de variétés améliorées, on cherche la provenance de la plus grande valeur, ou, si on emploie un matériau de la

flore spontanée, on préférera les régions ayant une matière première de qualité supérieure.

Pour prévenir les maladies, on désinfecte le matériau de reproduction avant les semailles, traitement qui s'impose au cas de la casse brune de l'inflorescence chez Coriandrum sativum et de la rouille chez Mentha piperita et M. crispa.

Les semences de quelques espèces médicinales et aromatiques lèvent difficilement et d'une manière échelonnée et c'est pourquoi, pour accélérer la germination, on utilise différentes méthodes. Ainsi, pour Melissa officinalis, on a établi que l'hydroxyde de potassium stimule le processus de germination. De même, on fait l'ensemencement de l'espèce Solanum laciniatum au commencement de l'hiver, les conditions de celui-ci actionnant sur les semences et déterminant une levée plus rapide et uniforme.

Il faut que la semence ait le poids de 1000 grains spécifiques pour l'espèce et la zone dans laquelle elle a été cultivée, qu'elle corresponde aux normes en vigueur en ce qui concerne la germination, la pureté et l'humidité.

Il faut tenir compte que, pour certaines espèces, la semence perd vite sa faculté germinative, ce qui exige que la semence provienne de la récolte de l'année respective ou de celle antérieure.

On réalise la garantie d'un matériau de reproduction de grande valeur par l'utilisation de semences reconnues, obtenues dans le processus de production de semences et du matériau bon pour être planté.

2. On peut grouper les espèces des plantes médicinales et aromatiques, en fonction de l'époque des semailles ou de plantation, de la manière suivante:

- (a) espèces qu'on sème à la fin de l'été: Matricaria chamomilla, Valeriana officinalis;
- (b) espèces qu'on plante en automne: Mentha piperita, Lavandula angustifolia, Vinca minor;
- (c) espèces qu'on sème au seuil de l'hiver: Digitalis

- lanata, Melissa officinalis, Saponaria officinalis;
- (d) espèces qu'on sème le printemps, à la I-ère époque:
Digitalis lanata, Coriandrum sativum, Papaver somni-
ferum, Carum carvi, Sinapis alba;
- (e) espèces qu'on plante au printemps: Majorana hortensis,
Thymus vulgaris;
- (f) espèces qu'on sème le printemps, en II-ème époque:
Cynara scolymus, Ocimum basilicum.

On tiendra compte pour les semailles d'automne qu'il est nécessaire que les plantes entrent en hiver avec une rosette de feuilles et des racines bien développés, pour résister à l'hivernage. Pour la majorité des plantes médicinales et aromatiques, l'époque d'ensemencement la plus indiquée est celle du seuil de l'hiver, étant donné que les semences trouvent alors des conditions qui ressemblent à celles du milieu spontané; elles emploient l'humidité accumulée dans le sol en hiver et présentent un avantage du point de vue de l'organisation, étant donné qu'il s'agit d'une période avec moins de travaux agricoles qu'au printemps.

On ne recommande pas les semailles à cette époque dans les régions ayant des hivers moins constants, parce que, en périodes à température plus élevée, les plantes lèvent et lorsqu'une gelée survient, les plantes, étant petites et délicates, peuvent périr.

De même, on ne sèmera pas, au seuil de l'hiver, sur sols sans structure, lourds, qui au printemps prennent de la croûte et empêchent ainsi la bonne levée; on ne sème pas non plus sur terrains à surface accidentée, où les semences peuvent être lavées ou embourbées jusqu'au printemps (2).

On fait les semailles au printemps lorsque l'ensemencement au début de l'hiver est incertain et pour des variétés thermophiles, qui poussent au-dessus de 10°C.

Au printemps, on fait la plantation le plus tôt possible, par temps nuageux et dans un sol humide.

L'observation de l'époque optimale des semailles et de plantation est d'une importance particulière pour la réussite

de la culture et, par conséquent, elle influe la production réalisée.

3. On exécute les semences par rangées, manuellement ou mécaniquement.

Les espèces à petites semences (Digitalis lanata, Matricaria chamomilla) peuvent être semées avec de bons résultats à l'aide des sémoirs pourvus de distributeurs pour petites semences et de limiteurs de profondeur aux socs.

Les espèces à grandes semences (Cynara scolymus, Silybum marianum) peuvent être semées au sémoir à de grandes distances.

4. Il est important de réaliser la densité optimale, en respectant la distance des semences ou de plantation propre à chaque espèce.

Chez Vinca minor, on obtient une plus grande production d'herbe fraîche par plantation à distance de 30 cm entre les rangées (7); chez Sinapis alba, le plus grand rendement en semences est obtenu par semences à des distances entre les rangées de 20 cm, à une norme de 12 Kg/ha (1); chez Tagetes signata, la distance entre rangées de 25 cm, à une norme de 4 Kg/ha de semences, conduit au meilleur rendement en herbe (4).

5. La profondeur des semences diffère en fonction de l'espèce. Chez les espèces à très petites semences, la profondeur est de 0,3 à 0,5 cm (Matricaria chamomilla), 0,5 - 1 cm pour Plantago sp. et Valeriana off.; pour les espèces à plus grandes semences, la profondeur est de 3 à 4 cm (Coriandrum sativum, Datura innoxia).

La profondeur des semences est aussi fonction de l'humidité du sol (humidité plus grande - profondeur plus petite), de la nature du sol (sols lourds - profondeur plus petite). La profondeur des semences est d'une très grande importance pour l'uniformité de la levée et du développement de la culture.

6. Quelques espèces se multiplient d'habitude par plants, parce que les semences directes s'effectuent difficilement.

Tableau 4

Surfaces des plants et quantité de semence
nécessaire pour un hectare de culture (9)

Espèce	Surface		Quantité de semence (g)
	couches chaudes (m ²)	couches froides (m ²)	
Thymus vulgaris	-	120-150	300-350
Lavandula angustifolia	-	150-200	1500-1700
Majorana hortensis	80-100	100-120	300-350
Melissa off.	60-70	120-150	250-300

7. D'autres espèces, par exemple Lavandula angustifolia et Lavandula hybrida, se multiplient par boutures enracinées. On récolte les boutures en automne (septembre - octobre), ou au début du printemps (mars - avril), au temps du repos végétal, de plantes saines et bien développées. On plante en couches bien nivelées, emplantées aux endroits sans danger d'embourbage. En automne, on plante ce matériau à l'endroit définitif.

On fait la plantation sur sol humide, les jours nuageux après la pluie. Lavandula angustifolia, L. hybrida sont plantées manuellement, tandis que les autres espèces - à l'aide du plantoir mécanique, réglé d'une manière adéquate, en fonction des besoins des différentes espèces.

Pour les espèces se multipliant par stolons (Mentha piperita, Vinca minor), la distance entre rangées est de 70, respectivement 50 cm, en ligne continue, avec la norme de 1200-1500, respectivement 1300-1500 Kg/ha de stolons et avec un nombre de 35 à 40, respectivement de 30 à 40 plantes par mètre carré (9).

Tableau 5

Epoque de plantation, distance et
nombre de plantes par hectare, pour
espèces se multipliant par plants

Espèce	Epoque de plantation	Distance (cm)	Nombre de plantes par hectare
Thymus vulgaris	automne - octobre printemps - mars avril	60/25	67.000 - 100.000 à 2 brins sur 50% des paquets
Lavandula angustifolia	automne - octobre printemps - mars	100/50	20.000 seulement 1 brin
Lavandula hybrida	automne - octobre printemps - mars	100/100	10.000 seulement 1 brin
Majorana hortensis	printemps - avril mai	30/20	340.000 - 510.000 à 2-3 brins par paquet
Melissa officinalis	automne - octobre printemps - mars	60/30	55.000 - 80.000 à 2 brins sur 50% des paquets

VII. TRAVAUX D'ENTRETIEN DES CULTURES

Le but de ces travaux est d'assurer aux plantes les meilleures conditions de vie et de prévenir ou de faire disparaître les effets défavorables de quelques facteurs qui agissent sur celles-ci pendant la période de végétation.

1. Chez les plantes médicinales et aromatiques, les travaux d'entretien sont spécifiques pour chaque espèce.

On commence par le hersage des cultures (Mentha piperita, plantée en automne, Matricaria chamomilla en II-ème année, Carum carvi en II-ème année). On fait le hersage perpendiculairement à la direction des rangées, à la profondeur de 3 à 4 cm, à l'humidité adéquate du sol.

Dans les cultures de Lavandula angustifolia et de Satureja hortensis, plantées en automne, se produit souvent un déchaussage des plantes; c'est pourquoi il est nécessaire, immédiatement qu'on peut entrer sur le terrain, de contrôler l'état des plantes et de les mettre, de nouveau, en contact avec le sol. Lorsque les plantes sont levées, quelquefois avant la levée, on exécute le binage entre rangées. L'intervalle entre les rangées est travaillé d'habitude par moyens mécanisés (cultivateurs). On détruit les mauvaises herbes par binages et sarclages manuelles. Le moment de l'exécution des travaux d'entretien (binage, sarclage) est déterminé par le degré d'envahissement du sol par des mauvaises herbes, de même que par le rythme de croissance de l'espèce cultivée. Pour les espèces à croissance lente (Digitalis lanata) si on ne respecte pas le moment de l'exécution des travaux durant les premières phases de la végétation, on peut compromettre la culture. Le nombre de binages manuelles ou mécaniques dépend du degré d'envahissement du sol par les mauvaises herbes, de la longueur de la période de végétation et des précipitations enregistrées durant la période respective. Aux cultures bi-annuelles et pérennantes (Carum carvi) en automne de la première année on bine et, en même temps, on incorpore aussi le superphosphate. Un travail semblable, mais plus profond, peut être effectué en automne aux plantations de Lavandula

angustifolia, L. hybrida et Thymus vulgaris.

2. Les plantes médicinales et aromatiques sont des cultures qui nécessitent une nombreuse main d'oeuvre et c'est pourquoi il est très difficile d'exécuter les travaux de binage-sarclage au moment optimum. Cette particularité impose le passage rapide au traitement chimique contre les mauvaises herbes, qui conduit à la réduction des frais d'entretien.

L'utilisation correcte d'herbicides suppose la prise en considération de la texture du sol, de son contenu en humus, du degré d'envahissement par des mauvaises herbes, des conditions spécifiques de climat et des propriétés des produits utilisés.

L'effet des herbicides dépend de la bonne préparation du lit germinatif, de l'incorporation rapide et adéquate des herbicides volatiles, du degré de recouvrement des mauvaises herbes par la solution d'arrosage, ainsi que de l'uniformité de l'arrosage.

On fait l'application par recouvrement intégral du terrain avec 600 l d'eau à l'hectare. On accorde un soin particulier au jalonnement du terrain, pour éviter qu'il reste des rangées sans herbicide, ou qu'il y ait des superpositions qui doublent la dose des substances, conduisant ainsi à la phyto-toxicité.

On a homologué une série d'herbicides pour un nombre de plantes médicinales et aromatiques (cf. Tableau 6) (10).

Tableau 6

Herbicides homologués pour plantes médicinales
et aromatiques

Herbicide	Dose	Espèce	Epoque d'application
"Treflan"	4 l/ha	Datura innoxia	avant semailles
"Treflan"	6 l/ha	Cynara scolymus	avant semailles
"Afolon"	5 Kg/ha	Matricaria chamomilla	au printemps, en phase de grande rosette (8-10 feuilles)

(Tableau 6, continuation)

Herbicide	Dose	Espèce	Epoque d'application
"Afalon"	5 Kg/ha	Pimpinella anisum	immédiatement après semailles
"Afalon"	7 Kg/ha	Satureja hortensis	après semailles
"Gesagard"	10 Kg/ha	Thymus vulgaris	avant la plantation
"Gesagard"	10 Kg/ha	Lavandula angustifolia	tard en automne
"Balan"	6 l/ha	Cnicus benedictus	avant semailles
"Lasso"	8 l/ha	Sylibum marianum	avant semailles
"Dicuran" et "Reglone"	2 Kg/ha 1,5-2 l/ha	Papaver somniferum	1 Kg de "Dicuran" immédiatement après semailles et en phase de 4-6 feuilles on intervient avec la combinaison "Dicuran" (1 Kg/ha) + "Reglone" (1,5-2 l/ha)
"Igran"	6 Kg/ha	Foeniculum vulgare	immédiatement après semailles
"Gesagard"	5 Kg/ha	Coriandrum sativum	après semailles
"Gesagard" et "Sinbar"	5-7 Kg/ha 2-3 Kg/ha	Mentha piperita	quelques jours après plantation

3. Une autre mesure qui contribue à l'obtention de productions élevées est constituée par l'irrigation, qui est obligatoire dans les zones de steppe.

En fonction des conditions biologiques et du régime des précipitations, on pratiquera l'irrigation différemment, selon les espèces et les périodes de végétation (cf. Tableau 7) (9).

Le tableau 8 (9) apporte à l'attention du lecteur les rendements réalisés par voie de l'irrigation.

Tableau 7

Irrigation de plantes médicinales

Culture	Dans la période de ramification		En phase de boutons	
	nombre d'irrig.	normes m ³	nombre d'irrig.	normes m ³
Mentha piperita	2	250-300	2-3	500-600
Solanum laciniatum	2-3	300-350	3-4	500-600
Digitalis lanata	jusqu'à la formation de la rosette		après la formation de la rosette	
	2-3	250-300	2-3	450-500

Tableau 8

Rendements par irrigation

Culture	Moyen de culture	Production	
		q/ha	%
Mentha piperita	non irrigué	80	100
	irrigué	146	182
Digitalis lanata	non irrigué	100	100
	irrigué	197	197

VIII. MALADIES, PARASITES, LUTTE CONTRE CEUX-CI

L'extension en cultures de plantes médicinales et aromatiques a conduit à l'augmentation considérable des maladies et des parasites, à une agressivité élevée de l'attaque, à l'apparition de quelques agents pathogènes spécifiques, quelquefois inexistants dans la flore spontanée.

Sont plus fréquemment attaquées les cultures qui occupent des surfaces plus grandes. Chez Coriandrum sativum, l'attaque complexe de bactéries et de champignons peut détruire complètement la production; chez Papaver somniferum, le charançon de la capsule et des racines diminue beaucoup la production et chez Mentha piperita, la rouille produit d'importants préjudices.

L'effet de l'attaque des maladies et des parasites est amplifié grâce à la diminution de la teneur en principes actifs.

Les mesures les plus efficaces de réduction de l'attaque des maladies et des parasites sont celles préventives; les mesures agrophytotechniques sont faciles à appliquer et conduisent à éviter, dans une grande mesure, l'attaque des maladies et des parasites. Un autre moyen de combattre les maladies et les parasites est la création de variétés résistantes.

On applique la lutte chimique au moyen de substances les plus indiquées à une attaque puissante, en fonction des cultures, des conditions de climat, des parasites. À l'application des pesticides, on respectera les indications concernant la rémanence du produit, parce que les drogues sont employées telles quelles.

On exécutera le dernier traitement 25-30 jours avant la récolte et cette restriction est absolument obligatoire pour les espèces dont on récolte la matière végétale pour des tisanes (9).

IX. RECOLTE

Anneau final de la chaîne de culture, la récolte doit assurer l'obtention de produits végétaux à teneur la plus élevée possible en principes actifs, la corrélation de la teneur avec le niveau des productions obtenues, de même qu'avec l'aspect commercial.

Une condition fondamentale pour obtenir un produit végétal escompté, sous l'aspect qualitatif et quantitatif,

est le choix du moment optimum de récolte. Dans ce but, on a établi pour les principales espèces des plantes médicinales et aromatiques cultivées en Roumanie les époques propices, lorsque s'accumule dans les tissus, la plus grande quantité de principes actifs ou d'huiles volatiles.

On récolte, en général, les parties souterraines (racines, rhizomes) en période de repos de l'automne et du printemps, lorsqu'il y a afflux de structures chimiques physiologiquement actives vers ces organes.

On récolte d'habitude les feuilles jusqu'à la phase des boutons (Mentha piperita, Malva glabra), tandis que pour les plantes qui forment en I-ère année seulement des rosettes basales (Digitalis lanata, D. purpurea et Cynara scolymus) à mesure de la maturité technique. Les parties aériennes (Hypericum perforatum, Mentha piperita, Thymus vulgaris) sont récoltées au début de la floraison; les fleurs et les inflorescences (Lavandula angustifolia, L. hybrida, Calendula officinalis) sont récoltées dès le début et jusqu'au moment de la floraison; on récolte les fruits et les semences (Pimpinella anisum, Carum carvi, Coriandrum sativum) près de la maturité complète.

Les plantes aromatiques cultivées pour l'huile volatile seront récoltées entre 9.00 et 16.00 heures, à l'exception de Salvia sclarea, qu'on récolte la nuit, entre 19.00 et 4.00 heures du matin.

La récolte doit être faite par beau temps. On récolte les feuilles et les fleurs après la levée de la rosée, pour assurer une concentration plus grande en substances actives, de même que pour éviter les difficultés de dessiccation. Les racines et rhizomes peuvent être récoltés par n'importe quel temps.

La non-observation de ces indications conduit à d'importantes pertes de la teneur en principes actifs.

Les espèces dont on récolte les organes souterrains seront récoltées à l'aide de la charrue sans oreilles ou de l'arracheuse de pommes de terre. Les feuilles et les fleurs sont récoltées à la main, ou à l'aide de la faucille

et la masse végétale, par la coupure de celle-ci, à l'aide de la faucille, de la faux et de la faucheuse mécanique.

Pour les espèces dont on récolte les fruits ou les semences, on emploie la moissonneuse-batteuse. Pour éviter le cassage des fruits ou des semences, on règle la moissonneuse-batteuse en diminuant le tour du tambour, en réduisant le nombre de tamis, en augmentant l'espace entre le tambour et le contrebatteur et en diminuant la vitesse du ventilateur.

On obtient des produits de qualité par la conservation adéquate de la matière première fraîche, de même que par le transport de celle-ci dans des conditions adéquates au lieu de dessiccation ou de transformation.

X. CONDITIONNEMENT PRIMAIRE

Par le conditionnement primaire, on passe du produit végétal frais à l'état de drogue correspondant qualitativement.

1. On fait tout d'abord le préconditionnement, qui consiste en la préparation des drogues avant d'être soumises à la ~~dessiccation~~ dessiccation. On ne préconditionne pas les produits qu'on distillera par la suite, car ces travaux sont chers et liés à des pertes d'huile volatile.

Les racines sont débarassés de la terre dès qu'on les récolte, puis on les lave avec un jet d'eau. On accorde une grande attention à l'élimination de tous les restes de terre, sable etc. L'herbe, les feuilles ou les inflorescences qui seront séchées seront nettoyées des restes de terre, des restes végétaux et des mauvaises herbes. Immédiatement, on passera par le tamis les semences et les fruits; on les éventrera ensuite.

On emploie des tamis de dimensions différentes, pour éliminer les restes végétaux frais, qui, par leur grand pourcentage en humidité, contribuent à la dépréciation de la production. Après le passage par les tamis, la production doit être passée par la vanneuse, pour éliminer toute poussière végétale.

2. On poursuit par la dessiccation, durant laquelle il est nécessaire de garder l'aspect extérieur de la drogue, de même que sa composition chimique.

À l'exception des plantes destinées à la distillation, les autres produits doivent être séchés le plus rapidement possible.

La dessiccation des plantes médicinales suppose un abordage différent, en fonction de:

- . l'organe employé pour les drogues, la texture et sa teneur en eau;
- . la nature des principes actifs des tissus soumis à la déshydratation;
- . la nature de l'équipement enzymatique;
- . les possibilités économiques.

(a) La dessiccation naturelle au soleil reste la plus accessible, mais elle ne peut être réalisée qu'en été et dans les zones à climat plus chaud, pour un nombre restreint d'espèces. On recommande de sécher au soleil seulement les racines, les semences, les fruits, l'herbe ou d'autres produits qui ne sont pas dégradés par l'action des rayons solaires. Les produits sont étendus sur cadres, bâches, paillassons, feuilles de papier, carton, même sur la terre sèche et bien nettoyée, ou sur des plate-formes bétonnées, selon les possibilités, mais en respectant obligatoirement les nécessités imposées pour obtenir des drogues de qualité.

On prendra des mesures de protection des drogues exposées au soleil en cas de précipitations et contre l'humectation produite par la rosée.

La dessiccation naturelle est faite en écuries ou hangars, qui doivent être bien nettoyés et secs. On étend les produits directement par terre, sur paillassons ou feuilles de papier. L'épaisseur de la couche des produits médicinaux ou aromatiques soumis à la dessiccation est en fonction de la nature de ceux-ci. Ainsi, sur un mètre carré on peut sécher 2-3 Kg racines, 1-2 Kg herba, 0,5-1 Kg feuilles, 0,5-1 Kg fleurs et inflorescences, 3-4 Kg semences ou fruits. On laissera des sentiers entre les carrés de plantes pour

l'accès des ouvriers, qui les retourneront périodiquement, en vue d'accélérer la dessiccation.

Dans des constructions en tôle, lorsque le temps de dessiccation est réduit, en raison des températures élevées du mélange, il faut augmenter la surface de dessiccation par étagères de dessiccation en bois et filets en fil de fer ou toile.

En aucun cas on ne fera sécher des plantes toxiques aux côtés d'autres plantes.

(b) La dessiccation artificielle, dans des sécheries modernes, conduit aux rendements qualitatifs maxima, si on l'applique correctement et différemment. Il faut tenir compte de la température optima pour la dessiccation les variétés qui contiennent des huiles volatiles sont séchées jusqu'à la température de 35°C (Matricaria chamomilla, Mentha piperita, Salvia off.), les espèces à mucilage - jusqu'à 40°C (Malva glabra, Althaea sp.), les variétés de glycosydes cardiotoniques (Digitalis lanata) - jusqu'à 45°C, les variétés à alcaloïdes (Atropa belladonna, Datura innoxia) - entre 50° et 70°C, tandis que les espèces à glycoalcaloïdes (Solanum laciniatum) - entre 70° et 80°C.

Pour employer toute la capacité des installations de dessiccation l'uniformité et l'épaisseur de la couche du produit soumis à dessiccation jouent un rôle particulier.

3. Après dessiccation on fait le contrôle supplémentaire et l'emballage. Par le contrôle on éloigne tout ce qui ne correspond pas à un aspect qualitatif adéquat (poussières, corps étrangers, débris non-admis).

Les racines seront emballées dans des sacs en jute. Les grandes feuilles (Digitalis lanata, Plantago sp., Cynara scolymus), l'herbe, les écorces de pavot, résultant du battage, seront emballées en sacs de toile. On emballe dans des caisses de carton ou de placage les fleurs et les inflorescences, de même que certaines feuilles de petites dimensions (Mentha piperita). Les fruits et les semences de grandes dimensions seront emballés dans des sacs de jute, tandis que ceux de très

petite taille - dans des sacs de toile ou de papier.

En cas de réutilisation de quelques emballages, ceux-ci doivent être bien nettoyés, car certaines drogues sont toxiques (Datura innoxia Mill., Digitalis lanata).

4. Le traitement industriel de quelques variétés aromatiques, par exemple Mentha piperita, Lavandula angustifolia, L. hybrida, est fait par distillation.

Il y a deux types d'installations de distillation:

(a) à distillation en discontinu, où la matière première n'est pas mise directement dans la chaudière, mais dans une corbeille confectionnée en fil de fer, pour faciliter les travaux de chargement et déchargement;

(b) distillation en continu, à chaudières fixes, ou à chaudières mobiles basculantes.

5. La conservation des drogues végétales implique quelques normes strictes, qui excluent les variations au delà de certaines limites d'humidité atmosphérique ou de température dans les entrepôts, ainsi que le développement de maladies ou d'agents nuisibles.

Une conservation telle que stipulée par les normes en vigueur maintient le niveau qualitatif réalisé dans les opérations de conditionnement primaire.

B I B L I O G R A F I E

1. Braga A., Male Stefania (1980) - Herba Romanica, vol. II, pp. 65-69, Bucarest
2. Coiciu Evdochia, Racz G. (1962) - Plante medicinale și aromatice, Ed. Academiei R.P.R., Bucarest, p. 67
3. Ivan Veronica et collab.(1980) - Herba Romanica, vol. II, pp. 33-37, Bucarest
4. Male Stefania, Ivan D. (1981) - Herba Romanica, vol. III, pp. 43-46, Bucarest
5. Mihalea A. et collab. (1979) - Herba Romanica, vol. I, pp. 85-89, Bucarest
6. Mihalea A. et collab. (1979) - Herba Romanica, vol. I, pp. 71-77, Bucarest
7. Mihalea A. et collab. (1979) - Herba Romanica, vol. I, pp. 51-55, Bucarest
8. Păun E., Mihalea A. (1966) - Analele I.C.C.P.T. Fundulea, vol. XXXIV, seria B, p. 668, Bucarest
9. Păun E. et collab. (1978) - Indrumător pentru cultura plantelor medicinale și aromatice, pp. 29, 40-44, 47-49, 51-54, 56, 58, 63, 69-70, Bucarest
10. Ministerul Agriculturii și Industriei Alimentare (1981) - Lista pesticidelor avizate pentru utilizarea în agricultură, pp. 40-46, Bucarest

AMELIORATION ET PRODUCTION DES SEMENCES
POUR PLANTES MEDICINALES ET AROMATIQUES

Anela Dumitrescu +)

Aurel Mihalea +)

Emil Păun ++)

+) Chercheur à la Station expérimentale pour plantes
médicinales et aromatiques, Fundulea, Roumanie

++) Directeur de la Station expérimentale pour plantes
médicinales et aromatiques, Fundulea, Roumanie

I. INTRODUCTION

Bien que l'utilisation des plantes médicinales et aromatiques soit aussi ancienne que celle des plantes alimentaires, on considère leur amélioration comme ayant subi un certain retard. Cependant, au cours des dernières 30 à 40 années on peut signaler un progrès certain dans ce domaine, mais des difficultés spécifiques à ce groupe de plantes persistent néanmoins.

Stein (27) considère que les causes du retard dans l'amélioration des plantes médicinales et aromatiques par rapport aux autres plantes cultivées sont multiples et elles sont différemment expliquées par les spécialistes. La plupart considère cet état comme résultat du fait que les plantes médicinales et aromatiques cultivées sur des grandes surfaces représentent une branche relativement nouvelle. De même, on apprécie que, par rapport aux autres secteurs de la production agricole, les plantes médicinales et aromatiques ont une importance économique plus réduite. Enfin, on ajoute aux causes du manque de progrès notables dans le domaine de l'amélioration des plantes médicinales et aromatiques la connaissance réduite des principes actifs, le manque de méthodes rapides d'analyse et des corrélations entre le phénotype et la teneur (27, 29).

La majorité des spécialistes (3, 27, 29 etc.) en amélioration considère comme but essentiel de l'amélioration la richesse en principes actifs et leur qualité. D'autres mettent sur le même plan la qualité et la capacité de production des formes améliorées. Il est normal d'avoir en vue les deux objectifs et de ne pas négliger en outre ni la résistance aux maladies et aux conditions défavorables de l'environnement, ni la qualité de la plante de se prêter à une récolte mécanisée.

Parcourant brièvement les causes qui ont déterminé et qui déterminent encore certains retards dans l'amélioration

des plantes médicinales et aromatiques, il convient de mentionner que les particularités biologiques mêmes créent quelquefois des difficultés dans les différentes étapes de création de nouvelles formes, supérieures. De plus, le grand nombre d'espèces et leur variété supposent l'adaptation de méthodes d'amélioration adéquates ainsi que l'utilisation de méthodes d'analyse chimique spécifiques.

Les espèces sont, d'après leur cycle vital, annuelles (Coriandrum sativum, Matricaria chamomilla, Datura innoxia, Solanum laciniatum, Papaver somniferum, Mentha piperita), biennuelles (Digitalis lanata, Cynara scolymus, Carum carvi) ou pérennantes (Lavandula angustifolia, Vinca minor, Valeriana officinalis).

La plupart des espèces médicinales et aromatiques se multiplie par voie générative, certaines par voie végétative, comme Mentha piperita ou Vinca minor et d'autres tant par semences que par diverses parties végétatives (Lavandula angustifolia, Valeriana officinalis).

Outre le fait que chez ces espèces les principes actifs sont localisés dans différents organes, leurs structure et catégorie varient des huiles volatiles aux alcaloïdes, glycosides, flavones etc.

La majorité des espèces médicinales et aromatiques sont allogames ou dominant allogames; chez Datura innoxia et Solanum laciniatum domine l'autogamie.

La plupart des plantes médicinales et aromatiques est représentée par des populations constituées par de nombreux biotypes. La variabilité accentuée génotypique et phénotypique et de la teneur chimique de ces populations constitue un avantage dans les travaux d'amélioration.

II. OBJECTIFS DE L'AMÉLIORATION DES PLANTES MÉDICINALES ET AROMATIQUES

Dans le domaine de l'amélioration, les recherches sont orientées dans les directions suivantes :

- (a) augmentation de la capacité de production des plantes médicinales et aromatiques;
- (b) augmentation de la teneur en principes actifs;
- (c) amélioration de la composition en principes actifs;
- (d) augmentation de la résistance aux maladies, agents nuisibles, conditions défavorables d'environnement, en vue de réaliser des productions stables;
- (e) perfectionnement des méthodes de maintien des propriétés génétiques des variétés créés.

A. Augmentation de la capacité
de production

La création de variétés à capacité de production augmentée est moins difficile à réaliser, tenant compte que pour plusieurs espèces on utilise des populations locales, des variétés extensives ou même du matériel issu de la flore spontanée, ayant un riche bagage héréditaire (24).

L'amélioration de la capacité de production par des méthodes génétiques est cependant limitée, au stade actuel des connaissances et des moyens, pour les raisons suivantes:

- (a) la capacité de production est une propriété complexe, qui est conditionnée par les éléments de production (cf. Tableau 1), par une série de processus biochimiques et physiologiques et par des facteurs d'influence (résistance aux maladies et aux conditions défavorables d'environnement);
- (b) le contrôle génétique de la capacité de production - caractère typiquement quantitatif - est compliqué, c'est-à-dire outre les polygènes interviennent également d'autres systèmes de gènes (gènes majeures et interactions);
- (c) la capacité de production et ses composantes sont fortement affectées par des facteurs écologiques et agrophytotechniques, ce qui rend difficile leur étude génétique;

- (d) les connaissances relatives aux bases biochimiques et physiologiques de la formation des récoltes sont insuffisantes (8);
- (e) en plus, chez les plantes médicinales et aromatiques existe une grande variété de formes sous lesquelles se présente la matière première végétale, ce qui suppose l'application de méthodes spécifiques d'amélioration (cf. Tableau 1).

Tableau 1

Variété de formes sous lesquelles se présente la matière première des plantes médicinales et aromatiques et éléments constitutifs spécifiques de la capacité de production

Espèce	Organe qu'on récolte	Eléments de la capacité de production
Coriandrum sativum	fruit	nombre d'ombelles, nombre de fruits/ombelle, poids spécifique
Digitalis lanata	feuille	nombre de feuilles, dimensions des feuilles, poids des feuilles
Valeriana officinalis	racine	nombre de radicelles, poids des racines
Mentha piperita	herbe	nombre de ramifications, nombre de feuilles, poids de la plante
Lavandula angustifolia	inflorescence	nombre d'inflorescences, nombre de verticilles, nombre de fleurs
Papaver somniferum	semence capsule	nombre de ramifications, poids de la capsule

B. Amélioration de la teneur en principes actifs

Cet objectif est d'une importance primordiale dans l'amélioration des plantes médicinales et aromatiques. La richesse en principes actifs est déterminée par des méthodes

polygènes ayant un caractère quantitatif. L'hérédité de la teneur en principes actifs est soumise à l'action modificatrice de certains facteurs internes ou externes. Parmi les facteurs qui influent sur la teneur en principes actifs, la structure génétique, les conditions écologiques et de culture, ainsi que l'interaction génotype/conditions externes jouent un rôle considérable.

L'influence du génotype sur la teneur en principes actifs est assez forte. Chez le pavot existent des variétés qui ont une teneur de 0,5 à 0,6% en morphine, alors que d'autres variétés ont seulement 0,2 - 0,3% de morphine. Chez le coriandre, la teneur en huile volatile des variétés "Luci" et "Smena" varie de 1,3 à 2,0%, alors que celle de la population du Bărăgan (plaine dans le Sud de la Roumanie) est seulement de 0,6 à 0,8%. La teneur des variétés de camomille "Mărgăritar" et "Zloty-lan" est de 0,6 à 0,7% d'huile volatile, alors que la population du Criș (Nord de la Roumanie) atteint seulement 0,25 - 0,35%.

Mais on signale des variations assez grandes de la teneur en principes actifs d'un an à l'autre, d'une zone à l'autre. En plus, chez beaucoup d'espèces, ces variations sont saisonnières et diurnes (cf. Tableaux 2, 3).

Tableau 2

Variation de la teneur en morphine de
Papaver somniferum d'un an à l'autre
(d'après Hotin et Novikova) (10)

Variété	Indicateur de qualité	Années d'expérience					
		1961	1962	1963	1964	1965	1966
"Novinka"	teneur en morphine en %	0,62	0,46	0,62	0,61	0,45	0,65

Tableau 3

Variation diurne de la teneur en lanatoside C
de l'espèce Digitalis lanata

Indicateur de qualité	Heure de récolte				
	8	10	12	14	16
Lanatoside C (%)	0,156	0,171	0,211	0,204	0,180

Pour la réalisation de cet objectif d'amélioration on se heurte à de nombreux obstacles, certains d'entre eux étant difficiles à surmonter.

Un exemple édifiant dans ce sens est la corrélation négative entre la production de matière première végétale et la teneur en principes actifs. Chez certaines espèces cette corrélation négative s'établit entre la dimension des feuilles et la teneur en huile volatile (Mentha piperita), ou bien entre la dimension des fruits et la teneur en huile volatile (Coriandrum sativum).

C. Amélioration de la composition des principes actifs

Cet objectif a, chez les plantes médicinales et aromatiques, une importance particulière, car dans beaucoup de cas de l'ensemble des principes actifs d'une plante, l'industrie n'utilise que certains composants.

On considère que le composant principal du total des principes actifs est déterminé par une gène majeure, sa présence étant une propriété dominante (18, 8, 23) (cf. Tableau 4).

Pour Datura innoxia, du total des alcaloïdes il faut augmenter la teneur en scopolamine, pour Digitalis lanata - augmenter la teneur en lanatoside C et réduire la teneur en lanatoside A, pour Vinca minor - augmenter la teneur en vincamine, pour Papaver somniferum - la teneur en morphine (cf. Tableau 5).

Tableau 4

Composant principal dont la teneur dans
le total des principes actifs doit être
augmentée par amélioration

Espèce	Catégorie de principes actifs y contenus	Composant sollicité
<i>Datura innoxia</i>	alcaloïdes	scopolamine
<i>Solanum laciniatum</i>	gluco-alcaloïdes	solasodine
<i>Vinca minor</i>	alcaloïdes	vincamine
<i>Papaver sommiferum</i>	alcaloïdes	morphine
<i>Atropa belladonna</i>	alcaloïdes	hyosciamine
<i>Cynara scolymus</i>	polyphénols - flavones	cinarine - lutéoline
<i>Valeriana officinalis</i>	huile volatile	valépotriates
<i>Digitalis lanata</i>	cardenolides	lanatoside C
<i>Matricaria chamomilla</i>	huile volatile	azulènes, bisoboloxides, flavones
<i>Mentha piperita</i>	huile volatile	menthol
<i>Lavandula angustifolia</i>	huile volatile	acétate de linalil

C'est également le cas du menthol dans Mentha piperita, de l'acétate de linalil dans Lavandula angustifolia, des azulènes dans Matricaria chamomilla, des valépotriates dans Valeriana officinalis qui représentent les principaux composants dont la proportion doit être augmentée.

Dans ce sens on envisage aussi la réalisation de formes différenciées uniquement du point de vue chimique. Elles constituent des composés dits taxons chimiques (29, 30).

Tableau 5

Variation de la proportion du composant principal dans le total des principes actifs chez quelques espèces de plantes médicinales et aromatiques

Espèce	Composant principal	Limites de variation %
<i>Datura innoxia</i>	scopolamine	0,09 - 0,13
<i>Solanum laciniatum</i>	solasodine	0,5 - 1,2
<i>Vinca minor</i>	vincamine	0,07 - 0,15
<i>Papaver somniferum</i>	morphine	0,25 - 0,65
<i>Atropa belladonna</i>	hyosciamine	0,3 - 0,5
<i>Cynara scolymus</i>	cinarine - lutéoline	1,5 - 3,5
<i>Digitalis lanata</i>	lanatoside C	0,15 - 0,23
<i>Matricaria chamomilla</i>	azulènes	5 - 15

La réalisation de cet objectif est difficile, vu l'absence de corrélations entre la teneur totale en principes actifs et la proportion du composant sollicité (29, 3).

D. Amélioration de la résistance aux maladies et aux agents nuisibles

Bien que les dommages causés par les maladies et agents nuisibles aux plantes médicinales et aromatiques ne soient pas aussi grands que ceux enregistrés chez d'autres cultures agricoles, ceux-ci ont commencé à être ressentis avec l'augmentation des surfaces cultivées.

Chez Mentha piperita on rencontre souvent la rouille, chez Digitalis lanata - la septoriose et des viroses, chez Datura innoxia - des viroses et, chez Coriandrum sativum - des bacterioses. Parmi les agents nuisibles on a

constaté des dommages importants par l'attaque du doryphore sur Solanum laciniatum, Hyosciamus niger, du charançon des capsules sur Papaver somniferum, de la guêpe du coriandre sur Coriandrum sativum.

Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la lutte chimique contre les maladies et les agents nuisibles, l'amélioration génétique de la résistance et la création de variétés résistantes reste une mesure parmi les plus efficaces et économiques de prévention des dommages. Le succès dans le domaine de l'amélioration de la résistance aux maladies et agents nuisibles dépend de l'existence des sources de résistance. Dans ce but, on utilisera comme géniteurs des formes résistantes améliorées ou des espèces cultivées et spontanées apparentées du même genre, capables de s'hybrider avec les formes à améliorer.

En même temps que le développement des cultures de tissus, on crée aussi la prémisse de l'obtention plus rapide des formes exemptes de maladie, donc une source idéale de matériau pour les croisements.

Mais la lutte contre les maladies et les agents nuisibles ne doit pas être menée seulement par des moyens génétiques. Outre la création de formes résistantes, il faut appliquer toutes les mesures agrotechniques qui assurent le développement vigoureux des plantes et la création des conditions défavorables pour l'apparition des maladies et la propagation des agents nuisibles.

E. Amélioration de la capacité d'adaptation

Dans les collections existantes on trouve des sources de gènes pour la résistance aux facteurs climatiques, qui peuvent être incorporés dans les formes améliorées. Ces gènes sont transmis aux descendants par dominance, additivité et transgression.

Une propriété adaptative de grande importance pour les espèces de plantes médicinales et aromatiques est la précocité. L'utilisation des formes précoces contribue à la diminution

des pertes ou même à la sauvegarde des cultures contre les calamités provoquées par la longue sécheresse, pendant l'été, la gèle prématurée en automne, l'attaque des maladies etc.(2).

Chez les espèces dont on récolte les semences ou les fruits en cultivant de formes à période plus courte de végétation on peut éviter la diminution des récoltes pendant les canicules, en période de floraison ou de fructification. Les variétés précoces de Coriandrum sativum, Sinapis alba, Pimpinella anisum sont préférées, car elles permettent l'extension des cultures doubles en conditions d'irrigation et constituent des prémisses idéales pour la deuxième culture, celle des céréales d'automne. Le rythme de croissance, comme élément de la précocité, représente un critère de sélection pour les espèces dont on utilise l'herbe ou les feuilles.

Comme mesure d'organisation, on recommande, pour la même unité, la culture de variétés à périodes différentes de végétation, en vue de l'échelonnement des récoltes et leur éventuel emploi comme matière première en industrie. Ainsi, l'existence de 2 à 3 variétés de menthe ou de lavande crée la prémisses de l'utilisation rationnelle des installations de distillation.

L'uniformité de la floraison et la maturation simultanée des fruits ou des semences des espèces ombellifères ou crucifères constituent des propriétés adaptatives d'une importance particulière. La réalisation de cet objectif par amélioration permet la récolte mécanisée en une seule phase des cultures et contribue à la diminution des pertes par secouage (8).

La résistance à la chute représente pour certaines espèces (pavot, chamomille, coriandre, moutarde, cumin) une propriété qui peut être améliorée. L'aptitude pour une récolte mécanisée est également un objectif dont on doit tenir compte dans l'amélioration des espèces dont on récolte les feuilles (artichaut, digitale) ou l'herbe (menthe, sarriette).

Un objectif spécifique se rapporte à l'aspect commercial de la matière première. Ainsi, par exemple, les feuilles de menthe doivent avoir la couleur vert -foncé et la nervure violacée, les semences de pavot doivent présenter une couleur bleu-acier et les fleurs de camomille doivent donner une tisane couleur de citron (3).

III. MATERIAU INITIAL D'AMELIORATION

La notion de matériau initial d'amélioration définit les formes des plantes utilisées dans le processus d'amélioration.

Le succès des travaux d'amélioration est déterminé par la diversité génétique et l'abondance du matériau initial. L'améliorateur doit savoir si celui-ci possède la variabilité nécessaire pour séparer par sélection les génotypes désirés ou bien s'il doit provoquer la variabilité par diverses méthodes (hybridation, polyploïdie, mutagenèse).

Le matériau initial doit posséder un germoplasme qui puisse déterminer les caractéristiques à obtenir par la nouvelle variété (adaptabilité, résistance aux maladies et aux agents nuisibles, caractéristiques de qualité, capacité de production etc.).

Pour enrichir le germoplasme il faut organiser la collection et le maintien des formes de la flore spontanée, des populations locales, ou provenant d'autres zones, des variétés améliorées et des espèces apparentées.

En vue d'utiliser dans les travaux d'amélioration de la collection du matériau initial, il convient de faire une recherche multilatérale pour mettre en évidence certaines caractéristiques ou de formes de valeur qui correspondent aux objectifs d'amélioration proposés.

La flore spontanée de plantes médicinales et aromatiques représente une source inépuisable de matériau initial, par le bagage héréditaire complexe qui confère une grande plasticité écologique, en raison des propriétés d'adaptabilité et de bonne résistance aux maladies.

Ces formes présentent pourtant quelques caractéristiques négatives : capacité réduite de production, qualité inférieure comme matière première, germination et maturation échelonnées, mauvaise résistance au secouage.

Dans le champ de collection s'impose une étude attentive

et détaillée des formes existantes, en établissant les possibilités et les méthodes par lesquelles les caractéristiques de valeur pourront être concentrées dans les nouvelles variétés.

L'enrichissement permanent du matériel initial par des échanges inter-pays, avec divers jardins botaniques, s'impose pour la collection de diverses populations, provenances et des formes de la flore spontanée.

On gardera dans "la banque de gènes" les nouvelles lignées et variétés améliorées et le matériel initial obtenu par diverses méthodes connues: hybridation, mutagenèse, polyploïdie.

IV. METHODES D'AMELIORATION APPLIQUEES AUX PLANTES MEDICINALES ET AROMATIQUES

Du point de vue économique, les plantes médicinales et aromatiques se divisent en:

- . espèces cultivées sur des surfaces réduites (quelques dizaines d'hectares) dont les demandes ne sont constantes d'une année à l'autre, ni pour la consommation interne, ni pour l'exportation;
 - . espèces cultivées sur des plus grandes surfaces, toujours sollicitées par les industries chimique-pharmaceutique, cosmétique et les ménages.
- A. Pour le premier groupe d'espèces (Achillea millefolium, Artemisia absintium, Satureja hortensis, Malva glabra, Calendula officinalis), les schémas d'amélioration doivent être simples et de courte durée.

1. Introduction de formes nouvelles

Des espèces mentionnées on cultive généralement les populations locales ou de provenance étrangère. Il s'impose de collecter diverses populations du pays ou étrangères et de les étudier dans le champ de collection sous l'aspect productif - qualitatif et des principales propriétés physiologiques et, par la suite, étendre en culture les populations les plus valeureuses.

2. Sélection en masse négative

On élimine du champ les plantes malades, sous-développées et celles non-typiques. On fera de même l'étude des biotypes composants, du point de vue morphologique et chimique. D'après le résultat de cette étude on choisira les biotypes de valeur. Si la population, dans sa structure initiale, présente des caractères supérieurs de productivité et de qualité, on maintiendra la même proportion entre les biotypes composants que celle de la forme initiale. Il convient de rappeler que les formes à base génétique plus large ont une plasticité écologique accrue et une résistance meilleure aux maladies et aux agents nuisibles.

Au cours du processus d'amélioration on tiendra compte que la base génétique des formes sélectionnées ne soit pas trop rétrécie.

3. Sélection individuelle avec un seul choix

Pour ce groupe d'espèces l'amélioration de la valeur biologique du matériau peut également être obtenue dans le processus de production de la semence, qui comporte trois stades:

- (a) champ de choix - pour lequel on utilise des formes de la flore spontanée ou des champs de production de semence;
- (b) champ de sélection - où l'on sème individuellement chaque élite en l'étudiant des points de vue morphologique et chimique;
- (c) champs de superélite - où l'on sème un mélange des élites les plus précieuses. La semence obtenue passe après dans le champ d'élite et dans les cultures de production.

Paralèlement, le matériau des stades mentionnés doit être étudié dans des cultures comparatives.

B. Pour les espèces sur grandes superficies de culture on applique quelques méthodes classiques d'amélioration, utilisées aussi pour d'autres espèces agricoles, notamment:

- . introduction de nouvelles formes;
- . sélection;
- . hybridation;
- . polyploïdisation;
- . mutagenèse (mutagènes physiques, chimiques ou mutations spontanées).

1. Introduction de nouvelles formes

La méthode consiste en l'introduction de populations ou variétés d'autres pays. On enrichit ainsi l'assortiment ou la collection des formes chez diverses espèces. Celle-ci est une des plus anciennes et efficaces méthodes d'augmentation de la production et de la qualité par extension en culture de formes importées jusqu'à l'obtention de variétés locales.

Certaines des formes introduites peuvent provenir de zones aux conditions semblables, étant ainsi adaptées, ou si les conditions pédoclimatiques sont différentes on pourra les adapter de manière génotypique sous l'influence des conditions naturelles. Ces formes, cultivées au début telles quelles, peuvent être utilisées après comme géniteurs dans les travaux d'amélioration (19).

En Roumanie, dans la période 1973-1976, ont été autorisées et mises en culture quelques variétés de l'étranger: pour Matricaria chamomilla - la variété "Zloty-lan"; pour Coriandrum sativum - les variétés "Luci" et "Smena"; pour Papaver somniferum - les variétés "Start" et "Goluboi jubileinfi".

2. Sélection

(a) La sélection individuelle répétée s'applique aux espèces autogames et à celles à multiplication végétative. Cette méthode mène à la séparation des variations génétiques

naturelles d'une population.

La méthode consiste dans le choix de plantes de valeur, y inclus leurs variantes, d'après les caractéristiques morphologiques, physiologiques et chimiques suivies de la multiplication séparée des descendants.

La sélection individuelle ne doit pas être répétée sur un trop grand nombre de générations, pour ne pas appauvrir la base héréditaire des formes séparées par sélection.

En Roumanie, on a obtenu par cette méthode les variétés de pavot (Papaver somniferum) "Cluj R" et "Cluj A" (6), une variété de Digitalis lanata, "Lanata 1", avec une teneur élevée en total cardénolitique et en lanatoside C (15).

Chez Datura innoxia, par la sélection de la population locale "De Bărăgan", on a obtenu des lignes valeureuses, parmi lesquelles "F-75/74" a été homologuée sous la désignation "Laura" (31).

Tableau 6

Lignées de perspective pour Datura innoxia,
obtenues par sélection individuelle répétée chaque année

Variété/ lignée	Herbe sèche		Alcaloïdes totaux exprimés en scopolamine			
	q/ha	%	teneur		production	
			g/100 g	%	Kg/ha	%
"De Bărăgan" (témoin)	26,3	100	0,332	100	8,7	100
"F-51/74"	30,9	117	0,352	106	10,8	124
"F-75/74" ("Laura")	33,8	128	0,345	104	11,3	129

Chez Mentha piperita, par la sélection individuelle appliquée à la descendance générative caractérisée par une large variabilité (la menthe étant multipliée de manière végétative), on a créé la variété productive "Columna", avec

une teneur en huile volatile au niveau de la menthe locale et résistant à la rouille (cf. Tableau 7) (22).

Tableau 7

Mentha piperita - variété "Columna"

Espèce/ variété	Herbe fraîche		Huile volatile		Menthol	
	q/ha	%	Kg/ha	%	Kg/ha	%
Mentha piperita locale	277	100	63,9	100	33,8	100
"Columna"	329	119	77,1	121	39,2	116

Chez Mentha spicata var. Crispa, on a créé en Roumanie la variété "Mencriis" (cf. Tableau 8), qui offre une augmentation de 21% pour la production d'herbe fraîche et de 43% pour l'huile volatile (25).

Tableau 8

Mentha spicata var. Crispa

Espèce/ variété	Herbe fraîche		Huile volatile	
	q/ha	%	Kg/ha	%
Mentha spicata (U.S.A.)	153	100	35,1	100
"Mencriis"	185	121	50,4	143

Par la sélection individuelle clonale de Valeriana officinalis, on a obtenu la variété "Măgurele 100" de la lignée "M-100", variété homologuée en 1981 (cf. Tableau 9) (16).

Tableau 9

Lignée de perspective chez Valeriana officinalis

Variété/ lignée	Racines sèches		Huile volatile			
	q/ha	%	teneur		production	
			mg/100 g	%	Kg/ha	%
Témoin	13,7	100	0,45	100	6,16	100
"M-12"	15,4	112	0,54	120	8,31	134
"Măgurele -100"	16,1	117	0,59	131	9,50	154

(b) La sélection individuelle, variante "moitié de la quantité de semence", s'applique aux espèces allogames des familles Umbelliferae, Compositae etc.

Chez Carum carvi, cette méthode est appliquée, les matériaux de perspective étant en cours d'obtention.

Pour Matricaria chamomilla, par la méthode mentionnée, appliquée à un matériau consanguinisé sur trois générations, on a obtenu des lignées de valeur, parmi lesquelles la lignée "F-445/77" a été homologuée comme variété ("Märgäritar") en 1982 (cf. Tableau 10) (5).

Tableau 10

Lignées de perspective pour Matricaria chamomilla

Variété/ ligne	Inflorescences sèches		Huile volatile		Azulènes	
	q/ha	%	ml/100 g	%	mg/100 g	%
"Zloty-lan" (témoin)	15,2	100	0,63	100	11,8	100
"F-445/77" ("Märgäritar")	17,7	116	0,66	105	12,6	107

(c) La sélection par familles est une méthode qui est recommandée pour certaines espèces allogames, pour lesquelles la nécessité biologique de la hétérogénéité a été démontrée. Ainsi, la méthode de la réalisation des lignées pures de Digitalis lanata n'a pas donné de résultats; leur vitalité a pu être maintenue uniquement par un croisement libre bien dirigé (7).

3. Hybridation

Chez les plantes médicinales cette méthode n'a pas été souvent utilisée, du fait que les plantes médicinales - étant presque toutes des espèces allogames, représentées par des populations non-améliorées - possèdent une variabilité génétique, morphologique et chimique suffisante pour pouvoir en séparer, par sélection, des formes de valeur.

(a) L'hybridation en masse répétée est utilisée pour les espèces allogames à petites fleurs, dont la castration s'avère très difficile (Matricaria chamomilla, Coriandrum sativum), créant ainsi un matériau d'amélioration à une variabilité génétique prononcée.

Chez Coriandrum sativum, du matériau hybride on a séparé par sélection des formes valeureuses.

L'hybridation en masse donne de bons résultats chez les espèces à multiplication végétative ou pérennantes.

(b) L'hybridation simple a conduit à la création de populations hybrides chez Papaver somniferum dont, par sélection opérée sur plusieurs générations, on a séparé des formes de valeur. L'une des lignées obtenues en Roumanie, "M-295", a été récemment homologuée comme variété sous le nom d'"Extaz" se caractérisant par une teneur riche en morphine (cf. Tableau 11) (17).

Tableau 11

Lignées de perspective pour Papaver somniferum

Ligne	Morphine					
	Capsules		teneur		production	
	q/ha	%	g/100 g	%	Kg/ha	%
"O-245" (témoin)	8,7	100	0,33	100	2,76	100
M-295/67 ("Extaz")	10,1	116	0,58	180	5,8	207

(c) L'hybridation interspécifique est une méthode de perspective dans l'amélioration des plantes médicinales et aromatiques, qui contribue à l'obtention de formes à spectre large de principes actifs provenant des formes parentales et à la création de nouveaux composants.

C'est ainsi que chez les hybrides obtenus entre les espèces Papaver somniferum et Papaver bracteatum on a décelé de la thebaïne et de la morphine dans les capsules, racines et drageons (23).

On a constaté des études effectuées que la morphine est l'alcaloïde de base des hybrides maturés, la thebaïne formée au début en grandes quantités se transformant en morphine. La codéine apparaît comme alcaloïde secondaire dans le processus de transformation de la thebaïne en morphine. Dans toute la collection mondiale de pavot (plus de 400 provenances) on n'a pas identifié des formes qui contiennent de la codéine comme alcaloïde principal, les hybridations interspécifiques étant les seules méthodes de perspective par lesquelles on peut changer le chimisme de l'espèce (3).

La preuve des aptitudes d'hybridation des espèces doit être faite dans différentes conditions d'environnement, en essayant l'hybridation directe et réciproque pour établir le sens de l'hybridation liée à leur compatibilité.

Pour combattre la stérilité qui apparaît lors de l'hybridation entre espèces, si la multiplication végétative n'est pas possible, on recommande l'utilisation de l'amphidiploïdie provoquée avec de la colquichine (26).

(d) La méthode backcross est utilisée chez quelques espèces pour le transfert des caractères. En utilisant cette méthode pour Solanum laciniatum on a créé en URSS les variétés "Vostok" et "Uspeh" à teneur élevée en solasodine par pollinisation répétée de la variété Solanum laciniatum avec du pollen de l'espèce Solanum aviculare, suivie de la sélection de formes pareilles chez Solanum laciniatum, mais à teneur plus élevée en solasodine (1,5%).

(e) L'hybridation végétative a donné de bons résultats pour les espèces Tanacetum, Artemisia, Chrysanthemum, Solanaceae, Rosa et pour les Umbelliferae (29).

(f) Variété synthétique

Chez les espèces à multiplication végétative et pour la plupart des variétés allogames, qui se multiplient par voie sexuée, une méthode de perspective est la création de la variété synthétique par la pollinisation des clones, variétés ou lignées en système polycross. On utilise à présent cette méthode pour les espèces Digitalis lanata, Matricaria chamomilla, Coriandrum sativum.

4. Polyploïdisation

La méthode de la polyploïdisation avec de la colquichine a été appliquée chez un grand nombre d'espèces (environ 40)(29), mais jusqu'à présent on a utilisé des formes polyploïdes uniquement chez Matricaria chamomilla, Chrysanthemum cinerariae folium et Mentha piperita. Chez les espèces mentionnées, les formes tetraploïdes ont donné des productions de matière première ayant une teneur en principes actifs supérieure aux formes diploïdes. Par cette méthode ont été créés les variétés de chamomille "Zloty-lan", "Budakalasz", "Grossblutige", "Pohorelka velkovata".

Sur le plan mondial, on a essayé la polyploïdisation de la variété Carum carvi et on a obtenu des formes polyploïdes qui se sont maintenues pendant les années IV et V et ont donné de grandes productions, à teneur élevée en huile volatile, étant aussi plus résistantes au froid.

Un rôle important revient à la polyploïdie dans l'obtention de formes allopolyploïdes ou amphidiploïdes à la suite d'hybridations lointaines, en créant ainsi la possibilité d'obtenir des plantes allopolyploïdes chez les espèces à nombre différent de chromosomes (26).

Pour la réussite des travaux, il est indiqué de changer le nombre de chromosomes chez les plantes à nombre réduit avant l'hybridation.

En utilisant cette méthode on a obtenu en URSS des hybrides entre Solanum laciniatum ($n = 92$) et Solanum aviculare ($n = 46$), après la polyploïdisation de l'espèce Solanum aviculare (26).

5. Mutagenèse

Par la provocation de mutations avec des agents mutagènes physiques (irradiation avec diverses sources) ou chimiques (diéthylsulfonate, diméthylsulfonate, éthylèneamine), on a obtenu dans quelques pays des variétés à la suite de la sélection des mutateurs. Ainsi, en République démocratique Allemande on a créé la variété "Multimenta" et en Hongrie on a obtenu des résultats positifs par irradiation des espèces

Papaver somniferum et Solanum laciniatum avec une source de cobalte.

Les taxons chimiques existants dans une série d'espèces médicinales représentent des mutateurs chimiques spontanés, comme suite de la différenciation chimique intraspécifique de la loi biologique fréquente en nature (29). Les études faites sur Mentha piperita durant 25-30 années (en URSS) par déterminations complexes sur les diverses formes ont conduit à l'identification du même taxon chez plusieurs espèces et de plusieurs taxons pour la même espèce. Trente ans après, on a établi sur le territoire étudié chez 10 espèces un total de 21 chemotaxons. Les plus répandus sont 8 du total étudié.

À présent on utilise en Roumanie la mutagenèse pour la majorité des espèces du projet d'amélioration. On a obtenu des mutateurs chez Datura innoxia Mill. avec certaines caractéristiques supérieures au témoin non-traité.

Chez Mentha piperita, une méthode d'amélioration est représentée par la sélection des mutateurs somatiques issus spontanément, qui affectent certains organes ou secteurs de la plante, ou bien la plante toute entière. La majorité des mutations somatiques représente un retour aux formes sauvages et ne sont pas de valeur.

On a obtenu par cette voie des variétés de valeur, par exemple "Maritsa 1" en Bulgarie, celle-ci étant précoce et réalisant une grande production d'huile volatile par hectare.

En Roumanie, on a réussi l'isolement de lignées très valeureuses à grandes feuilles, facilement séparables, avec une bonne résistance à la rouille, desquelles on pourrait obtenir des variétés distinctes pour la production des feuilles pour tisanes.

Dans les grandes lignes, nous avons cité les principales méthodes d'amélioration des plantes médicinales et aromatiques. En Roumanie, pour augmenter l'efficacité des travaux d'amélioration et créer la possibilité d'extension en culture des matériaux biologiques de valeur, on applique

plusieurs méthodes parallèles chez la plupart des espèces à grande importance en culture. Ainsi, pour les allogames on imbrique la consanguinisation avec sélection et la méthode polycross, chez les autogames l'hybridation avec sélection et la polyploïdie, alors que pour la plupart des espèces on utilise également la mutagenèse.

V. PRODUCTION DE MATERIAUX A REPRODUCTION

A. Objectifs

- (a) Maintien de la structure génétique et de la capacité de production et des propriétés d'adaptation des populations ou variétés au niveau initial.
- (b) Maintien de l'état sanitaire des matériaux à reproduction.
- (c) Maintien de la capacité combinative élevée chez les hybrides et les variétés synthétiques.
- (d) Approvisionnement régulier des unités de production en matériaux de reproduction possédant des propriétés biologiques et physiques élevées et en quantités sollicitées.

B. Facteurs qui changent la structure des variétés et des populations (facteurs d'évolution)

Dans la conception moderne de la génétique des populations, la variété représente une population, indépendamment si elle appartient à une espèce de plantes autogames ou allogames. Chaque population est caractérisée par certaines structure génétique et fréquence des génotypes. Une population où la fréquence reste non-altérée durant plusieurs générations se trouve en équilibre génétique.

Dans la nature, l'état d'équilibre de la variété et de la population est temporaire.

Les facteurs qui modifient l'état d'équilibre de la variété sont la mutation, la migration, la sélection et le drift génétique, qui sont des facteurs d'évolution.

La mutation et la migration produisent les variations héréditaires et la sélection et le drift génétique les arrangent par catégories et produisent un nouvel état d'équilibre génétique de la variété. Les facteurs mentionnés peuvent actionner en combinaison ou séparément.

1. La mutation agit constamment, mais sans être saisie; d'habitude, il y a des micro-mutations qui affectent les caractères quantitatifs. Ceux-ci ont, généralement, une valeur d'adaptation élevée et ces mutations se révèlent avantageuses pour la population du point de vue économique, motifs pour lesquels ces caractères se répandent dans les populations, tandis que les macro-mutations, qui, ayant une valeur sélective réduite, sont éliminées des populations par sélection naturelle ou artificielle.

2. Migration : la pollinisation d'une variété avec du pollen provenant d'une autre variété; ou par mélange avec de la semence d'une autre variété constituent la cause la plus fréquente de modifications de la structure génétique d'une variété ou d'une provenance.

3. La sélection naturelle, dont l'intensité varie d'un an à l'autre et d'une zone à l'autre, agit sur les génotypes composants des populations ou des variétés et aussi sur les unités, en modifiant la constitution génétique de la variété.

La sélection naturelle promeut les génotypes à valeur adaptative élevée, résistant aux facteurs défavorables qui sont, généralement, moins productifs.

C'est pourquoi il est absolument nécessaire que la sélection artificielle - méthode appliquée dans le processus de production de semence - contribue au maintien de la structure génétique et de la productivité des variétés et des populations, car les génotypes intensifs ont une valeur sélective plus réduite que ceux extensifs, pendant les années à climat défavorable.

La sélection naturelle actionne si fortement, qu'en quelques années elle peut changer visiblement la structure génétique des variétés ou populations locales ou importées,

si on ne prend pas des mesures pour maintenir les propriétés génétiques des variétés par l'application de méthodes adéquates de produire la semence.

Le changement des structures des populations et des variétés se produit aussi dans le cas où le processus de production de la semence commence d'un nombre trop petit de plantes élites. Dans ce cas, un nombre important de gènes se perd, le phénomène étant connu sous le nom de :

4. Drift génétique, qui mène au changement de la valeur biologique des variétés. Pour éviter ce phénomène on choisit un nombre assez grand de plantes élites qui permettra le maintien non-altéré de la base génétique des variétés ou populations.

L'impurification mécanique est le facteur qui déprécie le plus la valeur biologique des variétés. Cela arrive en raison de plusieurs causes:

- (a) utilisation d'une rotation non-adéquate;
- (b) nettoyage superficiel des semeuses, moissonneuses, sélecteurs, remises, sacs.

L'impurification biologique contribue à la modification des propriétés d'une population ou variété, surtout quand on ne respecte pas les espaces d'isolement, ou quand on néglige les travaux de purification biologique.

On a apprécié que l'action des facteurs d'évolution se rapporte uniquement aux espèces allogames. Les recherches effectuées à présent montrent que les plantes autogames sont soumises aux mêmes influences et modifications.

C. Schémas et méthodes de reproduction

Tenant compte de l'importance économique, du poids dans la culture des espèces médicinales et aromatiques et du spécifique biologique, les schémas suivants s'appliquent:

1. Pour les espèces sur grandes surfaces - des schémas complets:
 - (a) champ de choix;

- (b) champ de sélection;
- (c) champ superélite;
- (d) champ élite;
- (e) champ de multiplication.

2. Pour les espèces sur petites surfaces on utilisera un schéma plus simple:

- (a) champ de choix;
- (b) champ superélite;
- (c) champ élite;
- (d) champ de multiplication.

Dans le cadre de ces schémas de base des modifications interviennent d'après le cycle biologique des plantes ou d'autres aspects de leur biologie.

(a) Le champ de choix est, généralement, cultivé pour le matériau des catégories superélite et élite. D'après l'espèce, il sera isolé dans l'espace aux distances normalisées.

Peu avant la floraison, on exécute la purification biologique du champ et on élimine les plantes non-typiques, malades, ou peu développées. Le choix des élites se réalise pendant la période de floraison ou à maturité, sur la base des critères morpho-productifs. Celles-ci sont récoltées séparément et on fait leur triage au laboratoire, par catégories, d'après les divers caractères spécifiques de chaque plante. On retient la semence des élites qui correspond aux objectifs de productivité.

(b) Champ de sélection. Pour aménager ce champ on utilise la semence de chaque plante élite ou d'une partie de l'élite antérieurement retenue.

Le nombre des élites et la surface qu'occupe chaque descendance dans le champ de sélection s'établissent par rapport à la quantité de semences nécessaires pour aménager le champ de superélite.

L'étude des descendance dans le champ de sélection se rapporte aux caractères et propriétés spécifiques, à la résistance aux maladies et aux facteurs défavorables. Celles qui ne correspondent pas sont éliminées avant floraison pour

les espèces allogames et celles retenues sont examinées après la récolte du point de vue morpho-productif. Chez les plantes allogames, la réserve de semences et chez les plantes autogames la semence qui résulte sont mélangées et constituent le matériau affecté aux semailles du champ de superélite.

(c) Champ de superélite. Chez les plantes allogames, on ensemence ce champ isolément. Pendant la période de végétation, on élimine du champ les plantes non-typiques, malades, ou peu développées. A certains moments - qui diffèrent d'une espèce à l'autre - on prélève des échantillons moyens, en vue d'analyser le matériau du point de vue qualitatif.

(d) Champ d'élite. Pour réaliser ce champ, on utilise la semence superélite produite l'année antérieure. Pendant la période de végétation, on fait les purifications biologiques suivant les mêmes critères que pour la superélite.

(e) Le champ de multiplication est organisé dans les fermes spécialisées en utilisant la semence élite antérieurement produite. La technologie de culture est pareille pour les grandes cultures de production.

3. Pour les espèces qui occupent dans la production des petites surfaces, le schéma de reproduction est simplifié.

Ainsi, la semence des élites choisies dans le champ de choix, après le triage d'après des critères biomorphologiques, est mélangée aussi l'année suivante et on réalise avec la semence respective le champ de superélite.

Le champ d'élite est organisé dans le cadre offert par le secteur de production des unités de recherche.

4. Chez les plantes pérennantes, dans le cadre du secteur de recherche on organise uniquement le champ de choix et celui de superélite.

Pour le champ de choix on utilise la semence à valeur biologique élevée. On fait les semailles dans des nids à des distances qui varient par rapport aux espèces entre 40 x 40 et 70 x 70 cm.

Pendant la deuxième année de végétation, on étudie les

plantes, en marquant celles typiques de la variété ou de la population. Avant la floraison, on enlève à la faucille les inflorescences ou fleurs des plantes peu développées, alors que la semence qui reste est mélangée.

Le champ de superélite est réalisé avec la semence obtenue du champ de choix. La densité des plantes dans ce champ est plus petite que celle des cultures de production. Pendant la période de végétation, on élimine les plantes non-typiques, malades, ou peu développées.

Le champ de superélite se maintient de 3 à 5 années, d'après le degré de pérennité de l'espèce. Pendant la suppression il constituera un champ de choix; avec la semence des élites on réalisera l'année suivante un nouveau champ d'élite.

Le champ d'élite est organisé dans le secteur de production des unités de recherches. Pendant la période de végétation, on effectue des contrôles routiniers et on enlève les plantes non-typiques, malades, ou peu développées.

B I B L I O G R A F H I E

1. CEAPOIU N. (1975) - Probleme de genetică teoretică și aplicată, vol. VII, no. 5
2. CEAPOIU N. (1977) - Genetica și evoluția populațiilor biologice, Ed. Acad. R.S.R., București
3. COICIU E., RACZ G. (1962) - Plante medicinale și aromatice, Ed. Acad. R.S.R., București
4. CZABAJSKA W. (1960) - Bull. Inst. Rasl., 6, 71-83
5. DULITRESCU A., LUPEANU R. (1982) - Herba Rom., vol. 4
6. FELICAN et collab. (1957) - Studii și cercet. de agr., Acad. R.P.R., Cluj, 1-2
7. FOUCONNET (1960) - Pharm. Acta Helv., 35, 121-127
8. GIOSAN N., CEAPOIU N. (1976) - Probleme de genetică teoretică și aplicată, vol. VIII, no. 4
9. GLUSCENKO N. (1963) - Izd. selskakh liter. jurnal plantov, Moscou, 101-171
10. HOTIN A.A., NOVIKOVA P.I. (1968) - Lekarstv. rastenia, tom 13, Moscou
11. CHLADEK M. (1958) - Sborn. Česk. Akad. Zeměd., 4, 305
12. IVANOVA R.M. (1968) - Lekarstv. rastenia, tom 13, 289-293, Moscou
13. KCRNEVA E. (1976) - Ghenetika, t. XII, no. 2, 10
14. MATVEEV N.D. (1959) - Osnovy sortobodana-semenoga dela po lekarstv. kulturam, Selhozgiz, Moscou
15. MIHALEA A., SILVA F. (1972) - Herba Hung., t. 11, no. 1
16. MIHALEA A. (1982) - Herba Rom., vol. 4
17. MIHALEA A., MIRICIOIU E. (1982) - Herba Rom., vol. 4
18. MURESAN T. (1967) - Bazele genetice ale ameliorării plantelor, Ed. Agrosilvică, București
19. MURESAN T., CRACIUN T. (1970) - Ameliorarea specială a plantelor, Ed. Ceres, București

20. PARIS R. (1966) - Herba Hung., 5, 2-3, 75-80
21. PAUN E. (1970) - An. ICCPT Fundulea, vol. XXXVII, seria C
22. PAUN E., POPESCU R. (1972) - An. ICCPT Fundulea, vol. XXXVIII, seria C
23. PAUN E. et collab. (1974) - Probleme de genetică teoretică și aplicată, vol. VI, no. 6
24. PAUN E. et collab. (1975) - Probleme de genetică teoretică și aplicată, vol. II
25. PAUN E., POPESCU R. (1976) - An. ICCPT Fundulea, vol. XLI, seria C
26. REZNIKOVA Z., KORNEVA E. (1965) - Ghenetika, no. 5, 142
27. STEIN M. (1966) - Herba Hung., 5, 2-3, 112-118
28. SWARTZ E. (1961) - Handbuch der Pflanzenzüchtung, vol. V, Berlin
29. TETENYI P. (1966) - Herba Hung., 5, 2-3, 100-111
30. TETENYI P. (1970) - Akademiai Kiado, Budapest
31. VERZEA M., COSOCARIU O. (1982) - Herba Rom., vol. 4
32. + + + (1973) - Scheme, metodici și tehnologii pentru producerea de sămânță și material săditor la plante medicinale și aromatice, MAIA-ASAS, București

PART IV

CULTURES DE CELLULES ET DE TISSUS
VEGETAUX

I. LES TECHNIQUES

Brîndușa Tesio +)

+) Biologiste, Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques,
Bucarest, Roumanie

I. BREF HISTORIQUE

En 1902, G. Haberlandt - le fondateur des cultures "in vitro" - a énoncé la théorie de la "totipotence", selon laquelle des cellules déjà différenciées peuvent retrouver toutes les potentialités du zygote. La cellule, unité morphologique et physiologique des organismes vivants, contient dans son noyau la totalité de l'information génétique de l'organisme, y compris le programme de l'embryogénèse. Par conséquent, à partir d'une seule cellule on peut régénérer l'organisme tout entier. Pour mettre en évidence la "totipotence", il est nécessaire d'extraire les cellules d'un organisme complexe et d'obtenir leur multiplication dans un milieu convenable.

Les premières tentatives ont échoué, mais en 1927 Robbins réussit à maintenir des cultures de racines isolées pendant plusieurs mois et en 1931 P. White en perfectionne leur conservation pendant un temps illimité.

En 1935, R. Gautheret obtient à l'aide de l'auxine des cals à partir de fragments de tissu cambial. Si les auxines permettaient d'obtenir des cals pour les plantes dicotylédones, le phénomène est impossible pour les plantes monocotylédones. Leur culture "in vitro" a été possible quand on a utilisé le lait de coco, qui contient la kinétine, une phytohormone naturelle découverte par Skoog. Grâce à l'utilisation des phytohormones on obtient des bourgeons, des racines et même des fleurs à partir de cals.

En 1947, Lévine observe même l'apparition d'embryons dans les cals, et Stewart (1958) et Reinert (1959), en changeant la composition du milieu de culture, induisent la formation d'embryons somatiques (embryoïdes) dans les cultures de cals provenant des racines de carottes.

G. Morel constate qu'en ajoutant au milieu de culture de l'auxine du type de la gibbérelline, une prolifération des méristèmes a lieu, donnant ensuite naissance à une plante entière. Cette expérience sera à la base de la multiplication végétative appelée, d'une façon impropre, micropropagation.

Dans ses travaux, P. White a constaté que le virus de la mosaïque du tabac n'attaque pas le méristème de la racine, et M. Limasset, observant que la même chose a lieu pour le méristème de la tige, a envisagé la possibilité d'obtenir des plantes saines par des cultures de méristème. Partant de cette observation, G. Morel et C. Martin obtiennent des plantes exemptes de virus et jettent ainsi les bases d'une nouvelle méthode de guérison des plantes.

En 1954, Muir, Hildebrandt et Riker obtiennent pour la première fois des cultures de cellules isolées, et Bergman inaugure la culture des suspensions de cellules végétales par des procédés similaires aux cultures bactériennes, technique qui allait connaître un grand essor.

En 1964, S.C. Maheshwari et S. Guha, en cultivant des anthères "in vitro", observent le développement de cellules de pollen, leur multiplication et la formation d'embryons haploïdes. Les travaux constitueront les bases de l'androgénèse expérimentale.

Plus récents dans le domaine des cultures "in vitro" sont les travaux effectués sur des protoplastes (cellules végétales dépourvues de parois rigides, faites de pectine et de cellulose). Ces travaux commencent à se développer à partir de 1960, quand Cocking a mis au point la méthode enzymatique pour obtenir des protoplastes en grandes quantités. Leur utilisation dans les cultures "in vitro" a rendu possible l'hybridation cellulaire chez les plantes.

Les perspectives de l'utilisation des cultures cellulaires et tissulaires végétales sont reliées à de recherches fondamentales et appliquées.

II. ETABLISSEMENT DU CAL ET DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

Un fragment de tissu végétal organisé (racine, tige, feuille) prélevé d'une certaine plante - l'explant - et inoculé dans des conditions d'asepsie dans un milieu nutritif solidifié d'une composition bien déterminée peut être transformé entièrement en un amas de cellules qui ne sont pas différenciées et

qui présentent une prolifération rapide. Cet amas s'appelle cal.

Des petits fragments de ce cal peuvent être repiqués en milieu de culture frais et on arrive à obtenir un cal typique et à stabiliser la culture de tissu végétal sans l'influence de l'explant.

Les cals peuvent être transplantés, plusieurs fois, toujours en milieu aseptique, dans un milieu nutritif frais par repiquages successifs.

Le temps entre deux passages successifs dépend de la vitesse de croissance du cal, de l'appauvrissement du milieu en substances nutritives ou bien de l'accumulation de produits cataboliques.

De cette manière on peut maintenir le cal en culture pendant une période illimitée.

Le cal peut être utilisé pour différentes études (biochimiques, cytologiques et métaboliques), ou pour la réalisation de suspensions cellulaires. Dans ce cas il faut partir d'un cal friable, qui présente une croissance vigoureuse. On le suspend dans un volume de 50 ml de milieu nutritif continu, dans un flacon de 250 ml. La culture est maintenue sous agitation. Par la suite, les cellules isolées ou groupées peuvent être repiquées en milieu frais et ainsi la suspension cellulaire est maintenue en culture un temps indéfini.

Mais, en variant les composants du milieu nutritif (solide ou liquide) et spécialement la balance hormonale, les cellules (séparément ou groupées) peuvent former certaines zones de tissus qui représentent des centres de prolifération d'organes (bourgeons ou petites racines) ou "des colonies embryogènes".

Ces colonies donnent d'abord des embryons somatiques et ensuite des plantules, tandis que les bourgeons ou les petites racines évoluent directement en plantules et puis en plantes entières.

Le maintien des cultures entre deux repiquages successifs se fait en observant des paramètres physiques: température, lumière, aération, agitation et pH. Ces paramètres se modifient en fonction du type de la culture, de l'espèce étudiée et du but envisagé.

Les cultures de tissus et cellules nécessitent un degré poussé d'asepsie. Lorsque les règles d'asepsie ne sont pas respectées, on constate, avec le temps, la contamination de la culture. Si la contamination est déterminée par un agent capable d'une croissance rapide, celui-ci peut être facilement dépisté et écarté.

Mais celle qui est provoquée par des agents à développement lent, difficiles à dépister, sera transmise au cours des repiquages successifs en infectant tout le stock de culture. Par conséquent le stock doit être soumis à des tests de stérilité. En plus, certains chercheurs ont recours à l'utilisation d'antibiotiques. Des produits comme: bacitracine, pénicilline, tylosine, nystatine ont été employés avec succès étant donné qu'ils ne sont pas toxiques pour les tissus. Par exemple: on ajoute la tylosine (20 ppm) et la nystatine (0,02 ppm) dans le milieu nutritif utilisé pour la culture à grande échelle des cellules de carotte (2).

En fonction du milieu nutritif on distingue:

- . cultures statiques en milieu solide
- . cultures en suspension en milieu liquide.

III. CULTURES STATIQUES

A. L'initiation d'une culture de tissu se fait en général par la germination aseptique des semences, suivie de l'excision d'une partie de l'organe de la plante stérile (l'explant), de la mise de celle-ci en milieu de culture approprié qui doit contenir les facteurs de croissance permettant la formation du cal. L'explant peut être fourni de toutes les parties de la plante: racine, tige, semence, embryon, cotylédon, pollen, fruit.

L'initiation d'une culture de tissu peut être faite aussi en utilisant la plante du champ, mais dans ce cas des mesures de stérilisation s'imposent. La stérilisation de l'explant se fait avec une solution d'hypochlorite de sodium ou de calcium à 0,8-2,5% pendant 5 à 30 minutes, suivie de plusieurs rinçages avec de l'eau distillée stérile. L'explant choisi, prélevé aseptiquement est transféré dans des boîtes de Petri ou des tubes qui contiennent du milieu nutritif solidifié avec une composition

convenable pour l'espèce étudiée.

Le maintien de la culture se fait dans une chambre thermostatée à la température de 25 à 28°C, à l'obscurité ou sous lumière continue ou intermittente (16/24 h).

B. La nutrition se fait à l'aide du milieu nutritif. Les milieux utilisés pour la culture de tissus végétaux sont nombreux. La plupart d'entre eux représentent la modification d'un milieu de base appelé du nom du chercheur qui l'a établi. Dans le tableau suivant on présente les formules de quatre milieux nutritifs fréquemment utilisés dans la culture des tissus végétaux (4,9,2). Les différences d'ordres qualitatif et quantitatif résident en l'utilisation de macro-et microéléments, de vitamines, de sources de carbon, de facteurs de croissance (phytohormones), de suppléments organiques et de l'agar bactériologique.

1. Composition du milieu

Si la plante entière exige certains sels minéraux pour ses croissance et développement, les cellules manifestent les mêmes besoins dans la culture "in vitro".

Les composants inorganiques suivants: N, K, P, S, Ca, Mg sont nécessaires en concentration de millimols. Ce sont des macroéléments. Leur concentration optimale dans le milieu nutritif pour que les cellules puissent atteindre le taux maximum de croissance varie dans des limites assez grandes. Un milieu nutritif à l'utilisation multiple doit contenir de l'azote (N) inorganique en concentration de 25 à 60 millimols. Etant donné que la source d'azote est fournie par les ions NO_3^- et NH_4^+ , on les emploie séparément ou en combinaison.

Le potassium (K) est utilisé dans des concentrations de 20 millimols ou plus, tandis que le phosphore (P), le magnésium (Mg), le calcium (Ca) et le soufre (S) sont ajoutés dans des concentrations de 1 à 3 millimols (4).

Les composants essentiels sont inclus dans le milieu en concentration micromolaire. Les microéléments employés sont le fer (F), le manganèse (Mn), le zinc (Zn), le bore (B), le cuivre (Cu) et le molybdène (Mo). Le fer et quelquefois le zinc sont utilisés en combinaison avec l'acide éthylène-diamine-tetraacétique (EDTA).

FORMULES DE MILIEUX NUTRITIFS

Constituant	Murashige- Skoog-1964 mg/l	Mitsch 1969 (9) mg/l	Heller 1953 (2) mg/l	White 1963 (2) mg/l
<u>Macroéléments</u>				
NH ₄ NO ₃	1650	720	-	-
KNO ₃	1900	950	-	80
NaNO ₃	-	-	600	-
KCl	-	-	750	65
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	166	75	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	-	300
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	185	250	720
Na ₂ SO ₄	-	-	-	200
KH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	170	68	-	-
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	-	125	16,5
<u>Microéléments</u>				
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	-	1	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	-	2,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,84	-	-	-
Na ₂ EDTA	37,34	-	-	-
AlCl ₃	-	-	0,03	-
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	25	0,1	7
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,5	10	1	3
H ₃ BO ₃	6,2	10	1	1,5
KI	0,83	-	0,01	0,75
CuSC ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,03	0,001
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	-	-
MoO ₃	-	-	-	0,0001
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	-	-	-
NiCl ₂	-	-	0,03	-
<u>Suppléments organiques</u>				
Mio-inositol	100	100	-	-
Glycine	2	2	-	3
Acide nicotinique	0,5	5	-	-
Pyridoxine-HCl	0,5	0,5	-	0,1
Thiamine-HCl	0,1	0,5	1	0,1
Biotine	0,05	0,05	-	-
Acide folique	0,5	0,5	-	-
<u>Sources de carbone</u>				
Saccharose	30-20000	20000	20000	20000
Agar bactériologique	0,2%	0,8%	0,8%	0,8%

Le milieu doit contenir une source de carbone parce que les cellules végétales mises en culture ont une nutrition du type hétérotrophe en ce qui concerne les hydrates de carbone même si les cultures sont maintenues à la lumière.

Les hydrates de carbone utilisés sont: le saccharose, le glucose, le maltose, le raffinose, le fructose, le mannose et l'amidon. Le choix de l'hydrate de carbone se fait en fonction de l'espèce et du but envisagé. Pour la plupart des milieux on utilise le saccharose en concentration de 2 à 4% (8).

Bien que les vitamines soient synthétisées par les cellules mises en culture "in vitro", elles sont incluses dans le milieu du fait que leur taux de synthèse peut être plus petit par rapport au taux de croissance cellulaire. Le mésoinositol, quoique non essentiel, est ajouté parce qu'il augmente la vitesse de croissance (8).

Les cultures de cellules végétales "in vitro" nécessitent la présence d'hormones de croissance, de phytohormones ou de régulateurs de croissance. On emploie des auxines, des cytokinines et rarement des gibberellines, seules ou dans des combinaisons.

Leur mécanisme d'action n'est pas encore élucidé. On suppose qu'ils interviennent au niveau des gènes en les activant soit directement, soit par l'intermédiaire de certaines réactions métaboliques particulières (8).

Les auxines présentent une gamme d'action assez large. Elles induisent la division cellulaire dans l'explant, provoquent l'élongation cellulaire, stimulent la formation des racines, actionnent sur le développement des pousses et dans l'accumulation des métabolites secondaires.

Les auxines naturelles sont synthétisées par toutes les cellules végétales à partir du tryptophane. Dans les cultures "in vitro", leur synthèse commence au moment de la différenciation du cal. Elles ne s'accumulent pas dans le tissu et sont dégradées par oxydation dans le processus de croissance. D'après certains chercheurs, la lumière bleue les dégrade, d'où résulte une inhibition de la croissance; l'obscurité produit une destruction partielle (2).

Les auxines les plus employées sont l'acide naphthalène-1-acétique (A.N.A.), l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) qui sont des produits de synthèse, tandis que l'acide indol-3-acétique (A.I.A.) est un produit naturel.

Les cytokinines stimulent la division cellulaire et agissent sur le développement des pousses. Les plus employées sont la kinétine (K; 6-furfurylamino-purine; 6-furfuryladénine), la benzyladénine (B.A.P.; 6-benzylaminopurine) comme produits de synthèse et la zéatine (Zea) (γ -méthyl- γ -oxyméthylallylamino-purine), produit naturel.

Les concentrations utilisées pour les phytohormones sont très variées. Elles commencent par quelques fractions de mg/l et arrivent jusqu'à la concentration maximale de 2 mg/l de K; 5-10 mg/l de A.N.A. et 6 mg/l de 2,4-D (2). Parmi tous ces phytohormones la plus utilisée pour la stabilisation des cultures est la 2,4-D.

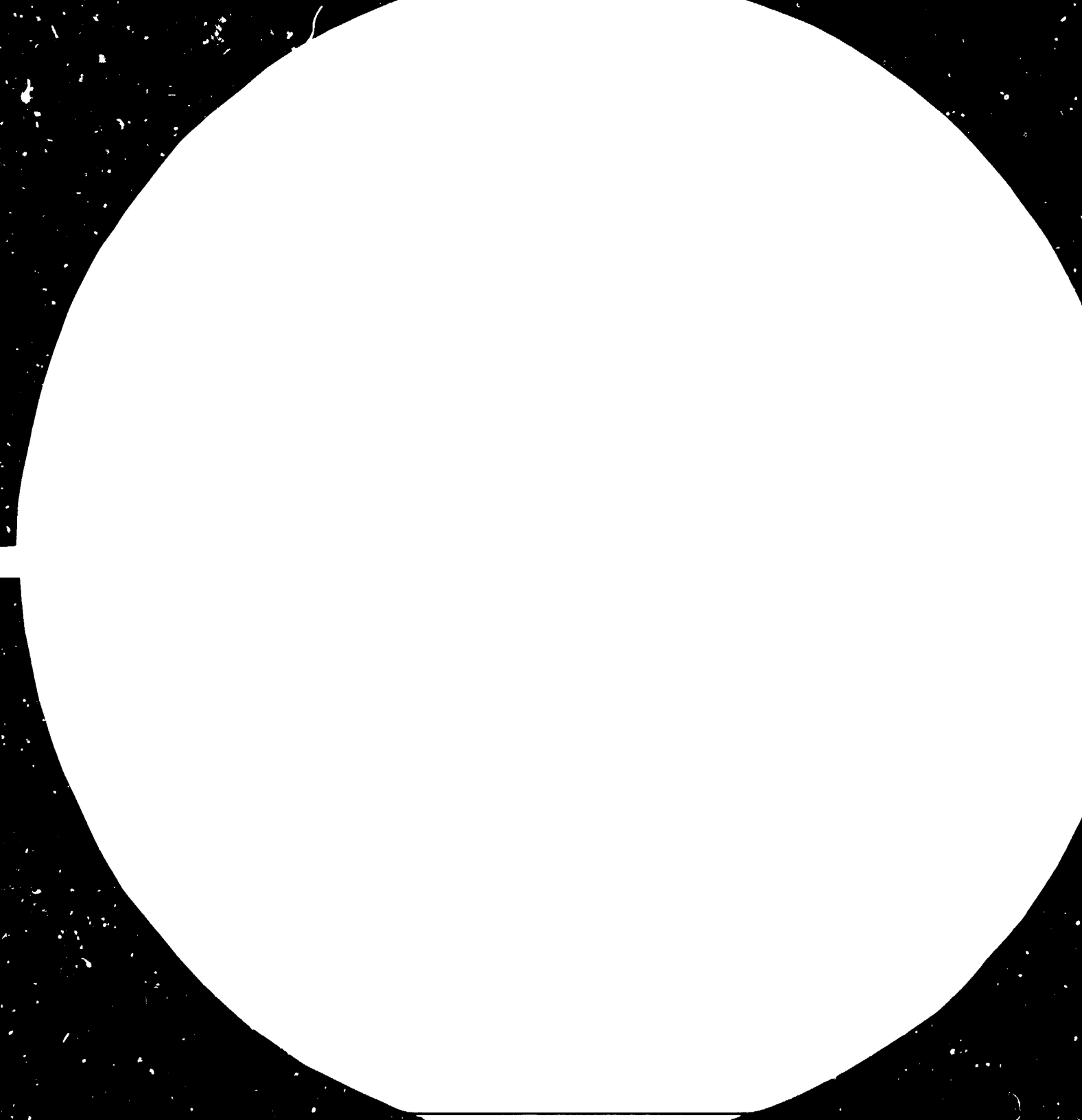
En dehors de ces ingrédients le milieu peut contenir un supplément organique. Les cellules végétales mises en cultures "in vitro" synthétisent les aminoacides; c'est pourquoi ceux-ci ne sont pas essentiels. Mais, dans certaines conditions, comme l'initiation et l'établissement d'une culture, on ajoute de l'hydrolysate de caséine en concentration de 0,05 à 0,1 g/l de milieu. Plus tard, l'hydrolysate peut être remplacé par du L-glutamine (2 à 10 millimols), ou carrément supprimé (8).

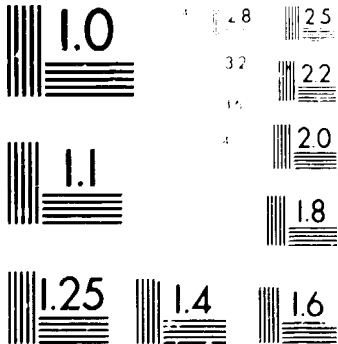
Quelquefois on ajoute des produits naturels complexes: le liquide obtenu à partir de l'endosperme de la noix de coco (Cocunut Water) ou l'extrait de levure ou de malt.

Le choix de la composition du milieu nutritif employé pour la croissance d'une certaine culture de tissus végétaux dépend de l'espèce végétale à partir de laquelle on réalise la culture et du but envisagé.

En plus, on peut utiliser pour la même espèce plusieurs types de milieux, notamment:

- (a) le milieu pour l'induction du cal, qui représente le premier passage du matériau végétal sur le milieu nutritif;
- (b) le milieu pour la stimulation d'une croissance optimale pour le cal;
- (c) le milieu pour l'induction de l'organogénèse.





MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
 NATIONAL BUREAU OF STANDARDS-
 STANDARD REFERENCE MATERIAL 1910A
 APR 1963 EDITION TEST CHART #2-2

La différence entre le milieu de base et les variantes consiste dans le changement de la balance hormonale ou de certains ingrédients.

2. Préparation du milieu de culture

L'eau employée pour la préparation des milieux nutritifs est bidistillée, apyrogène et présente un haut degré de pureté. Pour la redistillation de l'eau on utilise des appareils en pyrex, quartz ou nickel.

Après la dissolution des ingrédients, le milieu est ajusté, avant stérilisation, à un pH de 5,5 à 6,8 conformément aux indications.

Ensuite le milieu est mis en autoclave à 121°C pendant 15 à 20 minutes pour les volumes au-dessous d'un litre et 30 à 40 minutes pour les volumes au-dessous de 10 litres (1).

En général, les composants du milieu sont résistants aux températures élevées. Pour les substances thermolabiles on emploie la filtration aseptique.

Après stérilisation, le milieu contenant de l'agar est refroidi jusqu'à 40°C et ensuite est coulé aseptiquement dans des boîtes Petri ou des flacons qui ont été stérilisés à 180°C pendant 1 heure.

Le milieu liquide est reparti dès le début dans des flacons fermés avec des bouchons en coton hydrophobe, couverts par de la gaze ou de la mousseline et après sont soumis à la stérilisation.

Une fois préparé, le milieu peut être gardé à une température de +10°C dans l'obscurité.

3. Culture du cal

La formation du nouveau tissu végétal à la surface de l'explant constitue le début ou l'initiation de la culture. Des fragments de ce tissu sont prélevés aseptiquement, mis en milieu frais et maintenus dans les mêmes conditions de lumière et de température.

Après quelques semaines, le cal présente une croissance satisfaisante pour permettre le prélèvement aseptique de nouveaux petits fragments et leur transfert en milieu frais. A partir

de ce moment on peut commencer la sélection du matériau qui présente un taux de croissance élevé dans le but de le souscultiver.

Le cal doit être transféré périodiquement en milieu frais. Le repiquage se fait à 3-4 semaines, en fonction du taux de croissance.

Les fragments du cal, qui sont prélevés aseptiquement dans le but d'une inoculation en milieu frais s'appellent "inoculum" et on estime, d'après différents chercheurs, que 10 à 50 mg de tissu frais constitue un inoculum suffisant pour permettre une bonne sousculture.

IV. CULTURES EN SUSPENSION

Le développement des techniques de cultures cellulaires en suspension au cours des dernières 10 à 15 années a été possible grâce aux recherches de physiologie, de biochimie et de génétique.

Les cultures en suspension présentent certains avantages sur les cultures statiques notamment les suivants:

- . une croissance plus rapide;
- . la suspension peut être pipetée;
- . la suspension est moins hétérogène et la différenciation cellulaire est moins prononcée;
- . elles permettent un contrôle stricte des différents paramètres;
- . on peut les cultiver en grands volumes allant jusqu'à 1500 l;
- . la synthèse des produits naturels peut être stimulée à l'aide de précurseurs.

Les cultures en suspension cellulaire sont en général hétérogènes, ayant des cellules isolées et des amas cellulaires en croissance dans différents stades. Le rapport entre les cellules libres et les amas cellulaires et aussi leur taille dépendent de l'espèce, de l'âge de la culture, de la composition du milieu nutritif et de l'environnement.

Du point de vue morphologique, les suspensions cellulaires sont de deux types:

. type (a): une vraie suspension ayant des cellules isolées, souvent en chaîne, avec une faible tendance à l'agré-
gation (cf. Morinda citrifolia);

. type (b): dans la suspension les cellules forment des
amas plus ou moins grands, en grappes, en pelotes ou en flocons
(cf. Beta vulgaris, Digitalis lanata) (11).

A. L'initiation des suspensions cellulaires se fait en
partant du cal. Un cal formé d'un tissu friable et à croissance
rapide est le meilleur pour le transfert en milieu liquide et
peut facilement former une culture cellulaire en suspension.

En général, à peu près 0,5 g de tissu frais sont suspendus
dans 50 ml de milieu nutritif contenu dans des flacons de 250 ml.
La culture obtenue est incubée dans certaines conditions de
température et de lumière et soumise à une agitation de 120 à
150 rotations/minute. Cette suspension constitue la source de
l'inoculum.

B. Inoculum. La grandeur de l'inoculum est très importante
pour l'initiation de la croissance dans les suspensions cellu-
laires. Quand la grandeur de l'inoculum est au-dessous de la
grandeur critique rapportée au volume du milieu de culture, la
division cellulaire s'arrête. Pour la plupart des espèces, l'ino-
culum représente à peu près 10-15% v/v de la culture en sus-
pension en croissance active.

Le rapport entre les cellules isolées et les amas cellu-
laires influence la vitesse de croissance et pour certaines
investigations l'inoculum doit être refiltré pour obtenir une
suspension plus homogène.

Un inoculum trop grand peut diminuer le temps de condi-
tionnement du milieu, mais il peut aussi diminuer la vitesse
de croissance relative des cellules.

C. Culture de cellules. Lorsqu'on cultive des suspensions
de cellules on obtient des populations de cellules qui sont les
meilleures pour l'étude du métabolisme de la cellule végétale
à cause de leur uniformité. Ces cellules peuvent être considé-
rées comme des micro-organismes sur lesquels on peut appliquer
les techniques très bien développées de la microbiologie.

Mais les cellules végétales cultivées en lot (batch culture) présentent des variations dans la croissance et le métabolisme en fonction de la situation spatiale et du temps.

Pour surmonter cette difficulté, les recherches ont été orientées vers le développement de cultures de cellules isolées d'un côté et vers la réalisation d'états constants de croissance et de métabolisme par l'établissement de certaines conditions de culture, de l'autre côté.

L'absence d'uniformité spatiale est déterminée par le degré d'agrégation cellulaire. Les cellules qui forment des amas, des grappes, se trouvent dans des conditions complètement différentes par rapport aux cellules isolées. Des études faites sur les suspensions de cellules de sycomore (Acer pseudoplatanus L.) ont montré que malgré leur degré poussé de dispersion à la fin du cycle de croissance en système batch (en lot) par rapport aux autres types de suspensions, dans chaque étape de la culture cette suspension présente des amas cellulaires.

Ceci est valable pour tous les types de suspensions, même pour celles qui présentent un rapport élevé de cellules isolées dans toutes les étapes de la culture (6).

L'agrégation cellulaire peut être diminuée par: (1) le choix d'un milieu nutritif approprié, en variant la concentration des phytohormones et des hydrates de carbone; (2) l'établissement d'une certaine vitesse d'agitation pendant l'incubation de la culture et (3) l'incorporation dans le milieu nutritif de faibles concentrations d'enzymes qui dégradent la paroi cellulaire en ajoutant en même temps des concentrations appropriées de sorbitol pour maintenir le potentiel osmotique correspondant.

Un autre facteur de non-uniformité spatiale est dû à la variabilité cellulaire. Pour obtenir de plus en plus d'uniformité dans les cultures on a utilisé des techniques de clonage des cellules isolées.

L'isolement des cellules est devenu possible grâce à l'utilisation d'enzymes en vue de l'obtention de suspensions formées seulement de cellules isolées et à la culture de celles-ci en milieu solide par des techniques appelées "plating cells".

Les variations en fonction du temps concernent les modifications de croissance et de métabolisme cellulaire.

L'investigation des modifications physiologiques et biochimiques qui accompagnent la division et l'expansion cellulaires a été effectuée par l'utilisation de cultures en lots (batch cultures). Elles ont montré que dans une telle culture, à partir de l'initiation jusqu'à la phase stationnaire, se produisent des modifications dans la microstructure cellulaire, aux niveaux des constituants cellulaires (protéines, acide ribonucléique, hydrates de carbone et enzymes), dans la concentration et la composition des substances extracellulaires, dans le métabolisme des produits secondaires et aux niveaux des autres activités physiologiques.

Pour obtenir un état constant de croissance et de métabolisme on a développé au cours des dernières années de nouvelles méthodes de culture.

D'après P.J. King (7), l'utilisation de l'expression "suspension cellulaire" est inadéquate pour la description des différents types de culture en milieu liquide.

L'absence d'un système strict de classification accompagnée de fréquents manques de descriptions histologiques dans la littérature spécialisée ont conduit à de confusions et de ce fait à la nécessité de préciser le type de culture impliqué.

Au hasard, on a isolé au niveau des suspensions cellulaires, certaines cultures qui présentent une grande friabilité, un état particulier de croissance et d'autres caractéristiques dues à un état métabolique spécifique et stable. Ces traits ne sont pas déterminés initialement par des conditions de culture et sont fondamentalement différents en ce qui concerne la croissance et le métabolisme par rapport à l'explant.

Ces types de suspensions cellulaires sont appelés des lignées cellulaires et dans le tableau qui suit on présente leurs caractéristiques, établies par P.J. King.

A cause de l'absence de connaissances sur les facteurs qui induisent les lignées cellulaires et sur les modifications du réglage de l'expression du gène qui détermine cet état parti-

culier de croissance, on ne peut pas donner des recettes pour l'obtention de lignées cellulaires ou mêmes de bonnes suspensions cellulaires.

CARACTERISTIQUES DES LIGNEES CELLULAIRES

1. Grande friabilité
 2. Type cellulaire homogène
 3. Cellules plus ou moins isodiamétriques
 4. Cellules fortement cytoplasmatiques
 5. Noyau distinct
 6. Grains d'amidon proéminents
 7. Cytodifférenciation limitée, rares pigments
 8. Temps de doublement cellulaire de 24 à 72 heures
 9. Ne présentent pas de capacité de régénération apparente
 10. Auxotrophiques pour plusieurs métabolites communs
 11. Facilement convertibles à l'indépendance hormonale
 12. Croissance stimulée par augmentation de la concentration en CO₂
 13. Susceptibles à l'éthylène
 14. Degré anormal de ploïdie, souvent aneuploïdes
-

D. Méthodes de culture. Une culture idéale de cellules en suspension est homogène des points de vue morphologique, biochimique et génétique et elle est obtenue dans un milieu parfaitement contrôlé. Mais cet état est loin d'être réalisé, malgré d'intenses recherches effectuées ces derniers temps en ce qui concerne la cellule végétale.

1. Cultures en lots("batch cultures"). Dans ce type de culture, la croissance se fait en "système clos", les cellules sont inoculées dans un volume fixe du milieu nutritif, isolé de l'environnement, à l'exception des échanges de gaz et de métabolites volatiles. Les cellules se trouvent dans une quantité limitée de milieu et se multiplient en formant une population, dans laquelle les générations qui se succèdent modifient progressivement le milieu nutritif. Cette succession de modifications dans

la culture est improprement appelée "cycle de croissance". Le taux de croissance des cellules se modifie pendant la période de culture, de sorte que le temps nécessaire pour le doublement de la population s'accroît d'habitude pendant que la culture progresse. Dans ces conditions non-équilibrées, le métabolisme et la composition des cellules sont aussi altérées par les générations successives. Ce fait rend difficile la détermination des facteurs responsables de cette fluctuation. Malgré ce fait, la technique de la culture "batch" peut jouer un rôle important dans la production de la biomasse et dans l'étude exploratoire de la synthèse de métabolites secondaires.

2. Cultures en continu . Les conditions de non-équilibre réalisées par la culture du type "batch" (en lots) peuvent être théoriquement écartées par l'utilisation de la culture en continu dans laquelle la croissance se fait dans un système ouvert, par souscultures rapides et sériées.

Dans les cultures en continu en système ouvert l'apport du milieu frais est équilibré (balancé) par élimination d'un volume égal de culture, volume qui est suffisant pour maintenir la culture à un taux de croissance constant (sous-maximal) à temps illimité.

Cette méthode de culture permet d'atteindre un état constant de croissance et de métabolisme, d'étudier les modifications qui se produisent par le passage d'un état à l'autre et d'identifier les facteurs de contrôle.

Les cultures en continu en système ouvert les plus utilisées sont du type chemostat (12,3) ou turbidostat (10,11).

Dans le chemostat, l'apport continu du milieu frais se fait à un taux prédéterminé (en ajoutant le composant limiteur) et détermine la nature de l'équilibre installé, c'est-à-dire un taux spécifique de croissance et une certaine densité de cellules.

Dans le turbidostat, la densité cellulaire est réglée à un niveau prédéterminé, établi d'après les propriétés optiques de la culture et, de temps en temps, le milieu nutritif est ajouté pour maintenir la densité cellulaire entre certaines limites contrôlées.

La culture en continu présente certains avantages par rapport à la technique "en lots", dû aux conditions de culture relativement invariables et aux possibilités de stimulation de la biosynthèse à l'aide de précurseurs.

3. Cultures synchrones continues. Dans la culture en lots de même que dans la culture en continu, les cellules se multiplient de façon chaotique. Si dans la culture en lots le temps de doublement des générations successives peut être modifié, dans la culture en continu il reste constant.

Dans la culture synchrone en continu, qui est un système ouvert idéal, toutes les cellules sont dans la même phase de leur cycle cellulaire. Ainsi, à la place d'une condition moyenne, comme on l'obtient dans l'état constant de chemostat, où la population des cellules se multiplie au hasard, dans la culture en continu synchrone il y a la possibilité de modifier le milieu qui coïncide avec le cycle cellulaire et qui est modifié avec chaque doublement successif de la population cellulaire. La population étant synchrone, les cellules peuvent être examinées dans n'importe quelle étape du cycle cellulaire et à un taux de croissance désiré. Elle présente l'avantage que les enzymes ou les métabolites, qui se produisent seulement dans certaines étapes du cycle cellulaire, peuvent être obtenues en plus grande quantité.

La méthode de culture synchrone pour les cellules végétales en suspension a été développée récemment par l'utilisation de flux gazeux d'azote ou d'éthylène à des intervalles réguliers de temps, sur des cultures en chémostat.

3. Systèmes de culture. Le but de tous les systèmes de culture est la réalisation d'une distribution uniforme des cellules à l'intérieur de la culture par le mélange du milieu et de la culture ainsi que la réalisation d'un échange adéquat entre les phases liquides et gazeuses de la culture. Les systèmes de culture en suspension végétale tendent à écarter les facteurs nuisibles comme le frottement, la pression, le déchirement et autres caractéristiques mécaniques qui finalement, peuvent déchirer la mince paroi de la cellule végétale.

Les premiers systèmes avaient des dispositifs de roule-

ment adaptés aux différents récipients de culture, dispositifs qui permettaient une rotation lente.

D'autres systèmes de culture sont représentés par des agitateurs rotatoires ou vibratoires dans lesquels la croissance des suspensions cellulaires se fait dans des flacons ou autres récipients de différentes formes et tailles. La vitesse de rotation va jusqu'à 150 rotations/minute et pour les vibrateurs jusqu'à 100 oscillations/minute.

Les dispositifs pour les cultures en suspension de type "batch" (en lot) sur une grande échelle emploient l'aération forcée (pour l'agitation et l'aération y compris) ou l'aération avec agitation mécanique. L'avantage de ces dispositifs est de permettre le contrôle et le réglage des paramètres (température, pH, agitation, aération).

Au cours des dernières années, on a développé des systèmes de culture en continu, dans lesquels on réalise des conditions de croissance en état équilibré, illimité et défini.

Le système de Kurtz emploie de l'air comprimé pour l'aération et l'agitation, en réalisant l'alimentation avec de l'air pulsé à des intervalles de temps réguliers à l'intérieur du récipient. L'air comprimé pénètre dans le récipient par une pipe centrale disposée au fond du récipient de culture, où se forme une boule du même diamètre que l'intérieur du récipient. Cette boule monte lentement et le milieu de culture s'écoule en couche mince entre la paroi du récipient et la surface de la boule, en réalisant l'aération et l'agitation. La réduction de la pression de l'air jusqu'à la pression atmosphérique et l'expansion de la boule provoquent une faible vibration de la culture. Cette vibration représente probablement le principal facteur dans la production d'une culture formée de cellules en majorité isolées qui se maintiennent de cette façon en culture pendant une longue période de temps. Ce système a été employé avec succès pour l'induction des divisions cellulaires partiellement synchrones dans les suspensions cellulaires végétales mises en condition de culture en continu.

Le fermentateur en V est dû à Veliky et Martin. Dans ce

cas la culture est agitée en employant une barre magnétique double enrobée de teflon, disposée au fond du récipient et l'air pénètre par l'intermédiaire d'une aiguille hypodermique. De cette façon on réduit au minimum le nombre des dispositifs qui se trouvent dans la culture et on évite aussi l'enrobage par des amas cellulaires. Ce système est très employé pour les cultures de type "batch" et en culture semicontinue en permettant le renouvellement intermittent du milieu et la récolte de la culture.

Le phytostat de Miller et le dispositif de Wilson peuvent être employés pour les cultures en continu ou de type "batch". Ils sont équipés de valves avec aiguilles pour le prélèvement automatique des échantillons. Ces types d'appareils posent une série de problèmes du fait que sur les tuyaux, les agitateurs, les thermomètres et les autres dispositifs qui sortent du milieu se dépose la masse cellulaire au niveau de l'interphase entre la culture et la phase gazeuse.

F. Facteurs de l'environnement

1) Lumière. En général, les suspensions cellulaires sont maintenues sous lumière fluorescente diffuse. En fonction de l'espèce et du but envisagés, l'exposition à la lumière peut varier depuis d'obscurité jusqu'à une intensité plus ou moins élevée. L'illumination peut être en continu ou par photopériodes cycliques (le tissu de pomme de terre préfère 1000-2000 lx.) (5).

2) Température. Les cellules végétales en suspension ont besoin d'une température moins élevée que la plante entière. La plupart des cultures se maintiennent entre 20 et 28°C.

3) Aération. Pour la plupart des cultures en suspension l'aération est essentielle pour la croissance optimale des cultures. La proportion recommandée pour les cultures faites dans des conditions d'aération forcée est de 1/4 air/milieu. Il y a des cas où l'aération forcée réduit le taux de croissance (8).

4) L'agitation des suspensions cellulaires se réalise par plusieurs modalités :

- . placement des récipients de culture sur des agitateurs rotatoires ou vibratoires;
- . passage de l'air à travers des tuyaux filtrants;
- . passage de l'air comprimé,

soit en utilisant des agitateurs magnétiques, des fermentateurs communs ou des dispositifs roulants.

5) pH. Chez les cultures en suspension le pH du milieu varie entre 5,2 et 6,8; cependant l'optimum dépend du tissu cultivé. Une attention spéciale doit être accordée à l'ajustement du pH qui se fait avant stérilisation.

B I B L I O G R A P H I E

1. Biondi S., Trevor A. Thorpe (1981) - Requirements for a tissue culture facility, in "Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture", Ed. Trevor A. Thorpe, Acad. Press
2. Carew D.P., Staba E.J. (1965) - *Lloydia*, 28, 1, 1-26
3. Fawler M.W. (1977) - Growth of Cell Cultures under Chemostat Conditions, in "Plant Tissue Culture and its Bio-Technological Application", Ed. Barz W., Reinhard E., Zenk M.H., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
4. Gamborg L., Shybuk J.P. (1981) - Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures, in "Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture", Ed. Trevor A. Thorpe, Acad. Press
5. Helgeson J.P. (1980) - Plant tissue and cell suspension culture, in Tissue Culture, in "Methods for Plant Pathologist", Ed. Ingram D.S., Helgeson J.P.
6. King P.J., Mansfield K.J., Street H.E. (1973) - *Canad. J. Bot.*, 51, 1807-1823
7. King P.J. (1980) - *Int. Rev. Cyt.*, Suppl. 11A, 25-53
8. Kurtz W.G.W., Constable F. (1979) - *Microbiol. Technology*, vol. 1, ed. 2. Acad. Press Inc.
9. Nitsch J.P., Nitsch C. (1969) - Haploid plants from pollen grains, *Science*, vol. 163, 85-87
10. Street M.E. (1977) - Applications of Cell Suspension Cultures, in "Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture", Ed. Reinhard J., Bajaj Y.P.S.
11. Wagner F., Vogelmann H. (1977) - Cultivation of Plant Tissue Cultures in Bioreactors and Formation of Secondary Metabolites, in "Plant Tissue Culture and its Bio-Technological Application", Ed. Barz W., Reinhard E., Zenk M.H., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, New York
12. Wilson G. (1980) - Continuous Culture of Plant Cells Using the Chemostat Principle, in "Plant Cell Cultures", I, Ed. Akademie Verlag, Berlin

CULTURES DE CELLULES ET DE TISSUS VÉGÉTAUX
II. ASPECTS PRATIQUES

Brîndușa Tesio +)
Elena Badea ++)

-
- +) Biologiste, chercheur à l'Institut de Recherches Chimiques-
Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie
- ++) Biologiste, chercheur à l'Institut de Sciences Biologiques,
Bucarest, Roumanie

La culture de cellules végétales représente un instrument idéal de recherche fondamentale qui permet d'élucider divers problèmes dans le domaine de la biologie cellulaire, la physiologie, la génétique, etc.

Quant aux applications pratiques, les recherches suivent des directions différentes : multiplication végétative, amélioration des plantes et production des substances naturelles.

I. MULTIPLICATION VEGETATIVE "IN VITRO"

Du point de vue fondamental, la multiplication végétative est le résultat des mitoses, la multiplication sexuée ayant lieu à la suite de la méiose. Pour les horticulteurs le terme de multiplication végétative a, pratiquement, un sens beaucoup plus restreint. Cette appellation désigne la reproduction accélérée "in vitro" des clones, des variétés, des espèces tout en gardant leur patrimoine génétique, c'est-à-dire les caractères biologiques, physiologiques, agronomiques et technologiques. Le pourcentage des "mutations" obtenues par cette technique est le même que celui obtenu par les méthodes traditionnelles de multiplication : bouturage, marcottage et greffage.

Les avantages de la multiplication végétative par la technique des cultures "in vitro" sont les suivants :

- . obtenir des plantes exemptes de maladies;
- . intensifier la vitesse de propagation, surtout pour les plantes difficiles à multiplier;
- . conserver certaines espèces en voie de disparition;
- . sélectionner certaines variétés avantageuses du point de vue économique.

A. Choix de la voie de multiplication végétative

Quand il s'agit de multiplication végétative des plantes par des cultures "in vitro", il est important de préciser dès le commencement la voie à suivre.

Une propagation très rapide peut-être obtenue à partir des cultures de tissus non-différenciés (cals). Cette voie est attrayante, car on obtient ainsi des dizaines de milliers de plantes à partir d'un fragment de tissu de quelques centaines de milligrammes. C'est la voie qui a été choisie pour multiplier le palmier à huile en France (1).

Une autre voie part des parties organisées de la plante: méristèmes, méristèmes apicaux, bourgeons, tiges et racines.

Ce qui décide du choix d'une des 2 voies est le but envisagé par la multiplication végétative.

L'induction de la différenciation (embryogenèse somatique ou organogénèse) dans les tissus non-différenciés (cals) est préférée quand l'obtention d'une descendance hétérogène ne dérange pas.

Cette voie a une applicabilité limitée car le passage par cals peut favoriser l'apparition de modifications génétiques, qui se manifesteront chez un nombre d'individus qui présenteront d'autres caractères que la plante-mère et la capacité de différenciation baissera lors des sous-cultivations répétées. Les généticiens profitent de ces possibilités et les favorisent même, en utilisant des agents mutagènes.

Cette voie devra être évitée quand il faut assurer une descendance "identique" à la plante-mère. En ce cas, la propagation par cultures "in vitro" des plantes ornementales, des légumes, des arbres fruitiers ou forestiers doit se faire par des cultures d'organes, en évitant autant que possible la formation des cals.

En général, la multiplication clonale est initiée soit en partant de la culture de méristèmes, où l'état sanitaire doit également être garanti, soit en partant des sommets ou bourgeons.

Bien que la multiplication de la plante soit plus lente par cette voie, la méthode est largement utilisée pour certains genres. Chez le genre *Gerbera*, par exemple, on obtient des bourgeons dans 3 mois environ par des cultures de méristèmes floraux. A partir de 20 bourgeons formés "in vitro" on peut obtenir plus de 200.000 plantes à la fin de l'année, alors que

par bouturage, dans des conditions de cultures "in vitro" on ne peut obtenir plus de 50 boutures d'une seule plante(1).

La multiplication clonale exige une série de mesures :

- . choisir rigoureusement les plantes qu'on désire multiplier;
- . cloner les espèces ou les variétés mises en culture "in vitro";
- . cultiver un nombre suffisant de clones;
- . vérifier l'identité des variétés par prélèvements de chaque clone;
- . surveiller quotidiennement la culture et éliminer sans hésitation toutes les plantes à caractères anormaux pour éviter l'apparition de mutations car, une fois entrées en culture, elles se multiplieront avec la même vitesse que les individus normaux.

B. Conditions de culture

1. Choix du milieu de culture. Les milieux nutritifs utilisés pour la culture "in vitro" ont été initialement mis au point pour étudier la prolifération des cellules végétales. Ils ont servi comme point de départ pour des nouvelles formules de milieux nutritifs appropriés.

Les milieux de culture contiennent : des macroéléments minéraux, des microéléments minéraux, un sucre, des phytohormones, des vitamines et différentes substances qui réagissent avec les éléments minéraux ou les phytohormones.

Les éléments minéraux de la composition du milieu nutritif présentent une grande diversité qualitative et quantitative. Leur quantité varie de 500 à 4500 mg/litre. Exemple : les cultures "in vitro" du genre *Hortensia* et du genre *Pelargonium* ne peuvent être obtenues sur le même milieu de culture à cause de leurs exigences différentes en ions de calcium(1). En outre, les milieux d'initiation d'une culture sont différents de ceux utilisés pour la prolifération, car l'état physiologique du méristème ou du sommet n'est pas le même que pour la bouture développée.

Les éléments organiques présentent une grande diversité suivant l'espèce ou la variété aussi bien que pour la même espèce, fonction du milieu utilisé pour l'initiation ou la multiplication.

Les sucres peuvent varier de 4-5 jusqu'à 40-70 g/litre. Si pour initier une culture de Salix babylonica, en partant de l'apex, il faut 20 g de glucose/litre, la quantité devra être diminuée à 5 g/litre dans l'étape suivante, car autrement les boutures meurent (1).

Les phytohormones utilisées sont les auxines, les cytokinines et les gibberellines auxquelles s'ajoutent occasionnellement les inhibiteurs de croissance. Bien qu'indispensable dans la plupart des cas, elles doivent être utilisées avec beaucoup de prudence; le milieu optimal doit avoir la plus petite concentration en phytohormones pour une prolifération satisfaisante.

2. Caractères physiologiques. Pour une bonne réussite de la multiplication végétative il convient de connaître les caractères physiologiques et biochimiques du développement des plantes. Les données physiologiques du développement des plantes sont indispensables pour :

- . déterminer la période de prélèvement de l'explant (fragment de tissu végétal servant à initier une culture);
- . choisir l'organe le plus apte à fournir un matériau de départ capable de se développer ultérieurement;
- . déterminer les conditions qui favorisent le développement de la plante ou son accélération quand elle est mise en culture. La détermination de ces conditions exigent des études sur la différenciation cellulaire, la morphogenèse de l'état juvénile ou de l'état sénescence de la plante;
- . déterminer les conditions du milieu environnant représentées surtout par deux facteurs: lumière et température.

Bien que pour certaines espèces le problème de la multiplication végétative soit résolu, on ne peut affirmer que tous ses aspects ont été élucidés. Des recherches scientifiques intensives se poursuivent dans plusieurs laboratoires pour trouver des réponses aux questions :

. pourquoi un bourgeon dans une culture "in vitro" développera un cal ou se transforme en une plantule?

. pourquoi les plantules obtenues de jeunes arbres se développent facilement, alors que les plantules provenant d'arbres adultes sont rebelles?

. pourquoi apparaît le phénomène de vitrosité (liquification précoce) suivi d'un arrêt de la croissance?

C. Performances

Pour illustrer les performances auxquelles nous pouvons nous attendre lors de la multiplication végétative "in vitro" nous présenterons quelques chiffres d'après Claude Martin (7) :

. un pied de framboisier fournit par les techniques classiques 50 descendants/an, tandis que par des cultures "in vitro" on obtient 50 000 à partir d'un seul méristème;

. la multiplication d'une nouvelle variété de rosier dépend du nombre de greffes qu'on peut prélever de chaque plante, (20 - 50/an); à partir d'une microplante cultivée en tube, on obtient 200 - 400.000 plantes qui peuvent fournir des écussons qui poussent sur leurs propres racines;

. le pêcher-amandier, remarquable porte-greffe pour le pêcher et difficile à multiplier par les techniques classiques, peut produire à partir d'une plante en tube 1.000.000/an;

. on peut prélever 20 boutures par an d'un oeillet tandis qu'une microplante peut aisément produire 500.000 descendants.

II. AMELIORATION DES PLANTES

A. Haploïdie par androgenèse expérimentale

Les grands progrès dans la génétique microbienne peuvent être attribués à la nature haploïde des microorganismes, tandis que chez les plantes supérieures qui sont di-ou polyploïdes des recherches similaires ont été difficiles à cause des problèmes soulevés par la dominance et la ségrégation. Les haploïdes naturels sont rares chez les plantes supérieures et se limitent à certaines espèces. Les généticiens et les amélio-

rateurs ont toujours voulu des méthodes à produire les haploïdes.

Les haploïdes peuvent être utilisés non seulement pour obtenir des mutants très fréquents, mais aussi pour produire des lignées homozygotes pures. Jusqu'en 1964 la production sur grande échelle des haploïdes chez les plantes supérieures était rarement possible. Les travaux de Guha et Maheshwari ont été suivis par de recherches visant à perfectionner la technique, pour pouvoir être utilisées couramment. La plante qui a favorisé le succès de l'androgenèse expérimentale est Datura innoxia de la famille des Solanacées. La culture des anthères de cette plante a permis d'obtenir des embryoides haploïdes développés à partir du pollen. Jusqu'à présent la culture des anthères a été réalisée avec succès chez 153 espèces appartenant à 52 genres et 23 familles de Dicotylédones et Monocotylédones (6).

Les plantes haploïdes obtenues par androgenèse sont, en essence, le résultat de la déviation du programme normal du microspore sous l'influence de stimuli externes (milieu nutritif, lumière, température, centrifugation des anthères, etc.). Par conséquent, le programme normal est réprimé, une évolution particulière du noyau haploïde a lieu, qui, par divisions mitotiques répétées, devient embryoides et ensuite plante haploïde. C'est l'androgenèse directe.

Dans l'androgenèse indirecte, les divisions mitotiques donnent naissance d'abord à un tissu non-différencié- le cal, à partir duquel, dans des conditions favorables, se différencieront divers organes et respectivement des plantes haploïdes, et des plantes, avec différents degrés de ploïdie.

1. Production des haploïdes.

Les haploïdes peuvent s'obtenir par deux méthodes de culture "in vitro" :

- . culture d'anthères et
- . culture de pollen.

(a) La culture d'anthères. Pour cette culture, les bourgeons

floraux sont stérilisés et disséqués pour prélever les anthères; l'opération doit éviter la blessure des anthères, ce qui stimulerait la formation du cal.

(b) La culture de pollen. La culture d'anthères présente un grand désavantage car les plantes peuvent naître non à partir du pollen uniquement mais aussi d'autres parties d'une anthère, en obtenant une population de plantes avec des niveaux différents de ploïdie. De plus, la paroi de l'anthère peut avoir un effet inhibiteur sur le développement du pollen dans l'embryon. C'est pourquoi de nombreux chercheurs ont essayé la culture du pollen isolé qui assure la pureté génétique de la plante. Le pollen peut être cultivé et manipulé de la même manière que les microorganismes, étant aussi très utile pour étudier les mutations et les transformations génétiques.

2. Les facteurs de l'androgenèse.

Les facteurs qui contrôlent l'androgenèse sont nombreux et incomplètement élucidés, ce qui explique la réussite de l'androgenèse seulement chez certaines espèces.

Parmi les facteurs qui favorisent l'androgenèse mentionnons :

- . le génotype de la plante mère;
- . l'âge des anthères qui devront être cultivées;

La phase optimale étant, pour certaines plantes, l'intervalle entre le stade de tétrade et la première mitose pollenique; le choc thermique des inflorescences à + 3°C, pendant 24-48 heures ou leur centrifugation pendant quelques minutes.

. le milieu nutritif; on utilise des milieux solides ou liquides contenant des macro-et microéléments et des substances organiques différentes suivant l'espèce.

Les phytohormones jouent un rôle important dans l'induction de l'androgenèse; on emploie dans ce but certaines concentrations d'auxines et de cytokinines. Certaines espèces comme, par exemple, le tabac (Nicotiana tabacum) n'ont pas besoin d'un supplément hormonal dans le milieu, car les anthères semblent avoir une teneur hormonale adéquate.

En cas d'androgenèse indirecte, on utilise le milieu de régénération pour induire la différenciation cellulaire du cal.

La composition de ce dernier est différente des milieux nutritifs utilisés pour induire l'androgenèse, seulement du point de vue de la teneur en hormones.

La température et la lumière, comme facteurs du milieu environnant, jouent un rôle important. On utilise, en général, des températures entre 23 et 28°C. L'effet de la lumière n'est pas trop bien connu. Suivant les espèces, les exigences varient en ce qui concerne la présence ou l'absence de la lumière et son intensité.

Des recherches effectuées en Roumanie sur 6 hybrides appartenant aux espèces du genre Nicotiana ont montré que la fréquence des anthères dont on obtient les haploïdes varie entre 4 et 43%, le nombre de plantules haploïdes par anthère a varié dans de très larges limites, le maximum étant représenté par une anthère dont on a isolé 90 plantules (10).

3. Importance des haploïdes

Les plantes haploïdes sont génétiquement pures en manifestant le phénomène de hémizygotisme. Par conséquent, il y a une parfaite correspondance entre génotype et phénotype. Ceci est très important car, pour améliorer les plantes, on peut obtenir la sélection du type désiré de plante haploïde.

Par la diploïdisation des haploïdes on obtient des lignées isogènes homozygotes pour la totalité des gènes. Le phénomène de la diploïdisation peut être obtenu par deux voies. La première consiste à appliquer une solution de colchicine (0,4-0,5%) aux plantules haploïdes, aux plantes adultes ou par l'introduction de la solution dans le milieu de culture des anthères et des plantules haploïdes. La seconde voie consiste en cultures de moelle où l'on obtient dans une première étape des cals; au cours de leur croissance ont lieu des endomitoses à la suite desquelles apparaissent des cellules dont se différencieront des plantes diploïdes isogènes et tétraploïdes.

Les plantes haploïdes sont des génotypes variés, chose essentielle pour améliorer les plantes, la sélection étant effi-

cace lorsque les lignées isogènes représentent le matériau de base pour la création de nouvelles variétés et la production d'hybrides qui manifestent le phénomène d'hétérosis. Si pour obtenir des lignées pures par la méthode classique on a besoin de nombreuses générations de consanguinité, par androgenèse on obtient des lignées isogènes au cours d'une seule génération.

La méthode de l'androgenèse expérimentale met en relief rapidement les mutations récessives qui existent dans le fond génétique de la plante et permet d'induire artificiellement des mutants au niveau haploïde.

Les avantages de l'utilisation des haploïdes dans l'amélioration des plantes sont importants. Ils réduisent le temps de 7-10 ans à 1-2 ans, le volume de travail de 65.636 individus à 256 individus (pour les caractères déterminés par l'action de 8 gènes) et multiplient les chances de sélection rapide et plus exacte (11).

Le plus grand nombre de tentatives d'utiliser les haploïdes en agriculture ont été réalisées au Japon et en Chine. Au Japon on a obtenu une variété excellente de tabac, résistant à la maladie "bacterial wilt" (flétrissure provoquée par les bactéries). En Chine, on a obtenu des variétés productives supérieures de tabac: Tanyu I, II et III; de riz: Hucya I, II et Tanfang I; de blé: Haupei I et Lunghua I.

Au Canada, on a obtenu des lignées haploïdes par la culture des anthères chez Brassica napus.

En Allemagne, les haploïdes sont utilisés pour améliorer la pomme de terre et le seigle (6).

3. Protoplastes et hybridation cellulaire chez les plantes

Chez les plantes, l'hybridation cellulaire ne s'est avérée possible qu'après l'élaboration de méthodes efficaces pour obtenir les protoplastes - un type spécial de cellules végétales.

1. Isolement enzymatique des protoplastes

Les protoplastes peuvent pratiquement être isolés de tous

Les organes d'une plante. On utilise d'habitude le mésophylle des feuilles grâce à la grande quantité de protoplastes que l'on en obtient (2×10^6 protoplastes/g de feuille fraîche). Ils peuvent être également obtenus des cals et du pollen mûr (cellules mères du pollen et tétrades polliniques) (11).

Le procédé standard pour isoler les protoplastes consiste à traiter le matériau avec un mélange d'enzymes (cellulase, pectinase, macérozyme, hélicase et rhozyme) qui dégradent la paroi cellulaire et séparent complètement les cellules. Le processus a lieu dans des solutions à stabilisants osmotiques (sorbitol, glucose, saccharose) qui remplacent la pression de la paroi cellulaire et équilibrent la membrane plasmatique. On sépare ensuite les protoplastes des restes sous-cellulaires, éléments vasculaires, cellules non-attaquées par les enzymes et on écarte la solution enzymatique par filtrages, centrifugations et resuspensions répétées qui peuvent toutefois réduire la viabilité des protoplastes. C'est pourquoi, avant de les utiliser, il est nécessaire d'en déterminer le coefficient de viabilité.

En 1971, J.P. Mitsch obtient pour la première fois la régénération de plantes entières de tabac, en partant de protoplastes cultivés dans un milieu artificiel.

2. Culture des protoplastes

Cette culture s'effectue en milieu solide, dans des boîtes Pétri. Les protoplastes commencent la régénération de la paroi cellulaire après quelques heures et la terminent dans deux ou plusieurs jours. La première division cellulaire a lieu dans 3-5 jours, la deuxième dans une semaine, et après une autre semaine se forment des amas cellulaires. Après trois semaines environ apparaissent des cals cellulaires verts, qui atteignent 1 mm de diamètre au bout de 6 semaines. Pour régénérer les plantes il est nécessaire de transférer le cal dans un milieu spécial de différenciation. Le tabac, par exemple, a besoin de 7 à 10 semaines pour régénérer.

3. Fusion des protoplastes

La fusion des protoplastes a lieu à cause de l'absence de la paroi cellulaire rigide et elle peut s'effectuer spontanément ou à l'aide de certaines substances chimiques: nitrate de sodium,

polyéthylène-glycol, ions de calcium à pH élevé, etc. Les protoplastes possèdent une charge électrique négative. Le nitrate de sodium et les ions de calcium éliminent cette charge, les protoplastes adhérant étroitement entre eux. Le polyéthylène-glycol en solution concentrée détermine une forte déshydratation qui fait également adhérer les protoplastes. On peut aussi obtenir leur fusion par des méthodes immunologiques.

La fusion des cellules est suivie par la fusion des noyaux; ensuite la paroi cellulaire est refaite et la division cellulaire commence.

Pour produire des cellules hybrides il est nécessaire de trouver une méthode convenable pour sélectionner dans le milieu de culture uniquement les cellules fusionnées qui se trouvent, dans le mélange, aux côtés des cellules non-fusionnées.

4. Hybrides cellulaires

En 1972, l'équipe du généticien P.S. Carlson a obtenu, aux Etats Unis, les premiers hybrides cellulaires par la fusion des protoplastes. Les chercheurs américains ont isolé les protoplastes de deux espèces de tabac: Nicotiana glauca ($2n = 24$ chromosomes) et Nicotiana langsdorffii ($2n = 18$ chromosomes) et les ont cultivé en mélange dans un milieu sans phytohormones. Comme les protoplastes de chaque parent ne pouvaient pousser dans un milieu exempt de phytohormones, on a sélectionné seulement les cellules fusionnées qui ont pu se dispenser de phytohormones. A partir des cellules fusionnées des plantes hybrides normales ont été régénérées et ce sont des amphidiploïdes à $2n=42$ chromosomes.

Les plantes hybrides obtenues par fusion des protoplastes sont identiques aux plantes obtenues par hybridation sexuée.

L'hybridation cellulaire réalisée par la fusion des cellules peut devenir un instrument important pour obtenir des hybrides entre espèces qui ne peuvent être croisées par voie sexuée. On a obtenu des fusions cellulaires en culture entre espèces différentes comme: maïs et avoine; carotte et tabac; navet et soja; petits pois et soja, ainsi que des hybrides cellulaires (dont on a régénéré des plantes entre espèces de Petunia hybrida et Petunia parodii, Lycopersicon esculentum et Solanum tuberosum (11).

Les protoplastes peuvent être également utilisés pour inclure dans les cellules végétales des molécules ou particules étrangères comme, par exemple, des gènes qui fixent l'azote, des chloroplastes et des virus.

5. Importance des protoplastes

Les protoplastes présentent une grande importance pour:

- . multiplier végétativement très vite des génotypes précieux, en créant les clones nécessaires en agriculture;
- . obtenir des hybrides cellulaires entre deux ou plusieurs espèces éloignées qui ne peuvent être croisées par voie sexuée;
- . obtenir des plantes à divers degrés de ploïdie, des autopoliploïdes, servant à améliorer des plantes;
- . transférer des gènes ou des chromosomes dans les protoplastes, ce qui permet la transmission de la résistance (aux maladies ou aux insectes nuisibles) des espèces sauvages aux espèces cultivées.

III. PRODUCTION DE SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUEMENT ACTIVES

A. Introduction

Les plantes supérieures représentent une source principale de diverses denrées alimentaires, de substances ligneuses, fibreuses, huileuses, etc., aussi bien qu'une importante source de substances médicinales.

Les substances d'intérêt médical sont des produits du métabolisme secondaire. Leur formation est déterminée par le génotype, les conditions physiologiques, l'étape de développement de la plante et de leur localisation à l'intérieur de la plante. Elles sont stockées dans les vacuoles ou excrétées.

Au cours des dernières années, l'approvisionnement en plantes médicinales a présenté une série de difficultés dues à la diminution drastique des ressources végétales (exploitation irrationnelle de la flore) et à l'augmentation des difficultés techniques ou économiques dans la culture de toutes les plantes.

L'introduction des systèmes de cultures cellulaires et de tissus végétaux "in vitro", dans le but de produire des substances médicinales pourraient écarter ces difficultés et amener une série d'avantages, comme :

- . produire les substances dans des conditions contrôlées du milieu environnant, indépendamment des changements climatiques ou des caractéristiques du sol;
- . obtenir ces substances à partir de cultures cellulaires saines, exemptes de maladies;
- . obtenir des substances médicinales à partir de cellules de plantes tropicales ou alpines;
- . contrôler le processus de croissance des cellules et régler les processus métaboliques en vue de l'amélioration de la productivité.

Les cellules et tissus végétaux cultivés "in vitro" maintiennent catégoriquement leur capacité de synthétiser les métabolites principaux et secondaires, qui sont génétiquement caractéristiques pour la plante entière. Ils représentent un matériau précieux pour étudier la biosynthèse des métabolites secondaires et fournir une méthode pour la production commerciale de certains produits thérapeutiques.

En dehors de ces aspects favorables, les cultures cellulaires sont encore limitées car elles ne produisent pas de quantités importantes de principes actifs caractéristiques des plantes dont elles ont été obtenues. Cette incapacité pourrait être causée par la modification de l'information génétique au cours des sous-cultures prolongées, quoique de nombreux exemples démontrent la totipotence de la cellule végétale. A l'exception des cultures d'organes, les cultures tissulaires sont composées de tissu désorganisé, avec un nombre limité de cellules. C'est pourquoi il n'est pas surprenant que certains métabolites secondaires ne se produisent pas dans la culture "in vitro", leur synthèse dans la plante étant associée à la différenciation de cellules spécialisées ou à l'organisation des systèmes tissulaires.

Dans ce qui suit nous analyserons les facteurs biologiques et du milieu environnant qui exercent une influence sur

la production des substances médicinales dans des cultures "in vitro" et sur la présentation de différentes classes de substances obtenues par cette voie.

3. Facteurs qui contrôlent la production de métabolites secondaires "in vitro"

1. Influence des facteurs biologiques

(a) Croissance. Les cellules végétales ont une vitesse de croissance assez réduite par comparaison aux micro-organismes. L'augmentation de la vitesse de croissance doit avoir pour but une plus grande production de métabolites secondaires, étant donné que l'accélération de la croissance des cellules végétales "in vitro" ne détermine pas toujours une quantité accrue du constituant désiré.

Les données expérimentales obtenues sur des suspensions cellulaires cultivées selon le système de culture "batch" montrent que les cellules végétales présentent un modèle caractéristique de croissance et de division. Celui-ci comporte les phases suivantes :

. la période de latence, caractérisée par l'augmentation de la masse cellulaire inoculée et dépendant des facteurs comme la quantité de l'inoculum et la nature du milieu nutritif;

. la période de croissance exponentielle, caractérisée par la croissance et la division des cellules;

. la période stationnaire, quand les cellules s'arrêtent de croître et de se diviser. Leur croissance et division auront lieu seulement si les cellules sont transférées dans un milieu frais ou si le milieu de culture a été remplacé par un milieu frais.

L'activité biosynthétique des cellules varie suivant la croissance des cellules et l'utilisation du substrat; à cette fin, des études cinétiques de la vitesse de croissance et de la synthèse des métabolites respectifs sont nécessaires. Les données expérimentales indiquent l'existence de 3 modèles majeurs de production-croissance à savoir (13) :

Modèle 1 - la synthèse du produit a lieu parallèlement avec la croissance des cellules. Les cultures de Nicotiana glauca pour la production de nicotine et les cultures de Datura et Scopolia pour la production des alcaloïdes tropa- niques (16) appartiennent à ce type.

Modèle 2 - la synthèse du produit a lieu à la fin de la période de croissance. La production de polyphénol (5) appar- tient à ce type.

Modèle 3 - la courbe de production, est diphasique et reste en arrière de la courbe de croissance, comme c'est le cas pour la production de diosgénine (4).

Pour augmenter l'efficacité de la production il convient d'abrèger la phase de latence que certains chercheurs ont déjà obtenu en diminuant la concentration en auxines du milieu de culture.

(b) Différenciation morphologique. On sait que les plantes synthétisent certaines substances qui s'accumulent dans des organes et tissus spécialisés. Malgré un grand nombre de cas dans lesquels le tissu non-organisé est capable de produire des substances qui se trouvent exclusivement dans les tissus spécialisés de la plante intacte, il existe aussi des cas où l'induction de la différenciation morphologique est nécessaire pour déterminer la production de substances désirées. Il y a donc un étroit rapport entre la différenciation morphologique et la synthèse de certains métabolites. Par exemple, dans les cultures de Datura innoxia les alcaloïdes totaux qui se trouvent en petites quantités dans les cals, ont augmenté progressivement avec la différenciation et la croissance des plantes.

L'induction artificielle de l'organogenèse afin d'obtenir des substances médicinales a été expérimentée par Umori et Tomita (1974) sur des cultures de Eupleurum falcatum. Les saiko- saponines de la racine des plantes ne sont pas produites par les cals mais par les suspensions cellulaires chez lesquelles on a induit la différenciation de la racine. Cette différenci- ation exige toutefois un intervalle de temps plus long néces-

saire à la production. L'induction de synthèses chimiques sans différenciation morphologique serait idéale. Comme exemple de différenciation chimique sans différenciation morphologique nous pouvons citer la production de résine dans les cultures cellulaires de Pinus sylvestris, la production d'huile essentielle dans les suspensions cellulaires non différenciées de Perilla frutescens, aussi bien que la production de thébaine dans les cultures cellulaires non-différenciées de Papaver bracteatum (13).

(c) Variabilité cellulaire. La variation de l'activité biosynthétique des cultures "in vitro" est due, en grande mesure, à la variabilité génotypique cellulaire, qui conduit, dans des cultures prolongées, à l'apparition de sous-cultures ayant des capacités biosynthétiques différentes. Les cultures de Lithospermum forment spontanément, au cours des sous-cultures successives, des zones de tissus incolores et colorés en rouge foncé ayant un aspect de mosaïque. La sélection de ces tissus colorés différemment a été efficace pour la croissance de la productivité en métabolites secondaires (14).

A partir des cellules isolées des cultures de Nicotiana rustica se sont développés des souches qui ont présenté de grandes différences de croissance et de production de nicotine (15).

Cette sélection qui a pour but d'obtenir des souches à capacité biosynthétique élevée est très importante pour augmenter la production.

L'induction artificielle des mutations est une autre voie pour obtenir des lignées à l'activité biosynthétique élevée. En utilisant comme agent mutagène chimique la N-méthyl-N-nitro-nitrosoguanidine, Nishi (1974) a obtenu des souches de cellules de carotte à capacité biosynthétique augmentée en β -carotène et lycopène à savoir trois fois plus qu'en partant de la souche initiale et quatre fois plus qu'en partant de la racine de la plante entière.

2. Influence des facteurs du milieu environnant

(a) Composition du milieu nutritif. Les cultures de cellules présentent l'avantage de pouvoir pousser dans des milieux synthétiques simples. Les recherches concernant les effets sur la production de métabolites secondaires des constituants du milieu et leur interaction se sont multipliées dernièrement. En 1974 West et Hensaw ont montré que la formation des catécholamines dans les suspensions cellulaires du sycomore est positivement influencée par l'augmentation du rapport C/N suggérant le règlement antagoniste entre le métabolisme du sucre et de l'azote. Les hydrates de carbone représentent un constituant important du milieu nutritif des points de vue qualitatif (le type de glucide utilisé) et quantitatif (sa concentration dans le milieu).

Quant à la composition des substances organiques ajoutées, on a constaté que parmi les acides aminés, seul le glycocole a un effet prononcé sur la croissance des cultures. A présent, des recherches se poursuivent sur grande échelle pour utiliser certaines acides aminés comme précurseurs dans les processus de synthèse.

(b) Phytohormones. Les régulateurs de croissance affectent non seulement la croissance et la différenciation des cellules en culture, mais également le métabolisme secondaire. Leurs effets sont très variés en fonction du type de métabolite à obtenir.

La synthèse de la nicotine dans les cultures de Nicotiana tabacum est fortement inhibée par l'auxine 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique), tandis que la Kinétine (Cytokynine) la stimule (16). Mizusaki (1971) a démontré qu'une concentration élevée en auxines, dans les cultures de tabac, inhibent l'action de l'enzyme putrescine-N-méthyl-transférase. A cause de ce blocage, la putrescine accumulée dans les cellules se combine avec l'acide p-coumarique et forme un métabolite anormal, la p-cumarol - putrescine (9).

Même entre divers types d'auxines il existe des différences importantes concernant la production de métabolites

secondaires. Jentz (1975) a fait des études sur la production d'anthraquinones dans les cultures cellulaires de Lorinda citrifolia et a montré que le A.T.A. favorise la production d'anthraquinones, et le 2,4-D- l'inhibe. La même auxine 2,4-D pourtant n'affecte pas la production des anthraquinones du type émodine obtenues par culture cellulaires de Cassia tora (17).

(c) Précurseurs. Pour augmenter la productivité de certaines cultures cellulaires on ajoute des précurseurs directs ou indirects au milieu nutritif.

Le choix du précurseur le plus efficace est un problème très difficile, en raison de la toxicité que certaines substances peuvent induire. Pour augmenter la production de l'arbutine dans les cultures cellulaires de Datura, l'addition d'hydroquinone en petites quantités est favorable, tandis que les grandes doses peuvent tuer les cellules (13).

(d) Lumière. La lumière a un rôle important dans le règlement du métabolisme secondaire pour certaines espèces, tandis que pour d'autres on n'observe pas une influence significative. Corduan et Reinhard (1972) ont constaté une altération caractéristique dans le modèle de la composition chimique de l'huile volatile de Ruta graveolens selon que la culture cellulaire était exposée à la lumière ou gardée dans l'obscurité. On a montré, en général, que la lumière stimule la formation des constituants des types caroténoïde, flavonoïde, polyphénol et plastaquinone (2).

C. Différentes classes de substances obtenues

Dans le tableau établi par Kurtz et Constabel que nous présentons ci-après sont présentées les substances naturelles obtenues par la technique de la culture des cellules et tissus végétaux, en utilisant les cultures en suspension.

Nom du produit	Espèce	Références
Alcaloïdes du tabac	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solt, 1957, 1960
Berbérines	<i>Nicotiana glauca</i>	Speake et coll., 1964
Alcaloïdes tropaniques	<i>Datura stramonium</i>	Chan et Staba, 1965; Stohs, 1969
Alcaloïdes indoliques	<i>Vinca minor</i>	Petiani et Guine- bault, 1962; Boder et coll., 1964
	<i>Catharantus roseus</i>	Patterson et Carew, 1969; Stockigt et coll., 1976
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Velicky, 1972
Alcaloïdes puriniques	<i>Coffea arabica</i>	Keller et coll., 1972
Alcaloïdes quinoliniques	<i>Ruta graveolens</i>	Boulanger et coll., 1973
Bétalaines	<i>Phytolacca americana</i>	Misawa et coll., 1973
Saponines	<i>Panax ginseng</i>	Furuya et Ishii, 1973
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Tanaki et coll., 1975
Glycosides cardiotoniques	<i>Digitalis purpurea</i>	Staba et Lamba, 1963
Furanocoumarines	<i>Ruta graveolens</i>	Steck, 1971
Anthocyanines	<i>Populus nigra</i>	Metsumoto et coll., 1970
Quinones	<i>Nicotiana tabacum</i>	Ikeda et coll., 1974
Anthraquinones	<i>Morinda citrifolia</i>	Zenk et coll., 1975
Caroténoïdes	<i>Daucus carota</i>	Sugano et coll., 1971
Peptides	<i>Scopolia japonica</i>	Misawa et coll., 1973 et 1975c
Antibiotiques	<i>Phytolacca americana</i>	Misawa et al., 1974b
Inhibiteurs des virus des plantes	<i>Phytolacca americana</i>	Misawa et al., 1974c et 1976
Coccidiostatiques	<i>Catharanthus roseus</i>	Misawa et al., 1975c
Phosphodiesterases	<i>Catharanthus roseus</i>	Furuya et al., 1973
	<i>Phytolacca amer.</i>	Ukita et al., 1973

../..

	<i>Nicotiana tabacum</i>	Kubo, 1974
	<i>Daucus carota</i>	Kubo, 1974
	<i>Scopolia japonica</i>	
	Sea mays	
Amylases	<i>Saccharum officinarum</i>	Maratzki, 1971
Glucanases	<i>Hordeum vulgare</i>	Gamborg et Eveleigh, 1968

1. Substances à action pharmacologique connue

La tentative d'obtenir par cultures in vitro des substances à action pharmacologique connue et qui normalement sont extraites des plantes in vivo s'explique par la diminution dans ces dernières de la quantité et de la qualité des principes actifs, par la difficulté de réaliser en cultures de champ certaines espèces de la flore spontanée et par le long intervalle de temps nécessaire à la plante pour atteindre la maturité (5-7 ans).

(a) Alcaloïdes. La berbérine a été obtenue dans les cultures statiques en utilisant des cals, des cellules tumorales ou des plantes différenciées du cal de l'espèce Coptis japonica. Le cal obtenu en milieu Murashige-Skoog additionné de 30 g de saccharose, 1 mg de 2,4-D et 0,1 mg K/l maintenu 4 semaines à 26°C a été prélevé et soumis à l'extraction par l'éthanol et le chloroforme. L'alcaloïde obtenu par chromatographie en couche mince a été recristallisé dans l'eau, la substance étant identifiée comme du chlorhydrate de berbérine. La production obtenue a été de 2,4 mg/64 g de cal frais (8).

Des chercheurs japonais ont obtenu par cette voie une production d'alcaloïdes tropaniques. Ainsi Shio (1973) a obtenu l'hyoscyamine brute des cultures de Datura stramonium âgées de 5 semaines (0,3 mg/2 g de substance sèche) et de la nicotine en cultures de Nicotiana tabacum (11,46 mg/5,05 g de substance sèche) (3).

(b) Saponines. Radix ginseng contient des saponines et saponinés parmi lesquelles le ginsénoside R_p qui a une activité sédatrice et R_q - avec une activité stimulante. Furuya (1973) a

réalisé des cultures cellulaires de Panax ginseng sur milieu Murashige-Skoog, additionné de vitamines, saccharose, 2,4-D, soja ou extrait de viande, incubés à 25-28°C, pendant quelques semaines, d'où il a isolé les deux saponines. La production de saponines brutes a atteint un titre de 21,1%, qui est à comparer avec les 4% seulement de racines de la plante entière. Récemment, ce chercheur a réussi à isoler des mutants qui augmentent le titre des saponines à 25,5% (8).

(c) Quinones. Les cultures cellulaires statiques de Litosperrum erythrorhizen réalisées par Tabata (14) ont présenté une teneur supérieure de pigments naphthoquinoniques, qui sont utilisés en Chine et au Japon dans le traitement des brûlures, des affections de la peau et des hémorroïdes. La teneur en pigments de 12% du poids sec des suspensions cellulaires a été 8 fois plus grande que dans le cas des plantes.

Malgré le grand nombre d'exemples où les composants spécifiques des plantes ont été obtenus par la technique des cultures cellulaires, un assez grand nombre de substances médicinales n'ont pu être obtenues par cette voie ou bien elles n'ont pu être décelées dans ces cultures. Parmi celles-ci, mentionnons: la morphine, la codéine, la vincristine, la vinblastine, la spartéine, le menthol, des glycosides cardiotoniques, etc. (13).

2. Substances médicinales, obtenues par biotransformation

En partant de la prémisse que les modifications spécifiques des structures chimiques de certaines substances peuvent être synthétisées plus facilement par des cultures de cellules et de tissus végétaux que par les micro-organismes ou la synthèse chimique, la biotransformation est considérée comme une application biotechnologique très prometteuse.

Les suspensions cellulaires de Digitalis lanata peuvent convertir assez bien la digitoxine et la β -méthyl-digitoxine en substances utiles, en hydroxylant spécifiquement la position 12 du squelette stéroïdal (12).

Comme les phénols simples administrés aux cultures cellulaires peuvent être convertis en monoglucides correspondants, Tabata (1977) a étudié la glucosidification phénolique par les

cultures cellulaires en suspension de Datura innoxia et a montré que les 3 isomères du hydroxybenzène aussi bien que d'autres produits phénoliques sont convertis assez vite en mono- β -D-glucosides. Les suspensions cellulaires de Datura innoxia possèdent une capacité élevée de transformer l'hydroquinone en arbutine (diurétique et antiseptique urinaire). La glucosidification de l'hydroquinone a été totale 10 heures après administration.

On entrevoit aussi la possibilité que les cellules végétales "in vitro" soient utilisées dans les conversions enzymatiques des constituants racémiques en produits optiquement actifs.

3. Médicaments nouveaux découverts au moyen du screening pharmacologique

Le screening pharmacologique s'est avéré efficace pour isoler de nouvelles substances actives produites par les cultures cellulaires. Les premières études dans ce domaine ont mis en évidence que certains cals possèdent une activité antimicrobienne. On a montré, par exemple, que les extraits aqueux préparés à partir du cal ou des suspensions de Isodon japonicus inhibent la sécrétion du suc gastrique chez la souris et favorisent la guérison des ulcères peptiques. L'activité antiulcéreuse de l'extrait de cal a été presque équivalente à l'activité de l'extrait de la plante entière.

En utilisant la méthode du screening pharmacologique sur de nombreuses cultures cellulaires, Misawa (8) a isolé quelques substances nouvelles, parmi lesquelles un inhibiteur de la protéinase (enzyme qui détermine des inflammations, pancréatites et emphysemes), substance ayant une activité antiplasmatique prononcée. Elle a été obtenue dans les cultures cellulaires en suspension de Scopolia japonica où elle s'est accumulée en plus grandes quantités que dans les plantes. Cet inhibiteur a une activité plus forte (contre différentes protéinases) que l'inhibiteur trypsine-Kallikrein obtenu des bovins.

Les mêmes chercheurs ont observé que la biomasse sèche, résultant des cultures de Vinca rosea ajoutée à la nourriture des poussins en doses de 250 ppm par jour, agit curativement dans la coccidiomycose des poussins et prophylactiquement contre

Les protozoaires pathogènes, la vitesse de croissance des poussins étant de beaucoup augmentée. La nature chimique de cette activité n'a pas encore été élucidée (13).

Les exemples présentés sont très intéressants, car ils élargissent le domaine des applications possibles des cultures cellulaires.

D. Perspectives

L'application de la technique des cultures cellulaires et des tissus végétaux dans l'industrie, afin de produire des substances médicinales dans un proche avenir est prometteuse, mais elle dépend de la solution de certains problèmes d'ordres fondamental et pratique. Si la vitesse de croissance peut être considérablement accélérée par l'amélioration des conditions de culture et l'élévation sélective des cultures cellulaires, l'augmentation des vitesses biosynthétiques, par les réglages chimiques ou génétiques, exigent encore de grands efforts.

La réalisation d'une production constante exige la stabilité génétique des lignées cellulaires cultivées. Les cultures pourraient être maintenues disponibles en stocks en les réfrigérant, mais le contrôle de la stabilité biosynthétique réclame encore des études cytogénétiques et physiologiques.

Un autre problème se réfère à la nécessité d'accumuler les métabolites dans les cellules, ou dans le milieu de culture. L'accumulation du produit final en excès dans la cellule végétale peut déterminer un feed-back négatif, une répression du processus de biosynthèse. On a également en vue d'élaborer des méthodes qui augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire pour éliminer le métabolite secondaire du milieu nutritif.

Il faut mentionner, enfin, les problèmes du prix de revient. Le coût élevé de la source de culture organique pourrait être diminué par l'utilisation de sources bon marché du type mélasse, amidon ou alcools. Quant à la consommation d'énergie (réglage de la température, aération, agitation, etc.), elle pourrait être réduite en diminuant la période entre l'initiation de la culture et la formation du produit et en introduisant des

systèmes de cultures en continu ou semi-continu, ce qui conduirait à programmer la composition du milieu nécessaire pour régler l'activité biosynthétique des cellules.

B I B L I O G R A P H I E

1. Beauchesne M.G. (1980) - Comptes Rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France, (66), 8, 638-649
2. Corduan G., Reinhard K. (1972) - Phytochemistry, 11, 917-22
3. Davies M. (1972) - Planta, 104, 50-65
4. Kaul B., Stohs S.Y., Staba E.J. (1969) - Lloydia, 12, 147-59
5. Kurtz W.G.W., Constabel F. (1979) - Microbial Technology, 1
6. Maheswari S.S., Tyagi A.K., Malhotra K. (1980) - Theor. Appl. Genet., 58, 5, 193
7. Martin C. (1980) - Comptes Rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France, 66, 8, 629-637
8. Misawa M. (1977) - Production of Natural Substances by Plant Cell Culture. Japanese Patent, in "Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application" (Barz W., Reinhard E., Zenk M.H., eds.) Springer Verlag, Berlin
9. Mizusaki S., Tanabe Y., Nogunachi M., Tanaki E. (1971) - Phytochemistry, 10, 1347-1350
10. Nishi A., Yoshida A., Mori M., Sugano M. (1974) - Phytochemistry, 13, 1653
11. Raicu P. (1980) - Genetica, Editura Didactică și Pedagogică, Bucarest
12. Reinhard K. (1974) - Biotransformation by Plant Tissue Cultures, in: "Tissue Culture and Plant Science", Street H.E. (ed.), Academic Press, London
13. Tabata M. (1977) - Recent Advances in the Production of Medicinal Substances by Plant Cell Cultures, in: "Plant Tissue Culture and its Bio-technological

Application" (Barz W., Reinhard E., Zenk
M.H., eds.), Springer Verlag, Berlin

14. Tabata M., Mizukani H., Hiraoka H., Konoshima H. (1974) -
Phytochemistry, 13, 927-932
15. Tabata M., Hiraoka H. (1976) - Physiol. Plantarum, 38,
pp. 19-23
16. Tabata M., Yamamoto H., Hiraoka H., Marumoto Y., Konoshima
H. (1971) - Phytochemistry, 10, 723-729
17. Zenk M.H., El Shagi H., Schulte V. (1975) - Planta Med.
Suppl., 79-101

PART V

METHODES D'EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE POUR
L'OBTENTION DES PRINCIPES ACTIFS DE PLANTES
MEDICINALES

Valentin Măşcov ⁺)

⁺) Pharmacien, chercheur à l'Institut de Recherches Chimiques-
Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

L'extraction est un procédé de séparation de certains composants d'un mélange complexe, basé sur leurs solubilités sélectives dans différents solvants. Le processus d'extraction peut être discontinu ou continu, dans le même trajet ou en contre-courant.

Dans le domaine des plantes médicinales et aromatiques, la matière première peut être à l'état frais, congelé ou desséché. La plante peut être entière ou on emploie des parties d'elle: fleurs, fruits, semences, feuilles, racines, etc. De ces sources on extrait les principes actifs qui intéressent (alcaloïdes, glycosides, lipides, amino-acides, etc.).

En général, dans la manière d'aborder l'extraction de la matière première végétale, on doit prendre en considération les aspects suivants:

- . l'état de "semi-perméabilité" du matériau végétal frais;
- . la solubilité des substances complexes ou la possibilité d'être scindées;
- . l'activité physiologique des fractions scindées de cette manière.

I. ASPECTS THEORIQUES DE L'EXTRACTION. DIFFUSION

La diffusion règle dans le temps et dans l'espace le transfert des substances dissoutes, de couche en couche au sein du solvant, principalement sous l'effet de l'osmose. L'expression élémentaire pour un plan donné et dans l'espace a été traduite par Fick:

A. Pour la diffusion sur un plan donné, l'équation est exprimée par la relation:

$$dm = K.ds \frac{dc}{dx} dt \quad (1)$$

Où: K = la constante de diffusion
dm = la quantité de matière
ds = la surface élémentaire
dx = le parcours élémentaire
dt = le temps

dc = l'écart de concentration

$\frac{dc}{dx}$ = le gradient de concentration

Cette relation montre que: une quantité de matière dm diffuse, à travers une surface élémentaire ds , sur un parcours élémentaire dx , pendant un temps dt , sous un écart de concentration dc , et que le rendement de l'extraction est d'autant plus élevé que la surface de contact, la durée de l'opération et le renouvellement du solvant sont plus grands.

B. Pour la diffusion dans l'espace, l'équation la plus générale de la diffusion est représentée par la relation:

$$\frac{dc}{dt} = K \frac{d^2c}{dx^2} \quad (2)$$

où: K = la constante de diffusion

c = la concentration du corps diffusé à une distance x de l'origine

t = le temps.

Cette équation (2) semblable à celle qui exprime la propagation de la chaleur, admet des solutions du type des équations de Fourier (séries convergentes). Certaines de ces solutions, correspondant à des cas simples, ont pu être vérifiées.

Les conditions d'application de cette formule s'entendent dans les hypothèses théoriques suivantes:

- . diffusion exercée uniquement en surface
- . épaisseur de tranche négligeable, par rapport à la longueur et à la largeur;
- . la valeur du coefficient de diffusion, ne dépendant pas de l'épaisseur de la tranche;
- . uniformité de distribution du principe actif.

Une bonne concordance a été observée entre le calcul et les mesures expérimentales.

II. MODALITES D'EPUISEMENT

Trois modes d'épuisement sont utilisés:

- . contact simple
- . contacts multiples
- . contre-courant

A. Epuisement par contact simple

Une quantité donnée de matière première est traitée en une seule fois par une quantité donnée de solvant, dans des conditions de temps, d'agitation et de température qui peuvent être variables.

D'après les formules de calcul de Hawley, dans une hypothèse de première approximation, on admet que tout se passe comme si la substance soluble était déposée à la surface d'un support insoluble.

Il distingue deux cas, suivant que la matière est humectée ou qu'elle ne l'est pas.

1. Echanges compte non-tenu de l'humectation préalable

Une quantité de matière est choisie par convention, de façon telle que le poids des substances extraites pouvant en être retirées soit égal à l'unité. Elle est supposée être parfaitement humectée par une quantité de solvant dont il n'est pas tenu compte, en fonction de l'hypothèse de départ.

Un volume \underline{S} de solvant frais est mis à son contact et l'épuise.

Après avoir atteint l'équilibre d'échange, la colature est recueillie. Un partage des principes dissous s'est effectué dans la partie de la colature (S_e) écoulée et la partie de la colature (S_r) retenue par le marc.

Ce partage s'exprime par le rapport des deux quantités extraites correspondantes (q_1) et (q_2), proportionnel aux volumes (S_e) et (S_r).

$$\frac{S_e}{S_r} = \frac{q_1}{q_2} = a \quad (3)$$

Ce rapport (a) est appelé "rapport de solvant"; seul, il caractérise quantitativement une opération si mal définie par ailleurs.

En fonction de la convention de départ, la matière extractive initiale, égale à l'unité, s'est répartie entre (q_1) extraite et (q_2) retenue:

$$q_1 + q_2 = 1 \quad (4)$$

Des deux relations (3) et (4) il résulte:

$$q_1 = \frac{a}{a+1} \quad \text{et} \quad q_2 = \frac{1}{a+1} \quad (5)$$

et en ramenant les calculs à 100 grammes de matières extraites:

- pourcentage des substances extraites : $Q_1 = \frac{a}{a+1} \cdot 100$
- pourcentage des substances retenues par le marc:

$$Q_2 = \frac{1}{a+1} \cdot 100$$

2. Echanges compte tenu de l'humectation préalable

Le raisonnement précédent montre que l'humectation préalable nécessite la mise en oeuvre d'une quantité de solvant égale à (s_r).

Si on tient compte de ce fait, les relations de base doivent être écrites:

$$\frac{s_e + s_r}{s_r} = \frac{q_1 + q_2}{q_2} = a$$

D'où il résulte:

- pourcentage de substances extraites: $Q = 100 \left(1 - \frac{1}{a}\right)$
- pourcentage de substances retenues par le marc: $Q_2 = \frac{100}{a}$

Si le rapport des solvants est égal à 3, le rendement n'est que de 75% ou de 66-67%, suivant que compte est tenu ou non de l'humectation préalable. Donc, après un seul épuisement, 25% ou 33,3% des matières extractives restent dans le marc.

L'épuisement par simple contact ne peut donc pas être industriellement admis. Il doit être amélioré par l'emploi de plus grandes quantités de solvants, par la répétition des épuisements (contacts multiples), par des contre-courants.

Néanmoins, il est parfois retenu pour les traitements extemporanés et exceptionnels, car l'appareillage est simple et peu coûteux.

Pour les buts galéniques et pharmaceutiques la réalisation de l'épuisement par contact simple se fait par: macération, lixiviation, diacotation, évacotation. Infusion, décoction, digestion sont trois modalités de macération effectuées à des températures toujours supérieures à la température ordinaire.

3. Epuisement par contacts multiples

L'épuisement par contacts multiples est une succession d'épuisements par contact simple.

Le calcul du bilan, d'après Hawley, est le suivant:

1. Matière humectée au départ

Après le premier contact (épuisement par contact simple):

- la partie de matières extraites est: $q_1 = \frac{a}{a+1}$
- la partie retenue par le marc est: $q_2 = \frac{1}{a+1}$

Le second épuisement extraira une partie de cette dernière quantité (q_2). Celle-ci sera fractionnée en:

- q_3 = passant dans la colature;
- q_4 = restant dans le marc.

Les conditions liant ces deux valeurs sont:

$$q_3 + q_4 = q_2 = \frac{1}{a+1} \quad (6)$$

$$\frac{q_3}{q_4} = a \quad (7)$$

$$\text{On en déduit que: } q_4 = \frac{1}{(a+1)^2} \quad (8)$$

$$\text{correspondant à un pourcentage : } q_4 = \frac{100}{(a+1)^2}$$

On démontre de même que:

• après le troisième épuisement, il reste dans le marc le pourcentage: $\frac{100}{(a+1)^3} \quad (9)$

• après le quatrième épuisement, il reste dans le marc le pourcentage: $\frac{100}{(a+1)^4} \quad (10)$

. après le n-ième épuisement, il reste dans le marc
le pourcentage: $\frac{100}{(a+1)^n}$

Le pourcentage d'extraction est: $1 - \left[\frac{1}{(a+1)^n} \right] \cdot 100$

2. Matière non-humectée

La matière n'a pas été humectée au départ: mais ce fait n'est valable que pour le premier épuisement: à partir du second épuisement, la drogue en épuisement est bien entendu humectée.

Après le premier épuisement, il reste dans le marc:

$$q'_1 = \frac{1}{a} \quad (11)$$

Le second épuisement conduira aux répartitions:

$$\frac{q'_3}{q'_4} = a \quad (12)$$

$$q'_3 + q'_4 = q'_2 = \frac{1}{a} \quad (13)$$

$$\text{On en déduit que: } q'_4 = \frac{1}{a(a+1)} \quad (14)$$

correspondant au pourcentage:

$$\frac{100}{a(a+1)}$$

On démontre de même que:

. après le troisième épuisement, il reste dans le marc
le pourcentage: $\frac{100}{a(a+1)^2}$

. après le quatrième épuisement, il reste dans le marc
le pourcentage: $\frac{100}{a(a+1)^3}$

. après le n-ième épuisement, il reste dans le marc
le pourcentage: $\frac{100}{a(a+1)^{n-1}}$

Le pourcentage d'extraction est: $1 - \left[\frac{1}{a(a+1)^{n-1}} \right] \cdot 100$

Lorsqu'une extraction s'effectue avec un rapport de solvants égal, par exemple, à trois, on obtient, après quatre traitements successifs, un rendement de :

- . 99,61%, si la drogue a été humectée;
- . 99,48%, si elle ne l'a pas été.

Ce degré d'épuisement n'a été obtenu qu'au prix d'une grande dépense de solvants:

- . 12 volumes de colatures, c'est-à-dire, 4 fois le volume des colatures du premier épuisement, dans le premier cas;
- . 11 volumes de colatures, dans le second cas.

Ces quantités nécessiteront, lors de leur distillation et de leur concentration, une forte dépense d'énergie.

Une autre constatation peut être notée:

. L'efficacité des différents traitements décroît très rapidement:

- . le premier épuisement a extrait 75% des matières extractibles,
- . le deuxième épuisement a extrait 13,75% des matières extractibles,
- . le troisième épuisement a extrait 4,69% des matières extractibles,
- . le quatrième épuisement a extrait 1,17% des matières extractibles.

Les seconde, troisième et quatrième fractions de solvants sont donc très mal utilisées et gardent une grande capacité d'extraction; l'extraction par contre-courant remédie à cet inconvénient.

C. Epuisement par contre-courant

Ainsi qu'il a été signalé, l'épuisement par contacts multiples utilise inégalement les différentes fractions de solvant.

Au contraire, une efficacité entière est obtenue lorsqu'un courant continu de solvant rencontre en sens inverse de sa progression un courant du produit à extraire: c'est le principe de l'épuisement par contre-courant.

Le solvant se charge progressivement, le solide s'appauvrit méthodiquement. Aux deux extrémités du circuit sont recueillies

des liqueurs saturées, tandis que le produit traité sort entièrement épuisé.

Ce principe est réalisé, dans l'industrie, par l'association d'éléments discontinus, ou par circuits continus.

Le calcul du bilan s'applique indifféremment à ces deux types, les circuits continus pouvant être supposés découpés en tranches théoriques.

Soit une série d'extracteurs numérotés 1, 2, 3,, n:

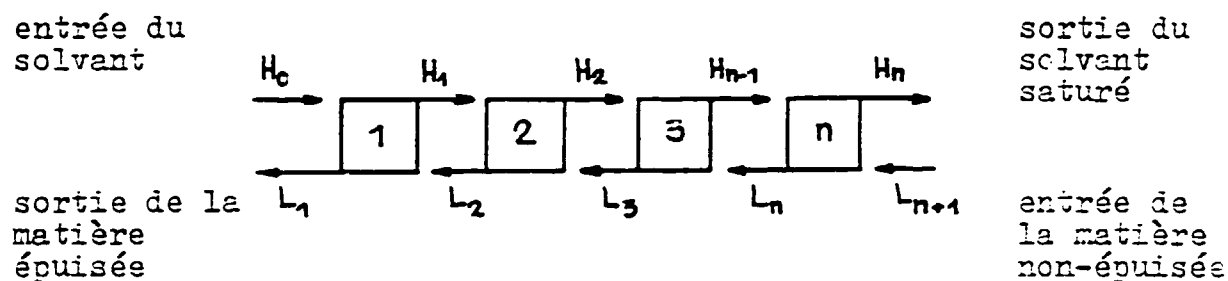


Fig. 1. Schéma de l'épuisement par contre-courant

Ils sont parcourus par un courant de solvant dirigé de gauche à droite, tandis que la plante en épuisement parcourt un trajet en sens inverse, de droite à gauche. Le solvant entre dans l'extracteur No.1 et sort, saturé, de l'extracteur de rang (n), après avoir travers  les (n) extracteurs.

Inversement, la plante non  puis e, entre dans l'extracteur de rang (n) et sort  puis e de l'extracteur 1.

Soient: $H_1, H_2, \dots H_n$ les volumes des solvants d'épuisement transmis d'élément en élément, et $L_n, \dots L_2, L_1$ les volumes de solvants, humectant les marcs, qui se déplacent en sens inverse.

Le rapport de solvant est supposé rester constant de stade en stade.

1. Plante humect e au départ

Le n-ième extracteur reçoit un volume H_{n-1} de solvant destiné à épuiser une quantité de matières préalablement humect es par un volume de solvant L_{n+1} . L'extraction, une fois termin e, un volume de colatures satur es, H_n , sort de l'élément,

tandis que le marc épuisé sort humecté par une quantité L_n de solvant.

Puisque la plante est humectée au départ, le volume total de solvant, à l'état initial, est évidemment égal au volume total de solvant à l'état final.

$$\text{Donc: } H_{n-1} + L_{n+1} = H_n + L_n \quad (15)$$

D'autre part, par suite de la définition du rapport de solvant:

$$\frac{H_n}{L_n} = \frac{H_{n-1}}{L_{n+1}} = a \quad (16)$$

D'où la relation générale:

$$L_{n+1} - L_n = H_n - H_{n-1} = a(L_n - L_{n-1}) \quad (17)$$

La résolution de ces équations permet de calculer le pourcentage d'extraction Q_n pour l'extracteur de rang (n), car ses variations sont proportionnelles, comme on l'a vu plus haut, à celles de L_n .

$$Q_n = 100 \cdot \frac{(a+a^2+a^3+\dots+a^n)}{1+a+a^2+\dots+a^n}$$

Exemple: dans une série de 4 extracteurs et pour un rapport de solvant égal à 3, le rendement de l'extraction est de 99,17%.

$$Q_n = 99,17$$

Le volume des colatures correspond à celui d'un épuisement par contact simple effectué avec un rendement de 75%.

Des extractions multiples, pour un rendement du même ordre (99,61%) auraient conduit à un volume des colatures quatre fois plus important.

2. Plante non humectée au départ

Dans ce cas, la chaîne fonctionne entièrement comme dans le cas précédent, sauf pour l'extracteur recevant la matière première qui a le rang (n).

Pour ce seul extracteur, étant donnée la nécessité d'humecter la matière sèche par un volume de solvant égal à celui qui sera retenu par le marc en fin d'épuisement, le rapport des solvants est:

$$a = \frac{H_n + L_n}{L_n}$$

d'où: $\frac{H_n}{L_n} = a - 1$ (18)

Pour les extracteurs de rang: n-1, ... 3,2,1, les rapports de solvants restent ce qu'ils étaient dans le premier cas, ils reçoivent tous des produits humectés.

$$\frac{H_{n-1}}{L_{n+1}} = a$$

On en déduit, d'après (16) :

$$L_{n+1} = a(L_n - L_{n-1})$$

La résolution de ces équations conduit aux conclusions:

- pourcentage de fraction extraite = $100 \left(1 - \frac{1}{a^n} \right)$
- pourcentage de fraction résiduelle = $\frac{100}{a^n}$

III. REALISATION PRATIQUE DE L'EXTRACTION

A. Matières premières et solvants

Une extraction industrielle doit réaliser les meilleures conditions de rendement: épuisement maximum pour une quantité minima de solvant, méthodicité, automaticité et étanchéité des circuits et appareillages, récupération, recyclage, dessiccation des résidus, etc.

Les matières premières sont en continu triées, desséchées s'il y a lieu, calibrées, divisées, humectées, épuisées, pressées, distillées pour récupération, desséchées.

La progression des solvants s'effectue par gravité, par aspiration, ou bien par pression d'air comprimé, l'appareillage électrique étant relié à une prise de terre pour éviter la formation de potentiels pouvant atteindre plusieurs centaines de volts et provoquer l'explosion des mélanges de vapeurs, de solvants et d'air.

Les traitements par solvants inflammables entraînent l'obligation d'opérer en locaux isolés pourvus de tubes d'aération et

de citernes capables d'absorber, le cas échéant, la totalité des liquides mis en oeuvre.

Les mélanges de solvants s'effectuent par brassage, passage à travers des dispositifs à chicanes ou tous autres, dans des enceintes hermétiquement closes.

L'appareillage doit être facilement chargeable et déchargeable, de préférence par dispositifs automatiques, être étanche, ne pas être attaqué par les colatures très souvent acides: c'est pourquoi, le plus souvent le bois, le cuivre étamé, les aciers inoxydables, émaillés ou vitrifiés sont choisis pour les épuisements en milieu neutre, légèrement acide ou alcalin.

Pour la récupération des solvants dans les marcs (plante épuisée avec le solvant remanent), on utilise généralement trois méthodes:

- . lavage: les solvants hydrosolubles (tels que l'éthanol) retenus dans les marcs sont entraînés par l'eau. L'ensemble est ensuite rectifié, avec une dépense importante d'énergie;

- . entraînement par de la vapeur: lorsque le solvant est entraînable par la vapeur d'eau le solvant est récupéré soit par décantation, soit par rectification;

- . distillation sous vide: pratiquée au sein même du récipient d'épuisement lorsque celui-ci peut résister au vide (extracteurs rotatifs, tambours à double paroi et à vis hélicoïdale axiale). Toutes ces opérations doivent être complétées par la récupération des vapeurs subsistant dans les tuyauteries de la même manière.

En pratique, ces conditions dépendent des facteurs suivants:

- . surface de contact de la matière première;
- . solvant d'extraction;
- . type d'appareillage.

1. Surface de contact de la matière première

En extraction il est souvent nécessaire de provoquer une rupture d'équilibre sur le plan mécanique comme sur celui de l'organisation interne de la cellule végétale par:

- . traitements mécaniques, et
- . traitements débloquentants.

(a) Traitements mécaniques

En général, les tissus végétaux sont broyés dans des moulins de différents types (Henry, Forplex, Perplex, etc.) et dans des cas spéciaux, dans des moulins colloïdaux ou par d'autres procédés comme: une suite de congélations et de dégels (pour la destruction des mitochondries); une succession de mises sous pression et de détentes en autoclave (graines oléagineuses, cascara, noix vomique); des ultra-sons de fréquence 960 kc/seconde (dépolymérisations des polysaccharides: dextrane, mucilages et pectines) ou à des fréquences moindres d'ordre de 20 à 30.000 vibrations/seconde. La division par section ou par écrasement est toujours préférable.

Les dispositifs utilisés sont variables et doivent être adaptés à la nature des matières traitées. Ils peuvent être:

- . des couteaux disposés radialement sur un disque assemblé perpendiculairement à son plan,
- . des meules ou moulins à surface active tronconique,
- . des associations de couples de cylindres calibrés, réalisant un écrasement progressif.

(b) Traitements débloquentants

Relativement à la préparation de la matière première par des traitements débloquentants, les combinaisons complexes sont détruites par l'élimination d'un ou de plusieurs de leurs éléments sous l'influence d'actions diverses:

- . solubilisations,
- . dénaturations et insolubilisations,
- . actions fermentatives,
- . désorganisations par dessiccation.

Les principes liposolubles peuvent être entraînés en milieu aqueux par des agents tensio-actifs (le principe de l'extraction par "isolation"), certaines protéines sont spontanément solubles au sein de l'eau, du glycérol, des solutions salines diverses.

L'action de dénaturation ou d'insolubilisation provoquée par les solvants ou par des agents divers, est un des facteurs les plus importants de l'extraction biologique. Elle entraîne des modifications des conditions de perméabilité et de solubili-

sation. En chimie végétale, les tannins, acides organiques, protides, aminoacides, chlorophylles, cires, sont éliminés par des défécations plombiques, cuivriques, calciques, barytiques avec l'oxyde respectif, de préférence hydraté.

Des actions fermentatives peuvent désagréger les complexes naturels par hydrolyse, protéolyse, autolyse ou autodigestion, et libérer leurs constituants. Par exemple: les aurines des tissus végétaux sont libérées par l'action de la trypsine, ou par un traitement par des ferments du type de la strophantobiase, qui permettent l'extraction et la cristallisation ultérieure de certaines génines toni-cardiaques.

La dessiccation d'un tissu végétal entraîne des actions de déblocage et de désorganisation cellulaire : la déshydratation entraîne la mort des cellules et l'adsorption du suc cellulaire par les membranes. Parallèlement, les actions fermentatives dissocient les complexes. L'ensemble devient perméable. Pour cette raison, les plantes desséchées permettent d'obtenir des rendements d'extraction plus élevés que les plantes fraîches dont elles proviennent.

Sur le plan théorique, les matières premières doivent être divisées aussi finement que possible. Mais cette circonstance s'accomode mal des nécessités industrielles. Le miscella doit s'écouler librement à travers la masse qui doit rester suffisamment poreuse, même après gonflement. Les filtrations ne doivent pas être ralenties par colmatage. En ce cas, les "fines" doivent être éliminées.

2. Solvant d'extraction

Un solvant d'extraction est choisi en fonction de:

- . la nature des principes à dissoudre,
- .. ses caractéristiques économiques (prix, taxes),
- . ses propriétés physiques: densité, viscosité, point d'ébullition, chaleur spécifique, inflammabilité, déterminant les conditions de l'épuisement: vitesse d'écoulement et de filtration, conditions de distillation et de concentration, pertes par volatilisation, prix de revient.

La solubilité est la tendance d'une molécule à s'échapper au sein d'un liquide pour former une solution, c'est-à-dire un

mélange continu à l'échelle et sous l'état moléculaire. Il y a solution:

- lorsque des forces polaires sont en jeu et que les particules dispersées sont de symétrie sphérique;
- lorsque des identités de formes moléculaires, des similitudes de dimensions confèrent aux substances et aux solvants la possibilité d'association entre les molécules dispersées et celles des solvants. Ces considérations jouent particulièrement en fonction de la polarité, de la structure moléculaire, de la constante diélectrique, de la pression interne et du jeu des liaisons d'hydrogène. Les molécules riches en groupements hydrophiles ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{CO}$, etc.) se dissolvent dans les solvants polaires. Les molécules riches en groupements hydrophobes ($-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, et par leurs homologues) se dissolvent dans les solvants non-polaires.

La solubilité d'un principe dont la structure comprend, en général, plusieurs de ces deux types de groupements, est déterminée par le rapport des uns aux autres, par la balance lipophile/hydrophile.

L'exemple de la série des acides gras est classique à cet égard: l'acide acétique est soluble dans l'eau; l'acide stéarique y est très peu soluble.

Les solvants organiques de polarité faible ou nulle dissolvent les principes dont la structure comporte surtout des chaînes ou groupements hydrophobes: lipides, stéroïdes, terpènes, huiles essentielles. Certains sont ininflammables: chloroforme, tétrachlorure de carbone, trichloréthylène, etc; la plupart sont inflammables: éther, benzène, éther de pétrole, hexane, ligroïne, kerosène, acétone, alcools éthylique, méthylique, etc.

Les solvants polaires, tels que l'acétone, l'eau, dissolvent les principes riches en groupements hydrophiles: sucres, acides et alcools de faibles poids moléculaires, nitrites, etc.

Certains solvants, par mélange avec des proportions variables d'eau, agissent comme des agents tantôt hydrophobes (éthanol absolu, éthanol à 95°), tantôt hydrophiles (éthanol à bas degré). Cette dualité se retrouve pour l'alcool méthylique, isopropylique, le cellosolve, etc.

Dans l'extraction solide-liquide, l'effet de solubilité simple est toujours troublé et modifié par des solubilisations, des entraînements, des actions de surface, dues à l'action de principes très divers et particulièrement à des principes hydrotropes et tensioactifs, dont les éléments hydrophiles et lipophiles s'orientent vers les interfaces en y créant des "ponts". Ainsi agissent les saponines, les lécithines, les acides-alcools, les stéroïdes, etc.

B. Outillages pour le broyage du tissu végétal

Les matières premières le plus souvent employées dans l'industrie pharmaceutique se présentent sous forme solide. Pour augmenter les surfaces de contact, pour rendre les corps plus aptes à réagir, il est nécessaire de diviser les cellules et les tissus. L'opération préalable à l'extraction est, de façon presque générale, le broyage.

On emploie, actuellement, dans l'industrie, trois procédés de broyage:

- . procédé par sectionnement;
- . procédé par percussion;
- . procédé mixte.

Dans le premier cas, la division des solides se fait par coupure et les broyeurs utilisés sont équipés de couteaux animés d'un mouvement de va-et-vient horizontal ou vertical, ou bien encore d'un mouvement circulaire. Ce procédé utilise le broyeur Henry.

Dans le cas de la percussion, l'effet brisant est réalisé par des coups brusques portés par des marteaux. La plupart des appareils industriels sont équipés de marteaux qui tournent à grande vitesse entre des couronnes dentées fixes. Ce principe utilise les broyeurs du type Forplex, Farplex, etc. Ces appareils réalisent, en même temps, le broyage et le tamisage, à l'aide de tamis calibrés ou de grilles qui ne laissent passer que les poudres d'une certaine granulométrie.

Dans le procédé mixte, qui opère à la fois par percussion et par sectionnement, on utilise de nombreux broyeurs du type

Condux, Gondard, etc.

L'industrie utilise des appareils assez divers, comme, par exemple, broyeurs à cylindres parallèles, concasseurs à mâchoires, broyeurs à galets centrifuges, etc.

Tout en étant une opération physique simple, pour laquelle existent des appareils appropriés, la façon dont la matière première est divisée peut avoir une importance considérable pour la suite des opérations. Il est évident que, dans le cas de l'extraction solide-liquide, il est intéressant d'augmenter la surface d'échanges. Pourtant parfois, les difficultés de broyage sont si grands (le cas de graines huileuses), que l'on préfère un traitement sans broyage, même si les rendements sont moins élevés. C'est-à-dire il faut choisir, après avoir fait un calcul économique dans lequel on met en balance les augmentations de rendement d'un côté et les difficultés techniques de l'autre.

Actuellement, pour certains extracteurs, la préparation primaire des matières premières est encore plus grande. Une fois les matières premières broyées, on les agglomère en plaquettes ou lamelles, traitement qui ouvre la voie à des percolations poussées. Ce procédé est très récent et, dans certains cas, donne des résultats excellents. Il y a aussi les traitements spéciaux comme, par exemple, la division par ultrasons, la fermentation, etc., qui ont comme but de faciliter également l'extraction.

Une fois la matière première préparée, l'opération qui suit est l'extraction solide-liquide.

C. Appareillage de l'extraction

A ce stade, il faut d'une part, faire le choix du solvant ou du mélange des solvants, d'autre part celui de l'appareil le plus adapté. Souvent, il est encore nécessaire, avant de passer à l'extraction proprement dite, de purifier les matières premières à l'aide d'un dégraissage, comme, par exemple, dans le cas de l'extraction des alcaloïdes de l'ergot de seigle.

On peut partager les appareils utilisés actuellement en deux grands groupes, selon leur fonctionnement.

1. Extracteurs en discontinu

(a) Épuisement par contact simple

Les appareils qui travaillent en discontinu, par charges, sont encore les plus utilisés, du fait que les quantités de matières premières traitées par l'industrie pharmaceutique sont relativement faibles. Parmi les extracteurs discontinus par contact simple on rencontre encore partout des percolateurs. Ce sont des cuves tronconiques, de capacité variable, que l'on remplit avec les plantes broyées: on ajoute, ensuite, le solvant d'extraction choisi qui passe au travers d'une couche épaisse de plantes. Durant son parcours, qui s'effectue à faible vitesse, le solvant s'enrichit progressivement. La première quantité de solvant passée, on ajoute du solvant frais et ainsi de suite, jusqu'à l'épuisement total de la plante. Le système a l'avantage d'être peu coûteux et très simple. Par contre, le temps d'une opération est long et le bilan faible.

Une autre méthode d'épuisement par contact simple est la macération. Dans ce cas, la plante est mise en contact avec la totalité du solvant, pour un temps déterminé, dans des appareils à agitation lente. L'agitation est effectuée soit par des arbres à cames soit par la rotation de l'ensemble. En fin d'opération, on filtre ou on presse pour séparer le solvant enrichi de la plante extraite.

(b) Épuisement par contacts multiples

L'appareil le plus utilisé, au laboratoire et en industrie, est l'appareil qui fonctionne d'après le principe Soxhlet, en différentes variantes. La plante est traversée en continu par un courant de solvant propre. Le solvant enrichi, arrive dans un récipient chauffé où il distille. Les vapeurs se condensent dans un réfrigérant et retombent sur la plante et ainsi de suite. D'après ce principe, pour des buts scientifiques et industriels, ont été construits des appareils de différentes dimensions allant de l'échelle "micro" jusqu'à l'échelle industrielle.

L'avantage de ce procédé est que les quantités de solvants utilisées sont beaucoup plus faibles, la récupération ayant lieu en continu. Par contre, les principes extraits sont constamment en contact avec la chaleur, ce qui est parfois très gênant pour

des produits fragiles. Cet inconvénient peut être partiellement corrigé en effectuant l'opération sous pression réduite. Néanmoins, l'économie de solvant obtenue est diminuée par la perte de calories nécessaires pour chauffer et refroidir.

Pour l'échelle "micro" (usage analytique), existent des appareils comme, par exemple, des types Blount, Haanen-Badum, Kuhlmann, Browning, Gorbach, etc. Pour les quantités moyennes de matières végétales on utilise les appareils des types Kuragawa, Metz, Rudermann, Grafe Schobel-Prausnitz, ou même l'évaporateur Jena adapté pour ce but. Pour l'usage industriel, existent les types Applezweig ou Greiner-Friedrichs.

(c) Épuisement par contre-courant

Selon ce principe, le solvant se charge progressivement tandis que le solide s'épuise. Une progression en sens inverse a lieu et, aux deux bouts du circuit, on recueille, d'une part, le solvant enrichi et, d'autre part, la plante épuisée.

Le principe d'extraction méthodique par contre-courant peut être réalisé ou bien par une série d'extracteurs simples en discontinu, ou bien par un seul extracteur en liaison avec des réservoirs contenant des extraits enrichis à différents degrés.

(d) Période de démarrage. Etablissement de l'équilibre

L'équilibre de l'épuisement d'une batterie n'est obtenu qu'au bout d'une durée relativement longue. L'étude en est complexe.

La figure No.2 (d'après Hawley) schématise le cas très simple d'une batterie de deux extracteurs fonctionnant "en balance": l'élément frais (n+1)^{ème} est toujours introduit en contre bas, reçoit les colatures de l'élément supérieur (n-^{ème}), qui est alimenté par le solvant frais.

Ce n'est qu'au bout de quatre opérations que la dernière concentration se stabilise à 85,7%, chiffre prévu pour $a=2$ et $n=2$. Ce rendement est très bas: c'est pourquoi, en pratique, des batteries de quatre éléments au minimum sont utilisées.

L'épuisement par contre-courant peut être effectué par l'association d'extracteurs individuels de deux manières:

. par gravité: par un courant de solvant circulant de haut en bas, et un courant de matière inversé de bas en haut ;

. sur un même plan horizontal: La progression du solvant est alors réalisée par pompage en longueur de la matière traversée.

L'extraction par contre-courant en discontinu est réalisée dans plusieurs types d'appareils. Le plus simple dispositif est un groupement de quelques percolateurs (extracteurs) (3-4 ou plusieurs unités), qui forment une batterie d'extraction. Celle-ci peut travailler à la pression normale, quand le passage de la colature se fait par des pompes de récirculation, ou à une pression élevée. Dans ce cas, pour la récirculation de la colature, le pompage n'est pas nécessaire. Par cette méthode, le temps de l'extraction est réduit approximativement par 6 fois.

L'extraction solide-liquide est un problème d'agitation et un problème de filtration. Pour améliorer les techniques existantes, qui présentent certains inconvénients, il faut trouver un appareil capable de réaliser un contact intime entre la plante et le solvant approprié, à chaud ou à froid, et effectuer ensuite la filtration intensive. Mais, le problème de trouver un tel appareil polyvalent capable de traiter des quantités moyennes de plante reste toujours posé. Une solution possible serait de combiner différents procédés d'extraction, la macération et la percolation accélérée, ainsi que la filtration. Pour l'industrie ont été conçus: l'appareil Tournaire, le filtre Philippe, la décanteuse en continu Guinard, le filtre Funda, etc.

Pour mettre en pratique les formules énoncées dans les chapitres II.B.1 et II.B.2, nous pouvons calculer l'enrichissement de la colature en principes actifs. Pour cela, il est utile de connaître, au préalable, les données suivantes:

- . la méthode analytique, quantitative, pour déterminer le principe actif,
- . le solvant approprié,
- . le poids volumétrique de la matière végétale,
- . le volume de solvant retenu par la matière végétale (le solvant d'humectation),
- . le temps nécessaire pour réaliser l'humectation,
- . le volume du solvant d'extraction,
- . le temps d'extraction,

- . le mode d'extraction (statique ou dynamique),
- . la température de l'extraction (facultative).

Après avoir établi ces paramètres, on réalise un essai technologique et on établit le schéma d'épuisement de la matière végétale. L'efficacité de l'extraction est évaluée en pour-cents du rendement calculé. On considère qu'un rendement de 90% du calcul théorique est tout à fait satisfaisant (Fig.3).

De la même façon on effectue le calcul théorique dans le cas d'une plante non-humectée. La différence consiste dans le volume de solvant que l'on ajoute au départ pour humecter préalablement la plante. Il va de soi aussi qu'au temps de l'extraction il faut ajouter le temps d'humectation de la matière végétale.

Parfois, quand le principe actif est sensible en présence d'agents physiques (lumière, oxygène, etc.), on peut utiliser une autre variante comme, par exemple, le collectage de l'extrait même du premier élément de la batterie. Dans ce cas, aussi, l'état d'équilibre se produit dans le neuvième élément pour une batterie de 3 + 1 unités (dans le douzième élément, pour 4 + 1 unités), mais l'établissement de l'équilibre se fait par la croissance de la concentration en principe actif de la colature et non par la décroissance comme dans la méthode classique.

2. Extracteurs avec action continue en contre-courant

Dès que les quantités de matières premières traitées dépassent un certain tonnage, les extracteurs en discontinu ne sont plus rentables, du fait que les opérations de chargement et de déchargement, ainsi que le nettoyage, entraînent des frais de main d'oeuvre trop élevés et les temps morts d'utilisation sont trop grands. Dans ce cas, il est obligatoire d'employer des appareils en continu, avec une progression constante et ininterrompue de la matière première qui rencontre en sens inverse les solvants d'extraction.

Ces appareils peuvent être horizontaux, verticaux, circulaires, hélicoïdaux, etc. Ils ont été conçus pour la fabrication des sucres, des huiles alimentaires, pour l'extraction du café ou des jus de fruits. Il est assez rare d'employer ce genre

d'appareil dans l'extraction des substances naturelles, du fait que aussi bien leur prix que leur encombrement sont très grands, alors que leur polyvalence est réduite et chaque appareil est employé à une extraction bien définie. Les appareils peuvent être en partie ou entièrement automatisés.

Un critère de classification des appareils peut être considéré du point de vue du circuit :

- (a) Circuit vertical: Bonotto, Tyca, Hildebrandt, Miro, Oliver, Bollmann;
- (b) Circuit horizontal: de Smet, Bamag, Kennedy, Fauth and Ford, Schlotterhose;
- (c) Circuit circulaire: Miag, Carrousel;
- (d) Circuit hélicoïdal: de Smet modifié.

Un autre critère de classification des appareils peut être considéré du point de vue de la manière d'action du solvant:

- (a') Percolation par pulvérisation: Bollmann, de Smet, Tyca, Bamag, etc.
- (b') Immersion totale: Hildebrandt, Miro, Carrousel, Bonotto, Olier, Miag, Kennedy, etc.

Les appareils d'extraction solide-liquide qui ont été décrits ont été choisis pour donner une idée générale des différentes possibilités qui existent. En réalité, la gamme des extracteurs est plus large et le choix de l'appareil le plus adapté représente un problème délicat. Du choix fait à cette étape dépend, dans une large mesure, la rentabilité globale du processus.

Les formules de calcul pour établir le rendement théorique sont celles indiquées dans les sections II.C.1 et II.C.2.

Pour mettre en marche un appareil d'extraction en continu il est nécessaire de connaître les paramètres de fonctionnement, de même que les caractéristiques de la matière première.

Dans les tableaux 1 à 3 (voir la page suivante) nous illustrons ces calculs pour un appareil de type Hildebrandt (voir Fig. 4).

Tableau 1

Paramètres de fonctionnement de l'appareil

Spécification	Symbole	Valeurs
Longueur de la zone d'extraction	L	5519 mm
Nombre de spires de la vis d'Archimède	Z	40
Diamètre de la zone d'extraction	d	312 mm
Pas de la vis d'Archimède	S	133 mm
Volume entre deux spires	V_s	10000 mm ³
Tour de la vis (limite)	n	0,3-2 rot/min.

Tableau 2

Formules de calcul pour les paramètres variables

Spécification	Symbole	Formule de calcul
Temps de rotation des spires	a_1	$\frac{60}{n}$ sec/rot.
Vitesse de rotation des spires	n	$\frac{G_u}{V_s \cdot \emptyset \cdot \frac{1}{V_i} \cdot 60}$ rot/min.
Facteur de remplissage	\emptyset	$\frac{V_u}{V_t}$ mc/mc
Productivité exprimée en plante sèche	G_u	$V_s \cdot \emptyset \cdot n \cdot \frac{1}{V_i} \cdot 60$ t/h
Débit de chargement/spire	D_s	$\frac{G_u}{n \cdot 60}$ t/rot.
Débit de chargement/solvant	D_e	l/min.

Tableau 3

Caractéristiques de la matière première (déterminées en laboratoire)

Spécification	Symbole	u/m
Volume de la matière végétale sèche/poids	V_u	mc/t
Volume de la matière végétale humectée/poids	V_i	mc/t
Volume occupé par la matière végétale humectée et le solvant pour le rapport de solvant = 1	V_t	mc/mc

(à suivre)

(Tableau 3, suite)

Volume du solvant libre / volume du solvant retenu	a	mc/mc
Temps de contact réel nécessaire pour faire l'extraction	T_r	minutes

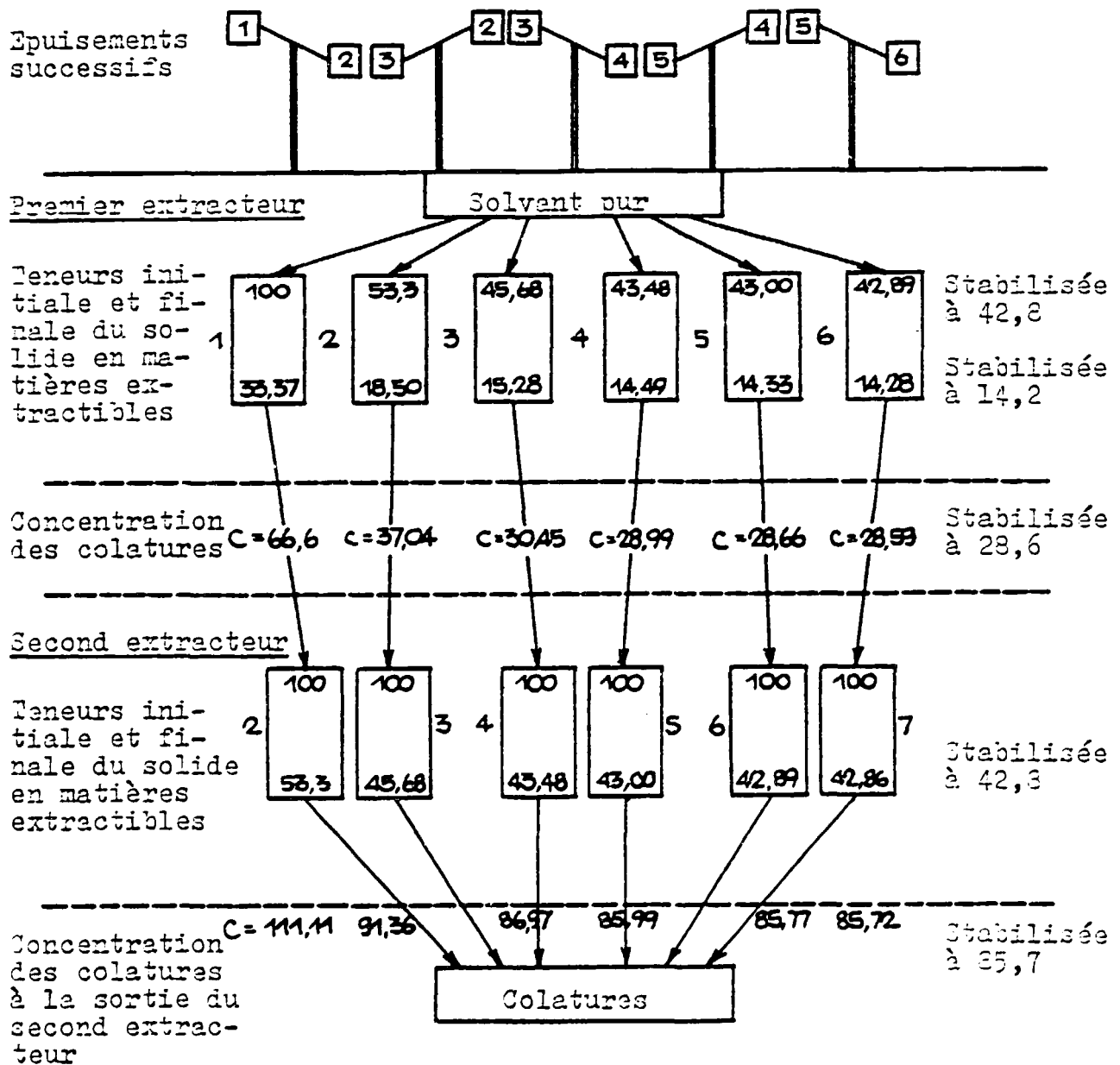
Par rapport à d'autres méthodes d'épuisement de la plante, l'extraction en continu présente deux grands avantages:

. L'extraction dans les différentes zones de l'appareil se réalise en même temps, de sorte que tous les phénomènes d'interaction entre la plante et le solvant (température, diffusion, pression, vitesse de déplacement, mélange, etc.) restent constants. Par conséquent, il y a des conditions extrêmement favorables pour atteindre l'équilibre d'extraction dans un temps beaucoup plus rapide que dans des conditions statiques avec des rendements qui s'approchent de ceux théoriques.

. La productivité beaucoup augmentée de ces appareils, leurs dimensions plus réduites que pour une batterie d'extraction en discontinu, ainsi que la possibilité d'avoir les opérations mécanisées ou même complètement automatisées.

La technique d'extraction en continu dispose d'un large domaine d'application dans l'industrie alimentaire (sucrière, huiles végétales, etc.) et dans l'industrie pharmaceutique pour valoriser des plantes médicinales.

Fig. 2. Démarrage d'un épuisement théorique (d'après Hawley), sur une série de deux extracteurs.
(Humectation préalable supposée parfaite; rapport de solvant = 2)



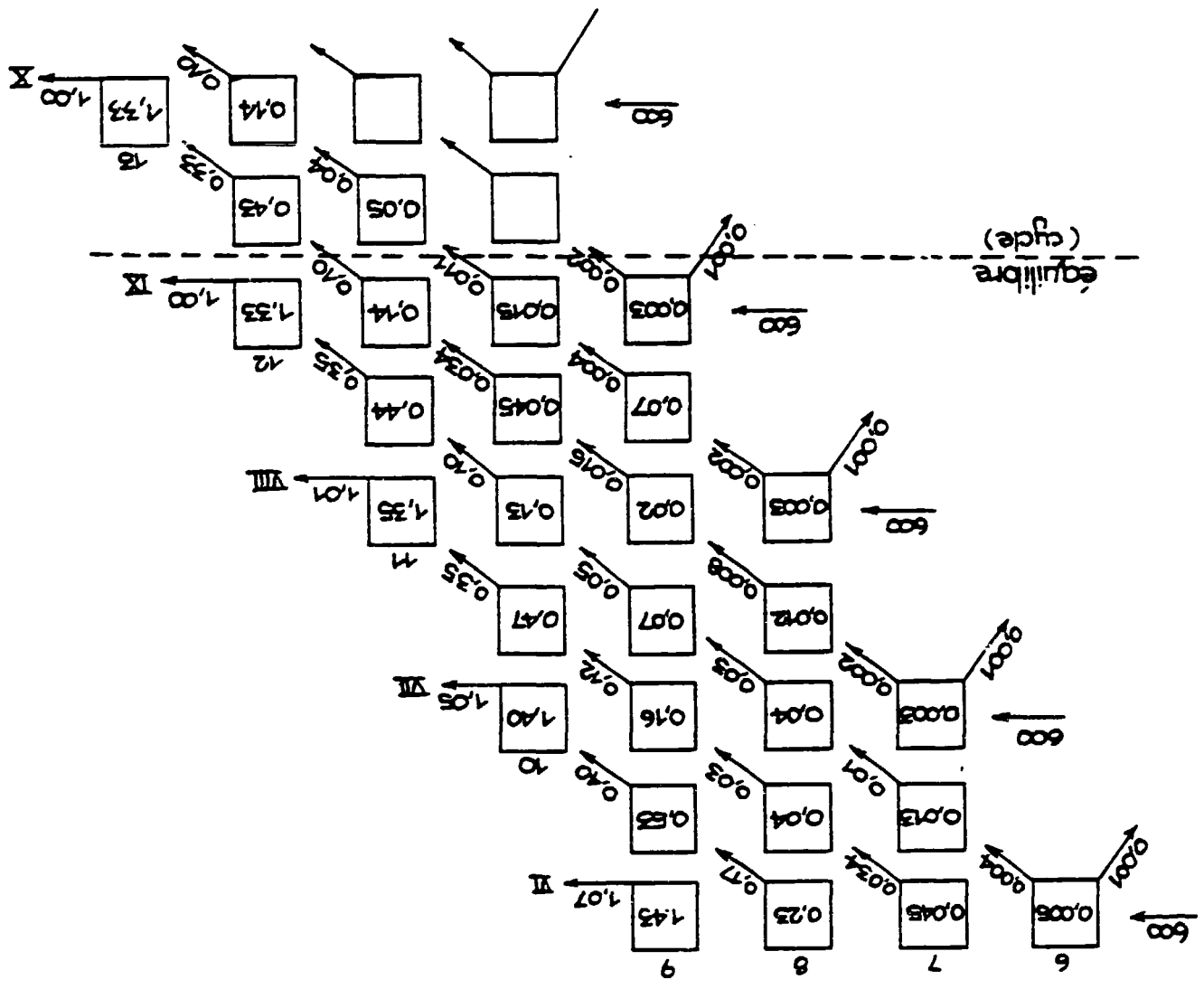
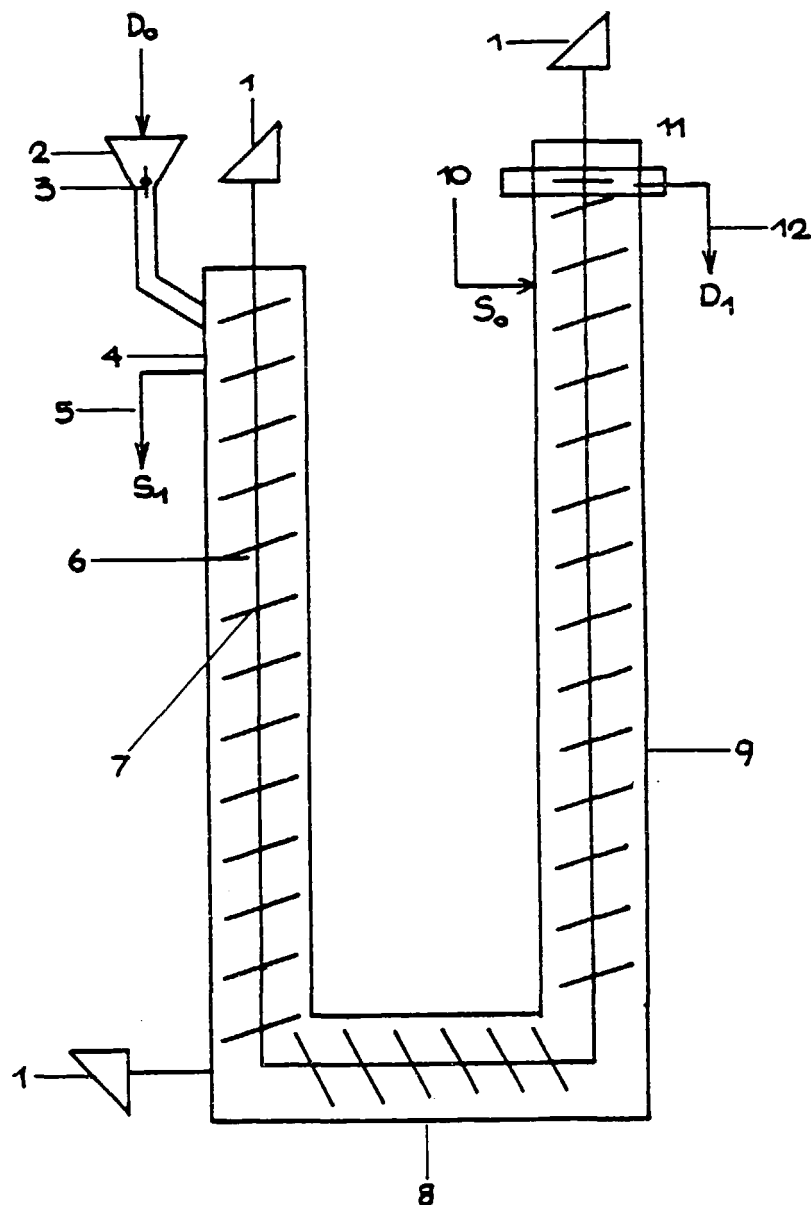


Fig.4. Appareil d'extraction Hildebrandt



$D_0 - D_1$ = Trajet de la matière première

$S_0 - S_1$ = Trajet du solvant

LEGENDE

- | | |
|---|---|
| 1.électromoteur | 7.spires de la vis d'Archimède |
| 2.silo pour chargement de la matière première | 8.colonne horizontale de l'appareil |
| 3.dispositif de dosage | 9.colonne d'extraction |
| 4.colonne de chargement de l'appareil | 10.orifice d'alimentation du solvant |
| 5.orifice d'évacuation de l'extrait | 11.dispositif d'évacuation de la matière végétale épuisée |
| 6.axe de la vis d'Archimède | 12.orifice d'évacuation de la matière végétale épuisée |

B I B L I O G R A P H I E

1. Armstrong R.T. (1942) - Ind. Eng. Chem., 34, 1228
2. Beckely et coll. (1948) - J. Am. Oil Chem. Soc., 25, 10
3. Breddin A. (1930) - Pharmaz. Ztg., 75, 336, 707
4. Botchorychvilli E.D., Abadjiai I.I. (1963) - Med. Prom. (URSS), (5), 40
5. Courtois M. (1953) - Bull. Soc. Chim. Biol., 35, 721
6. Drawert J. (1948) - Z. Naturforsch., 36, 111
7. Gontcharenko G.K. (1965) - Med. Prom. (URSS), (2), 38
8. Hickey D.F. (1966) - Brevet d'invention, Etats Unis, No. 3.243.264
9. Hildebrand F. (1949) - Chem. Rev. (USA), 44, 37
10. Lang Ch.L. (1965) - Brevet d'invention, France, No. 1.388.992
11. Moskowitz J. (1947) - Science, 105, 624
12. Pliachkewitch A.M., Zamyhliaeva M.D. (1964) - Med. Prom. (URSS), (2), 22
13. Ruth J.P. (1959) - Brevet d'invention, Etats Unis, No. 2.908.596
14. Schultz K., Klotz W. (1953) - Arz.mit.Forsch., 3, 471
15. Stoll A. (1952) - Fortschritte der Chemischen Forschung, 2, 538
16. Schlitter E., Furlenmeyer A. (1953) - Helv. Chim. Acta, 36, 2017
17. Vignerón M. (1954) - Fractionnements par solvants, Paris, Ed. Vigot Frères
18. Zabolotnaïa F.S. (1950) - Trudy VILAR (URSS), 10, 29

L'EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE

Vila Ștefan ⁺⁾

⁺⁾ Ingénieur chimiste, chercheur à l'Institut de Recherches
Chimiques et Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

I. INTRODUCTION

L'extraction est le processus de séparation des composants d'un mélange qui utilise la différence de solubilité de ceux-ci dans différents solvants. L'opération est appelée extraction liquide-liquide, ou raffinage par solvant sélectif, lorsque le mélange de départ est une solution de deux ou de plusieurs liquides.

Si l'on considère un mélange homogène de deux composants, A et B, mis en contact avec un solvant sélectif S, dans lequel A est très peu soluble et B très soluble, on constate après agitation et sédimentation la formation de deux couches distinctes:

1) le produit raffiné, contenant la presque totalité du composant A et de petites quantités de composant B et de solvant S; et

2) l'extrait, formé d'une petite quantité de composant A et de presque toute la quantité de composant B et de solvant S.

Après décantation des deux couches, on procède à la récupération du solvant (généralement par distillation) et l'on obtient une fraction riche en composant A et une autre riche en composant B.

Le processus comprend quatre étapes élémentaires: le mélange, la sédimentation, la décantation et la récupération du solvant, qui sont indiquées en figure 1.

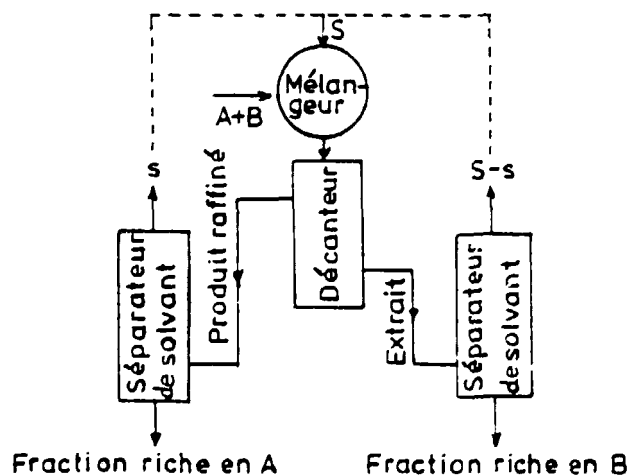


Fig. 1. Schéma de principe de l'extraction simple

Dans le domaine des plantes médicinales, l'extraction liquide-liquide est utilisée dans le but de séparer certaines classes de substances ou des substances pures des mélanges complexes se trouvant dans jus obtenu par pressurage ou dans les solutions résultant de l'extraction solide-liquide du matériau végétal.

II. FACTEURS INFLUANT SUR L'EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE

Le procédé d'extraction liquide-liquide est influencé par toute une série de facteurs dont nous rappelons les plus importants: A - le solvant; B - les procédés d'extraction; C - l'appareillage.

A. Le solvant

Il n'y a pas de règle pour le choix du solvant, mais il faut tenir compte de toute une série de facteurs physiques, chimiques, techniques et économiques, que nous présentons ci-après.

1. La constante de distribution (K) est le rapport entre les concentrations d'une substance donnée dans deux solvants non-miscibles. Les concentrations sont exprimées en grammes par litre, en moles par litre, en pour cent ou en fractions molaires.

Généralement on désigne les fractions molaires du produit raffiné par "x" et les fractions molaires de l'extrait par "y".

$$K_B = \frac{y_B}{x_B}$$

K_B - constante de distribution du composant B

x_B - fraction molaire du composant B dans le produit raffiné

y_B - fraction molaire du composant B dans l'extrait

La constante de distribution varie en fonction de la température et de la concentration; elle ne dépend pas de la concentration dans le cas des solutions diluées, des solvants non miscibles, lorsque la substance extraite ne se dissocie pas ni ne s'associe ou que des réactions chimiques n'ont pas lieu entre les composants du système.

2. La sélectivité est la capacité du solvant d'extraire de préférence l'un des composants de la solution et est exprimée par le rapport entre les constantes de distribution des composants A et B dans le produit raffiné et dans l'extrait.

$$\beta = \frac{K_B}{K_A}$$

β - sélectivité
 K_A - constante de distribution du composant A dans le produit raffiné
 K_B - constante de distribution du composant B dans l'extrait.

Un solvant est sélectif pour l'un des composants lorsque la concentration à l'équilibre de ce dernier est relativement plus grande dans l'extrait que dans le produit raffiné.

Le solvant est sélectif pour le composant A lorsque:

$$\frac{Y_A}{Y_B} > \frac{X_A}{X_B} \quad \text{ou} \quad \frac{Y_A}{X_A} > \frac{Y_B}{X_B} \quad \text{ou} \quad K_A > K_B$$

et il est sélectif pour le composant B lorsque:

$$\frac{Y_B}{Y_A} > \frac{X_B}{X_A} \quad \text{ou} \quad \frac{Y_B}{X_B} > \frac{Y_A}{X_A} \quad \text{ou} \quad K_B > K_A$$

La valeur de la sélectivité est indépendante de la façon d'exprimer les concentrations, à condition d'utiliser la même unité pour les deux composants, A et B.

Pour une bonne séparation il ne suffit pas que les valeurs des coefficients de distribution soient grandes, il faut encore que la sélectivité soit élevée. Plus la valeur de la sélectivité est grande par rapport à l'unité, plus le procédé est avantageux et demande moins d'étapes, un appareillage plus simple et moins de frais. Si la sélectivité $\beta = 1$, la séparation est impossible.

La sélectivité dépend de la structure chimique des composants du système, sa valeur étant d'autant plus faible que les structures chimiques de ceux-ci sont plus semblables l'une à l'autre. La sélectivité dépend des facteurs qui influent sur la valeur des constantes de distribution, à savoir la concentration et la température.

Lors du choix d'un solvant, il est nécessaire de déterminer la sélectivité des différents produits. La méthode la plus courante et la plus rapide pour évaluer et exprimer en termes quantitatifs la sélectivité d'un solvant consiste à faire un diagramme de la concentration du composant B dans l'extrait et dans le produit raffiné. L'on obtient une courbe dont l'éloignement par rapport à la diagonale de 45° donne la mesure de la sélectivité du solvant considéré dans les conditions d'extraction données.

3. La densité. Durant l'extraction, la différence entre les densités des phases doit être aussi grande que possible, afin de permettre une bonne séparation.

4. La tension interfaciale entre les phases non miscibles doit avoir une valeur qui permette une séparation des plus rapides. Une tension interfaciale trop grande empêche la dispersion des phases, alors qu'une tension trop faible favorise la formation d'émulsions stables, ce qui influe sur la capacité et l'efficacité de l'appareillage d'extraction.

5. Réactivité chimique. En principe, le solvant ne doit pas réagir chimiquement avec les composants à séparer.

6. La solubilité réciproque avec la matière première. Pour une bonne séparation, il est nécessaire que le solvant soit aussi miscible que possible avec la solution à extraire (la matière première). La récupération du solvant des systèmes fortement insolubles est plus facile à réaliser, et pour un coefficient de distribution donné la sélectivité est meilleure. La solubilité réciproque détermine dans une certaine mesure la quantité de solvant nécessaire à l'extraction.

7. Corrosion. Le solvant ne doit pas être corrosif afin de permettre l'utilisation d'appareils fabriqués avec des matériaux usuels, bon marché, ce qui réduit les frais d'investissement.

8. Viscosité. La viscosité du solvant doit être faible, pour une manipulation aisée.

9. Température de solidification. La température de solidification du solvant doit être suffisamment basse, pour ne pas créer de difficultés d'entreposage, de manipulation et pendant

l'extraction.

10. La pression de vapeur. La pression de vapeur doit être suffisamment basse, pour que l'entreposage et l'extraction puissent être effectuées à des basses pressions, voire à la pression atmosphérique.

11. Inflammabilité. Pour assurer la sécurité de l'entreposage et de l'opération d'extraction, le solvant doit avoir une inflammabilité réduite. Il est nécessaire d'avoir en vue les températures d'inflammation de tous les solvants employés.

12. Toxicité. Le solvant doit être dépourvu de toxicité ou au moins être aussi peu toxique que possible. Lorsque des solvants toxiques sont néanmoins utilisés, il faut prendre des mesures de sécurité adéquates .

13. Possibilités de récupération. Afin d'avoir des produits dépourvus de toute trace de solvant et pour pouvoir réutiliser le solvant en vue de diminuer le coût de l'opération, il convient de récupérer le solvant de l'extrait et du produit raffiné. La facilité de séparation est un critère technico-économique important lors du choix du solvant.

14. Coût et disponibilité. Lors du choix du solvant, il faut tenir compte dans une mesure importante de son coût et de sa disponibilité. On doit rajouter sans cesse du solvant afin de compenser les pertes inévitables durant l'opération. Le choix du solvant doit donc être fait en rapport avec les conditions économiques concrètes.

B. Procédés d'extraction

Selon la mise en contact des liquides, on distingue plusieurs procédés généraux d'extraction:

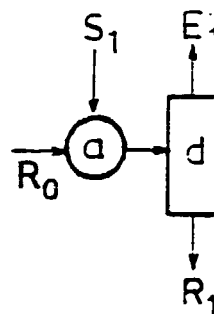
1. Extraction simple par contact unique;
2. Extraction simple par contacts multiples;
3. Extraction par contacts multiples à contre-courant;
4. Extraction à contre-courant avec reflux;
5. Extraction continue (différentielle) à contre-courant.

1. Extraction simple par contact unique

Le liquide de départ R_0 , formé des composants A et B,

est mis en contact avec le solvant S par agitation intense dans l'agitateur "a". On le laisse ensuite sédimenter dans le même appareil ou dans le décanteur "d", où les deux couches - le produit raffiné et l'extrait - se séparent selon leurs densités respectives (figure 2). Dans des installations annexes, le solvant du produit raffiné et de l'extrait est récupéré par distillation.

Figure 2. Extraction simple par contact unique; schéma de principe de l'opération



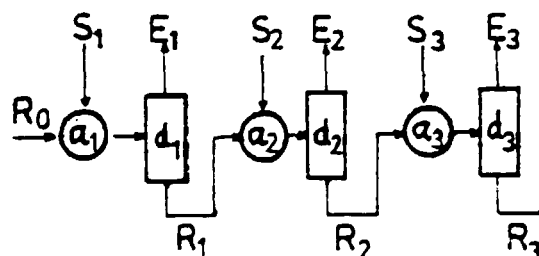
Le procédé est discontinu, mais il peut être appliqué en tant que procédé continu en régime stationnaire.

Avec une bonne agitation des liquides, l'efficacité de l'extraction se rapproche de celle d'une unité théorique, la séparation est relativement faible ou bien réclame des quantités importantes de solvant.

2. Extraction simple par contacts multiples

Une séparation plus poussée des composants du mélange de départ utilisant la même quantité de solvant que précédemment peut être obtenue en ajoutant le solvant à plusieurs reprises (figure 3).

Figure 3. Extraction simple par contacts multiples; schéma de principe de l'opération



Après chaque addition de solvant, les deux liquides sont agités, puis laissés sédimenter et décantés; au produit

raffiné restant on ajoute une nouvelle quantité de solvant. Chaque agitation, sédimentation et décantation correspond à une unité d'extraction. Les quantités de solvant ajoutées peuvent être égales ou non entre elles, la meilleure variante étant établie par des essais ou par calcul graphique.

Le procédé peut être effectué par charges (intermittent) ou en continu. Lorsque l'opération est effectuée par charges, une seule unité d'extraction utilisée successivement peut remplacer les "n" unités nécessaires.

3. Extraction par contacts multiples à contre-courant

Ce procédé qui applique le principe du contre-courant permet une utilisation plus rationnelle du solvant dont il réduit la consommation et améliore le rendement de séparation des composants.

Le mélange à séparer est introduit dans la première unité d'extraction et le solvant frais dans la dernière. Les produits raffinés passent successivement d'une unité à la suivante, tandis que les extraits font le trajet en sens inverse.

Cette circulation des liquides est donnée en figure 4a. En figure 4b, le même principe est illustré, chaque unité étant représentée cette fois par un rectangle.

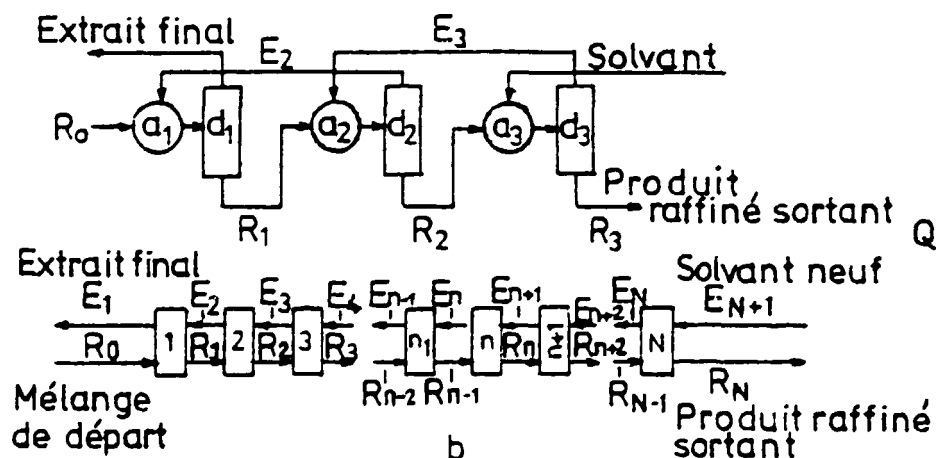


Fig. 4. Extraction par contacts multiples à contre-courant:

(a) schéma de la circulation des liquides; (b) schéma de principe d'une installation à N unités

4. Extraction à contre-courant avec reflux

Lorsque la sélectivité du solvant est faible, le nombre des unités d'extraction à contre-courant augmente et la pureté de l'extrait E_1 tend vers une limite qui ne pourrait être dépassée.

En utilisant le reflux, on diminue le nombre des unités d'extraction de façon à ce que l'on puisse travailler avec des solvants moins sélectifs pour le composant B ou même sélectifs pour le composant A, en obtenant finalement un extrait et un produit raffiné très purs.

L'opération peut être effectuée en plusieurs variantes:

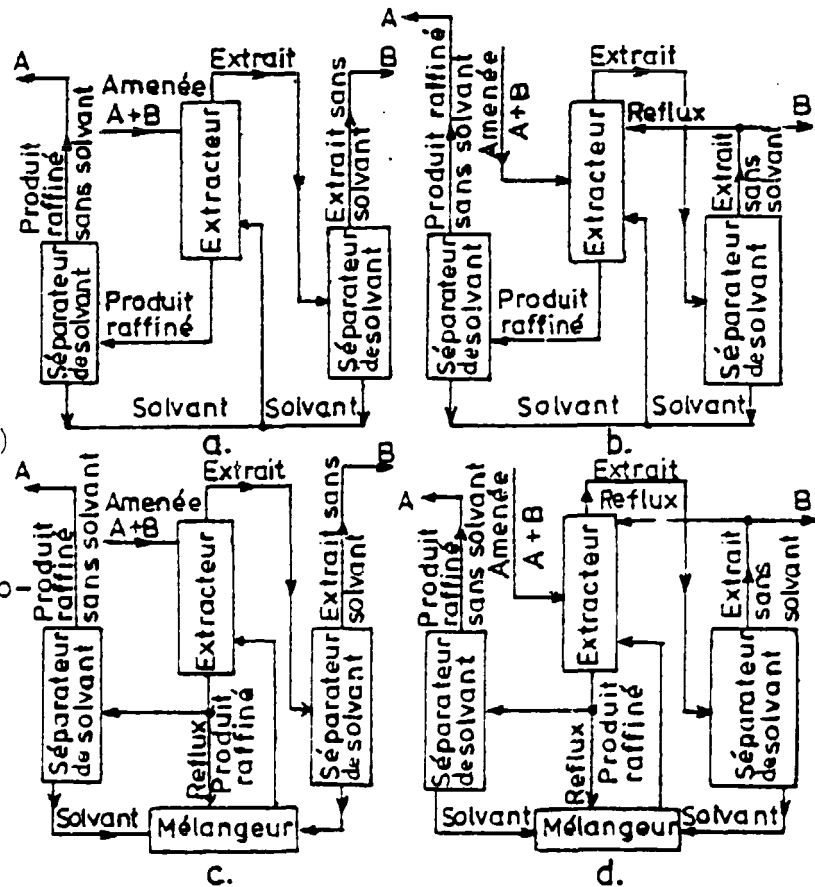
1. avec reflux de l'extrait;
2. avec reflux du produit raffiné;
3. avec reflux de l'extrait et du produit raffiné,

la variante avec reflux de l'extrait étant la plus utilisée.

En figure 5, on donne les schémas de ces variantes; elles peuvent être appliquées tant à des unités indépendantes qu'à des extracteurs continus différentiels.

Fig. 5. Extraction à contre-courant avec reflux:

- (a) sans reflux (témoin)
- (b) avec reflux de l'extrait
- (c) avec reflux du produit raffiné
- (d) avec reflux de l'extrait et du produit raffiné



Dans le procédé utilisant le reflux de l'extrait (figure 5b), une partie de l'extrait revient dans l'extracteur après la séparation du solvant. Il est rationnel que la séparation du solvant soit faite seulement jusqu'au point de saturation de l'extrait en solvant. Une teneur plus élevée en composant B permet d'obtenir un extrait plus pur que par le procédé sans reflux de l'extrait.

L'aménée dans l'extracteur est faite en un point intermédiaire, dans l'unité dont la composition est semblable à celle de la matière à introduire.

Dans le procédé à reflux du produit raffiné (figure 5c), une partie de ce dernier est ramenée dans l'extracteur, après avoir été mélangée au solvant.

Le rapport entre le produit raffiné réintroduit et le solvant doit correspondre au solvant saturé en composant A.

Dans ce cas, l'équilibre est établi à cette extrémité de l'extracteur pour un produit raffiné à teneur plus faible en composant B que lorsque l'opération est conduite sans reflux du produit raffiné.

L'aménée du mélange de départ se fait par l'extrémité opposée de l'extracteur.

Le procédé utilisant le reflux de l'extrait et du produit raffiné (figure 5d) offre les avantages combinés des deux procédés mentionnés. L'aménée du mélange de départ se fait en un point intermédiaire de la chaîne d'extraction, où la teneur en A et B correspond à la composition du matériau à introduire.

Le principal désavantage des procédés à reflux est la productivité plus faible de l'installation ou encore l'accroissement de la quantité de solvant, ce qui conduit à une plus grande consommation de chaleur pour la récupération du solvant.

5. Extraction différentielle à contre-courant

L'extraction différentielle à contre-courant utilise à la place des unités d'extraction indépendantes, une colonne avec ou sans remplissage, dans laquelle les deux phases liquides circulent à contre-courant de par la différence de leurs

densités.

L'on admet que dans les procédés utilisant des unités d'extraction indépendantes, l'équilibre thermodynamique entre les phases est atteint dans chacune d'entre elles. Dans une colonne d'extraction où les deux liquides circulent sans arrêt à contre-courant (régime stationnaire), l'équilibre des phases n'est atteint à aucun niveau de la colonne.

Le transfert du composant B depuis le produit raffiné vers l'extrait est déterminé justement par l'absence d'équilibre; la différence entre les concentrations des composants et la concentration d'équilibre constitue la force active déterminant le transfert du composant B.

6. Calcul de l'extraction

Le calcul des quantités de composants présentes dans l'extrait et dans le produit raffiné peut être effectué par des techniques analytiques ou graphiques.

(a) Calcul analytique

Notons: x_{0B} - la quantité de composant B présente dans le mélange de départ R_0 ;

x_{1B} - la quantité de composant B présente dans le produit raffiné après une extraction.

La quantité de composant B présente dans l'extrait sera donc égale à $x_{0B} - x_{1B}$.

La constante de distribution sera :

$$K_B = \frac{\frac{x_{0B} - x_{1B}}{S_1}}{\frac{x_{1B}}{R_0}} = \frac{x_{0B} - x_{1B}}{x_{1B}} \cdot \frac{R_0}{S_1}$$

$$K_B x_{1B} \cdot S_1 = R_0 x_{0B} - R_0 x_{1B}$$

$$K_B x_{0B} S_1 = R_0 x_{0B} - R_0 x_{1B} - K_B x_{1B} S_1 + K_B x_{0B} S_1$$

$$K_B x_{0B} S_1 = R_0 (x_{0B} - x_{1B}) + K_B S_1 (x_{0B} - x_{1B})$$

$$K_B x_{0B} S_1 = (x_{0B} - x_{1B}) (R_0 + K_B S_1)$$

$$x_{0B} - x_{1B} = x_{0B} \frac{K_B - S_1}{R_0 + K_B S_1} = \frac{x_{0B}}{1 + \frac{K_B \cdot S_1}{R_0}}$$

- quantité de composant B présente dans l'extrait après une extraction.

(1)
$$x_{1B} = x_{0B} \frac{R_0}{K_B S_1 + R_0} = x_{0B} \frac{1}{1 + \frac{K_B \cdot S_1}{R_0}}$$

- quantité de composant B présente dans le produit raffiné après une extraction.

Après la seconde extraction:

$$x_{2B} = \frac{x_{1B}}{1 + \frac{K_B S_2}{R_0}} = x_{0B} \frac{R_0}{R_0 + K_B S_1} \cdot \frac{R_0}{R_0 + K_B S_2}$$

Après "n" extractions:

$$x_n = x_{0B} \frac{R_0}{R_0 + K_B S_1} \cdot \frac{R_0}{R_0 + K_B S_2} \dots \frac{R_0}{R_0 + K_B S_n}$$

Lorsque l'on utilise des quantités de solvant égales

$$S_1 = S_2 = S_3 \dots = S_n = S$$

$$x_n = x_{0B} \frac{1}{\left(1 + \frac{K_B S}{R_0}\right)^n}$$

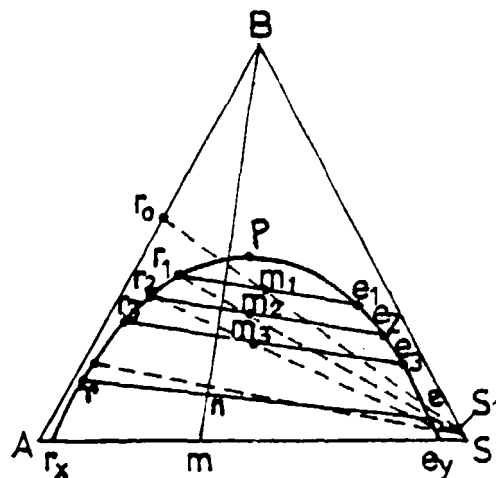
lorsque $n \rightarrow \infty$ $x_n = x_{0B} e^{-\frac{KBS}{R_0}}$
 $n \rightarrow \infty$

La quantité extraite maxima sera:

$$\emptyset = 1 - e^{-\frac{KS}{R_0}}$$

(b) Calcul graphique

Fig. 6. Représentation graphique de l'extraction



La représentation graphique la plus utilisée en extraction est celle qui fait appel au triangle de Gibbs (figure 6).

Le liquide B est miscible dans n'importe quelle proportion tant avec le liquide A, qu'avec S. Les liquides A et S ne sont que partiellement miscibles. Le liquide S n'est soluble dans A que jusqu'à une concentration correspondant au point r_x et qui représente la concentration de saturation du liquide S en A. Le liquide A est soluble dans S jusqu'à une concentration correspondant au point e_y et qui représente la concentration de saturation du liquide A en S.

Un mélange M de A et S représenté par le point "m" se séparera en deux couches dont la composition correspond aux concentrations de saturation représentées par r_x et e_y .

Si l'on ajoute au mélange binaire M le composant B, les points représentant le mélange ternaire résulté se trouveront sur la droite mB. Dans un mélange représenté par le point "n", il y aura deux couches dont la composition correspondra respectivement aux points r et e. L'accroissement de la teneur en composant B entraîne un déplacement du point n sur la droite mB et les points r et e donnent naissance chacun à une courbe se raccordant l'une à l'autre au point "p", appelé point critique. Les points r et e sont appelés points conjugués et la ligne re est appelée conodale ou ligne de raccordement. La courbe rpe est appelée courbe binodale.

Le point r_0 situé sur le côté AB correspond à la composition du mélange de départ R_0 . Le solvant est représenté au sommet de l'angle S du triangle s'il est pur et au point S_1 , à proximité du sommet, s'il est récupéré.

On établit la position du point m_1 sur la droite r_0S_1 , qui représente le mélange global. Sa position est calculée à l'aide de la relation:

$$\frac{\overline{r_0 m_1}}{\overline{S_1 m_1}} = \frac{S_1}{R_0}$$

$$\frac{\overline{r_0 m_1} + \overline{S_1 m_1}}{\overline{S_1 m_1}} = \frac{S_1 + R_0}{R_0} \quad \overline{S_1 m_1} = \overline{r_0 S_1} \frac{R_0}{R_0 + S_1}$$

$$\frac{\overline{r_0 m_1}}{\overline{r_0 m_1} + \overline{S_1 m_1}} = \frac{S_1}{R_0 + S_1} \Rightarrow \overline{r_0 m_1} = \overline{r_0 S_1} \frac{S_1}{R_0 + S_1}$$

Par interpolation, on trace entre les lignes de raccordement qui définissent le système, la ligne de raccordement passant par le point m_1 . Les intersections r_1 et e_1 de cette ligne de raccordement avec la courbe binodale représentent les compositions du produit raffiné et de l'extrait, respectivement.

Les quantités E_1 et R_1 de l'extrait et du produit raffiné sont déterminées à l'aide des relations:

$$R_0 + S_1 = R_1 + E_1$$

$$\frac{\overline{r_1 m_1}}{\overline{e_1 m_1}} = \frac{E_1}{R_1}$$

$$E_1 = (R_0 + S_1) \cdot \frac{\overline{r_1 m_1}}{\overline{r_1 e_1}}$$

$$R_1 = (R_0 + S_1) \cdot \frac{\overline{e_1 m_1}}{\overline{r_1 e_1}}$$

On unit r_1 à S_2 . Le point S_2 représente la composition du solvant ajouté dans la deuxième unité d'extraction. Généralement, $S_1 = S_2$. Sur la droite $r_1 S_2$, on établit la position du point m_2 , qui correspond au mélange M_2 formé du produit raffiné R_1 résulté de la première extraction et du solvant S_2 , à l'aide de la relation:

$$\frac{S_2}{R_1} = \frac{\overline{r_1 m_1}}{\overline{S_2 m_2}}$$

On trace par interpolation la ligne de raccordement qui passe par le point m_2 . Les intersections r_2 et e_2 de cette ligne de raccordement avec la courbe binodale représentent les compositions respectives du produit raffiné R_2 et de l'extrait E_2 .

On répète les opérations ci-dessus jusqu'à ce que le dernier des produits raffinés atteigne ou dépasse la composition requise pour le produit raffiné.

Le nombre des unités d'extraction nécessaires correspond à l'indice du dernier des produits raffinés.

La quantité totale de solvant utilisée est la somme $S_1 + S_2 + \dots + S_n$ des quantités de solvant employées dans chacune des unités d'extraction.

C. Appareillage d'extraction

La technique de l'extraction à l'échelon du laboratoire ou de l'industrie utilise de nombreux types d'extracteurs que l'on pourrait classer de la façon la plus rationnelle en:

- (1) extracteurs à unités d'extraction indépendantes;
- (2) extracteurs continus à contre-courant.

1. Extracteurs à unités d'extraction indépendantes

Les extracteurs de cette catégorie fonctionnent par charges (fonctionnement discontinu, intermittent) ou en continu.

Chaque unité d'extraction est formée de deux appareils: le mélangeur et le décanteur.

Dans les installations à fonctionnement discontinu, le mélangeur et le décanteur sont des appareils d'usage courant.

Les mélangeurs recommandés sont les agitateurs à hélice ou à turbine.

Dans les installations à fonctionnement continu, les mélangeurs et les décanteurs usuels de grande capacité ne conviennent pas, surtout lorsque l'installation doit correspondre à un grand nombre d'unités d'extraction.

Pour ces installations on préfère des dispositifs de mélange de capacité plus réduite, à chicanes avec ou sans trous, à ajustages montés dans les conduites ou les colonnes, à injecteurs mis en fonction par l'un des liquides.

Les décanteurs sont constitués par les espaces entre les dispositifs de mélange ou par des récipients pourvus de dispositifs permettant la décantation continue de l'extrait et du produit raffiné (siphons, appareils automatiques à niveau constant).

Les unités d'extraction formées de mélangeurs à agitateur et de décanteurs ont une efficacité élevée - de 75 à 100% - à condition que la durée de l'agitation et de la sédimentation

soit suffisante.

2. Extracteurs continus à contre-courant

Ces extracteurs répondent aux tendances actuelles de l'industrie chimique, car ce sont des dispositifs à efficacité et à productivité élevées. Les deux phases passent en contre-courant par l'extracteur, à une vitesse relative déterminée par la différence de densité. L'une des phases est continue, l'autre est dispersée et forme des gouttes à l'intérieur de la phase continue ou encore une pellicule liquide sur la surface intérieure de l'extracteur.

Ces appareils ont en général un caractère mixte et opèrent comme extracteurs différentiels (sans séparation intermédiaire des phases) tout autant que comme extracteurs à unités indépendantes (avec séparation intermédiaire des phases).

Les extracteurs continus à contre-courant appartiennent à trois types principaux:

- (a) Colonnes statiques: (a') à pulvérisation de la phase dispersée;
(a'') à chicanes ou plateaux;
(a''') à replissage
- (b) Colonnes à éléments rotatifs;
- (c) Colonnes à pulsations.

(a) Colonnes statiques

(a') Colonnes à pulvérisation de la phase dispersée

Dans ces appareils le contact entre les phases est réalisé à la surface des gouttes résultant de la pulvérisation de l'un des deux liquides (phase dispersée), à l'aide de buses de pulvérisation, dans la masse de l'autre (phase continue). La colonne est pourvue à ses deux extrémités de zones de décantation. Le niveau de la surface de séparation entre les deux liquides est maintenu par siphonage ou par des dispositifs de niveau constant.

Le processus d'extraction se fait en trois étapes: (1) au moment de la formation des gouttes; (2) durant le passage par la colonne; (3) durant la décantation. La seconde étape est la plus importante.

L'efficacité de ces colonnes baisse à cause de l'apparition de circuits intérieurs de liquide et de la coalescence des gouttes en grandes gouttes à surface spécifique réduite et à vitesse plus grande de passage par la colonne. Les gouttes maintiennent leur individualité si l'on évite les réductions de section du courant de la phase continue. Pour la pulvérisation de la phase dispersée il est recommandable d'utiliser des tubes de 2,5 mm de diamètre.

L'efficacité de ce type de colonne, représentée en figure 7, est petite.



Fig. 7. Extracteur à pulvérisation de la phase dispersée

(a") Colonnes à chicanes ou à plateaux

Ces colonnes sont formées d'un cylindre vertical, à chicanes transversales, montées à des distances variables, allant de 100 à 150 mm, comme il est montré en figure 8.

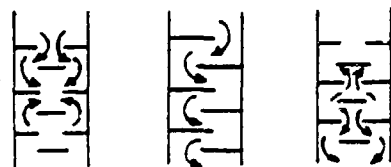


Fig. 8. Colonne d'extraction à chicanes

Pour une paire de chicanes l'efficacité n'est que de 5 à 10% de celle d'une unité théorique, mais de par la faible distance qui sépare les chicanes, une colonne haute correspond à plusieurs unités théoriques d'extraction.

Les extracteurs à plateaux ressemblent aux colonnes de rectification à plateaux perforés (figure 9). Certains sont pourvus de déverseurs par lesquels la phase continue circule en sens descendant ou ascendant, en fonction de son poids relatif. L'efficacité d'un plateau varie dans de très larges limites, allant de 2 à 30% de celle d'une unité théorique.

Les petites valeurs (de 5 à 10%) correspondent aux systèmes à grande tension superficielle entre les phases.

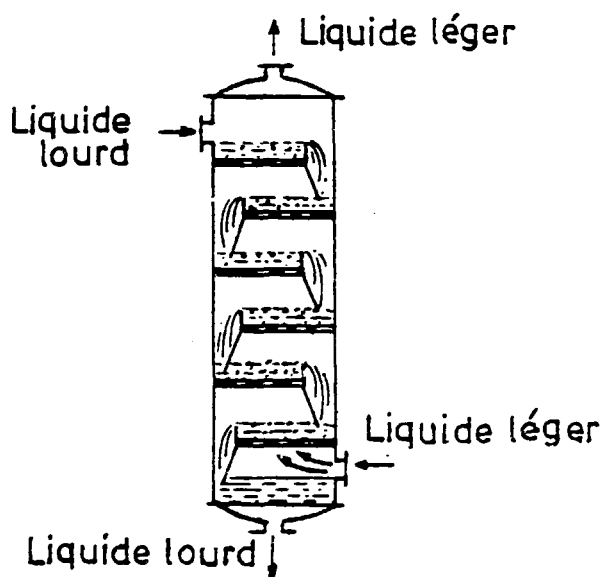


Fig. 9. Colonne d'extraction à plateaux perforés

(a'') Colonne à remplissage

Ces colonnes utilisent comme remplissage des anneaux Pall ou des anneaux Raschig. Dans le cas de ces colonnes on doit tenir compte du fait que la phase dispersée ne doit pas humidifier le remplissage.

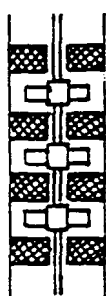
(b) Colonnes à éléments rotatifs

Ces extracteurs réunissent en un seul appareil compact l'installation classique d'extraction à mélangeurs et décan-teurs indépendants. Ils sont connus sous le nom d'extracteurs mixer-settler.

Les colonnes Scheibel (figure 10a) sont les plus utilisées. Elles sont formées d'un cylindre dans l'axe duquel tourne un arbre à palettes montées à égale distance l'une de l'autre; entre les palettes se trouve une couche de remplissage ou de la

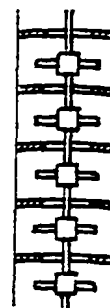
toile métallique. Il en résulte des zones alternatives de forte agitation et de calme, où la phase dispersée se sépare par coalescence des gouttes.

La colonne Reman représentée en figure 10b ressemble à la précédente à la différence près que le rotor est pourvu de disques plats qui alternent avec des disques annulaires fixés sur la paroi de la colonne.



(a)

Fig. 10.
Colonnes d'extraction
à éléments rotatifs



(b)

L'extracteur centrifuge Podbielniak fait partie de cette même catégorie. L'espace d'extraction est une spirale de section rectangulaire montée sur un arbre tournant à la vitesse de 3000-5000 tours/minute. Les phases de départ et finales entrent et sortent par l'arbre à tubes concentriques.

Le liquide léger est dirigé par les tubes vers l'extérieur de l'extracteur et le liquide lourd vers le centre; la force centrifuge détermine la circulation à contre-courant.

Les caractéristiques de cet appareil sont: la faible durée de contact, la retenue de liquide peu importante, sa capacité de traiter des émulsions, son faible encombrement.

A cause du coût élevé de l'investissement et de l'exploitation, l'extracteur centrifuge est utilisé surtout pour l'extraction de produits chers.

(c) Colonnes à pulsations

Ce sont des colonnes à remplissage ou à plateaux à l'inté-

rieur desquelles des pulsations dans les deux sens sont imprimées au liquide s'y trouvant par mouvement alternatif d'une pompe à piston mais sans soupapes (de 60 à 90 mouvements par minute).

Dans les colonnes sans pulsations, une partie de la phase légère demeure stationnaire sous la surface des plateaux ou du remplissage, tandis que la phase lourde se dépose au-dessus. Par la pulsation positive (introduction brusque de liquide dans la colonne), les parties stationnaires de la phase légère sont obligées de passer par les ouvertures voisines des plateaux ou du remplissage.

La pulsation négative (élimination de liquide de la colonne) agit de la même manière sur la phase lourde qu'elle oblige à traverser le plateau ou le remplissage en se dirigeant vers le bas. La succession rapide des pulsations dans les deux sens a pour effet la mise en mouvement de toute la masse de liquide et la transformation en gouttes de la totalité de la phase dispersée, ce qui augmente l'efficacité de la colonne.

Dans les colonnes à pulsations, l'efficacité augmente de 3 à 15 fois par rapport à l'extraction dans les mêmes conditions mais dans une colonne sans pulsations. Les pulsations sont contre-indiquées dans le cas des émulsions stables, car non efficaces ou dangereuses.

Le procédé d'extraction liquide-liquide est applicable dans un très grand nombre de domaines. La transposition des résultats obtenus au laboratoire à l'échelon des stations-pilotes ou de l'industrie réclame des investigations très sérieuses, destinées à mettre d'accord le grand nombre de variables pour que les résultats soient les meilleurs.

B I B L I O G R A P H I E

1. Bratu, Emil - Operații și utilaje în industria chimică, vol. II, Editura Tehnică, București 1970.
2. Soare S. et collab. - Extracția lichid-lichid, Editura Tehnică, București, 1963.
3. Weissberger, Arnold - Techniques of Chemistry. Vol. XII, New York 1978.
4. Vigneron M. - Fractionnements par solvants, Paris 1954.

PART VII

UTILISATION DE LA CHROMATOGRAPHIE
SUR COLONNE POUR ISOLER LES SUBSTANCES ACTIVES
DES PLANTES MEDICINALES

Valentina Cristea ⁺⁾

⁺⁾ Pharmacienne, chercheur à l'Institut de Recherches
Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

I. INTRODUCTION (1,2)

La méthode chromatographique a été introduite, pour la première fois, dans les recherches chimiques, par le botaniste russe Tsvet, en 1903, qui a séparé les colorants se trouvant dans la chlorophylle.

La chromatographie s'est rapidement développée, grâce aux travaux de Lederer, Eiselius et Claesson, et surtout de Martin et Synge, qui ont expliqué et mis au point la méthode chromatographique liquide-liquide. Martin et James ont établi, en 1952, les conditions pour la chromatographie de partage gaz-liquide, dans laquelle la phase mobile est un gaz (l'azote), transformant ainsi la chromatographie dans l'une des plus répandues et efficaces méthodes d'analyse physico-chimique et de séparation des principes actifs.

La chromatographie (graphie en couleurs) sur colonne est définie comme une méthode fondée sur la séparation des constituants d'un mélange de substances grâce à leur migration, à vitesses différentes, dans une colonne à remplissage convenable. Les constituants de l'échantillon sont retenus sélectivement sur la colonne à chromatographie par l'effet de leur distribution différente dans deux phases, la phase fixe (stationnaire) et la phase mobile, effet qui a pour résultat la séparation des constituants en zones ou bandes distinctes.

La chromatographie sur colonne est caractérisée par:

(a) sa spécificité, qui permet de séparer des constituants à structure chimique proche, ne pouvant être isolés par les méthodes conventionnelles (distillation fractionnée, extraction ou cristallisation fractionnée);

et

(b) son universalité, car elle s'applique à une gamme large de produits, à partir des gaz jusqu'aux produits naturels.

Pour rendre plus claire la chromatographie sur colonne, il est nécessaire de préciser certaines notions fondamentales utilisées couramment en pratique chromatographique.

1. Le phénomène d'adsorption, qui est à la base de la chromatographie, représente la concentration d'une substance à l'interface des deux phases. On rencontre couramment l'adsorption à l'interface solide-liquide (chromatographie sur colonne) ou solide-gaz (chromatographie en phase gazeuse). L'adsorption apparaît comme le résultat des forces qui s'exercent à l'interface des particules. La nature de ces forces est très différente, variant entre les forces physiques faibles de Van der Waals et les forces très puissantes qui, par leur intensité, se rapprochent de la liaison chimique.

Langmuir a étudié et jeté les fondements de la théorie de l'adsorption pour les solides. Il a montré qu'à la surface des solides, les forces d'adsorption ne sont pas équilibrées, en donnant ainsi la possibilité de fixer les molécules environnantes. Les particules sont disposées d'une façon non-uniforme à la surface de l'adsorbant, permettant une très forte adsorption, ce qui peut parfois présenter le désavantage d'une désorption difficile. L'adsorption est influencée positivement par l'homogénéité de la surface adsorbante. La présence des impuretés peut influencer ou même changer la qualité de l'adsorption. On a également observé qu'une trop grande porosité de la surface adsorbante conduit à l'augmentation du phénomène d'adsorption.

2. La phase fixe (stationnaire) est le matériau à travers lequel circule l'échantillon et qui, par son action spécifique sur tous les constituants du mélange, permet leur séparation.

3. La phase mobile (éluant) est le fluide qui circule à travers la phase stationnaire, en véhiculant les constituants du mélange fixés sur elle.

4. Le temps de rétention (T_r) ou le volume de rétention (V_r) est le temps et le volume, respectivement, d'éluant qui parcourt la colonne à partir du moment où l'on introduit l'échantillon jusqu'à l'obtention de la première séparation des constituants.

En passant un mélange de substances de concentration C à travers un adsorbant, une quantité de substances est retenue $q = f(C)$. En éluant l'adsorbant avec un solvant, le volume de rétention sera $V_r = \frac{f(C)}{C}$.

En chromatographie sur couche mince ou sur papier, cette valeur porte le nom de facteur de retard ou R_f et représente le rapport entre la distance à laquelle apparaît la zone caractéristique d'un certain composant et la distance du front de solvant pur.

La séparation des substances par élution de la colonne s'appelle développement chromatographique.

La détermination de la position des constituants séparés sur le chromatogramme développé porte le nom de détection chromatographique.

La séparation chromatographique se caractérise par le couple phase stationnaire/phase mobile, ce qui détermine également la classification de la chromatographie.

Phase stationnaire	Phase mobile	Méthode chromatographique	Notation
solide	gaz	Chromatographie d'adsorption gaz-solide	CGS
	liquide	Chromatographie d'adsorption liquide-solide	CLS
liquide	gaz	Chromatographie de partage gaz-liquide	CGL
	liquide	Chromatographie de partage liquide-liquide	CLL

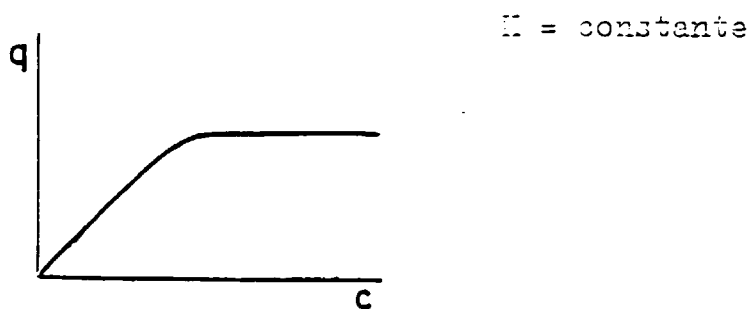
La représentation graphique de la distribution des constituants d'un mélange entre deux phases s'appelle isotherme de distribution de l'adsorption. L'un des critères de classification de la chromatographie suit la forme des isothermes de distribution. Le tracé des isothermes d'adsorption s'effectue dans des conditions de température constante, en déterminant la concentration de la solution avant qu'elle ne vienne en contact avec l'adsorbant et après avoir établi l'équilibre. Sur l'ordonnée du graphique on inscrit la quantité de substance adsorbée, et sur l'abscisse - la concentration de la solution jusqu'à l'établissement de l'équilibre. Les isothermes d'adsorption peuvent être linéaires et non-linéaires.

Les isothermes linéaires sont spécifiques pour les solutions diluées; dans ce cas, la quantité de substance adsorbée q/l g d'adsorbant est proportionnelle à la concentration C .

$$q = KC$$

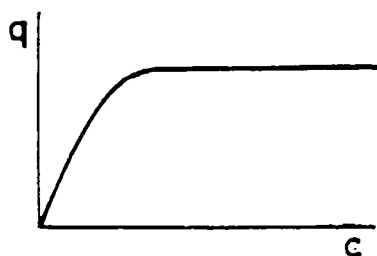
K = constante dépendant de la nature de l'adsorbant, du solvant et de la substance dissoute.

En pratique, la quantité de substance adsorbée/unité d'adsorbant tend vers une valeur constante, car à une certaine concentration, la surface de l'adsorbant est pratiquement saturée. Dans ce cas, la représentation graphique des isothermes a la forme des isothermes de Freundlich donnée par la fonction $q = KC^{1/n}$



ou des isothermes de Langmuir donnée par la fonction

$$q = \frac{K_1 C}{1 + K_2 C} \quad , \quad K_1, K_2 = \text{constantes}$$



Parmi les méthodes de chromatographie sur colonne les plus utilisées à séparer les composants citons :

- la chromatographie d'adsorption sur colonne
- la chromatographie de partage sur colonne

II. CHROMATOGRAFIE D'ADSORPTION SUR COLONNE (2)

Comme son nom l'indique, le phénomène responsable de

La séparation des constituants d'un mélange est l'adsorbabilité qui s'explique par l'établissement successif et répété de l'équilibre entre l'adsorbant solide, immobile, et la solution du mélange à séparer, en mouvement.

Le siège de ces processus de distribution est la colonne à chromatographie, c'est-à-dire un tube de verre, de métal ou de matière plastique, ou l'on introduit l'adsorbant. Les colonnes doivent être confectionnées de manière à pouvoir être remplies et vidées facilement. La partie inférieure de la colonne est munie d'une plaque de porcelaine poreuse nécessaire à soutenir l'adsorbant. Cette plaque doit être étanche aux parois de la colonne, pour empêcher l'adsorbant de s'écouler pendant le processus d'élu-tion de la colonne. La colonne à chromatographie est munie d'un robinet qui permet l'interruption temporaire de l'élu-tion. Avec cet appareillage on peut travailler à une pression normale ou élevée .

Lorsqu'on choisit les colonnes à chromatographie, il faut tenir compte, d'abord, de la quantité d'adsorbant nécessaire; le choix devra respecter le rapport entre le diamètre (\varnothing) et la hauteur (H) de la colonne. Le tableau ci-dessous indique ce rapport.

\varnothing : cm	0,5	1	1,5	2,5	3	4	6	8	10
H: cm	10	15	30	45	60	75	90	120	150

Dans certains cas, on peut travailler avec des colonnes très courtes et larges et si l'adsorbant a une granulation très fine, l'élu-tion de la colonne découlera à petite vitesse. Plus la colonne est large, plus les zones d'adsorption sont étroites et, en même temps, la possibilité d'un partage irrégulier augmente. La colonne à chromatographie doit être plus longue que la hauteur de la charge d'adsorbant, de sorte qu'il reste un espace suffisant pour la solution d'éluant nécessaire pour le développement de la colonne. Quand on utilise des adsorbants trop fins, l'augmentation de la vitesse d'élu-tion peut être obtenue en adaptant l'installation à un régime de travail sous pression.

Les adsorbants utilisés pour la chromatographie sur colonne doivent remplir deux conditions :

- (a) avoir une adsorbabilité augmentée et
- (b) assurer la séparation chromatographique

Le choix du type d'adsorbant se fera par analogie avec les données de littérature ou par des tâtonnements, en utilisant divers types d'adsorbants plus ou moins actifs. En dehors de la détermination du type d'adsorbant, il faut aussi établir la quantité, qui sera fonction des isothermes d'adsorption des divers constituants, si elles sont connues. Dans la plupart des cas, nous n'avons pas d'informations sur la composition du mélange à séparer, et des tâtonnements préliminaires sont nécessaires. On a observé, en général, que pour séparer des mélanges formés de constituants à adsorbabilité très différente, une quantité d'adsorbant 10 fois plus grande que la quantité de substance soumise à la séparation suffit. Pour les colonnes qui utilisent des adsorbants très fins, on ajoute une substance inerte qui réduit la résistance à l'écoulement de l'éluant; on emploie, par exemple, des terres spéciales comme la terre à diatomées ou d'autres substances qui ne possèdent pas de propriétés adsorbantes : sable, verre en poudre.

Une autre caractéristique des adsorbants est leur sélectivité. Il y a des adsorbants qui fixent fortement tous les constituants d'un mélange, ce qui rend impossible une différence d'adsorbabilité entre les constituants; lorsque les adsorbants sont trop peu actifs, les constituants du mélange passent à travers l'adsorbant sans qu'une séparation ait lieu. Les adsorbants doivent également être inertes, ne pas entrer en réaction avec aucun des constituants du mélange soumis à la chromatographie et n'exercer aucune action catalytique.

Suivant leurs propriétés, les adsorbants peuvent être classifiés en deux groupes :

- (a) adsorbants polaires (hydrophiles)
- (b) adsorbants non-polaires (hydrophobes)

Les adsorbants polaires sont caractérisés par une grande affinité pour l'eau; ils sont d'habitude des oxydes, hydroxydes, sulfates ou des carbonates.

Les adsorbants non-polaires fixent fortement les substances non polaires; plusieurs sortes de charbon activé appartiennent à cette catégorie.

Les adsorbants peuvent être normalisés suivant l'activité d'adsorption qui peut être contrôlée à l'aide de colorants azoïques. Brokmann a été le premier à utiliser cette méthode.

Nous présentons, ci-après, quelques types d'adsorbants utilisés dans la chromatographie sur colonne.

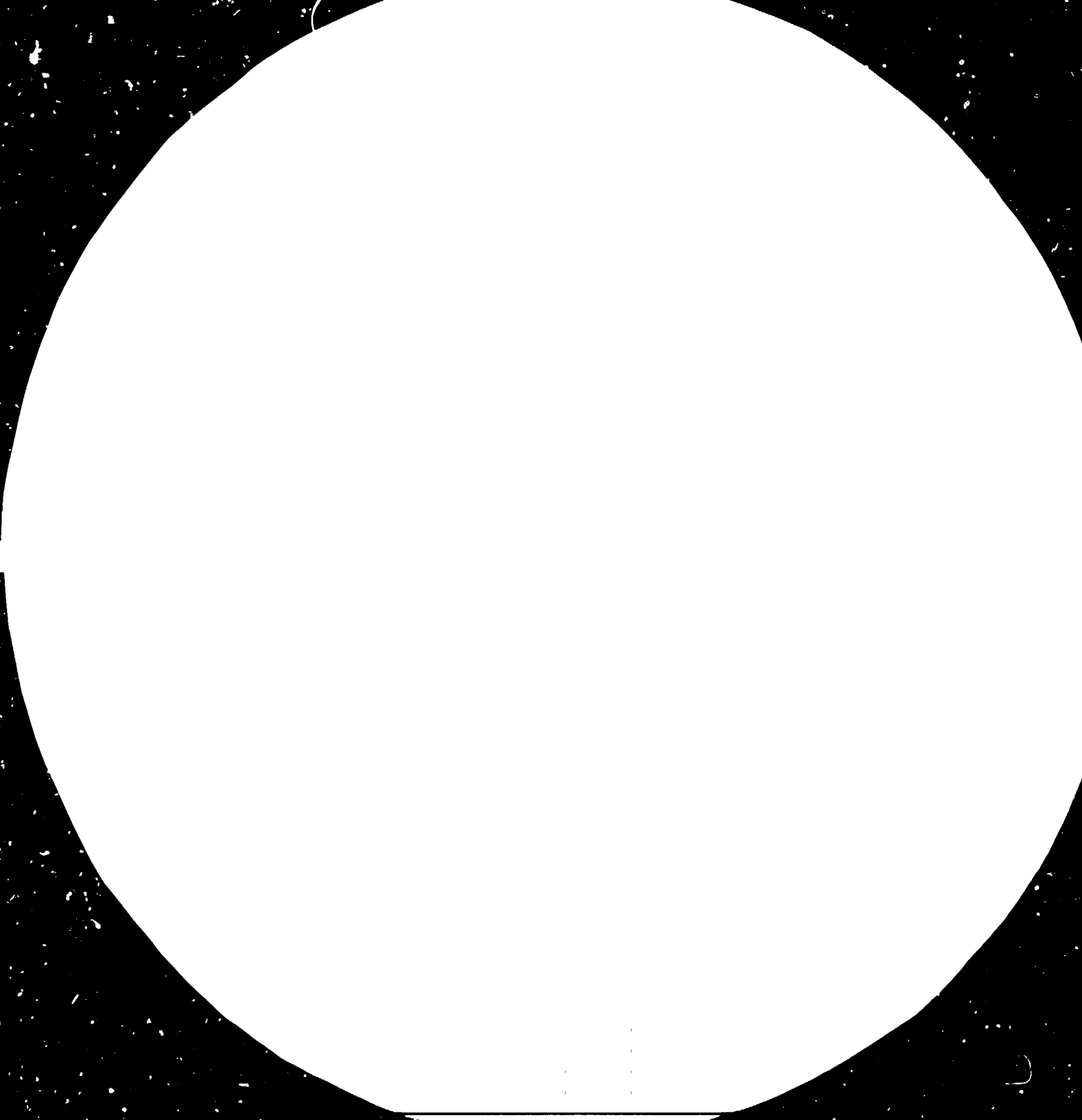
(a) Oxyde d'aluminium

C'est un adsorbant largement utilisé en chromatographie sur colonne. Il présente l'avantage de passer à une assez grande vitesse à travers la colonne, de pouvoir être préparé à différents degrés d'activité et d'être bon marché. On connaît plusieurs sortes d'oxyde d'aluminium : neutre, alcalin, acide. L'oxyde d'aluminium présente différents degrés d'activité, selon Brokmann en fonction de la quantité d'eau qu'il contient.

Oxyde d'aluminium - activité	Eau %
I degré	1,2
II degré	3,5
III degré	5,8
IV degré	8,1
V degré	10,4

L'oxyde d'aluminium peut contenir de l'eau entre 25 et 28 pour cent, tout en conservant son aspect pulvérulent.

En calcinant à 400 - 500°C l'oxyde d'aluminium, l'eau est éliminée et l'on obtient un oxyde d'aluminium actif qui devra être conservé dans des récipients étanches. Pour normaliser l'oxyde d'aluminium on utilise des colorants azoïques tels que azo-benzène, p-méthoxy-azo-benzène, jaune Soudan, rouge Soudan, p-amino-azo-benzène, p-hydroxy-azo-benzène.





28

25

32

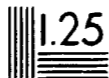
22

36

20



18



16

MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART

NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1963-A
ANSI Z39.18-1963 TEST CHART NO. 2

(b) Silicagel

C'est un adsorbant utilisé sur grande échelle en chromatographies d'adsorption et de partage. Une forme spéciale d'acide silicique est la terre d'infusoires. En chromatographie d'adsorption, on utilise le silicagel comme additif pour les adsorbants très fins, car il augmente la vitesse de migration des solvants dans la colonne.

(c) Oxyde de magnésium

Selon la granulation, il existe deux sortes d'oxydes de magnésium: fin et lourd. Selon Brokmann il peut être préparé avec 3 degrés d'activité. L'avantage de son utilisation dans la séparation des substances très sensibles est dû à sa neutralité.

(d) Oxyde et hydroxyde de calcium

Ce sont des adsorbants à très bas prix. Leur utilisation a donné de très bons résultats dans la chromatographie de partage des caroténoïdes.

(e) Carbonate de calcium. Carbonate de magnésium

Ce sont des adsorbants à activité moyenne et ils ont l'avantage d'être neutres. Ayant une granulation très fine, ils doivent être mélangés à de la terre d'infusoires.

(f) Sulfate de calcium

Adsorbant très accessible, il est recommandé pour les séparations où les tâtonnements effectués avec l'oxyde d'aluminium n'ont pas donné de résultats favorables.

(g) Terres actives

Les aluminosilicates naturels de magnésium sont le plus souvent utilisés car ils réagissent comme adsorbants et comme échangeurs d'ions, à la fois. Ces produits se trouvent dans le commerce sous divers noms : Floridine, Franconit, Dentonite, Ionsil.

(h) Adsorbants organiques

Pour des séparations spéciales, on utilise souvent des mono,- di- et polysaccharides, comme sont le glucose, le lactose,

le saccharose, l'amidon, la cellulose. Ils ont une activité réduite en tant qu'adsorbants et empêchent d'éventuelles transformations catalytiques. On a fait par exemple des séparations de chlorophylle sur du saccharose.

(i) Charbon activé

C'est un adsorbant irréversible et inadéquat pour les séparations, à cause de la coloration qu'il présente. Il est utilisé, d'habitude, comme adsorbant pour décolorer certaines solutions polaires.

La plupart des adsorbants utilisés ont un prix très réduit et le problème de leur régénération ne se pose pas. Certains adsorbants utilisés en grande quantité et permettant d'écartier totalement les impuretés peuvent quand même être soumis à un processus de régénération. Le processus consiste à laver avec des solvants organiques appropriés les solutions alcalines ou acides, à sécher et activer ensuite, de nouveau, l'adsorbant.

Outre l'adsorbant, le solvant d'évolution de la colonne à chromatographie a une grande influence sur la stabilité de l'adsorption. Plus la substance adsorbée est polaire, par rapport au solvant utilisé, plus elle est fortement fixée. Au cas où les adsorbabilités de la substance et du solvant sont rapprochées, les molécules du solvant éliminent la substance adsorbée sur la surface de l'adsorbant et la capacité d'adsorption de ce dernier est diminuée. Pour conclure, on peut dire que le solvant fixé plus fortement sur l'adsorbant que la substance adsorbée peut être utilisé comme éluant. Les solvants utilisés comme éluants en chromatographie sur colonne sont compris dans la série éluotrope de Trappe; ils sont caractérisés par la solubilité de l'eau dans le solvant, la constante diélectrique et la tension interface-eau-solvant.

Les solvants situés au commencement de la série éluotrope sont des éluants forts. Les solvants de la fin de la série sont indiqués pour les séparations chromatographiques.

Solvant	Solubilité: eau dans le solvant($\frac{g}{g}$)	Tension interface eau/sol- vant ($\frac{dyn}{cm}$)	Constante diélec- trique
Eau		-	81
Alcool méthylique		-	31,2
Alcool éthylique		-	25,8
Alcool propylique		-	22,2
Acétone		-	21,5
Acétate d'éthyle		6,3	6,1
Ether éthylique	1,3	9,7	4,4
Chloroforme	0,1	27,7	5,2
Benzène	0,06	32,6	2,3
Toluène	0,04	36	2,3
Trichloréthylène	0,02	-	-
Tétrachlorure de carbone	0,01	43,4	2,2
Cyclohexane	0,01	-	2
Hexane	0,007	50,4	1,88

Lors du choix des solvants d'éluion on doit tenir compte des conditions suivantes :

- (a) les substances à séparer à partir d'un mélange doivent être solubles dans l'éluant utilisé;
- (b) la fixation des substances sur l'adsorbant doit être modérée. Si l'adsorption est trop forte, elle exigera une élution prolongée avec une grande consommation de solvants, et si l'adsorption est faible ou nulle, les constituants du mélange à séparer seront entraînés par l'éluant;
- (c) les solvants d'éluion doivent être très purs si l'on veut obtenir une bonne séparation chromatographique. L'impurification des solvants d'éluion a une influence négative sur la stabilité de l'adsorption.

En pratique, on emploie également des mélanges de solvants au cas où les résultats d'une élution à un seul solvant

ne sont pas bons. Quand on associe les solvants, il faut tenir compte de leur polarité, en utilisant un solvant non-polaire avec un solvant polaire. L'explication est que le constituant polaire est adsorbé graduellement par l'adsorbant et élimine petit à petit la substance fixée plus faiblement ou accélère, au moins, le déplacement de la bande d'adsorption.

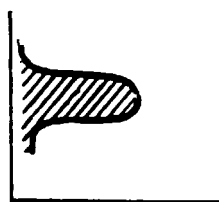
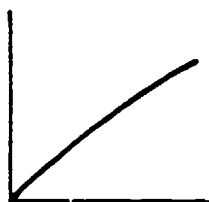
III. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE (2)

Les chromatographies de partage et d'adsorption se ressemblent du point de vue de leur exécution, tout en présentant des différences de principe et de domaine d'utilisation. Tandis que la chromatographie d'adsorption est utilisée pour séparer des substances qui peuvent, plus ou moins, être fixées sur la surface d'un adsorbant, la chromatographie de partage est fondée sur les différences existant entre les coefficients de répartition des substances qui se séparent entre deux phases non-miscibles.

Le coefficient de partage qui détermine le comportement d'une substance dans cette méthode est une constante qui représente le rapport des concentrations molaires d'une substance dissoute dans deux liquides non-miscibles, se trouvant en équilibre à une certaine température, conformément à la loi de Nernst :

$$K = \frac{C_1}{C_2}$$

Suivant cette loi, l'isotherme de partage est une droite, et la courbe de distribution est symétrique, ayant l'allure de la courbe de Gauss



concentration de la substance

concentration de la substance

Chromatographie de partage

Chromatographie d'adsorption

L'efficacité de la séparation dans la colonne, en chromatographie de partage, est fortement influencée par la concentration des substances dissoutes. A des concentrations supérieures, la loi de Harnst ne s'applique plus. L'isotherme de partage n'est plus linéaire et prend la forme des isothermes de partage, d'où l'on peut conclure que la séparation par la chromatographie de partage est une méthode sensible avec une capacité de séparation plus réduite que la chromatographie d'adsorption.

La chromatographie de partage n'est que la transposition de la distribution liquide-liquide à contre-courant sur une colonne à chromatographie. Martin et Synge, qui se sont particulièrement occupés de cette méthode, ont comparé les particules d'adsorbant de la colonne avec des micro-entonnoirs de séparation où ont lieu les processus de partage. Ultérieurement, on a introduit la notion de "plateau théorique", en considérant que la colonne est formée d'un très grand nombre de petites sections, chacune correspondant à un plateau théorique et ressemblant à une colonne de distillation fractionnée. La hauteur d'un plateau théorique a été définie comme l'épaisseur de la couche dans laquelle a lieu un processus de partage quantitatif de la substance entre deux phases. L'efficacité de la séparation est justement déterminée par le nombre des processus de partage. Connaissant les valeurs des concentrations de la substance qui se sépare à différentes hauteurs de la colonne, la valeur du volume de la phase fixe et celle du volume de la phase mobile, on a calculé la hauteur de la colonne équivalente à un plateau théorique, qui est de 0,002 mm; ceci illustre la capacité de séparation en chromatographie de partage, si l'on considère que la hauteur d'un plateau théorique de la meilleure colonne de fractionnement dépasse 1 mm.

La substance de la phase fixe est extraite par la phase mobile et se déplace, dans la colonne, plus ou moins vite, en fonction du coefficient de partage. En connaissant le coefficient de partage, on peut prévoir, dans une certaine mesure, le comportement de la substance respective dans la colonne.

Martin et Synge ont établi un rapport entre le coefficient de partage et la valeur R pour une zone de la substance dans la colonne.

$$R = \frac{A}{A_L + K A_S} \quad \text{ou} \quad K = \frac{A}{\frac{A}{R} - A_S}$$

déplacement de la position de concentration maximale de la substance

$$\text{où } R = \frac{\text{déplacement de la position de concentration maximale de la substance}}{\text{déplacement de la surface de la phase mobile}}$$

A = surface de la section transversale de la colonne

A_S = surface de la section transversale de la phase stationnaire

A_L = surface de la section transversale de la phase mobile

K = coefficient de partage

La valeur R calculée théoriquement pour une certaine substance se vérifie en pratique et sert à caractériser la substance respective.

Pour obtenir une bonne séparation au moyen de la chromatographie de partage, certaines conditions sont nécessaires:

- (a) choix d'un système de phases d'un support convenables ainsi que de
- (b) concentrations appropriées des substances à séparer.

Le système des phases sera choisi, de telle sorte que la substance qui se sépare soit beaucoup plus stable dans la phase stationnaire que dans la phase mobile. Les substances à coefficient de partage proche de 1 ne seront pas séparées au moyen de la chromatographie de partage, car elles sont extraites par la phase mobile. Le cas le plus général de séparation suppose une phase hydrophile et une phase hydrophobe non-miscibles. Les substances très hydrophiles à coefficients de partage beaucoup plus petits que 1 (se dissolvant mieux dans la phase hydrophile), se séparent avec succès sur un support à phase hydrophile stationnaire et phase hydrophobe mobile. Les substances à coefficient de séparation beaucoup plus grand que 1 (plus solubles dans la phase hydrophobe) se séparent

mieux sur un support à phase stationnaire hydrophobe.

Les supports les plus utilisés pour fixer les phases stationnaires dans le cas des substances hydrophobes sont: le silicagel, la terre d'infusoires, l'amidon, la cellulose, et pour les phases hydrophiles: la terre d'infusoires, les substances imprégnées de silicone, le caoutchouc, les polymères siliconiques. Tous ces supports ont des surfaces larges, de sorte que l'adsorption ne peut être évitée à côté du partage. Le plus souvent on peut éliminer l'adsorption, en choisissant le mode de préparation du support le plus convenable, une certaine dimension des granulés du support, ou en modifiant le système de phases. Par exemple, si l'on utilise une colonne de silicagel ayant l'eau comme phase stationnaire, on obtient des séparations beaucoup plus nettes si le chloroforme choisi comme phase mobile contient une petite quantité d'alcool, que dans le cas où le solvant utilisé est pur. Afin que la chromatographie se déroule dans de bonnes conditions et pour que l'adsorption perturbante soit éliminée, il est recommandé d'employer comme phase aqueuse une solution tampon d'un certain pH. Comme les coefficients de partage des substances ionisables dépendent en grande mesure du pH, on peut trouver des conditions qui assurent le partage optimum d'un mélange donné.

Les sels influencent fortement l'équilibre entre les phases saturées réciproquement. Parfois, les sels de la phase hydrophile peuvent salifier aussi une partie de la phase hydrophobe dissoute; il se produit ainsi un inversement des phases, la phase hydrophobe saturée d'eau se transformant en solution aqueuse du sel saturé avec la phase hydrophobe.

L'efficacité de la séparation en chromatographie de partage peut être augmentée, en saturant le système de phases avec une substance qui attire la substance à séparer dans l'une des phases. Pour la séparation des substances basiques on recommande donc d'ajouter des acides aromatiques ou aliphatiques supérieurs et pour la séparation des substances acides, on ajoute des amines.

La température a aussi une influence particulière sur la solubilité des deux phases et sur la solubilité des substances

qui se séparent; il est nécessaire donc d'assurer sa constance pendant tout le processus. L'appareil utilisé sera une colonne à chromatographie identique avec la colonne pour la chromatographie à adsorption, muni en plus d'un thermostat, grâce à une double enveloppe.

L'identification des substances séparées, aussi bien que leur dosage dépendent de la sensibilité et de la précision des méthodes de détection utilisées lors du partage dans la colonne à chromatographie. L'utilisation des méthodes sensibles, comme la potentiométrie, l'oscillométrie, la spectro-photométrie, la réfractométrie permet d'identifier à côté des constituants principaux les traces d'autres substances.

IV. UTILISATION DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE POUR ISOLER CERTAINS PRINCIPES ACTIFS DES PLANTES

Les applications de la chromatographie d'adsorption sont nombreuses et comprennent des substances très variées.

Au moyen de la chromatographie d'adsorption sur colonne on a pu séparer de nombreuses classes de substances: alcaloïdes, hétérosides, cardiotoniques, composés terpéniques des huiles volatiles, phytostérols; on a de même pu isoler et purifier certaines vitamines et d'autres substances.

Nous donnerons quelques exemples de l'application de la chromatographie d'adsorption sur colonne pour séparer les principes actifs de certaines plantes étudiées dans notre laboratoire.

Les alcaloïdes représentent une classe importante de principes actifs dans les plantes; ils ont été, pour la plupart, séparés et identifiés à l'aide de la chromatographie d'adsorption.

Nous avons étudié, par exemple, les alcaloïdes contenus dans Vinca minor, ergot de seigle et Glaucium flavum.

On a isolé de Vinca minor L. la vincamine (3) un alcaloïde du type indolique, séparé de l'extrait brut alcaloïdique sur la colonne d'adsorption avec de l'oxyde d'aluminium (degré d'activité II-III) et élution au benzène, et la minovincine.

Cette dernière se trouve dans les eaux acétoniques après la cristallisation de la vincamine. C'est un alcaloïde du type méthylène-indoléninique, qui peut être isolé sur la colonne d'adsorption avec de l'oxyde d'aluminium (degré d'activité I) et élution avec une mixture cyclohexane-benzène(1:1)(4).

Une autre classe importante d'alcaloïdes appartient à l'ergot de seigle. Ces alcaloïdes se trouvent dans le produit du type Hydergine, réalisé en Roumanie sous le nom d'Ergoceps. Dans le flux technologique utilisé pour obtenir l'Ergoceps, la colonne d'adsorption sert à purifier l'extrait brut alcaloïdique comme une étape vers l'ergotamine, et à fractionner l'ergotamine (mélange d'ergocornine, ergokriptine et ergocristine) de l'ergotamine (5).

Dans les deux cas l'adsorbant est l'oxyde d'aluminium et l'élution se fait avec de l'acétate d'éthyle.

Pour obtenir le méthansulfonate de bromergokriptine pur on utilise une colonne d'adsorption à l'oxyde d'aluminium qui a le rôle de retenir les pigments bruns. Le produit final satisfait aux exigences organoleptiques (6).

Pour la séparation de la glaucine des autres alcaloïdes de Glaucium flavum on utilise la colonne à chromatographie d'adsorption avec l'oxyde d'aluminium et l'élution au benzène quand on isole la glaucine du reste d'alcaloïdes (7).

Quant à l'isolement des composés terpéniques dans les huiles volatiles brutes au moyen de la chromatographie sur colonne, nous considérons que cette méthode permet de les purifier et enrichir simultanément. Dans l'huile d'estragon (Artemisia dracunculus) on isole par distillation fractionnée une fraction enrichie de méthylchavicol, produit utilisé en parfumerie. Cette substance terpénique peut être isolée à l'état pur par séparation sur la colonne d'adsorption à l'oxyde d'aluminium (degré d'activité I acide), en éluant avec du n-hexane (8).

La chromatographie d'adsorption ou de partage sont largement appliquées aux hétérosides cardiotoniques de Digitalis lanata, à savoir :

1. pour séparer le total A, B, C des glucosides primaires on a utilisé une colonne d'adsorption à l'oxyde d'aluminium (degré I), élué avec un mélange de dichlorométhane - méthanol (9:1) pour éliminer la chlorophylle; pour l'élution des glucosides primaires on utilise l'éthanol de 50° qui, en désactivant partiellement l'adsorbant, fixe les flavones sous forme de produits chélatés insolubles, qui pourraient empêcher la cristallisation des glucosides primaires;
2. pour séparer l'acétyldigitoxine du lanatoside A, l'adsorbant sera le silicagel activé à 110° et l'élution s'effectuera au chloroforme ou au benzène - méthanol (9:1); le lanatoside A reste fixé sur l'adsorbant à cause de la polarité, et l'acétyldigitoxine est présente dans l'éluant;
3. la chromatographie de partage s'applique pour séparer la digitoxine de la digoxine. La phase stationnaire est l'oxyde d'aluminium ou le silicagel imbibé de formamide dans l'acétone, et la phase mobile est représentée par du benzène-méthylacétone, mélange saturé de formamide. La première à se séparer sera la digitoxine, moins polaire, suivie de la gitoxine et, enfin, la digoxine.

B I B L I O G R A P H I E

1. Vigneron Maurice - Fractionnements par solvants, Vigot Frères - éditeurs, 1^e édition, Paris, 1954
2. Herout Vlastimil, Keil Borivoj - Laboratorní technika organické chemie, Praha, 1954
3. Sas I., Cristea V. - Proces tehnologic pilot, Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, Bucarest, 1974
4. Plat Monique, Le Men Jean - Annales pharmaceutiques françaises, 20, 1962, 399-906

5. Mişcov V. et collab. - Proces tehnologic pilot, Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, Bucarest, 1980
6. Sas I. et collab. - Conférence présentée à la session scientifique "30 années d'activité de l'Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques", Bucarest, 1979
7. Roşca L. et collab. - Conférence présentée à la 12^{ème} session scientifique de l'Académie des Sciences Médicales, Bucarest, Mai 1981
8. Thiene H., Nguyen Thi Tam - Pharmazeutisches Institut, Karl Marx-Universität, Leipzig, Pharmazie, 1968, 23 (6), 339-340

LA SEPARATION ET L'ISOLATION DE SUBSTANCES
NATURELLES A L'AIDE D'ECHANGEURS D'IONS

Gabriela Pintilie +)

+) Ingenieur chimiste, chercheur à l'Institut de Recherches
Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

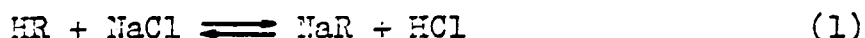
I. GENERALITES SUR LES ECHANGEURS D'IONS

L'échange ionique est un processus physique-chimique qui a gagné une importance pratique particulière dans différents domaines de la science et de l'industrie.

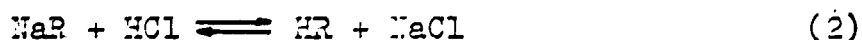
Les réactions d'échange ionique sont stoechiométriques et réversibles. Aux réactions d'échange ionique peut participer n'importe quel composé qui ionise en solution. La vitesse des réactions d'échange ionique dépend d'une série de facteurs: dimension des particules, charge d'ions, température du système, concentration d'ions etc.

Les réactions d'échange ionique peuvent être de type cationique, quand les ions positifs sont échangés, ou de type anionique, quand les ions négatifs sont échangés (7). Dans tous les cas, les ions de la solution de l'électrolyte remplacent les ions avec la même charge de la structure moléculaire des échangeurs d'ions. D'après la nature d'ions d'échange de leur structure chimique, il y a des échangeurs de cations et des échangeurs d'anions.

Les échangeurs de cations jouent le rôle d'acide s'ils contiennent l'ion H^+ , qu'ils peuvent remplacer avec différents cations des solutions d'électrolytes. Ces échangeurs de cations nommés aussi cationites, peuvent être représentés schématiquement par la formule H^+R (H-cationite). L'échange cationique des cationites acides se déroule conformément au schéma suivant:



Le cation "mobile" H^+ du cationite acide HR , diffusé dans la solution de chlorure de sodium, a été remplacé avec le cation Na^+ de la solution. A la suite de cet échange, le cationite acide devient un cationite neutre NaR , qui peut être considéré comme un "sel" du cationite acide. Ces cationites neutres peuvent passer dans la forme acide HR , à la suite du processus d'échange des cations mobiles, par exemple Na^+ , de la structure du cationite, avec les ions H^+ de la solution d'un acide, conformément au schéma:



Les processus d'échange cationique du type de ceux représentés dans l'équation (1) sont réversibles, pouvant donner lieu ainsi à la régénération du cationite, qui revient à sa forme initiale de cationite acide HR , conformément à l'équation (2). La régénération des cationites se réalise avec des solutions de HCl ou H_2SO_4 .

Les échangeurs de cations sont des produits naturels ou synthétiques, insolubles, de nature inorganique ou organique, avec une structure micro- ou macroporeuse, capables de s'imbiber d'eau et de solutions d'électrolytes et de réaliser l'échange entre les cations des solutions et les cations d'échange de la structure chimique du cationite.

Il existe huit types d'échangeurs de cations utilisés d'habitude: (1) cationites inorganiques naturels et synthétiques; (2) charbons fossiles (tourbes et lignites); (3) charbons fossiles sulfonés; (4) cationites à base de cellulose; (5) cationites à base de lignine; (6) résines phénoliques sulfonées; (7) résines polystyréniques sulfonées; (8) résines carboxyliques.

Les différents types de cationites diffèrent par leur structure moléculaire, par la capacité d'échange cationique, par la stabilité thermique et par leur stabilité envers les agents chimiques, particulièrement envers les agents oxydants.

Une importante catégorie d'échangeurs d'ions d'origine minérale fait partie de la série d'aluminosilicates, appartenant au groupe minéralogique des micas hydratés, au groupe du montmorillonite et au groupe des zéolites. Tous présentent une capacité relative réduite d'échange cationique. Exemples: glauconite, zéolites, montmorillonite, analcime, chabasite, permutites.

Dans la nature existent de nombreux types de substances macromoléculaires ayant des propriétés d'échange ionique. La matière organique du bois est composée de cellulose et de lignine. La cellulose et la lignine telles quelles ne présentent pratiquement pas de pouvoir d'échange ionique. Par l'introduction de groupes polaires dans la macromolécule de la cellulose ou de la lignine, on obtient une gamme d'échangeurs d'ions ayant des propriétés intéressantes, comme, par exemple, l'orzéolite, la permutite. Il est possible d'obtenir quelques catégories

d'échangeurs d'ions à partir de certaines résines naturelles, par oxydation préalable ménagée et sulfonation ultérieure.

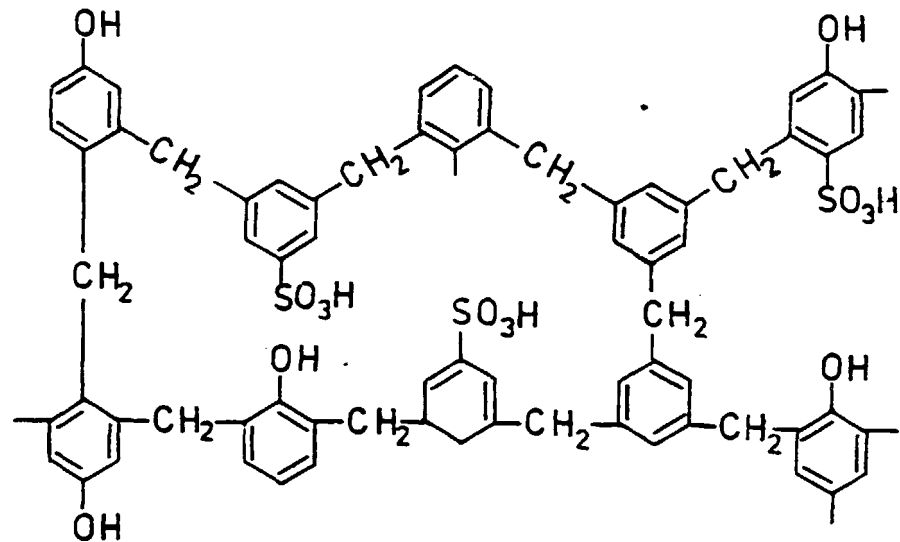
Les résines synthétiques échangeuses d'ions - produits macromoléculaires avec des groupes polaires capables de réaliser l'échange ionique - peuvent être considérées comme des polyélectrolytes insolubles, dont le caractère ionique est dû aux groupes polaires accessibles aux ions diffusables de solutions d'électrolytes. Les résines ioniques sont pratiquement insolubles dans l'eau, grâce à leur structure tridimensionnelle; leur degré de réticulation doit permettre la diffusion d'ions de la solution dans la masse de la résine. Pour faciliter cette diffusion, la résine doit être suffisamment hydrophile, propriété qui se manifeste par la tendance de gonflage des résines au contact prolongé avec l'eau. Pour avoir une capacité d'échange accessible, la résine doit contenir un nombre suffisant de groupes polaires; un nombre plus grand n'est pourtant pas désirable, parce que ces groupes augmentent la tendance à la dissolution de la résine. Les groupes polaires, qui confèrent la capacité d'échange ionique, peuvent être introduits soit dans la molécule du monomère, soit dans la macromolécule, pendant la réaction ou après la réaction de constitution de celle-ci. On peut obtenir ainsi des résines échangeuses de cations soit par la condensation de l'acide phénol-sulfonique avec le formaldéhyde, soit par la sulfonation ultérieure de la résine bakelitique obtenue par la condensation du phénol avec le formaldéhyde.

D'après la nature des groupes ionogènes de leur structure macromoléculaire les résines cationiques peuvent être fortement acides (celles avec des groupes $-SO_3H$, ou avec des groupes $-PC(CH_2)$), acides (celles avec des groupes $-COOH$) et faiblement acides (celles avec le groupe OH phénolique).

Les résines fortement acides s'obtiennent soit par polycondensation des acides phénol-sulfoniques avec des aldéhydes, soit par sulfonation des résines phénol-formol, ou bien par polycondensation des phénols avec des aldéhydes, en même temps avec le processus de sulfonation.

Par exemple, par la polycondensation de l'acide p-phénol-sulfonique avec le formaldéhyde on obtient une résine cationique

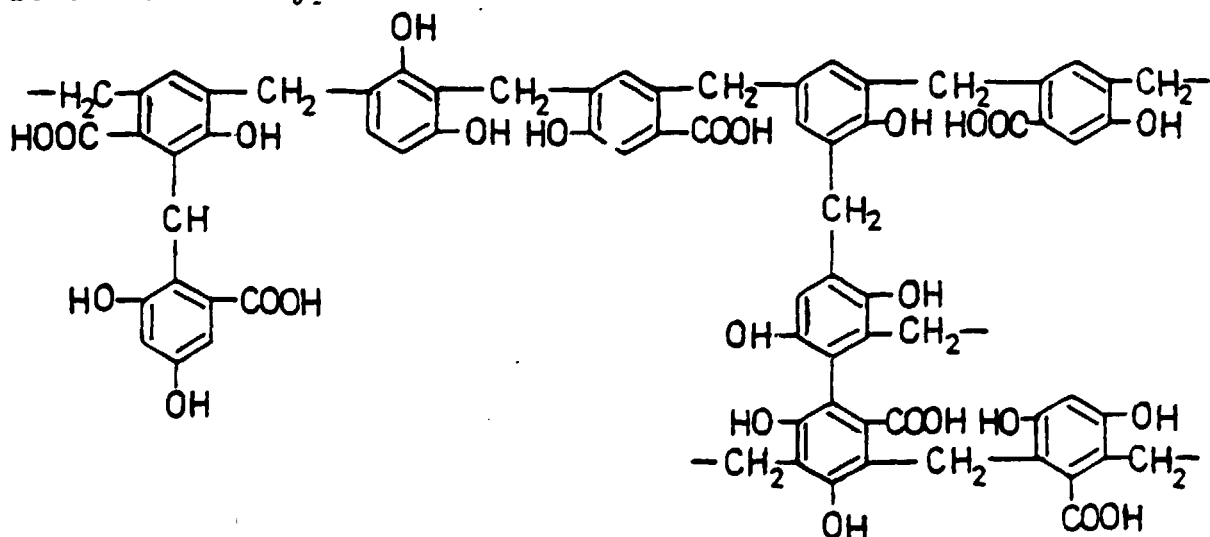
du type:



Les résines phénol-formaldéhydiques avec des groupes sulfoniques liés au noyau benzénique ($R-SO_3H$) sont des résines cationiques fortement acides, alors que celles avec des groupes sulfoniques dans la chaîne d'atomes latérale ($R-CH_2-SO_3H$) sont faiblement acides. Les groupes sulfoniques liés directement au noyau benzénique confèrent une capacité d'échange cationique dans des limites larges du pH de la solution d'électrolyte (de 1,5 jusqu'à 14).

Les résines faiblement acides, résines cationiques avec un caractère plus faiblement acide que les résines sulfoniques, s'obtiennent en utilisant à la place des dérivés phénoliques sulfonés, des dérivés phénoliques carboxylés ou phosphorylés, qui condensent avec le formaldéhyde dans le milieu alcalin.

Par exemple, par la condensation de l'acide résorcilique avec la résorcine et le formaldéhyde, on obtient un échangeur de cations du type:



Les résines les plus répandues sont celles obtenues par polymérisation ou copolymérisation en suspension sous forme de perles. Les résines ioniques sous forme de perles diffèrent de celles obtenues par polymérisation en bloc par leurs propriétés chimiques et mécaniques supérieures, par leur stabilité et leur capacité d'échange supérieures (3).

Les échangeurs d'anions jouent le rôle d'alcalis (bases) s'ils contiennent des ions OH^- qu'ils peuvent échanger avec divers anions de solutions d'électrolytes. Ces échangeurs d'anions peuvent être représentés schématiquement par la formule ROH (OH -anionite). L'échange anionique des anionites bases se déroule conformément au schéma suivant:



L'anion "mobile" OH^- de l'anionite basique ROH a été remplacé avec l'anion Cl^- de la solution de chlorure de sodium. On obtient ainsi l'anionite neutre RCl , qui peut être considéré comme un "sel" de l'anionite basique ROH .

Par le déroulement contraire de la réaction réversible (3) on réalise la régénération de l'anionite RCl , qui revient à sa forme initiale d'anionite basique ROH :



La régénération des anionites se réalise donc en utilisant des solutions alcalines.

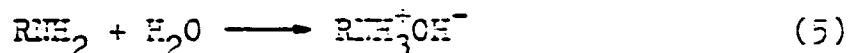
Les échangeurs d'anions sont, en général, des produits synthétiques de nature inorganique ou organique, des produits macromoléculaires à structure microporeuse, capables de s'imbibier d'eau et de solutions d'électrolytes et de réaliser l'échange entre les anions de la solution et les anions d'échange de la structure chimique de l'anionite.

Les anionites couramment utilisés contiennent dans leur structure chimique le groupement amine, étant différents entre eux selon la nature de ce groupement (primaire, secondaire, tertiaire, quaternaire). Ils peuvent être obtenus par des modifications chimiques des produits naturels (cellulose, protéines), ou par des réactions de condensation ou de polymérisation avec des monomères adéquats. Les différents types d'anionites diffèrent par leur capacité d'échange anionique, par leur stabilité

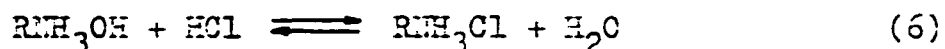
thermique et leur stabilité vis-à-vis de différents agents chimiques.

Les résines anioniques sont fortement basiques, moyennement basiques ou faiblement basiques, selon le type et la position des groupements aminiques de leurs structures moléculaires.

On accepte en général que les groupements amino de la structure macromoléculaire de la résine actionnent comme les amines dans les solutions aqueuses:



L'ion hydroxyle peut être facilement échangé avec les anions existant en solution conformément au schéma suivant:



La rétention des anions par les résines anioniques peut être considérée comme une réaction analogue à la neutralisation des bases avec des acides et découle quantitativement si la résine anionique est fortement basique. Dans le cas des résines faiblement basiques, la réaction (6) d'échange anionique est limitée par la réaction inverse (l'hydrolyse). Les anions des acides fortement dissociés (H_2SO_4 , HCl , HNO_3 , H_3PO_4) sont retenus facilement par les résines anioniques, même par celles faiblement basiques. Les anions des acides faiblement dissociés (H_2CO_3 , H_2SiO_3 et les acides organiques) ne peuvent être retenus que par des résines anioniques fortement basiques et la vitesse de rétention varie avec la constante de dissociation de l'acide.

Les anionites, ainsi que les cationites, s'obtiennent par deux voies de synthèse:

(a) on forme d'abord le squelette macromoléculaire dans lequel on introduit les groupements ionisables. La position des groupements ionisables dans le squelette macromoléculaire correspond, en ce cas, à une répartition statistique qui ne peut pas être précisée. La position de ces groupements par rapport au noyau benzénique, ainsi que le voisinage avec divers substituants, détermine leur degré de dissociation et par conséquent la capacité d'échange ionique de la résine.

(b) la polymérisation ou la condensation des composés qui contiennent des groupements ionisables. Dans ce cas, on obtient

des résines anioniques homogènes.

En ce qui concerne le type de la structure de base, les échangeurs d'ions possèdent une structure de gel ou une structure à macropores.

II. TECHNIQUE DE L'ECHANGE IONIQUE

On a montré auparavant que l'échange ionique se produit quand un échangeur d'ions est mis en contact avec le milieu dans lequel se trouvent des substances sous forme ionique. L'échange réciproque d'ions qui a lieu ne s'effectue pas quantitativement. Il se produit seulement jusqu'au moment de la réalisation d'un équilibre. L'état d'équilibre est influencé, parmi d'autres, par la concentration en ions et par la température. Plus l'affinité d'un ion pour l'échangeur d'ions est grande, plus l'échange ionique est complet. Un tel échange ionique discontinu est très rarement employé.

Une autre méthode d'une grande importance pratique est la technique des colonnes d'échangeurs d'ions (la méthode dynamique). Dans ce cas, la solution qui doit être traitée est passée par une colonne qui contient une couche immobile de résine. Pendant le passage de la solution s'établit continuellement un équilibre dans chaque couche imaginaire de résine. La concentration de l'ion initial diminue et la réaction d'échange a lieu entièrement.

La troisième méthode est basée sur la technique de la couche fluidisée. L'avantage de la méthode consiste en la petite quantité d'échangeurs d'ions nécessaire.

L'échange ionique par la technique dynamique comprend cinq phases du cycle de fonctionnement.

A. Ameublissement

Pour éloigner les impuretés mécaniques du filtre et les bulles d'air de la couche de résine, ainsi que pour le rangement des particules de résine, on procédera avant chaque régénération à un ameublissement, par l'introduction dans la colonne, de bas en haut, d'un courant d'eau. Etant donné que pendant

L'ameublissement la couche de résine s'élargit considérablement, il faut laisser dans la colonne, au-dessus de la couche de résine, un espace adéquat. En pratique, on charge approximativement la moitié de la colonne avec des échangeurs d'ions. On arrête l'ameublissement au moment où l'eau qui sort par l'extrémité supérieure de la colonne est claire. L'ameublissement peut durer jusqu'à deux heures.

3. Régénération

Dans cette phase, l'échangeur d'ions est amené de nouveau à son état actif (sous sa forme ionique initiale). Un échange ionique contraire à celui de la phase d'épuisement a lieu. Cette réaction contraire est réalisée en premier lieu avec une concentration relative élevée de l'ion respectif de l'agent régénérateur.

Le régénérateur est passé par la couche de résine de haut en bas (rarement le contraire) avec une telle vitesse, que pendant environ 30 minutes l'entière quantité de régénérateur soit passée.

Comme régénérateur pour un cationite de forme Na, on utilise une solution de NaCl d'environ 10%, pour un cationite de forme H, on utilise une solution de HCl 5-8%, ou une solution de H_2SO_4 avec une concentration plus petite que 1,5%, au commencement, qui ensuite peut augmenter (4%). Les concentrations faibles de H_2SO_4 sont nécessaires pour éviter la précipitation de $CaSO_4$.

Pour les anionites on emploie en général une solution diluée de NaOH (2-4%), de Na_2CO_3 ou d'ammoniaque.

Le nécessaire de régénérateur s'exprime en pourcentage par rapport à la quantité théoriquement nécessaire ou pratiquement en kg de substance de régénération 100% pour Ln^3 d'échangeur d'ions.

3. Lavage

Le lavage se fait pour éloigner de la couche de résine les restes de régénérateur, en introduisant de haut en bas un courant d'eau dans la colonne (dénommée aussi filtre ionique).

En ce qui concerne la qualité de l'eau de lavage (eau brute, eau décarbonatée ou déminéralisée), on tient compte du type d'échangeur d'ions. En tout cas, les anionites doivent être lavés au moins avec de l'eau désalcalinisée.

Les cationites se lavent en moyenne avec 3-5 litres d'eau de lavage par litre de résine et les anionites avec 6-10 litres d'eau par litre de résine.

D. Épuisement (chargement)

Cette phase représente en réalité la phase active de l'échange ionique. Les ions qui se trouvent en solution sont adsorbés par l'échangeur d'ions, d'autres ions étant cédés à leur place, jusqu'à l'épuisement de la capacité d'échange de l'échangeur.

Dans ce but, la solution qui doit être traitée est passée par une couche d'échangeur d'ions qui se trouve dans une colonne (filtre). En général, ce passage a lieu avec un chargement spécifique de 10 litres/litre résine/heure. Pendant l'épuisement, quelques ions plus faibles retenus par la résine peuvent passer sans interruption par la couche d'échangeur d'ions, se trouvant dans l'effluent dans une concentration relativement petite. Ce phénomène est désigné comme échappement (fuite) ionique. Lorsque la majorité des centres d'échange sont épuisés, la concentration des ions qui s'échappent augmente rapidement, ce qui signifie que la phase d'épuisement (chargement) a cessé.

Le moment de la croissance brusque dans l'effluent de la concentration d'ions qui doivent être retenus s'appelle perforation. Si on continue le passage de la solution par la colonne, on arrive à une égalisation de la composition des ions de l'influent et de l'effluent.

La quantité d'ions échangés jusqu'au moment de la perforation rapportée par unité de volume de l'échangeur d'ions s'appelle la capacité utile volumétrique (Cuv) et peut être calculée conformément à la relation suivante:

$$Cuv = \frac{V_1 C_1}{V_2}$$

où: V_1 = volume total de la solution d'épuisement utilisée jusqu'au moment de la perforation, en litres ou millilitres;

C_1 = concentration de la solution d'épuisement, en val/l ou mval/ml;

V_2 = volume gonflé de l'échangeur d'ions, sous forme ionique de livraison, en litres ou millilitres.

La capacité utile volumétrique représente une partie de la capacité totale volumétrique et exprime la capacité d'échange d'un échangeur d'ions totalement régénéré jusqu'au moment de l'épuisement complète (égalisation de la composition ionique de l'influent et de l'effluent rapportée à l'unité de volume).

2. Elution

L'élution consiste dans la désorption des substances adsorbées sur l'échangeur d'ions à l'aide d'un solvant approprié à un pH adéquat. Dans le cas de l'échange cationique, les substances se désorbent par le passage par la colonne de solvants alcalinisés avec de l'ammoniaque ou d'autres agents d'alcalinisation. Dans le cas de l'échange anionique, l'élution se réalise avec des solvants appropriés (dans lesquels la substance est soluble) à un pH acide.

En général, le volume du solvant d'élution est de 10 à 15 fois moindre que le volume de la solution de la phase d'adsorption (épuisement).

Pour la continuité du processus on utilise des installations à colonnes travaillant parallèlement. Par exemple, dans le cas de deux colonnes, lorsque une colonne effectue l'épuisement et puis l'élution des ions, l'autre, qui a déjà effectué l'épuisement et l'élution, passe à l'ameublissement, la régénération et le lavage.

L'installation à quatre colonnes travaille efficacement si la durée des phases successives est approximativement la même; en cas contraire, se produisent des discontinuités dans le déroulement du processus.

III. APPAREILLAGE UTILISE DANS L'ECHANGE IONIQUE

Les opérations d'échange ionique se réalisent à l'aide de colonnes chargées de l'échangeur d'ions par lesquelles passent les solutions qui interviennent dans le processus.

Les colonnes ou les filtres ioniques industriels sont construits en tôle d'acier carbone ou en aciers spéciaux, résistant à l'action des divers agents chimiques. Pour éviter la corrosion, l'intérieur des colonnes et des tuyaux métalliques est protégé par des couches de matières plastiques, en caoutchouc ou il est émaillé.

De très bons résultats s'obtiennent en utilisant les tuyaux de verre ou de matières plastiques, surtout du polyéthylène.

Les colonnes industrielles sont des cylindres ayant le diamètre intérieur d'environ 100 cm et la hauteur de 300 cm, pourvues de tuyaux et soupapes pour manoeuvrer les liquides qui entrent et sortent de la colonne.

Le calcul des dimensions des filtres ioniques se fait en fonction de la capacité d'échange de l'échangeur utilisé, de la quantité de solution qui doit être employée dans une seule charge et de la vitesse moyenne de réaction qui s'établit dans le processus.

Les dimensions des colonnes s'établissent en prenant d'habitude le diamètre de 1,0-1,5 m et la hauteur se déduit par calcul, en fonction du volume nécessaire de la résine chargée.

Pour les installations industrielles on emploie des colonnes ayant une hauteur de 3 à 5 fois plus grande que le diamètre, la charge de résine occupant environ 2/3 du volume de la colonne.

Il est nécessaire de laisser un volume libre assez grand au dessus de la résine, pour permettre tant le gonflage à cause de la diffusion de la solution d'électrolyte, que des variations de volume à cause du passage de la résine d'une forme à l'autre (HR, NaR, RCl, RCH).

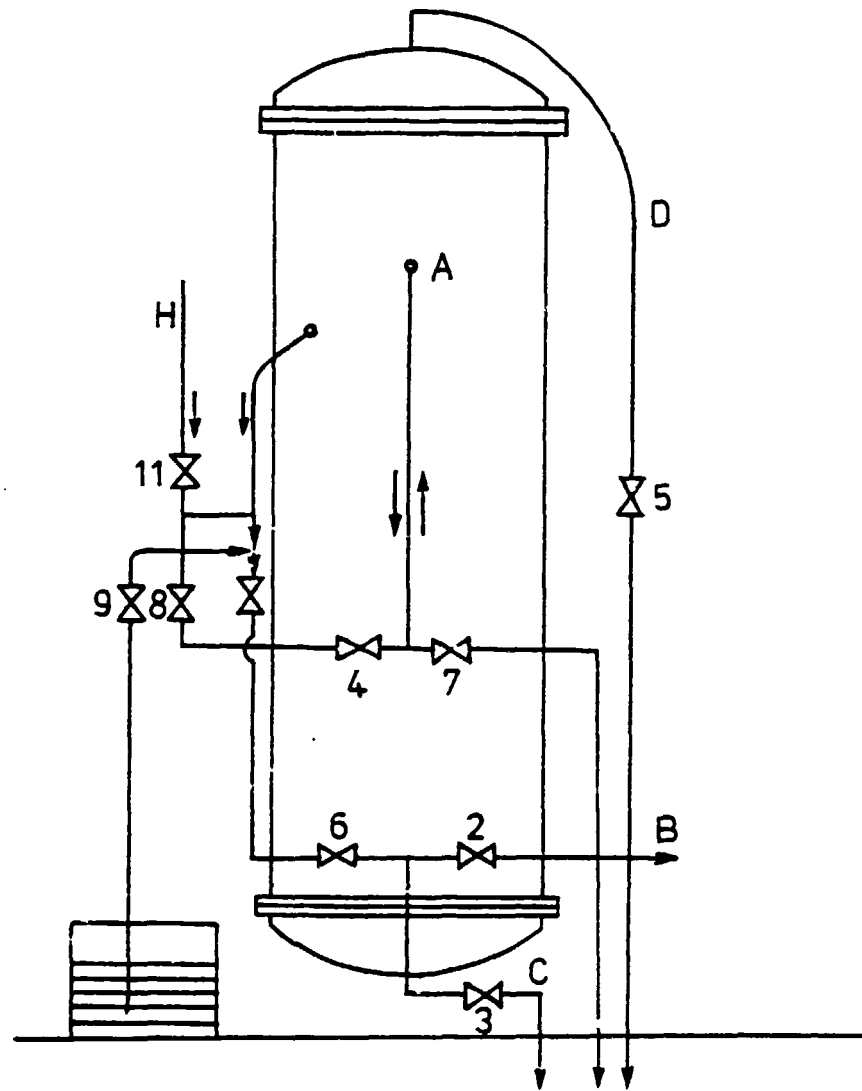


Fig. 1 Colonne ionique industrielle

Dans le cas où la colonne de résine ionique est traversée par des liquides ou des solutions de substances organiques, on utilise des colonnes plus hautes, le rapport entre le diamètre et la hauteur de la colonne étant 1/4 ou 1/6.

IV. APPLICATIONS DE L'ECHANGE IONIQUE POUR SEPARER ET PURIFIER DES PRODUITS NATURELS

Les domaines dans lesquels sont utilisés les échangeurs d'ions sont très divers, tels que:

- . traitement de l'eau: dédurisation, élimination des bicarbonates, déionisation, adsorption des substances organiques;
- . usinage de surfaces métalliques;
- . hydrométallurgie: enrichissement, purification et préparation de l'uranium, des terres rares, du germanium;
- . industrie chimique: purification poussée des substances chimiques inorganiques et organiques, purification des solvants, préparation d'acides et d'alcalis libres de leurs sels;
- . processus catalytiques;
- . industrie pharmaceutique: isolation d'antibiotiques, préparation de vitamines, séparation d'alcaloïdes, décoloration de solutions;
- . industrie alimentaire;
- . laboratoires d'analyses.

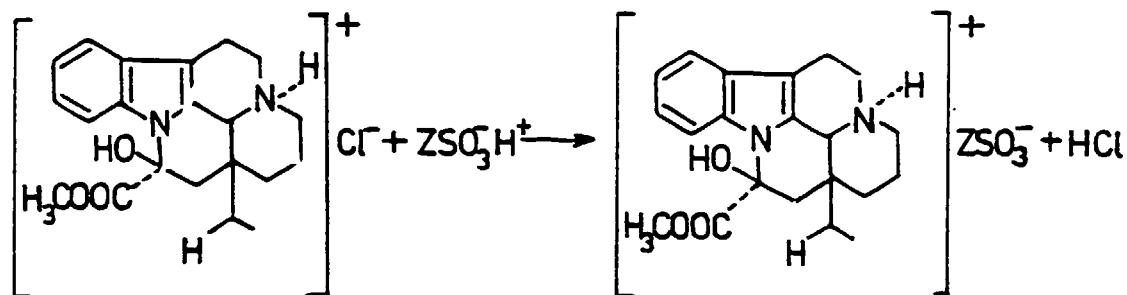
L'une des classes de produits naturels dans laquelle l'échange ionique est fréquemment utilisé est celle des alcaloïdes. On y emploie des cationites et des anionites, en fonction de la structure de l'alcaloïde (la nature de l'ion obtenu).

Karabaev (5) indique une méthode d'isolation de la vincamine de Vinca minor par le passage de la solution extractive acide aqueuse par deux absorbeurs en série, contenant l'échangeur d'ions fortement acide KU-1, en forme H^+ . La désorption des alcaloïdes s'effectue avec NE_4OH - 1,5% dans l'éthanol 85-90%. Après la concentration de la solution, on fait le traitement du résidu aqueux avec de l'éther éthylique

et la cristallisation, quand s'obtiennent 0,02% alcaloïdes, par rapport au matériau initial sec.

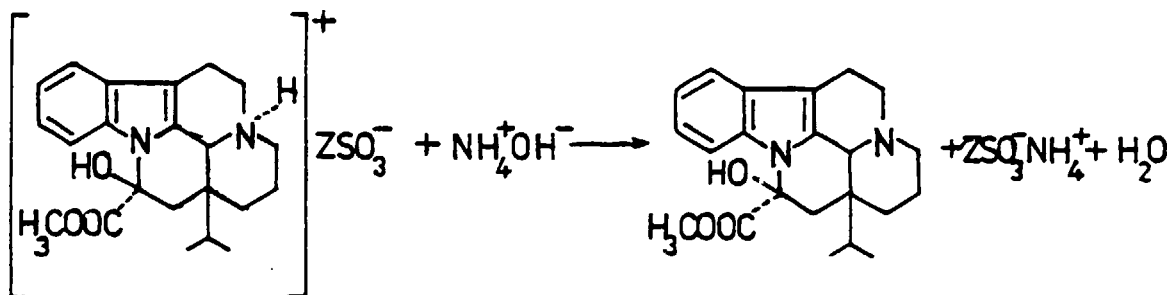
Le mécanisme de la réaction d'échange ionique appliqué dans le cas de la vincamine est le suivant:

1. adsorption sur la résine:



où: ZSO_3H^+ = cationite fortement acide, forme H^+

2. désorption de la résine:



3. régénération du cationite:



Le processus d'adsorption-désorption de la vincamine sur le cationite KU-1, décrit par Aripov Kh., découle similairement (1).

Un autre exemple d'application de l'échange ionique pour l'isolation des alcaloïdes se réfère à l'isolation de la pilocarpine de la solution aqueuse acide à l'aide des cationites fortement acides KU-1 et KU-2. L'éluion s'effectue avec de l'ammoniaque 1,5% en iso-PrOH-ClCH₂CH₂Cl (1:2). Après

purification, la pilocarpine s'obtient avec un rendement final de 55% (15).

Vyas (14) isole les alcaloïdes de cinquone par échange ionique sur des cationites fortement acides de forme NH_4^+ , en utilisant comme solvant d'extraction une solution aqueuse diluée d'acide sulfurique et comme éluant de l'éthanol ammoniacal.

Babaev (2) isole les alcaloïdes de Petilium raddeanum par le passage de la solution extractive chlorhydrique aqueuse dans deux colonnes contenant le cationite KU-1, de forme H^+ . La désorption s'effectue avec de l'éthanol à 96% saturé d'ammoniaque gazeux, à pH 9-9,5. Après des purifications ultérieures, on obtient 0,9% d'alcaloïdes, rapportés à la plante sèche.

Des auteurs tchèques (10) et roumains (12) décrivent la préparation de l'acide lysergique par échange ionique sur des cationites fortement acides du type Dowex 50 WA_2 ou Vionit CS_3 .

Mushinskaya (8) et Shostenko (11) décrivent l'obtention par échange ionique des alcaloïdes suivants: morphine, caféine, scopolamine, lobéline, alcaloïdes de Claviceps purpurea et pilocarpine. Les phases du procédé sont les suivantes: extraction, adsorption, désorption, élution et purification du produit brut. Les cationites KU-1 et KU-2 y sont utilisés. Les alcaloïdes sont obtenus avec des rendements de 60 à 80 fois plus grands que par les méthodes classiques d'extraction.

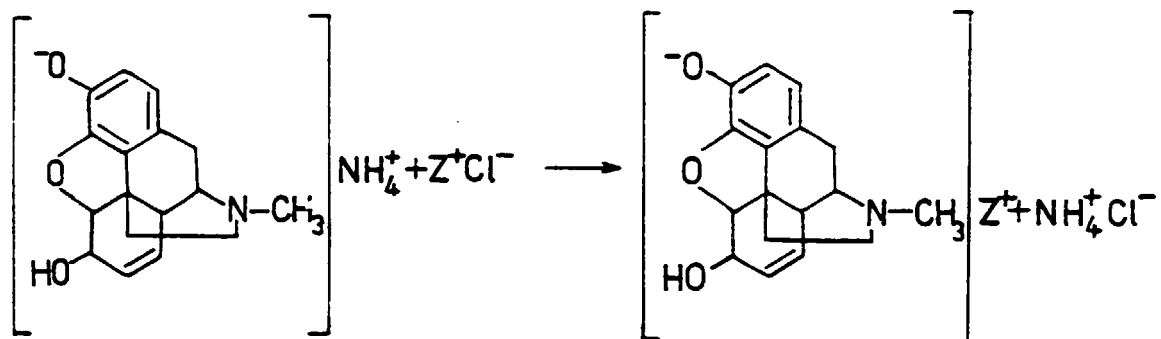
Un exemple de séparation des alcaloïdes par échange ionique est la séparation entre la morphine et la codéine, décrite par Mushinskaya (8) et Vysotskaya (16).

Quand un extrait alcool-ammoniacal de capsules de coquelicot (contenant 0,5-0,6% de morphine) passe sur l'anionite AV-17 (contenant 2% de divinyl-benzène), de forme Cl^- et OH^- , la morphine (parmi d'autres alcaloïdes phénoliques) est adsorbée de l'extrait avec un rendement de 98-99% et la codéine (parmi d'autres alcaloïdes non-phénoliques) reste dans l'extrait. La morphine est ensuite desorbée, purifiée avec du NaHSO_3 et du charbon actif, purifiée comme bitartrate; l'on obtient ainsi un rendement de 92%. L'éluat, après le passage sur l'anionite,

contenant la codéine, est extrait avec du benzène et purifié comme sulfate pour obtenir la codéine à l'état pur.

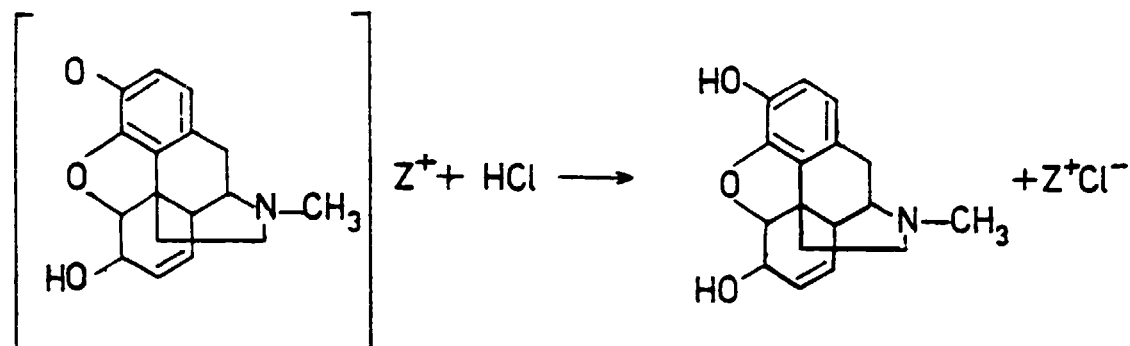
Le mécanisme d'échange ionique est le suivant:

(a) adsorption sur anionite:



où Z^+Cl^- = anionite de forme Cl^-

(b) désorption de la résine:



Une autre classe de produits naturels qui peuvent être séparés par la technique de l'échange ionique est celle des saponines.

Ainsi, Wolf Walter (13) indique une méthode de séparation des saponines de soya sur résine Dowex-1, de forme OH^- , à 50°C , par élution avec de l'acide acétique ou de l'acide propionique.

En utilisant comme éluant de l'acide propionique de concentrations comprises entre 1,5 N et 3 N, il a séparé les saponines en douze fractions, beaucoup d'entre eux étant constituées par deux ou plusieurs composants. Les fractions ainsi obtenues ont été hydrolysées et l'on a analysé les sucres et l'aglicone. L'acide glucuronique, le glucose, le galactose, le rhamnose, le xylose et l'arabinose y ont été identifiés. Trois fractions ont contenu le soysapogénole A, une fraction du soysapogénole E, quatre fractions du soysapogénole B et quelques petites quantités de soysapogénole C et D.

Kamphnis (4) extrait l'escine du marronnier d'Inde en utilisant une résine polystyrène-sulfonique, de forme H^+ .

Des méthyl-glycopyranosides des D-glucose, le D-mannose, le D-galactose, le 2-amino-2-déoxy-D-glucose, le 2-acetamido-2-déoxy-D-galactose ont été séparés avec de bons rendements, en utilisant des colonnes avec Dowex-1, de forme OH^- (9).

L'échange ionique est utilisé sur une grande échelle, pour la détermination et l'isolation des aminoacides dans les plantes, tel que décrit par Krishchenko (6). Les aminoacides sont séparés par la chromatographie sur colonne, en utilisant des cationites.

B I B L I O G R A P H I E

1. Aripov Kh.N. (1970) - Uzbekskij Himitcheskij Zhurnal, 12, (2), 84
2. Babaev B. (1972) - Himiija prirodnyh soedinenij, (5), 682
3. Ionescu Tudor (1964) - Schimbători de ioni (Echangeurs d'ions), Ed. tehnică, Bucarest
4. Kamphnis G. (1970) - Oesterreichische Apotheker Zeitung, 24 (29-30), 535-538
5. Karabaev Sh.Sh. (1972) - Himiija prirodnyh soedinenij, (5), 683
6. Krishchenko V.P. (1978) - Izvestia Akademii Nauk SSSR, Ser. Biol., (3), 405
7. Londono Jaime (1968) - Integral Ind., 27, 8, 10; d'après Chemical Abstracts, 72, 115135b (1970)
8. Mushinskaya S.Kh. (1972) - Himiko-farmatsevticheski Zhurnal, 6 (12), 34
9. Neuberger Albert - Carbohydrates Research, 1971, 56 (2), 281
10. Semonsky M., Zikan V. (1967) - Brévet tchécoslovaque No. I23689 - cl 12p C07d
11. Shostenko Iu.V. (1970) - Postep Dziedzinnie Leku Rosl. Pr. Ref. Dosw. Wygloszone Symp., 122; d'après Chemical Abstracts, 78, 101929 a) (1973)
12. Velea I., E. Nichiforescu - Brévet roumain No.56612 / 1971
13. Wolf Walter J. (1971) - Journal of Chromatography, 56 (2), 281
14. Vyas A.E. (1973) - Journal of Pharmaceutical Sciences, 62 (8), 1386
15. Vysotskaya E.S. (1969) - Trudy Voronezhskogo Gossudarstvennogo Universiteta, 72, 220
16. Vysotskaya E.S. (1973) - Zhurnal Fizicheskoi Himii, 47 (7)

PART VI

OBTENTION A L'ECHELLE INDUSTRIELLE DES TEINTURES,
EXTRAITS ET AUTRES COMPOSANTS INTERMEDIAIRES

Adrian Iuganu +)

+) Pharmacien, Chef de Secteur à l'Entreprise de Médicaments
"Biofarm", Bucarest, Roumanie

La connaissance de la médecine traditionnelle, son étude, peut conduire à d'importantes découvertes pour la santé humaine. Les plantes sont une source de matières premières inépuisable pour l'industrie des médicaments si l'humanité sait l'utiliser rationnellement. La nature offre, par les plantes, des principes actifs d'une grande diversité, dont l'homme ne peut se dispenser.

En dépit du fait qu'à présent la science ait fait des progrès impressionnants, il est très difficile, sinon impossible, de copier la nature au laboratoire, d'obtenir tous les principes actifs offerts par la nature dans sa grande diversité, avec des actions si complexes sur le corps humain.

Dans les derniers temps ont été réalisées, synthétiquement, quelques substances pures dont la composition chimique est semblable à celle des principes actifs existant dans les plantes; on connaît leur action pharmacodynamique, mais elle ne peut pas être comparée à l'action complexe des extraits de plantes, ce qui a déterminé l'essor des études des médicaments obtenus par extraction.

On peut donner des exemples qui plaident pour l'utilisation des extraits de plantes. Ainsi, il est connu que l'extrait total de belladonne a une action plus complexe sur l'organisme en comparaison de l'hyosciamine pure; il en est de même pour l'extrait total de digitale comparé à la digitaline.

Il résulte que l'efficacité d'un produit végétal ou d'un extrait ne se résume pas à l'activité du principe actif dominant, leur efficacité peut résulter de l'action de la totalité de leurs principes actifs et quelquefois de celle de certaines substances "ballast", susceptibles de décupler l'activité des principes actifs ou de prolonger leur action.

Cela justifie l'opinion de nombreux spécialistes qui recommandent l'utilisation des extraits de plantes quoique le principe actif soit disponible sous forme de substance pure.

Nous désirons relever un aspect très important pour les pays en développement, où l'industrie en général et l'industrie chimique en particulier ne connaît pas encore un développement

important, celui de l'utilisation des ressources naturelles, les plantes médicinales, dont on peut réaliser une vaste gamme de médicaments et qui ne nécessitent pas d'installations complexes.

L'obtention de teintures, extraits et huiles, de tablettes et dragées, contenant des extraits de plantes médicinales, peut assurer une gamme variée de médicaments (spécialement dans les pays où le climat favorise une flore diverse et riche et où cette matière première à bon marché est disponible pendant toute l'année).

L'industrie des médicaments réalise à présent de grandes quantités de solutions extraites qui sont livrées aux pharmacies pour la préparation de diverses prescriptions. La qualité de celles-ci est prévue dans les Pharmacopées internationales, en éliminant les possibilités de variation qualitative des petites quantités de teintures qui s'obtenaient autrefois dans les pharmacies.

Les teintures sont des solutions extraites alcooliques, hydroalcooliques ou éthéroalcooliques obtenues par des produits d'origine végétale. Elles sont simples ou composées, selon qu'elles contiennent des principes actifs d'un produit végétal ou de plusieurs produits et elles sont toujours colorées, d'où la dénomination "teintures" (mot latin: "tingere" = colorer).

Pour préparer une teinture, il faut tenir compte d'une série de facteurs qui peuvent influencer la qualité finale du produit et les rendements d'extraction.

Ces facteurs sont les suivants:

A. Pour le produit végétal

1. Nature du produit végétal:

- (a) le produit végétal frais (qui est indiqué d'être utilisé là où les plantes peuvent être traitées après la récolte, c'est le cas des entreprises emplantées près des cultures);
- (b) le produit végétal sec (en général utilisé dans l'industrie).

2. Humidité du produit

3. Degré de division, qui diffère pour:

- (a) les fleurs et les feuilles;
- (b) les racines, les rhizomes et les écorces;
- (c) les fruits et les graines.

3. Pour le solvant

1. Nature du solvant. Il faut tenir compte de la capacité d'imbibition du produit végétal pour favoriser l'osmose - la diffusion et la capacité de dissolution de la majorité des principes actifs. Le choix du solvant et de sa concentration se fait en tenant compte des substances qui sont extraites, ainsi que des substances inertes qui ne doivent pas être entraînées dans la solution.

2. La réaction du milieu. Pour favoriser l'extraction de certains principes actifs, en élevant ainsi le rendement de l'extraction, on utilise parfois des solvants acides ou alcalins, le pH et la concentration ayant une grande influence sur le rendement de l'extraction et les valeurs notées dans le processus technologique ont pour base des études de laboratoire et des expériences dans les stations pilotes.

3. Le rapport entre le produit végétal et le solvant. Pour une certaine quantité de plante qui est traitée, on utilise une certaine quantité de solvant, qui doit permettre l'extraction du principe actif par diffusion.

4. La durée du contact.

5. La température du solvant d'extraction.

C. Choix du procédé d'extraction

Dans l'industrie, le choix du procédé d'extraction du principe actif d'une plante médicinale dépend d'une série de facteurs qui, une fois corrélés, doivent conduire à l'obtention d'un produit de qualité et, en même temps, à un coût convenable.

Il faut tenir compte de la stabilité du principe actif dans le produit fini et, dans ce but, le solvant d'extraction a une grande importance. En fonction du solvant on choisira la méthode d'extraction qui doit permettre d'obtenir des rendements d'extraction les meilleurs, alors que le temps du travail doit être le plus court possible, afin de bien utiliser les équipements.

Chaque procédé d'extraction présente des avantages et des inconvénients, le choix de la méthode pouvant être influencé, en principal, par les conditions existant dans le pays où l'obtention du produit a lieu.

Ainsi, l'existence d'une main d'oeuvre à bon marché et le manque de fonds pour l'acquisition d'équipements complexes ainsi que de matériaux nécessaires pour ces équipements, peuvent déterminer le choix d'une méthode d'extraction plus simple, plus lente, mais qui conduit à un produit correspondant du point de vue pharmacodynamique.

Nous considérons que dans les pays en développement, où l'industrie ne peut fabriquer sur place la majorité des installations pour l'extraction et l'industrie chimique ne peut assurer une gamme variée de solvants et d'autres matériaux, il est recommandable de commencer par des installations pilotes pourvues d'équipements universels, et de passer graduellement à de procédés plus compliqués.

Un procédé d'extraction des plus simples est la macération qui consiste en l'extraction du principe actif d'un produit végétal divisé, en maintenant en contact le mélange plante-solvant un temps déterminé, à la température ambiante, et effectuant ensuite une agitation et finalement une séparation de la solution extraite. Dans l'industrie, ce procédé est utilisé comme une opération préliminaire à la préparation des teintures et des extraits, ayant pour but l'imbibition de la plante avec du solvant pour extraire le principe actif par osmose et diffusion.

Une variante de ce procédé d'extraction par macération est la turbo-extraction et consiste dans l'agitation mécanique du solvant et de la plante. Le procédé a l'avantage qu'il diminue beaucoup le temps d'extraction mais, en même temps, a l'inconvénient que la solution extraite contient outre le principe actif beaucoup de substances-ballasts qui doivent ultérieurement être éliminées.

Dans l'industrie des médicaments de Roumanie, le procédé est utilisé non pas pour l'obtention de teintures ou d'extraits, mais comme première phase dans des procédés technologiques complexes d'obtention de substances pures, qui comportent également

des opérations de purification.

Dans l'industrie des médicaments, pour l'obtention des teintures et des extraits on utilise couramment la percolation, qui consiste en l'extraction des principes actifs des plantes à l'aide d'un solvant qui traverse le produit végétal divisé. Les principes actifs sont cédés par les plantes par osmose et le solvant traverse les plantes sous l'action de la gravitation. Le procédé peut être considéré comme une succession de macérations de courte durée. Etant donné que le procédé ne présente pas de difficultés, nous montrerons les phases d'obtention d'une teinture à l'aide de la percolation, qui sont les suivantes:

- . Analyse qualitative des matières premières utilisées pour l'obtention de la teinture;
- . broyage de la plante médicinale qui contient le principe actif, le degré de division variant en fonction de la drogue utilisée (feuilles, herba, racines, rhizomes, fruits, semences);
- . préparation de l'équipement qui est, dans notre cas, le percolateur;
- . préparation du solvant d'extraction (généralement, un solvant hydroalcoolique d'une certaine concentration);
- . humectation de la plante par le solvant d'extraction (en cas de macération simple);
- . chargement de la plante humectée dans le percolateur pour effectuer l'extraction;
- . recouvrement de la plante par le solvant d'extraction;
- . percolation répétée et prélèvement des solutions extraites;
- . homogénéisation des solutions extraites en obtenant la teinture;
- . sédimentation de la teinture à une certaine température;
- . filtration de la teinture sédimentée;
- . analyse qualitative de la teinture filtrée.

Lors de l'obtention des extraits fluides par le procédé de percolation à l'aide d'un seul percolateur, on utilise un procédé technologique semblable à celui décrit plus haut en

exceptant le point - percolation répétée et collecte des solutions extraites - qui est modifié comme suit:

1. On pratique une première percolation équivalant à 30% de la quantité finale d'extrait fluide, qui doit être obtenu en fonction de la quantité de drogue utilisée et qui représente la première partie de l'extrait fluide (P.I);
2. des percolations multiples et des prélèvements des solutions extraites (opérations répétées jusqu'à l'épuisement de la drogue en principes actifs), qui après homogénéisation sont concentrées sous basse pression, à une certaine température (ne dépassant pas 70°C) jusqu'à une certaine quantité, équivalant à 20% de la quantité finale d'extrait qui doit être obtenue et qui représente la deuxième partie de l'extrait (P.II).

P.I et P. II sont homogénéisées en obtenant l'extrait fluide.

Pour l'obtention des extraits fluides, qui contiennent des principes actifs qui sont détruits par la température ou qui sont volatiles et dont on ne peut effectuer la concentration, on utilise une série de percolateurs où la solution extraite passe plusieurs fois sur des quantités égales de drogue, jusqu'à une concentration en principes actifs de la solution extraite expérimentalement déterminée et qui sera vérifiée par l'analyse finale de l'extrait.

Les teintures et les extraits fluides peuvent être obtenus par d'autres méthodes, moins utilisées, qui sont les suivantes :

. vibro-extraction basée sur l'agitation du mélange drogue-solvant à l'aide de vibrations électromagnétiques de grande fréquence et de basse amplitude;

. extraction à l'aide d'ultrasons - les rendements d'extraction sous l'influence des ultrasons dépendent du temps ainsi que de la fréquence et de l'intensité. Pour chaque principe actif, ces paramètres ont des limites assez serrées.

Des extraits "spiss" (mous) s'obtiennent en industrie, en cas de matériaux végétaux contenant des principes actifs thermorésistants et qui ne se perdent pas par concentration sous vide. Une phase existant dans tous les procédés technolo-

giques d'obtention des extraits "spiss", indifféremment de la méthode utilisée, est la concentration des solutions extraites sous vide jusqu'à l'obtention d'une masse molle, avec une humidité au dessous de 20%. Pour cette catégorie d'extraits, la concentration en principes actifs est plus grande que pour les teintures et les extraits fluides. Les extraits spiss s'obtiennent généralement par les procédés industriels suivants :

- . extraction par percolation dans un seul percolateur
- . extraction par percolation dans une série de percolateurs
- . turbo-extraction
- . extraction du principe actif d'une drogue par décoction. L'opération a lieu dans un équipement pourvu de chauffage. Le mélange drogue-solvant peut être agité ou non pendant la décoction. Mais on préfère l'agitation car l'extraction a, dans ce cas, des rendements supérieurs. En général, dans ce procédé, le solvant est l'eau et la température qui doit être atteinte est celle de l'ébullition de l'eau. Un inconvénient de la décoction est le fait que, pendant l'extraction à chaud et sans agitation, l'extrait aqueux se charge d'une série de substances-ballasts qui doivent être éliminées par filtration. En même temps, la plante étant imbibée d'une grande quantité de solvant, il est indiqué que celui-ci soit exprimé après l'écoulement de la solution extraite pour obtenir des rendements supérieurs.

La solution, qui résulte après le pressage de la drogue épuisée contient beaucoup de substances-ballasts qui doivent être éliminées par filtration, opération qui implique parfois des problèmes concernant le choix du matériau filtrant. En général, cette filtration a lieu sous vide ou sous pression pour réduire le temps de travail. Un avantage de la méthode est qu'on utilise comme solvant l'eau d'un coût bien plus réduit que les autres solvants.

- . la percolation à chaud est quelquefois utilisée dans l'industrie pour l'obtention de solutions extraites qui conduisent à l'obtention d'extraits "spiss" ou "sicc" (secs) procédé

qui conduit à des rendements plus grands d'extraction que la percolation simple sur un seul élément, la température influençant une série de processus physiques, la solubilité des substances, la diffusion. La température du régime est de 40 à 50°C, et le solvant utilisé est en général de nature hydroalcoolique. L'élément d'extraction utilisé est un percolateur aux parois doubles (chemise). Le mélange plante-solvant ne s'agite pas, alors que la solution extraite contient moins de substances-ballasts que dans le cas de l'extraction par décoction; il est néanmoins nécessaire de faire une filtration avant la concentration pour l'obtention de l'extrait "spiss" final.

D'autres procédés d'obtention d'extraits spiss ou sicc, moins utilisés, sont les suivants :

- (a) percolation sur un seul élément ou une série d'éléments où la solution extraite est obligée de traverser la drogue de haut en bas à l'aide de la pression.
- (b) percolation sur un élément ou une série d'éléments où le prélèvement de la solution extraite se réalise à l'aide du vide.
- (c) extraction du principe actif d'une drogue placée dans un appareil d'extraction, par introduction du solvant sous pression à la base, et le prélèvement du produit à la partie supérieure.
- (d) extraction en continu à l'aide d'équipements complexes où la plante est introduite en quantité déterminée par unité de temps et le solvant d'extraction est également introduit dans de quantités constantes; celui-ci est obligé de parcourir la colonne de drogue en sens inverse du mouvement de la plante au moyen d'une vis sans fin; la solution extraite est collectée près de l'endroit où la plante est introduite, alors que la plante épuisée est éliminée près de l'endroit d'introduction du solvant frais.

Les extraits spiss sont à présent utilisés pour l'obtention de certains produits pharmaceutiques, leur temps de conservation jusqu'à leur utilisation comme matières premières étant

écourté, parce que les extraits spiss peuvent être contaminés par des champignons et en même temps ils peuvent perdre une partie de l'eau qu'ils contiennent, ce qui conduit à une concentration en principes actifs qui fausse la normalisation. Le dernier temps on remarque le fait que ces extraits sont de moins en moins utilisés dans les pharmacies à la préparation des prescriptions étant remplacés par des extraits sicc, plus stables dans le temps, et dont les limites de concentration en principes actifs sont assez étroites, pouvant conduire à l'obtention de produits pharmaceutiques normalisés.

Pour l'obtention des extraits sicc, on utilise le même procédé d'extraction que pour les extraits spiss, jusqu'à la phase de concentration. En fonction du principe actif dominant dans l'extrait sicc que nous désirons, suivent des opérations technologiques supplémentaires:

. quelquefois l'extrait spiss est séché dans des appareils où la température peut être contrôlée continuellement et elle peut être réglée à chaque moment ou dans des appareils dans lesquels on peut réaliser une basse pression; en général, la température de séchage ne doit pas dépasser 50°C;

. d'autres fois, pour éliminer les substances-ballasts on a recours à des opérations de purification avec divers solvants pour l'obtention d'un extrait sicc final, facilement dosable, et une action pharmacodynamique bien précisée; l'opération est suivie d'une nouvelle concentration et puis du séchage;

. quand le principe actif prédominant dans l'extrait sicc, a une forte action pharmacodynamique s'impose quelquefois la dilution des extraits sicc, en fonction d'une analyse intermédiaire, jusqu'aux limites des concentrations imposées par les normes de qualité. La dilution se fait avec des substances bien tolérées par l'organisme et qui ne doivent pas entrer en réaction avec le principe actif extrait. En général, on utilise dans ce but la lactose et la dextrine.

Les extraits sicc ont une tendance à l'hygroscopicité qui doit être combattue parce que l'augmentation de l'humidité peut déterminer des réactions chimiques qui peuvent entraîner

également le principe actif, qui se dégrade dans le temps, et, lorsque ce phénomène ne se produit pas, la concentration en principe actif baisse par l'augmentation de l'humidité du produit. La tendance de capter l'eau est réduite, quand les extraits secs se présentent sous forme de granulés, ceux-ci ayant une surface plus petite de contact avec le milieu ambiant lorsqu'ils se présentent sous forme pulvérulente.

En ce qui concerne l'extraction des principes actifs purs, on utilise, en général, les méthodes d'extraction décrites plus haut, en y ajoutant les suivantes :

. extraction liquide-liquide ayant pour but la réduction des quantités utilisées et l'élimination des quantités de ballast;

. adsorption du principe actif sur un support inerte en vue de le faire passer dans un autre solvant. L'opération s'effectue dans les buts suivants :

- (a) assurer une stabilité plus grande au principe actif;
- (b) réduire les volumes à manipuler, tenant compte du degré de solubilité du principe actif dans le nouveau solvant;
- (c) assurer les meilleures conditions pour les phases suivantes du travail: purifications par filtration, précipitations, cristallisations, dissolutions, recristallisations et séchages.

Parmi les nombreuses méthodes d'extraction végétale hormis celles décrites, il convient de citer encore deux qui sont utilisées dans l'industrie et qui présentent des avantages économiques. Il s'agit de l'extraction des plantes contenant des principes actifs thermostables à l'aide de petites quantités de solvant, dans lequel le principe actif est très soluble, et ayant un point d'ébullition peu élevé, l'opération étant effectuée dans un appareil de type Soxhlet.

Le deuxième procédé consiste en l'entraînement à la vapeur d'eau des principes actifs volatiles et traitement ultérieur du distillat contenant les principes actifs jusqu'à l'obtention d'un produit final stable et dans des limites de

concentration désirées.

De ce qui précède nous pouvons conclure que l'extraction des principes actifs des plantes peut se faire par de nombreuses méthodes et nous considérons que pour chaque plante il existe un procédé général comportant quelque modifications spécifiques.

L'industrie des médicaments basée sur des extraits des plantes, même si elle se base sur l'expérience populaire, parfois multiséculaire, n'utilise qu'une petite partie des plantes à effets curatifs.

L'industrie des médicaments basée sur les plantes médicinales, même au XII-e siècle quand on a développé une industrie chimique de synthèse et qui a fait d'immenses progrès, n'a pas encore dit son dernier mot, mais au contraire, elle est aujourd'hui au début d'une période d'essor, surtout dans les pays qui ont une flore très riche qui cache beaucoup de remèdes pour de nombreuses maladies.

PREPARATION DE POUDRES ACTIVES SOLUBLES
A PARTIR D'EXTRAITS VEGETAUX

Ileana Popescu +)

+) Pharmacienne, chercheur à l'Institut de Recherches
Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

Dans le but de moderniser le mode d'administration des produits d'origine végétale, destinés à l'usage alimentaire ou thérapeutique, des nouvelles formes de présentation ont fait leur apparition un peu partout dans le monde: poudres, granulés ou tablettes à solubilisation instantanée. Ces nouvelles formes de présentation confèrent aux produits d'origine végétale une meilleure conservabilité, un stockage et un transport plus faciles, tout en assurant aux produits pharmaceutiques un dosage exact des principes actifs et une administration simple.

Les procédés utilisés pour préparer des produits instantanés ont pour but d'obtenir des poudres non-hygroscopiques, mobiles, qui permettent de reconstituer les produits de base par simple addition d'eau, tout en maintenant la couleur, la viscosité, l'arôme, le goût - pour les produits alimentaires, et les caractéristiques de la matière végétale, aussi bien que l'intégrité des principes actifs - pour les produits thérapeutiques.

La littérature spécialisée donne des indications sur les méthodes de préparation des produits instantanés alimentaires, par exemple ceux obtenus des jus de fruits, de thé, café, etc, procédés applicables également aux produits médicamenteux instantanés.

Les procédés technologiques d'obtention des poudres instantanées comprennent, en général, les phases suivantes:

- (1) Extraction des principes actifs;
- (2) Séparation et clarification des extraits;
- (3) Concentration des extraits;
- (4) Conditionnement des extraits.

I. EXTRACTION DES PRINCIPES ACTIFS

L'extraction des principes actifs des plantes se fait par l'eau, soit en utilisant la matière végétale telle quelle ou après fermentation de la plante avec une propre enzyme, une autre enzyme ou par fermentation alcoolique.

1. L'extraction à l'eau chaude se fait à une température

de 60° à 100°C; le temps d'extraction varie suivant la nature du matériau végétal (entre 5 minutes et 2 heures); l'extraction sous pression (2 Kgf/cm²) dure entre 10 minutes et 1 heure (6, 7, 8, 9).

2. La fermentation de la plante, suivie d'une extraction à l'eau chaude, s'effectue, en général, quand on utilise de la substance végétale fraîche. La plante fraîche est maintenue pendant 12-18 heures sous vide, soumise à fermentation pendant une heure et ensuite à l'extraction à l'eau chaude (6). Un autre procédé indique le chauffage à 60-70°C, une fermentation (avec des ferments sélectionnés) pendant 90 minutes et l'extraction des principes actifs par une solution aqueuse de NaCl à 2-4% (11) (voir Schéma 1).

3. La fermentation alcoolique a lieu dans une solution aqueuse contenant du sucre à 10%, la drogue à 4-5% et une solution de levure (Fungi imperfecti, Endomycetales). La fermentation se fait sous vide à 20-25°C, pendant 48 heures, à un pH de 3,5-4. L'extrait comprendra finalement 0,5% d'alcool éthylique (12). Une autre méthode (13) prévoit la fermentation du suc séparé après pressage de la plante verte humectée à 5% avec de l'eau, à 40-50°C. La fermentation a lieu sous vide, pendant 6-8 heures.

4. L'hydrolyse enzymatique permet d'obtenir un extrait plus riche en substances qu'on peut extraire par l'eau que celui obtenu par simple extraction du matériau végétal à l'eau chaude. L'hydrolyse enzymatique a lieu lorsqu'on utilise de la pectinase à 50°C, pendant 30 minutes (7, 11), des cellulases d'Aspergillus niger à 50°C, pendant 4-5 heures (2), des cellulases de Trichoderma viride et une enzyme de Rhizopus (solution à 0,6%) à 40°C, pendant 2 heures, à pH = 5,6 (4) (voir Schéma 2).

II. SEPARATION ET CLARIFICATION DES EXTRAITS

On obtient la séparation des extraits par centrifugation ou filtration, opérations qui peuvent être précédées par un refroidissement à 5°-10°C (10, 12, 25), la désactivation des enzymes en modifiant le pH, ou en chauffant à 70°-90°C (11).

Pour clarifier les extraits on utilise des filtres poreux

avec ou sans addition de cellite ou bentonite, ou en traitant l'extrait avec du CaCl_2 , en refroidissant à $10^\circ\text{-}20^\circ\text{C}$ et en centrifugeant (20). En général, pour les extraits obtenus par fermentation on utilise un barbotage d'oxygène pendant 15-20 minutes à $70^\circ\text{-}90^\circ\text{C}$, suivi d'un barbotage de vapeurs d'eau à 100°C pour enlever l'odeur de l'extrait (suivant le cas) avant ou après centrifugation.

Lorsque le sédiment séparé par centrifugation ou filtration contient des substances indispensables à la conservation des qualités caractéristiques de la substance végétale, il est nécessaire qu'il soit resolubilisé et ajouté à l'extrait. La solubilisation du sédiment s'obtient par oxydation alcaline d'une dispersion aqueuse des substances insolubles, à $\text{pH} = 9\text{-}10$, suivie de la décoloration de la solution obtenue en la traitant par des composés du soufre: bioxyde de soufre, acide sulfureux, sulfite ou bisulfite (20).

Dans la même situation, on préfère parfois d'éviter la formation du dépôt, en ajoutant des stabilisants, comme les acides alginique ou pectique, ou la cellulose. Grâce à ses puissantes propriétés polaires, l'acide alginique attire les groupes amino des molécules de protéine dans le dépôt formé, en retardant considérablement le processus de sédimentation. On peut aussi utiliser en guise de stabilisateurs des protéines solubles: la gélatine ou la caséine. L'addition de sels: carbonate, bicarbonate, phosphate, polyphosphate, citrate, borate ou silicate d'ammonium ou de lithium, sodium, potassium, magnésium, calcium, favorise l'effet stabilisateur (6).

III. CONCENTRATION DES EXTRAITS

Afin d'obtenir une poudre instantanée les extraits végétaux clarifiés seront concentrés jusqu'à une teneur de 25 à 60% de substance solide et, dans certains cas, même jusqu'à 80%. Un traitement thermique énergique conduit à la perte ou à la dégradation des huiles volatiles ou des substances aromatisantes de certains extraits; dans ce cas, il faut choisir une méthode adéquate de concentration.

Des études effectuées sur la modification de la composition de l'extrait, suivant le mode de concentration, ont montré qu'il est nécessaire de choisir pour chaque extrait un procédé adéquat de concentration.

IV. CONDITIONNEMENT DES EXTRAITS

Le conditionnement des extraits végétaux liquides sous forme de poudres solubles suppose l'utilisation d'un procédé de dessiccation. Les procédés classiques de dessiccation par pulvérisation, sous vide, sur tambour, dans l'écume ou par congélation, comportent de nombreuses difficultés d'ordre pratique et économique.

1. La dessiccation par pulvérisation (atomisation) ne représente pas une solution satisfaisante à cause des conditions sévères de chauffage (la température d'entrée de l'air est comprise entre 145° et 160°C et la température de sortie - entre 90° et 105°C), ce qui détermine la perte des composés volatils aromatisants dans une proportion de 60 à 80%. En outre, le produit qui en résulte est extrêmement hygroscopique, en raison de la caramélisation produite par la chaleur. L'atomisation peut se faire en présence ou non d'un support (15,21).
2. La dessiccation sous vide conduit aussi à la perte par évaporation de quantités considérables des composés volatils (21).
3. La dessiccation sur tambour ne peut pas être utilisée pour les extraits contenant une grande quantité de sucres, car il se forme une masse gommée qui s'accumule sur la surface et empêche la dessiccation (21).
4. La déshydratation par formation d'une pellicule d'écume exige l'utilisation d'un agent formateur d'écume qui mène à la formation d'une multitude de bulles microscopiques qui constituent une large surface favorisant la dessiccation rapide de l'extrait. Ce procédé a l'inconvénient que les poudres obtenues contiennent souvent des bulles d'air microscopiques qui peuvent périlcliter la stabilité et l'aspect de la solution obtenue par dissolution.
5. Parmi les procédés classiques de dessiccation, la lyo-

lyophilisation donne les produits les plus acceptables, la perte des substances aromatisantes volatiles étant beaucoup plus réduite que lors de l'atomisation, mais le procédé est moins économique. Par ce procédé l'humidité disparaît par la sublimation des molécules d'eau du produit congelé (-12°C , -70°C) sous un vide poussé (15-500 μ) et suffisamment chauffé pour produire la sublimation sans faire fondre le produit (-12°C à -43°C).

Une variante de ce procédé prévoit la transformation de l'extrait dans une écume avant d'être congelé, par l'introduction d'un gaz inerte dans l'extrait: anhydride carbonique ou azote.

La lyophilisation peut se faire avec ou sans addition d'un support dans une proportion de 20% (1, 3, 5, 14, 18, 19, 21, 22).

6. Un procédé de dessiccation ayant des avantages sûrs d'ordres pratique et économique est la dessiccation par adsorption sur support, qui permet aux produits de conserver leurs substances aromatiques et volatiles et d'obtenir des poudres non-hygroscopiques, stables. Les substances utilisées comme support sont des hydrates de carbone: dextrose, saccharose, maltose, xylose, amidon, polyalcools (xylitol, mannitol, sorbitol) (25). On choisit le support en fonction de la destination du produit. Lorsque l'amidon représente le support, il est nécessaire d'ajouter un agent qui empêche la fermentation, comme les acides salicylique ou tartrique. Le procédé de dessiccation sur un support consiste dans la transformation de l'humidité présente dans l'extrait concentré, en une forme d'humidité intérieure ou liée aux molécules du support, laissant seulement une quantité négligeable d'humidité disponible pour humecter les autres particules.

L'hydratation du support est accélérée par le chauffage du mélange extrait-support, pendant ou après le mélange (21).

(a) La préparation de produits granulés instantanés par dessiccation sur support comporte les phases suivantes: la réélisation d'un mélange homogène de l'extrait concentré avec un support à 70-85%, l'obtention du granulé dans un appareil ordinaire à granuler et la dessiccation sous un courant d'air chaud à 40° - 60°C (23).

Le traitement thermique qui intervient dans certaines

phases de la préparation des poudres de solubilité instantanée conduit à la perte partielle des huiles volatiles et de certaines substances aromatisantes. Pour conserver ces composants, certains procédés prévoient leur séparation de la matière première végétale avant l'extraction des substances solubles, et l'addition des composants respectifs dans l'extrait ou dans le produit final.

(b) Les méthodes de séparation de ces composants volatils sont:

(a') L'extraction par solvants volatils: alcool éthylique, éther de pétrole, hydrocarbures halogénés, acétone, le solvant étant éliminé par distillation à une température modérée, de préférence au-dessous de 30°C; les substances aromatiques sont suspendues dans l'eau ou l'alcool éthylique et incorporées ensuite, par pulvérisation, dans le produit fini instantané, ou dans un hydrate de carbone pulvérulent ajouté ultérieurement au produit instantané, ou bien elles sont incorporées à l'extrait et l'opération finit par la dessiccation par lyophilisation (24).

(b') L'entraînement à la vapeur d'eau des composants volatils à la pression atmosphérique et à une température de 82° à 110°C et leur condensation à 2°C, dans une atmosphère d'azote.

Ils peuvent être ensuite incorporés à l'extrait ou à la poudre (18).

(c') Les procédés modernes utilisent un courant liquide de CO₂ pour entraîner les huiles volatiles et les substances aromatiques qui sont ensuite ajoutées au produit fini (16,17,18,19) (voir Schéma 3).

(d') Un autre procédé destiné à préserver les composants aromatiques est la lyophilisation de l'extrait à 5-30%, le produit qui en résulte étant ajouté au reste de l'extrait (70-95%) atomisé au préalable. La quantité d'extrait soumis à la lyophilisation est calculée de sorte qu'elle assure au produit fini l'arôme caractéristique (19).

V. EXEMPLES DE REALISATIONS ROUMAINES

Pour introduire en Roumanie des médicaments d'origine végétale ainsi conditionnés, on a étudié l'adaptation des

divers procédés indiqués par la littérature pour obtenir des poudres alimentaires . La mise au point des technologies a eu en vue: la nature des principes actifs, leurs solubilité et stabilité et les possibilités d'utiliser les installations industrielles existantes. On a étudié également le solvant d'extraction, le rapport drogue/solvant, le temps d'extraction, la température, la pression, le mode d'extraction, les procédés de purification de la solution extractive et de conditionnement. Ces études ont abouti à l'élaboration de deux procédés généraux, qui peuvent être appliqués tenant compte des principes actifs contenus dans la substance végétale.

1. Procédé I

Le matériau végétal stabilisé par inactivation des enzymes à 90°-95°C est extrait à l'eau à la pression de 2 Kg/cm² et à la température de 120°C. L'extrait, séparé par centrifugation ou filtration, est concentré jusqu'à une densité de 1,05-1,10 g/cm³, purifié par l'acétone ou l'alcool éthylique dans un rapport de 1 à 1 et sédimenté à 1°-5°C pendant 18 heures. L'extrait hydroacétonique ou hydroalcoolique est séparé par centrifugation et le solvant éliminé par distillation. L'extrait est concentré jusqu'à une densité entre 1,10 et 1,20 g/cm³. Pour aboutir à l'obtention d'une poudre de solubilité instantanée, l'extrait est atomisé, en y ajoutant de la lactose à 10-20%, ou séché sur un support de mono- ou disaccharides anhydres (voir Schéma 4).

2. Procédé II

La substance végétale contenant des huiles volatiles est soumise à l'entraînement à la vapeur d'eau pour isoler les huiles volatiles; en même temps on réalise l'extraction des principes actifs solubles dans l'eau. Les extraits seront traités ensuite comme décrit au procédé I (voir Schéma 5).

Le procédé I a servi à préparer des produits à action cholagogue et diurétique et le procédé II - des produits sédatifs et d'amélioration des fonctions gastriques (26,29,27,28).

Pour les produits mentionnés nous avons choisi des plantes médicinales connues pour leur action pharmacodynamique, en tenant compte des possibilités d'en procurer des quantités

suffisantes pour l'industrie. Le rapport entre les différentes plantes dans les formules respectives a été obtenu sur la base de l'étude pharmacodynamique et le contrôle physico-chimique.

3. Médicaments à action cholagogue

L'étude pharmacologique a conduit à la formule suivante contenant un mélange de Folium Cynarae, Herba Taraxaci, Herba Hyperici, Herba Chelidonii. Les principes actifs connus pour leur activité cholagogue sont: les dérivés mono- et dicaféilquiniques, flavoniques, l'hypéricine et les alcaloïdes au noyau phénantridinique.

En appliquant le procédé I, on a obtenu une poudre granulée contenant des polyphénols cynariniques à 0,3 g% et flavoniques à 0,1 g%; l'hypéricine et les alcaloïdes de Herba Chelidonii sont mis en évidence par des réactions d'identification qualitatives spécifiques.

4. Médicaments à action diurétique

Dans la composition de ces produits entrent quelques espèces médicinales connues pour leurs actions diurétiques et anti-septiques des voies urinaires.

Les principes actifs responsables pour l'action diurétique appartiennent à la classe des polyphénols flavoniques, des saponines et des huiles volatiles. La solution extractive a été préparée suivant le procédé I, car la petite quantité d'huile volatile renfermée dans les plantes ne justifie pas la consommation d'énergie nécessaire pour leur séparation par entraînement à la vapeur d'eau.

Le conditionnement de la solution extractive purifiée se fait comme pour les produits présentés plus haut, par granulation sur un support de lactose et l'incorporation des huiles volatiles dans le produit granulé.

5. Médicaments à action sédative

Parmi les espèces médicinales connues pour leur action sédative on a choisi les plantes moins toxiques et qui ne provoquent pas de dépendance. Le rapport entre les diverses plantes a été établi en se basant sur les résultats pharmacologiques: Rhizoma et Radix Valerianae, Strobuli Lupuli, Flores

Tiliae, Herba Leonuri, Folium Crataegi, Herba Dracoccephali.

Les principes actifs responsables pour l'action sédative sont: les huiles essentielles, les dérivés triterpéniques, la léonurine et certains dérivés flavoniques. La solution extractive a été préparée selon le procédé II.

La solution extractive purifiée a été amenée sur un support de lactose, les huiles volatiles étant incorporées après granulation et séchage à 60-70°C.

6. Médicament améliorant les fonctions digestives

Dans la composition de ce produit entrent les espèces médicinales suivantes: Herba Cnici benedicti, Herba Taraxaci, Herba Centauri, Fructus Carvi, Flores Millefolii, Flores Calendulae, Radix Symphiti et Herba Menthae. Le produit améliore les troubles digestifs, ayant une action eupeptique et stomachique, aussi bien qu'une action cholagogue, spasmolytique et cicatrisante.

Ce produit a été obtenu dans des conditions optimales concernant l'activité pharmacologique et l'aspect général, en appliquant le procédé II, dans des conditions similaires à celles utilisées pour le produit à action sédative.

Le produit se présente comme une poudre granulée à odeur et goût caractéristiques, dans laquelle on a mis en évidence des huiles volatiles totales, le bornéol, la carvone, le menthol et des dérivés mono- et dicaféylquiniques.

Les exemples présentés montrent que les procédés d'extraction employés peuvent être appliqués pour obtenir des produits utilisés comme tisanes médicinales.

Mentionnons aussi que les études effectuées ont montré que le procédé ne peut être utilisé pour les drogues ayant une grande teneur d'amidon ou des principes actifs difficilement solubles dans l'eau, tel le cas de Rhizoma Rhei.

Les procédés d'extraction offrent l'avantage d'une valorisation supérieure des plantes médicinales, la consommation spécifique de matière végétale étant de 20 à 30% seulement, par rapport à celle utilisée pour la préparation des tisanes.

En conclusion, on a mis au point deux procédés pour préparer des extraits ayant une action pharmacologique spécifique; les produits s'obtiennent sous forme de poudre granulée, à solubilité instantanée dans l'eau. Ces procédés peuvent être appliqués à divers mélanges de plantes, sans leur apporter des modifications essentielles.

SCHÉMA 1

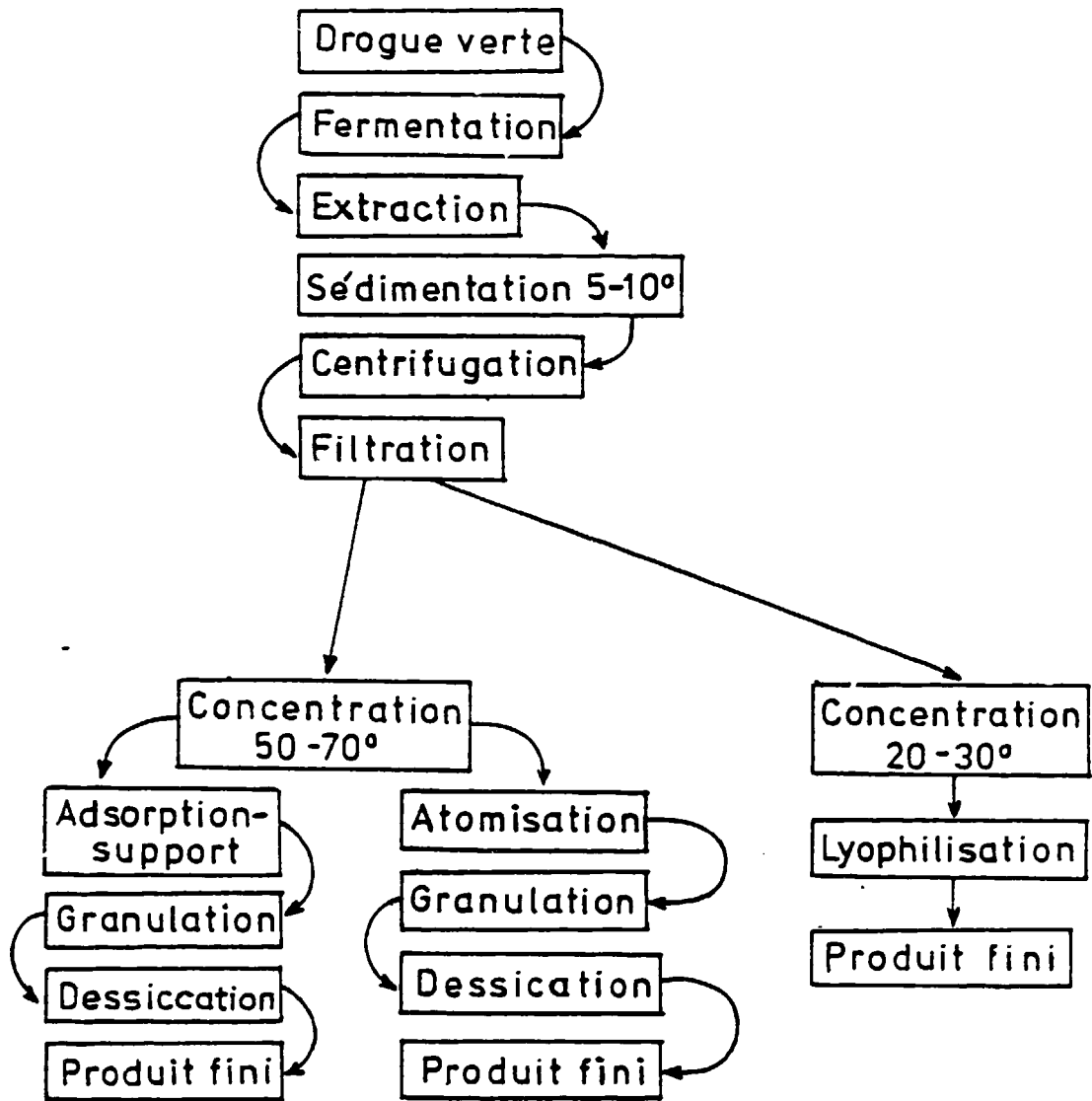


SCHÉMA 2

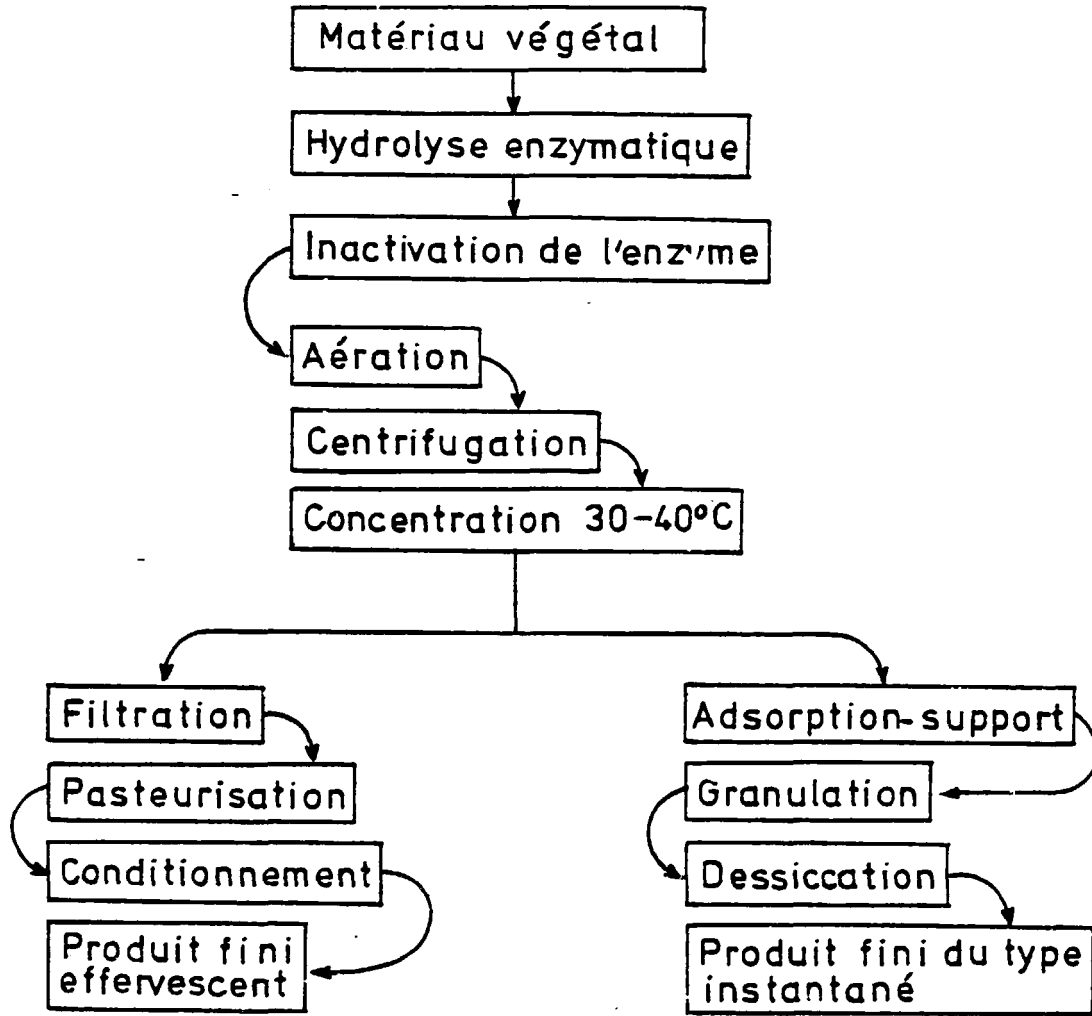


SCHÉMA 3

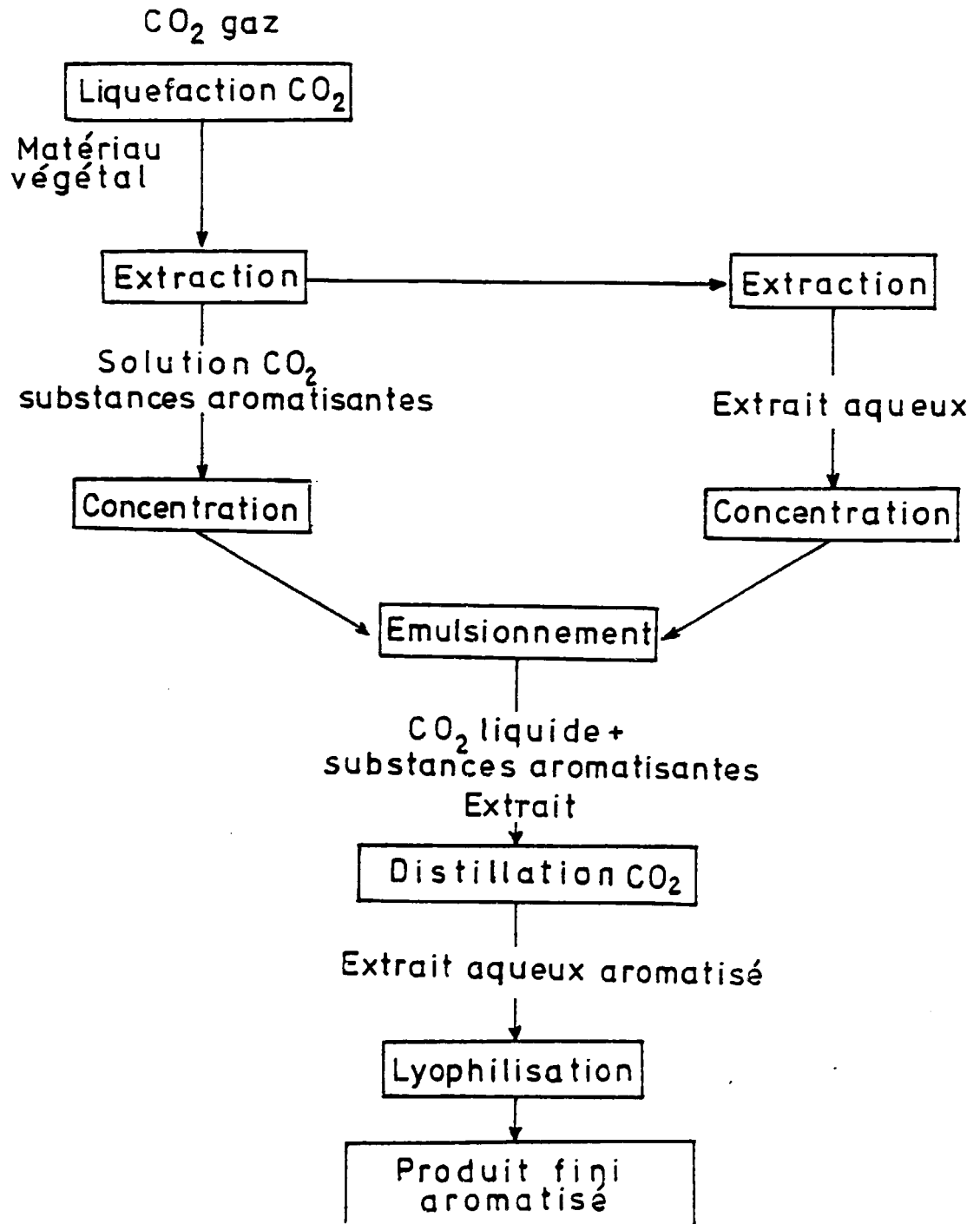


SCHÉMA 4

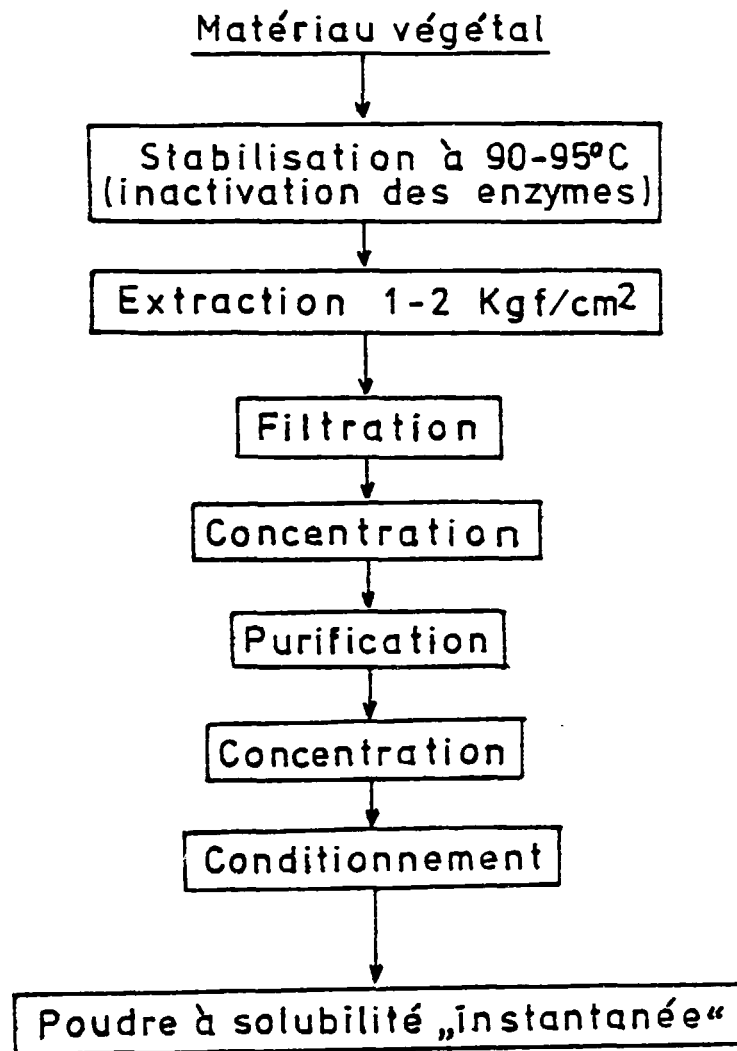
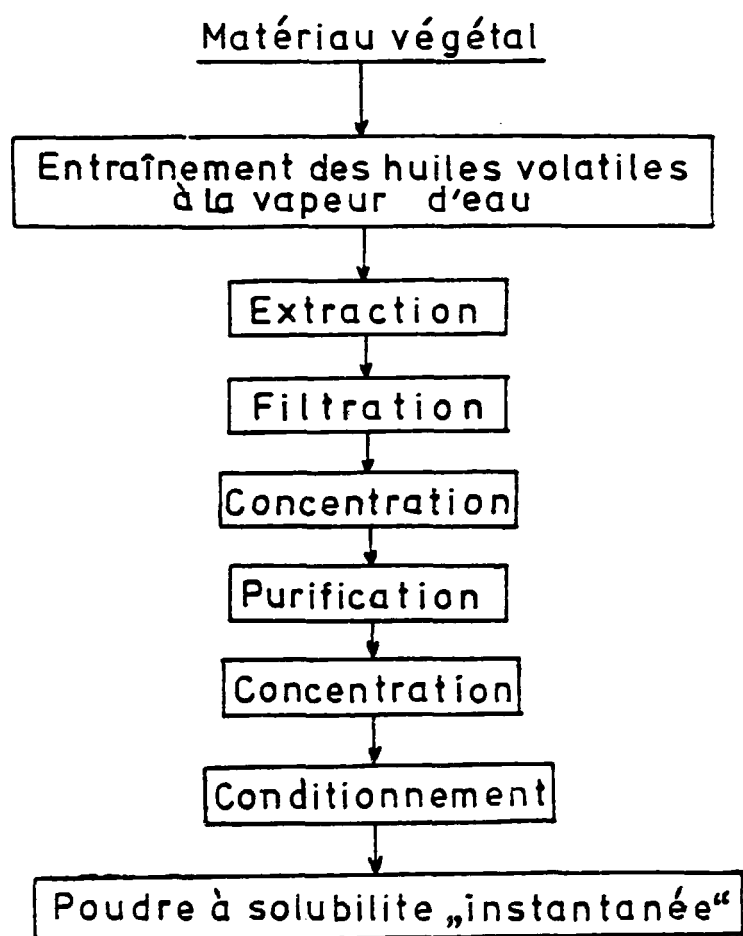


SCHÉMA 5



B I B L I O G R A P H I E

1. Jabarit A. (1969) - Ind. Alim. Agr., 36 (9,10), 1259-65,
cf. CA. 72, 99328 (1970)
2. Misaka Yutaka, Natsubara Makoto, Inuzuka Takeo (1968) -
Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai Shi, 15 (7), 306,
cf. CA. 70, 10516 (1969)
3. Sauvageot F. (1969) - Ind. Alim. Agr., 36 (1), 15-23,
(4) 529-37
4. Toyama Nobuo (1966) - Hakko Kagaku Zasshi, 44 (11), 830-4,
cf. CA. 69, 85539 (1968)
5. Thomas J. (1970) - Rev. Agrochim. Technol. Aliment., 10
(1), 96-104, cf. CA. 73, 65097 (1970)
6. + + + Brevet français 2.122.414
7. + + + Brevet britannique 1.200.700
8. + + + Brevet britannique 1.294.569
9. + + + Brevet britannique 1.319.439
10. + + + Brevet indien 126.158
11. + + + Brevet indien 123.382
12. + + + Brevet de la R.F. d'Allemagne 1.442.291
13. + + + Brevet de l'URSS 344.829
14. + + + Brevet des USA 3,483,038
15. + + + Brevet suisse 525.621
16. + + + Brevet suisse 525.623
17. + + + Brevet de l'URSS 227.527
18. + + + Brevet des USA 3,421,901
19. + + + Brevet suisse 434.946
20. + + + Brevet britannique 1.311.255
21. + + + Brevet français 2.148.194
22. + + + Brevet des USA 3,554,761
23. + + + Brevet français 1.554.084
24. + + + Brevet français 2.148.431
25. + + + Brevet indien 117.003
26. + + + Brevet roumain 66.407
27. + + + Brevet roumain 73.640
28. + + + Brevet roumain 73.675
29. Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest,
Roumanie - Procédé technologique sur pilote:
Technologie de préparation et de condition-
nement d'un médicament à action diurétique

ALCALOÏDES DERIVANT DU TROPANE

Constanța Rizescu +)

+) Docteur en chimie, chercheur à l'Institut de Recherches
Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

I. INTRODUCTION

Les alcaloïdes sont des composés azotés existant dans les végétaux (plus rarement dans les animaux) et qui sont doués de propriétés basiques. Ils appartiennent pour la plupart à la série hétérocyclique, ont une structure assez complexe et une forte activité pharmacodynamique.

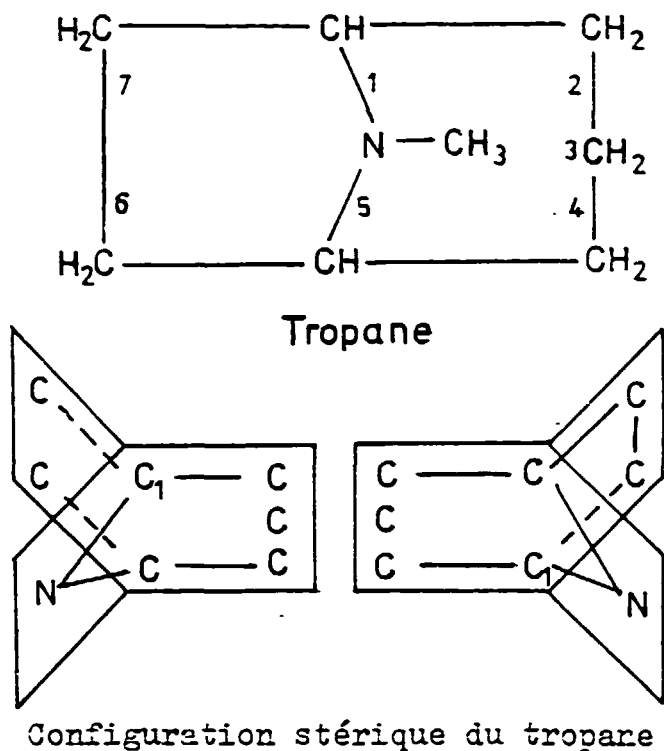
Les alcaloïdes dérivant du tropane représentent l'une des classes les plus importantes de substances naturelles utilisées par l'homme depuis très longtemps. Bien avant que la structure de ces alcaloïdes soit élucidée, l'action des extraits des plantes dont ils provenaient était connue et utilisée (13,20,27,29).

A côté de l'intérêt scientifique suscité par la détermination précise de la structure et de la biogenèse des alcaloïdes dérivés du tropane, il y a eu et il y a encore des préoccupations pour étudier leur action pharmacologique, en vue d'établir des rapports structure-activité, nécessaires à l'élaboration des modèles de produits de synthèse, pour l'amélioration et la modernisation des technologies d'extraction, d'isolement et de purification. Les recherches effectuées dans le but d'améliorer les plantes qui fournissent ces alcaloïdes ne sont pas non plus dépourvues d'intérêt, ayant pour but d'offrir à l'industrie une matière première de qualité et bon marché (2,7-13,17-29).

II. STRUCTURE CHIMIQUE DES ALCALOÏDES

Les alcaloïdes qui dérivent du tropane se trouvent dans différentes espèces de plantes appartenant aux familles des solanacées, convolvulacées, diascoréacées et érythroxyllacées; on en a isolé environ 25 alcaloïdes, ayant tous la composition d'un ester qui donnent par hydrolyse un acide et un amino-alcool.

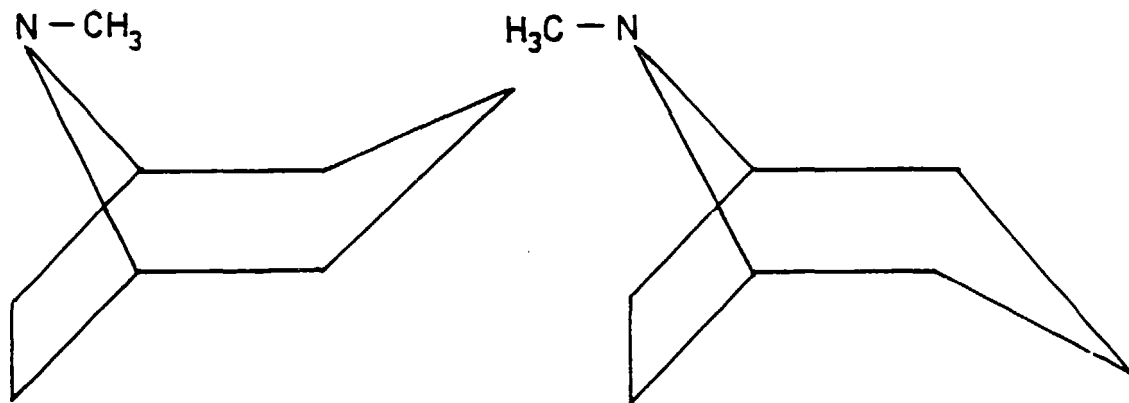
Les amino-alcools isolés dérivent du même produit fondamental, le tropane (1,3-6,14-16).



L'étude de la configuration des alcaloïdes dérivant du tropane, faite par Willstaetter, aux environs de 1900, et par A. Stoll, G. Fodor et d'autres, après 1950, représente un chapitre particulièrement attrayant de la chimie des alcaloïdes. Selon Willstaetter, le système cyclique du tropane s'étend sur trois plans qui s'entrecroisent sur la droite qui relie les atomes C₁ et C₅ (voir figure ci-dessus). Le tropane est donc une forme mezzo, optiquement inactive (les deux formules ci-dessus sont superposables). Cette situation n'est pas changée par l'introduction d'un groupement OH en C₃, la tropine et la pseudo-tropine étant aussi des formes mezzo optiquement inactives. Willstaetter a montré que ces deux amino-alcools sont des isomères géométriques résultant de la position cis ou trans du groupement OH par rapport au plan qui contient l'atome d'azote. Cette conclusion repose sur le fait que la tropine et la pseudo-tropine sont formées, en proportions inégales, par la réduction de la tropinone. L'attribution d'une certaine configuration, cis ou trans, à chacun des deux amino-alcools n'était néanmoins pas possible par les méthodes de la chimie classique.

Conformément aux connaissances actuelles sur la configuration des dérivés du cyclohexane, le tropane existe sous une forme "baignoire" et une forme "chaise" qui ne peuvent être

isolées, car elles passent vite d'une forme à l'autre; il y a donc un seul tropane, comme il y a un seul cyclohexane.

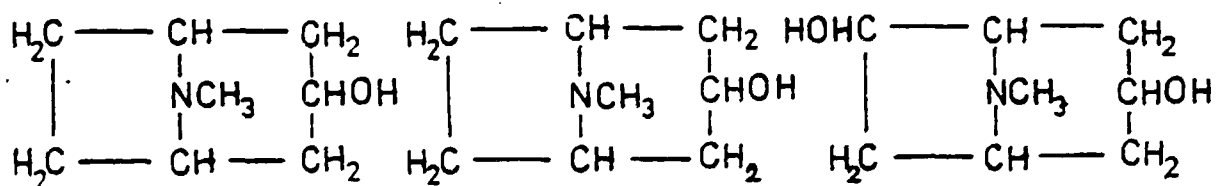


Tropane, forme "baignoire"

Tropane, forme "chaise"

Tous les dérivés du tropane trouvés jusqu'à présent dans la nature possèdent un groupement oxhydryle en position 3. D'autres groupements OH peuvent se trouver en positions 6 et 7. Entre ces deux dernières positions, on peut renfermer un anneau époxydique. Dans certains alcaloïdes il peut y avoir un groupement -COOH en position 2. Dans tous les alcaloïdes naturels de ce groupe, l'oxhydryle de la position 3 est estérifié (5,6,9, 16,23).

Les principaux amino-alcools naturels, les acides avec lesquels ils sont estérifiés et les alcaloïdes correspondants sont (9,12, 14,16): la tropine, la pseudo-tropine et le 3.6.dihydroxy-tropane.



Tropine

Pseudo-tropine

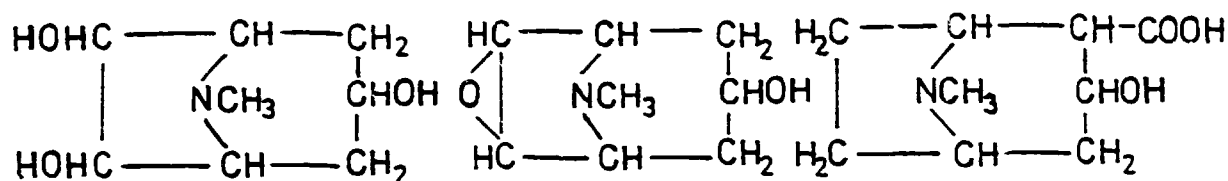
3.6.dihydroxy-tropane

qui donne avec l'acide tropique l'hyoscyamine, avec l'acide tropique l'atropine, avec l'acide vératrique la convolanine

qui donne avec l'acide tiglique la tigloïdine, avec l'acide benzoïque la tropococaïne

qui donne avec l'acide isovalérique la lérianidine, avec l'acide valérique la valéroïdine

Il existe également d'autres amino-alcools ayant une importance théorique qui donnent avec des acides d'importants alcaloïdes:



Téloïdine

Scopine

Ecgonine

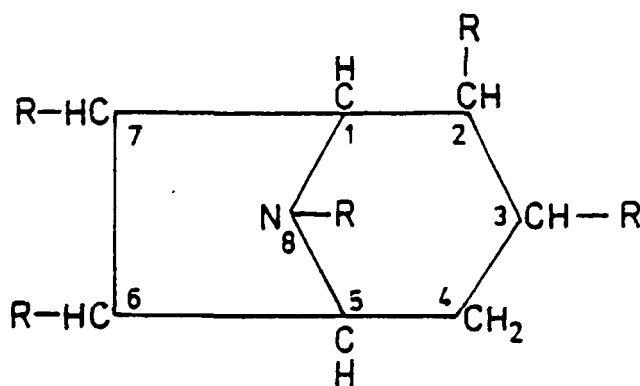
qui donne avec l'acide tiglique la méthylotéloïdine

qui donne avec l'acide tropique la scopolamine

qui donne avec l'acide benzoïque la cocaïne et avec l'acide cinnamique et le méthanol - la cinnamyl-cocaïne

Synthétisés surtout par un nombre de plantes telles que Datura, Atropa ou Erythroxylum Coca, les principaux alcaloïdes dérivant du tropane se trouvent dans le tableau ci-dessous, où l'on mentionne la source, la formule moléculaire et le point de fusion.

La formule générale des alcaloïdes tropaniques est celle qui suit:



De tous ces alcaloïdes on a préparé de nombreux dérivés par semi-synthèse (1,6-10,15,29).

Nous présentons dans le tableau qui suit les principaux alcaloïdes dérivant du tropane, obtenus par voie naturelle ou par semi-synthèse, utilisés en thérapeutique surtout pour leurs propriétés spasmolytiques.

Alcaloïdes	Origine	Base	Acide
Atropine	naturelle	tropine	tropique
Hyosciamine	"	"	"
Scopolamine (l-hyoscine)	"	scopine	"
Atroscine (l-d -hyoscine)	"	"	"
Méthylnitrate d'atropine	synthèse	méthylnitrate de tropine	"
Butylbromure de scopolamine	"	butylbromure de scopine	"
Homatropine	"	tropine	mandélique
Méthylbromure d'homatropine	"	méthylbromure de tropine	"

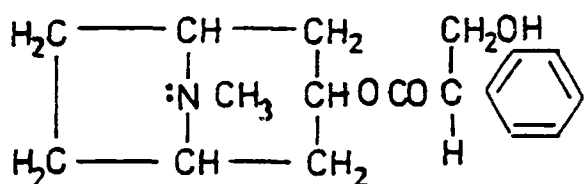
Dans le tableau suivant, nous présentons les principaux alcaloïdes extraits d'un certain nombre de plantes, ainsi que leurs points d'ébullition.

Produit	Plantes dont il provient	Formule moléculaire	Point d'ébullition
1	2	3	4
Tropine	Atropa belladonna Datura innoxia	$C_8H_{15}ON$	64°C
Pseudo-tropine	Datura innoxia (Fastuosa)	$C_8H_{15}ON$	108°C
Hyoscyamine	Atropa acuminata Atropa belladonna	$C_{17}H_{23}O_3N$	108°C
Atropine	Atropa belladonna	$C_{17}H_{23}O_3N$	116°C
Tropa-cocaïne	Erythroxylum coca	$C_{15}H_{19}O_2N$	49°C
Phyllalbine	Phyllanthus discoides Muell. org.	$C_{16}H_{21}O_4N$	209°C
Dihydroxy-tropane	Erythroxylum coca	$C_8H_{15}O_2N$	212°C
Valéroïdine	Datura sanguinea Duboisia myoparoides	$C_{13}H_{23}O_3H$	5°C
Météloïdine	Datura feros Datura innoxia (Fastuosa, etc)	$C_{13}H_{21}O_4N$	141°C
Scopolamine	probablement non naturelle, formée par la racémisation de l'hyoscine	$C_{17}H_{21}O_4N$	82°C

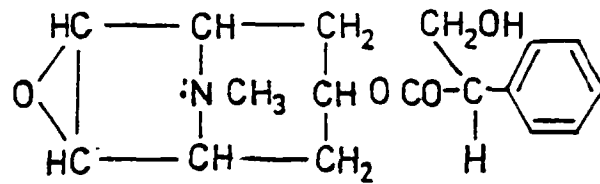
(Tableau des alcaloïdes, continuation)

1	2	3	4
Hyoscine	A. acuminata Datura innoxia Atropa belladonna Duboisia myoporoides, etc	$C_{17}H_{21}O_4^N$	59°C
Cocaïne	Erythroxylum coca E. monogynum	$C_{17}H_{21}O_4$	98°C

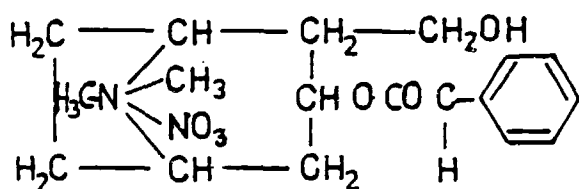
Les principaux alcaloïdes tropaniques ayant une action thérapeutique préparés en industrie sont:



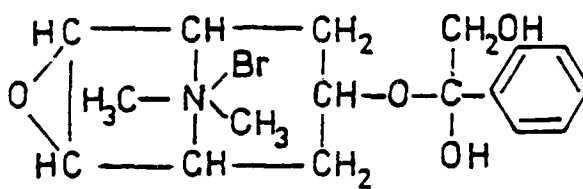
Atropine



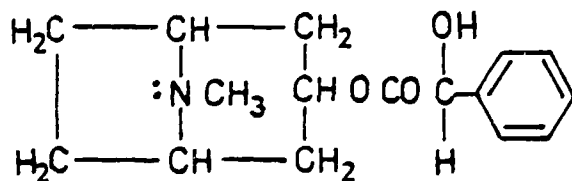
Scopolamine



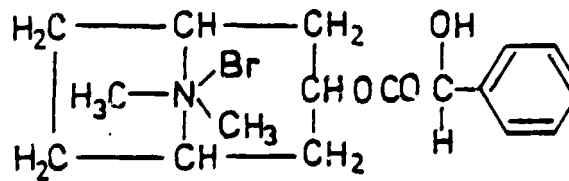
Méthylnitrate d'atropine



Méthylbromure de scopolamine



Homatropine



Méthylbromure d'homatropine

Ces médicaments appartiennent au groupe d'agents anticholinergiques qui bloquent l'accès de l'acétylcholine et son action au niveau du mécanisme récepteur des muscles lisses et des glandes. A doses thérapeutiques ces substances antagonisent seulement les effets muscariniques de l'acétylcholine, surtout la contraction des muscles lisses. Les substances de ce groupe sont surtout utilisées pour leurs propriétés antispasmodiques (31, 15, 33).

Sous l'effet du spasme, les muscles lisses des divers organes (intestin, voies biliaires et urinaires, bronches, utérus, artères, etc) sont empêchés de fonctionner normalement, d'où certains symptômes: dyspnée, constipation, stases biliaire et urinaire, etc, accompagnés de fortes douleurs.

On admet que le spasme des muscles lisses peut être produit soit par la stimulation des terminaisons nerveuses, soit par la stimulation directe de la fibre musculaire; c'est pourquoi les antispasmodiques se divisent, arbitrairement, en deux classes:

1. médicaments anticholinergiques à action spasmolytique neurotrope, dont l'atropine est le représentant;
2. médicaments anticholinergiques à multiples utilisations thérapeutiques: dans les états spastiques du trajet gastro-intestinal, des voies urinaires et biliaires, dans la dysménorrhée spastique, la salivation excessive (au cours des interventions chirurgicales); en ophtalmologie, ils produisent la mydriase et la cycloplégie. Ils sont encore utilisés dans le mal de transport et dans le traitement de certaines affections cardiovasculaires où l'on veut obtenir un relâchement et une dilatation des vaisseaux (surtout la papavérine et ses analogues). Enfin, certains de ces médicaments sont utilisés dans le traitement de la maladie de Parkinson (2, 13).

III. BIOSYNTHESE DES ALCALOÏDES

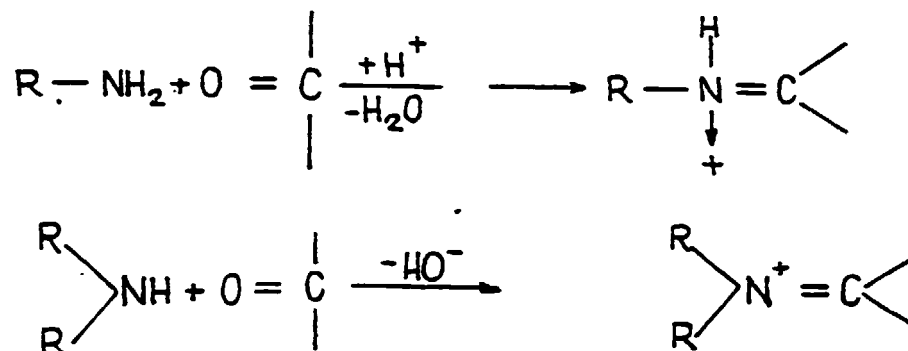
Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires formés par la transformation enzymatique des métabolites primaires, qui sont les produits finaux des principales voies métaboliques,

ayant l'origine dans la photosynthèse.

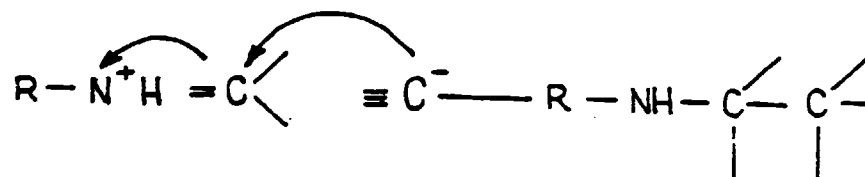
Les métabolites secondaires ont une distribution plus restreinte; ils peuvent être spécifiques exclusivement pour une espèce végétale.

Les réactions communes, qui sont à la base de la biosynthèse des alcaloïdes, sont les suivantes:

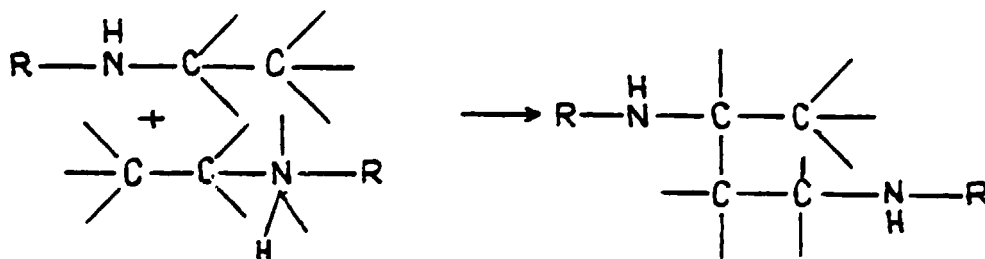
1. La formation d'une base Schiff, en condensant un aldéhyde ou une cétone avec une amine primaire ou secondaire.



2. La condensation du type Mannich entre la base Schiff et un carbonion, favorisée par l'augmentation du déficit en électrons à l'atome C de la base Schiff protonée où aura lieu l'attaque du carbonion.



3. La condensation aldolique entre les produits qui ont la fonction imino, résultant de la condensation Mannich.



Les alcaloïdes dérivant du tropane sont tous des esters qui donnent, par hydrolyse, un acide et un amino-alcool (8 - 11; 16).

L'amino-alcool dérive de l'amine tertiaire bicyclique - le tropane.

Les alcaloïdes dérivant du tropane sont synthétisés dans la plante à partir des aminoacides (ornitine, proline, acide glutamique, phénylalanine, etc).

Des données assez récentes ont montré que l'hygrine et la cuskhygrine jouent un rôle biogénétique dans la formation de l'hyoscyamine (d'après Dalton et Lee).

Teneur totale en alcaloïdes de certaines espèces
végétales de Roumanie

Nom de la plante	Partie de la plante utilisée	Pourcentage en alcaloïdes
<i>Hyoscyamus niger</i>	feuilles sèches	0,06 - 0,07
<i>Datura stramonii</i>	" "	0,05 - 0,13
<i>Atropa belladonna</i>	" "	0,16 - 0,36
<i>Atropa belladonna</i>	racine sèche	0,24 - 0,60
<i>Scopolia Lurida</i>	" "	0,20 - 0,35
<i>Scopolia Lurida</i>	herbe sèche	0,10 - 0,30

Comme on peut le voir, la plus indiquée pour obtenir l'atropine est l'Atropa belladonna, surtout sa racine, en tenant compte que la plus haute teneur se trouve pendant la période de floraison.

Par conséquent, on extrait les alcaloïdes par l'eau acide grâce à la solubilité de leurs sels dans l'eau, ou sous forme de bases dans les solvants organiques. D'ici découlent les deux procédés classiques d'extraction des alcaloïdes dérivant du tropane, à savoir l'extraction à l'eau acide, suivie de l'isolement et de la purification des alcaloïdes dans la solution obtenue, ou bien l'extraction de la plante par un solvant organique en milieu alcalin. L'isolement et la purification des alcaloïdes à partir des solutions acides ou des solvants organiques s'effectuent par une variété de procédés dont les plus utilisés sont l'adsorption sur supports solides ou l'extraction liquide-liquide combinée avec des passages successifs base-sel. Suivant le degré de pureté désiré pour le produit fini, les

technologies sont plus ou moins sophistiquées (9,13,16-27).

IV. METHODES D'EXTRACTION

Les alcaloïdes dérivant du tropane se trouvent dans les plantes sous forme de sels des acides succinique, malique et d'autres, ou bien ils se trouvent à l'état libre, en de très petites quantités.

La teneur totale en alcaloïdes de Datura innoxia Mill. est donnée dans le tableau ci-dessous:

Organe de la plante	Scopolamine %	Alcaloïdes totaux %
Tiges	0,09	0,15
Racines	0,11	0,20
Feuilles	0,19	0,20
Fruits non mûrs (capsules)	0,74	0,90

Pour la scopolamine, par exemple, les méthodes citées dans la littérature se réfèrent d'abord à l'extraction totale des alcaloïdes et, ensuite, à l'isolement de la scopolamine, en séparant les autres alcaloïdes et surtout l'hyoscyamine. Par conséquent, certaines méthodes isolent la scopolamine des eaux-mères obtenues lors de l'extraction de l'hyoscyamine. Pour extraire le total alcaloïdique des espèces de Datura, Scopolia, Hyoscyamus, etc, le produit végétal moulu est soumis à l'action de divers solvants, tels que méthanol, éthanol, isopropanol, benzène, éther éthylique ou eau acidulée. L'extrait obtenu est concentré, alcalinisé ou tamponné et on extrait ensuite les alcaloïdes par du chloroforme ou du chloroforme saturé d'ammoniaque. D'autres méthodes utilisent des agents adsorbants comme le Kieselguhr ou des argiles adsorbantes, ainsi que les résines échangeuses d'ions.

L'isolement des alcaloïdes de la solution extraite à l'aide de résines échangeuses consiste dans le passage de l'extrait limpide contenant l'alcaloïde dans une colonne de H-cationite, jusqu'à l'apparition de l'alcaloïde dans l'effluent. La désorption de l'alcaloïde retenu par la résine peut

s'effectuer par la précipitation dans les espaces interstitiels de la résine à l'aide d'une solution d'hydroxyde alcalin et l'extraction du précipité en lavant la résine avec un solvant organique dans lequel une base forte a été dissoute.

D'après une méthode modifiée, l'isolement des alcaloïdes peut s'effectuer en utilisant un couple de colonnes anionite-cationite. On passe d'abord la solution contenant les alcaloïdes dans une colonne à résine basique et ensuite dans une colonne à forte résine acide. Les alcaloïdes sont retenus et élués ensuite avec de l'alcool méthylique saturé d'ammoniaque (17-20, 27).

Partant des méthodes décrites par divers auteurs et ayant en vue les sources de matière première et les possibilités technologiques, on a élaboré en Roumanie des technologies pour obtenir le bromhydrate de scopolamine, le bromure de N-butylscopolamine et du sulfate d'atropine.

La matière première pour la scopolamine est représentée par la partie aérienne de Datura innoxia Mill, cultivée avec beaucoup de succès en Roumanie.

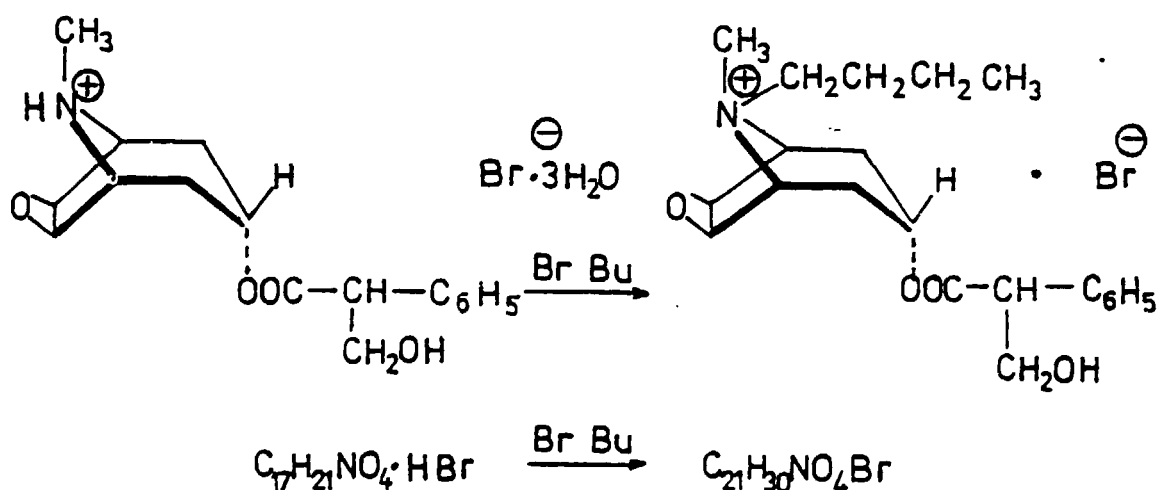
L'extraction peut s'effectuer à partir de la plante sèche ou verte, coupée en morceaux d'environ 10 cm. Nos études ont montré que le rendement d'extraction n'est pas influencé par les dimensions des morceaux de la plante verte, ou de la plante sèche. Les solutions obtenues sont toutefois plus limpides et plus faciles à préparer quand la plante n'est pas hachée. L'extraction s'effectue par une solution aqueuse d'acide sulfurique à pH=3, en régime statique avec recirculation à certains intervalles. On obtient de la sorte un rendement d'extraction d'environ 90% (7-10,13,16).

La solution obtenue est alcalinisée à un pH=8,5-9 et laissée précipiter et la solution, dépourvue d'impuretés, est siphonnée et neutralisée jusqu'à un pH=7-7,5, l'alcaloïde étant ensuite adsorbé sur du charbon. Après la séparation du charbon des eaux, le charbon est rendu anhydre par lavage au méthanol et l'alcaloïde est extrait par un solvant chloruré. La solution obtenue est extraite à nouveau par une solution acide à pH=2-3, ensuite l'alcaloïde est repris par le solvant chloruré, en obtenant une pureté qui conduit à une concentration

à sec de la scopolamine-base à 60%. Cette scopolamine est apte à passer soit en bromure de scopolamine, soit en bromure de N-butylscopolammonium, par des réactions avec l'acide bromhydrique et, respectivement, le bromure de N-butyle (8-10, 17-27).

Une autre variante de cette technologie élimine la phase d'adsorption sur charbon, en donnant à la solution extraite un pH alcalin ou par extraction par un solvant chloruré. Après un nouveau passage à l'eau acide et au solvant chloruré, la scopolamine obtenue a la qualité requise pour être transformée en dérivé quaternaire avec du bromure de N-butyle. Pourtant, pour la transformation en bromhydrate, il est nécessaire que la solution chloroformique (ou dichlorméthanique) soit purifiée par passage dans une colonne à l'oxyde d'aluminium (1,2,7-13).

Les substances finalement obtenues, correspondant qualitativement aux exigences de la Pharmacopée Roumaine (IX^e édition), sont le bromhydrate de scopolamine et le bromure de N-butyle scopolammonium.



Le processus technologique pour obtenir le sulfate d'atropine à partir d'Atropa belladonna comporte les phases suivantes:

- extraction de l'hyoscyamine brute de la racine moulue;
- cristallisation et purification de l'hyoscyamine brute;
- racémisation de l'hyoscyamine en atropine-base;
- purification de l'atropine-base en sulfate;

. purification du sulfate d'atropine.

Pour l'extraction, la plante moulue est alcalinisée à froid (pour éviter l'hydrolyse) avec une solution de carbonate de sodium et on procède ensuite à l'extraction en continu par du benzène. L'extrait benzénique obtenu est passé dans une colonne à remplissage intérieur et une solution diluée d'acide sulfurique jusqu'à l'épuisement complet des alcaloïdes. La solution aqueuse obtenue est rendue basique et extraite à nouveau au benzène pour la purifier, après avoir concentré la solution benzénique jusqu'à un volume adéquat qui permet à l'hyoscyamine-base de cristalliser.

L'hyoscyamine-base est ensuite soumise à la racémisation qui se fait à l'alcool ou à l'acétone, à des températures moyennes, pour empêcher l'apparition de réactions secondaires. L'atropine obtenue à la suite de la racémisation de l'hyoscyamine est recristallisée par l'acétone et transformée en sulfate. La réaction a lieu dans de l'alcool absolu.

Mentionnons que l'on obtient aussi un total alcaloïdique qui résulte de l'extraction de la plante à l'eau acide, suivie du transfert des alcaloïdes dans du benzène à un pH alcalin jusqu'à la cristallisation du total alcaloïdique. La concentration de la solution benzénique conduit au produit Belafit, qui contient de l'hyoscyamine à 80%.

V. CONCLUSIONS

Les alcaloïdes dérivant du tropane sont intéressants tant pour la recherche fondamentale, du point de vue de leur structure et leur conformation, que pour la science appliquée, dans le but de mettre au point les technologies d'extraction et de purification d'une haute efficacité. Entraînant une grande variété de procédés en fonction de la source de matières premières et des possibilités technologiques existantes, l'extraction et la purification des alcaloïdes dérivant du tropane ont conduit à l'obtention d'un total alcaloïdique amélioré en hyoscyamine et du bromure de N-butylscopolammonium, utilisés comme tels ou sous diverses formes pharmaceutiques, comme, par exemple, „Scobutil“, „Scobutil compus“, „Ulcomplex“, etc.

B I B L I O G R A F I E

1. Ahmed, A. Abou-Mandour (1977) - Pflanzensphysiol., 25, 273-277
2. Andronescu V., Rizescu C. et collab. (1980) - Brevet d'invention roumaine No. 76.364: "Procédé d'obtention d'un mélange d'alcaloïdes de type tropanique"
3. Baralle F.E., Gros E.G. (1969) - Biosynthesis of cuschygrine and hyoscyamine in Atropa belladonna from dl-N-methyl-(3H)-ornithyne and dl-N-methyl-3(H)-ornithyne. J. Chem. Soc. (D) Chem. Commun., 721
4. Bereznegovskaya, L.N. (1973) - Biol. Nauki, (5), 95-99
5. Beauchesne G.(1980) - C.R. Séances Acad. Agric. France, 66, 3
6. Bick I.R.C., Bremmer I.B., Gillard J.W., Winzenberg K.H. (1974) Alkaloids of Intherercis tasmanica (Solanaceae austral.). J. Chem., 27:2515-2518
7. Cănciu V., Rizescu C. et collab. (1980) - Brevet d'invention roumaine No. 75.320: "Procédé d'obtention du bromure de N-butyl-scopolammonium"
8. Chiriță Al., Rizescu C., Cănciu V. (1975) - Brevet d'invention roumaine No. 60.501: "Procédé de préparation de la N-butyl-scopolamine"
9. Ciorănescu E. - Medicamente de sinteză, ed. II, pp. 226, 227, 228, 229, 230
10. Ghani A., Evans W.C., Wooley V.A. - Alkaloids of Hyoscyamus species. Bangladesh Pharm. J., I, 12-14
11. Griffin W.J. (1976) - The isolation of 6-hydroxyhyoscyamine from a Duboisia hybrid. Naturwissenschaften, 62, 97
12. Gross D., Schutte H.R. - Phenylalanin als Vorstufe von Tropan-säure und Benzoessäure. Zur Biosynthese der Tropanalkaloide. III, Mitt. Arch. Pharm., 296-1-6
13. Goodman L.M.A., Gilman Ph.D. (1960) - Bazele farmacologice ale teraputicii, Ed. Medicală, pp. 466, 473, 474
14. Hsiao P.K., Hsia H.C., Ho L.Y. - Occurrence of some important tropane alkaloids in Chinese solanaceous plants. Acta Bot. Sinica, 15 : 187-194
15. Martin C. (1980) - C.R. Séances Acad. Agric. France, 66, 3
16. Merișescu C.D. - Tratat elementar de chimie organică, ed. IV, vol. II, pp. 945, 951, 952, 953

17. Rizescu C. et collab. (1970) - Brevet d'invention roumaine No. 53.166: "Procédé de préparation de la scopolamine"
18. Rizescu C. et collab. (1974) - Brevet d'invention roumaine No. 64.869: "Procédé d'obtention de la scopolamine de la plante Datura innoxia"
19. Rizescu C. (1976) - Thèse de doctorat, Institut de Chimie, Bucarest
20. Rizescu C. (1978) - Symposium, Tuşnad, Roumanie: "Nouvelles orientations dans la valorisation des plantes médicinales et aromatiques"
21. Rizescu C. et collab. (1979) - Données analytiques concernant la culture de Datura innoxia Mill. en Roumanie, durant les dernières trois années, VII^e Congrès National de Pharmacie, Bucarest, p. 25
22. Rizescu C. et collab. (1979) - Contributions à l'étude de la conservation de la plante fraîche de Datura innoxia Mill., VII^e Congrès National de Pharmacie, Bucarest, p. 124
23. Rizescu C. et collab. (1974) - Etudes analytiques sur l'isolement des alcaloïdes tropaniques de l'Atropa belladonna, Datura innoxia, Scopolia lurida. Symposium dédié au 50^e anniversaire de l'Entreprise "Biofarm", Bucarest, Roumanie
24. Rizescu C. et collab. (1977) - Etudes analytiques concernant la méthode d'isolement et le dosage chromatographique de la scopolamine de Datura innoxia. Symposium scientifique de l'Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie
25. Romeike A. (1978) - Tropane alkaloids. Occurrence and systematic importance in angiosperms. Bot. Notiser, 131, 85-96, Stockholm, ISSN 0006 8195
26. Tabata M., Yamamoto N., Hiraoka H. (1971) - Colloques internationaux CNRS, 193
27. Tefas D., Stan T. (1962) - Alcaloizi, pp. 77,79,80,81,85,92, 93,95,96
28. Verzea M., Rizescu C. et collab. (1981) - Etudes concernant les possibilités de conservation de l'herbe de Datura innoxia Mill., pour des fins industrielles. Herbă Romanică. An. St. cerc.pl. med. și arom., Fundulea, vol. 2
29. + + + (1980) - Farmacopeea Română, IX^e édition.

PART VIII

CLAVICEPS PURPUREA, MATIERE PREMIERE POUR
OBTENIR DES ALCALOÏDES NATURELS ET DE
SEMI-SYNTHESE. VALORISATION THERAPEUTIQUE

Lellya Roşca +)

Valentin Măscov ++)

Ecaterina Nichiforescu +++)

-
- +) Docteur en pharmacie, chercheur
++) Pharmacien, chercheur
+++) Docteur en pharmacie, chef de laboratoire de recherches
Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques,
Bucarest, Roumanie

I. INTRODUCTION

L'ergot de seigle, la forme de résistance du champignon parasite Claviceps purpurea (Fr.) Tul., présente une grande importance par ses principaux principes actifs, les alcaloïdes, un vrai trésor de substances pharmacologiques actives.

La valorisation de cette matière première a été réalisée sous la forme d'extraits bruts alcaloïdiques, d'alcaloïdes purs et de produits de semi-synthèse.

Les alcaloïdes naturels de l'ergot de seigle et leurs produits de semi-synthèse ont un spectre large d'action pharmacologique pouvant être valorisé en thérapeutique, dans le traitement de plusieurs affections du système nerveux, du coeur et des vaisseaux sanguins, de la musculature lisse, etc.

Claviceps purpurea (ergot de seigle) appartient à la famille Clavicipitaceae. Le territoire de dispersion est très grand, étant rencontré dans toute l'Europe, l'Afrique, l'Asie, l'Inde, l'Amérique du Sud, parasitant les organes floraux de plus de 200 espèces de graminées (22).

L'histoire de l'ergot est très ancienne. En 1816, L.N. Vauquelin a effectué les premières recherches chimiques-pharmaceutiques sur l'ergot de seigle. En 1853 L.R. Tulasne a fait l'encadrement systématique avec une description complète de l'espèce Claviceps purpurea. En 1875 C. Tanret a isolé la première substance cristallisée des extraits d'ergot de seigle. Très complexe, la chimie de l'ergot a été élucidée au cours des 100 années suivantes.

L'isolement des principaux principes actifs de l'ergot de seigle, les alcaloïdes, a été réalisé sur le parcours de quelques décennies. Ainsi, en 1906, G. Barger, F.H. Carr et F. Kraft ont isolé l'ergotoxine et en 1918 A. Stoll a mis en évidence et a isolé l'ergotamine. S. Smith et G. Timmis ont isolé l'ergine en 1932. Plus tard (1934), W.A. Jacobs et L.C. Craig (31, 32) obtiennent l'acide lysergique, le noyau des alcaloïdes de l'ergot. En 1935, l'ergométrine a été isolée par quatre groupes indépendants de chercheurs: H.W. Dudley et C. Moir (18), A. Stoll, et E. Burchardt (71), M.S. Karash et R.P.

Legault et R.K. Thompson (76). En 1937 a été isolée l'ergosine (70) et, en 1943, A. Stoll et A. Hofmann (72) ont obtenu un succès remarquable avec la séparation du complexe ergotoxinique de ses trois alcaloïdes constituants: l'ergocryptine, l'ergocornine et l'ergocristine.

Après 1951, M. Abe et collab. ont isolé les premiers alcaloïdes du type clavinique, en particulier l'agroclavine et l'élimoclavine, obtenus de Claviceps sp. croissant sur différentes plantes d'origine japonaise.

Ultérieurement, de l'ergot croissant sur les différentes plantes ou des cultures saprophytiques ont encore été isolés les alcaloïdes suivants: A. Stoll en 1954 - la péniclavine; M. Abe en 1954 - la festuclavine, en 1955 - la molliclavine, en 1956 - la pyroclavine et la costaclavine; A. Hofmann en 1957 l'isopéniclavine, la sétoclavine, l'isosétoclavine, la chano-clavine. En 1959 (M. Abe) ont été isolés d'autres alcaloïdes de type peptidique comme l'ergosécaline et l'ergosécalinine et en 1962 (W. Schlienz) - l'ergostine et l'ergostinine. En 1968 le premier alcaloïde lysergique hydrogéné, la dihydroergosine (36), a été découvert dans Claviceps species.

Depuis 1940 jusqu'à nos jours, de nombreux chercheurs se sont occupés d'obtenir des produits de semi-synthèse par modifications des noyaux lysergique, isolysergique ou dihydrolysergique, dont nous présentons quelques groupements principaux.

1. Produits hydrogénés

Par hydrogénation catalytique de la double liaison en position 9-10 du noyau lysergique ont été obtenus des dérivés des alcaloïdes naturels (20,43,44,48), par exemple dihydroergocristine, dihydroergocornine, dihydroergocryptine, dihydroergotamine, etc., ou différents produits de semi-synthèse hydrogénés de type amidique, par la substitution, au carboxyle du carbone 8, avec différents radicaux: -alkyle, -hydroxyalkyle, -cycloalkyle, etc. (13,19,26,27,55).

2. Produits de substitution au carboxyle du carbone 8 du noyau lysergique

Par greffage de différents radicaux sur le noyau lyser-

gique on a obtenu:

- (a) différents homologues et produits de l'ergométrine, par exemple la méthylergométrine, la N-benzylergométrine, la phénylergométrine, la cyclopentylergométrine, etc. (64,65,73);
- (b) des amides mono- et disubstituées des acides lysergique et isolysergique de type méthyl-amidique, diéthylamidique, piperidylamidique (13,26,55,73);
- (c) des cycloalkylamides, cyclopentylalkylamides, etc.

3. Produits de substitution au carbone 8 du noyau lysergique

Ces produits ont été obtenus par la substitution du carboxyle avec différents radicaux: -NH-CO-NR, R pouvant être hydrogène, méthyle ou éthyle, etc. (6).

4. Produits de substitution à l'azote de la position 1 du noyau lysergique

Par greffage de différents radicaux comme: alkyle, aralkyle, alkenil, etc., à l'azote indolique des alcaloïdes naturels (79,80) ou aux produits de semi-synthèse (4,13,55), on a réalisé un grand nombre de produits, comme par exemple: l'acide 1-N-méthyl-d-lysergique, 1-propyldihydroergocristine, 1-N-méthylbutanolamide de l'acide lysergique, 1-benzylidihydroergocristine, etc.

5. Produits halogénés en position 2 du noyau lysergique

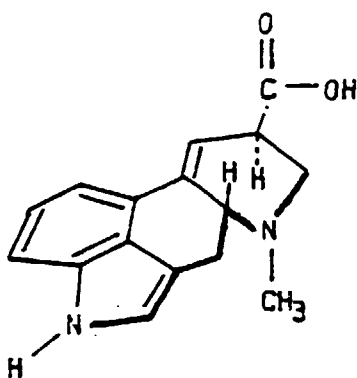
Par halogénéation avec du brome, de l'iode, etc., on a préparé des dérivés des alcaloïdes naturels, comme par exemple: 2-brom-ergocryptine, 2-bromo-dihydroergocristine, 2-iodo-dihydroergocristine, 2-bromo-diéthylamide de l'acide lysergique, etc. (10,11,12,20,21,43,44,48,86).

Dans le domaine de la préparation des produits de semi-synthèse des alcaloïdes naturels de l'ergot de seigle, les recherches continuent également de nos jours de sorte que le nombre de ces produits sera complété avec des dérivés de la série des clavines, des peptides, des lumidérivés, etc.

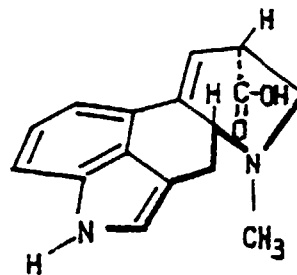
II. LES ALCALOÏDES NATURELS

A. Présentation des substances

A la suite des recherches (5,24), il s'ensuit que les alcaloïdes lysergiques de l'ergot de seigle appartiennent à la série "d" et se présentent sous la forme de deux séries d'isomères naturels désignés "normal" et "iso", qui diffèrent seulement par la configuration spatiale des liaisons du carbone asymétrique de la position 8 du noyau de l'acide lysergique.



Acide d-lysergique
("normal")

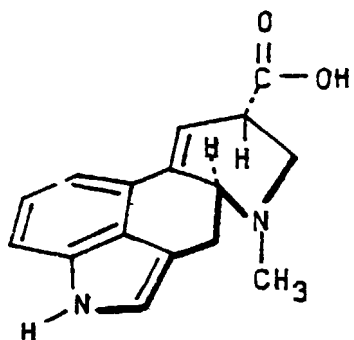


Acide d-isolysergique
("iso")

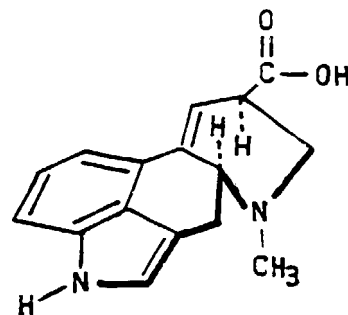
La présence de la double liaison en 9-10 détermine deux centres d'asymétrie en C_8 et C_5 .

Pendant les opérations d'isolement des alcaloïdes naturels ou des réactions pour obtenir des produits de semi-synthèse, il se produit facilement une isomérisation en C_8 conduisant aux isodérivés respectifs, qui est une transformation réversible, qui a lieu par l'intermédiaire d'un dérivé énolique (24).

Exceptant l'isomérisation réversible en C_8 , la molécule d'acide lysergique peut subir, durant les réactions de semi-synthèse, une autre isomérisation au centre de l'asymétrie en C_5 , qui peut conduire à l'obtention de deux antipodes optiques de la série "l" (63).



Acide l-lysergique



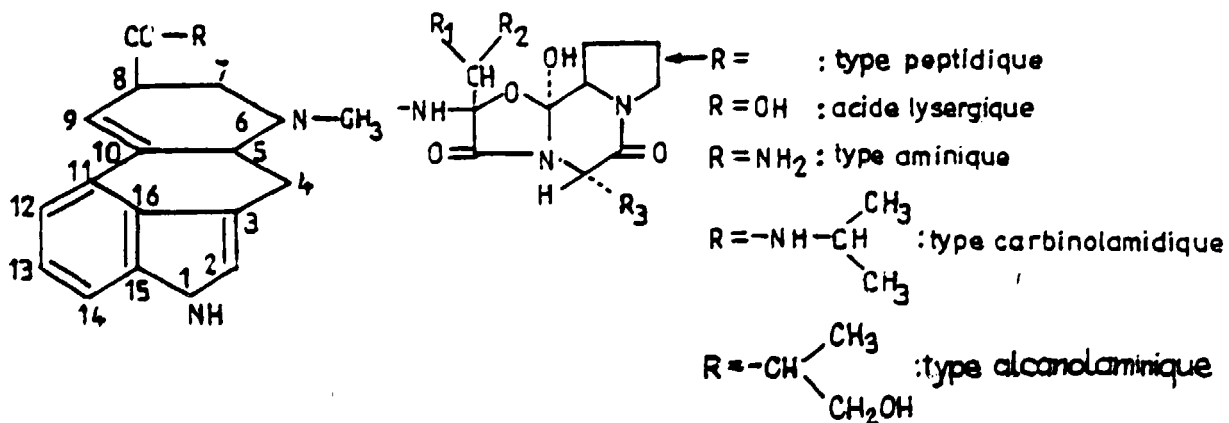
Acide l-isolysergique

Ces deux isomères de la série "l" n'ont pas été rencontrés dans la nature, leur présence étant signalée au cours de réactions chimiques (66,67,74,87).

Sous l'influence de réactants acides, les dérivés des acides lysergique et isolysergique peuvent subir un type particulier d'isomérisation, où le centre d'asymétrie en C₅ est détruit passant d'une manière irréversible en dérivés à structure benzindolinique (67).

B. Classification des alcaloïdes en fonction de la structure chimique

(1) Produits de l'acide lysergique



a) Type peptidique

	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>R₃</u>
Groupe de l'ergotamine:			
ergotamine (ergotaminine)	-H	-H	-CH ₂ -C ₆ H ₅
ergosine (ergosinine)	-H	-H	-CH ₂ -CH $\begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{matrix}$
ergovaline (ergovalinine)	-H	-H	-CH $\begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{matrix}$
Groupe de l'ergotoxine:			
ergocristine (ergocristinine)	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₂ -C ₆ H ₅
ergocryptine (ergocryptinine)	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₂ -CH $\begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{matrix}$
ergocornine (ergocorninine)	-CH ₃	-CH ₃	-CH $\begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{matrix}$
Groupe de l'ergostine:			
ergostine	-H	-CH ₃	-CH ₂ -C ₆ H ₅

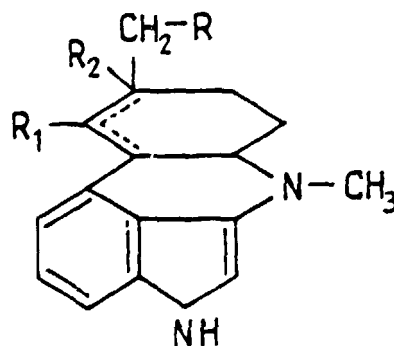
b) Type alcanolaminique

Groupe de l'ergométrine:	ergométrine (ergométrinine)	-NH	-CH $\begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_2\text{OH} \end{matrix}$
Groupe de l'ergine:	ergine (erginine)	-NH ₂	

c) Type carbinolamidique

Groupe de la méthylcarbinolamide:	-NH	-CH $\begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH} \end{matrix}$
-----------------------------------	-----	--

(2) Produits claviniques



a) Groupe des produits claviniques (C₈₋₉):

	<u>R</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>
Agroclavine	-H		
Elymoclavine	-OH	OH	
Mollyclavine	-OH		
Chanoclavine	-OH		Dans le noyau D il y a un -H en position 7

b) Groupe des produits claviniques (C₉₋₁₀):

	<u>R</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>
Setoclavine (Isosetoclavine)	-H	-	-OH
Penniclavine (Isopenniclavine)	-OH	-	-OH
Lysergine	-H	-	- - - H
Lysergol	-OH		- - - H
Lysergène	-	-	-

c) Groupe des produits ergoliniques :

Festoclavine	-H		- - - H
Piroclavine	- - - H		-H
Costaclavine	-H	O	
Fumigaclavine A	-H	H ₃ C - CO	
Fumigaclavine B	-H	-OH	

C. Méthodes d'isolement

L'isolement des extraits bruts alcaloïdiques de l'ergot de seigle a été réalisé par des méthodes classiques d'extraction des alcaloïdes d'un matériau végétal. En ce qui concerne la matière première, elle est très variée du point de vue qualitatif à cause de la nature variée des alcaloïdes de l'ergot, qui peuvent être ergotaminique, ergotoxinique, ergométrique ou mixte. Cependant, par des cultures dirigées, ce problème peut être solutionné par l'infection de la plante-amphytrion avec des souches de Claviceps, spécialisées pour produire certains types d'alcaloïdes indiqués plus haut.

Indifféremment de la souche, l'ergot de seigle contient une quantité remarquable de lipides et pour ce motif, certains des procédés d'extraction utilisent une drogue dégraissée au préalable (35,75), mais il y a beaucoup de procédés qui utilisent pour l'extraction la matière végétale non-dégraissée au préalable (15,33,37,68).

Les procédés décrits dans la littérature indiquent soit l'extraction des alcaloïdes sous forme de bases, soit sous forme de sels.

Les procédés ayant comme principal élément l'extraction des alcaloïdes bases, diffèrent entre eux autant par la substance employée à l'alcalinisation de la matière végétale, que par la nature du solvant d'extraction utilisé. Parmi les substances basiques indiquées par différents auteurs, nous mentionnons l'ammoniaque (75), le bicarbonate de sodium (15,36), le carbonate de sodium (68), l'oxyde de magnésium. Les solvants organiques utilisés pour l'extraction sont aussi bien ceux polaires, par exemple: l'alcool éthylique (36,68), l'alcool méthylique, l'acétone, que les solvants non-polaires comme le benzène (15,39,75), le toluène (35), la ligroïne, l'éther éthylique, les solvants chlorurés: chloroforme, chlorure d'éthylène, trichloréthylène (33), etc.

Parmi les moyens d'extraction la littérature indique, par exemple, l'eau acidulée ou des solutions hydroalcooliques acidulées.

Pour isoler les alcaloïdes des solutions extractives on utilise des méthodes usuelles: l'extraction liquide-liquide (40,68,75), l'adsorption/désorption sur du charbon actif (35) ou les échangeurs d'ions (33). Finalement, on peut réaliser un total alcaloïdique brut par une précipitation en milieu aqueux à pH alcalin (15,33,35,68,75).

L'obtention des alcaloïdes purs de chaque groupe peut être réalisée par les procédés suivants:

(1) leur transformation en sels peu solubles, tels que sulfates (34), phosphates (16,51) et le changement ultérieur, par alcalinisation de ceux-ci, en alcaloïdes-bases qui peuvent être isolés par extraction avec un solvant organique ou par

filtration directe (24,34);

(2) partage liquide-liquide, dans un système de solvants non-miscibles;

(3) chromatographie sur une colonne de Al_2O_3 et fractionnement avec des solvants sélectifs (2,24,41,42); on utilise encore des colonnes à silicagel ou à la cellulose (25).

L'ergotoxine-base a été scindée en trois alcaloïdes par:

(a) partage liquide-liquide en systèmes différents de solvants non-miscibles (23);

(b) chromatographie de répartition sur colonne à silicagel ou à Al_2O_3 (68), en utilisant comme phase stationnaire la formamide et comme phase mobile différents mélanges de solvants (2,51).

Les meilleurs indications de la littérature prévoient pour la séparation de l'ergotoxine, la méthode Stoll (72), qui indique l'utilisation de l'acide di-p-toluil-l-tartrique, pour la transformation en sels respectifs de l'ergocristine, l'ergocryptine et l'ergocornine, que l'on peut séparer par leur différence de solubilité.

Les bases amorphes résultées peuvent cristalliser du solvant spécifique de l'alcaloïde respectif, tels que le benzène (82), le toluène (35), le xylène (15), le sulfure de carbone (15), l'acétate d'éthyle (82).

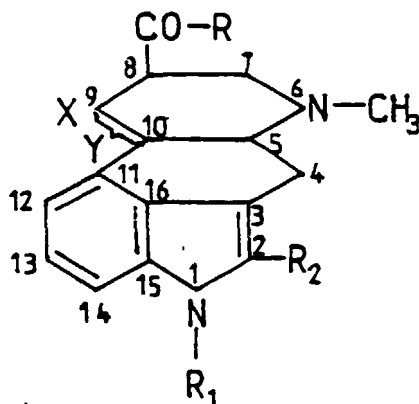
Toutes les méthodes de la littérature qui décrivent l'isolement et la purification des alcaloïdes de l'ergot de seigle, spécifient des mesures de protection, étant donné qu'ils sont thermolabiles, photosensibles et facilement détériorables.

III. PRODUITS DE SEMI-SYNTHESE

A. Présentation des substances

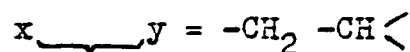
Groupements principaux de produits lysergiques de semi-synthèse; leur classification en fonction de la structure chimique

1. Dihydrodérivés



R: -reste peptidique, alcanolaminique, amidique, des alcaloïdes naturels de l'ergot de seigle (ex.: l'ergotamine, l'ergométrine, etc.)

-radical amidique, cycloalkylamidique, cyclopentilalkylamidique, etc., des produits de substitution au carboxyle en C₈



R₁ = H, alkyle; R₂ = H, halogène

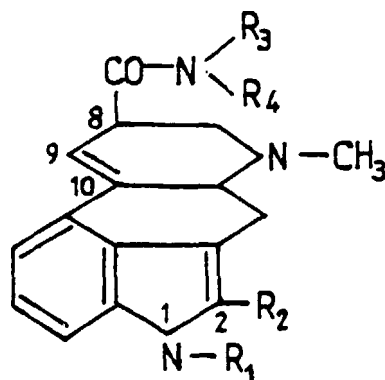
2. Produits de substitution au carboxyle en C₈

R₃: H, alkyle avec 1-5 atomes de carbone;

R₄: -un groupe alkyle, hydroxyalkyle avec 1-5 atomes de carbone, ou cycloalkyle avec 1-7 atomes de carbone;

-un groupe alkyle contenant 1-3 atomes de carbone, substitués avec un ou deux groupes d'hydroxyle;

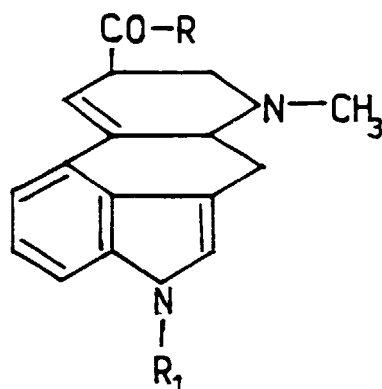
-un groupe alcanolaminique (CH₂)_{m-1}



(CH₂)_{m-1} { dans lesquels m et n sont des nombres entiers de 0 à 4, (CH₂)_{n-X} { X peut être un groupe phénylique, indolique, imidasolique, substitué avec alkyle, hydroxyalkyle, thioalkyle, ou des groupes alkyle aralkyle, substitués ou non.

R₁ = H, alkyle; R₂ = H, halogène.

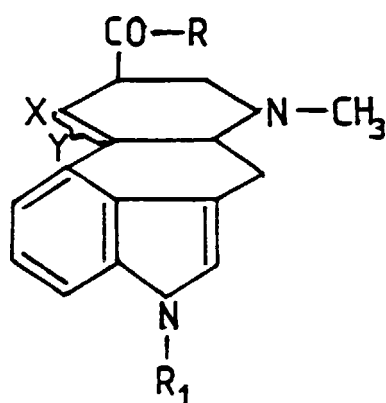
3. Produits de substitution au carbone en position C₈



R: NH-CO-NR₂ (avec R₂ ayant la signification: -hydrogène, méthyle ou éthyle);

R₁: H

4. Produits de substitution à l'azote en position-1

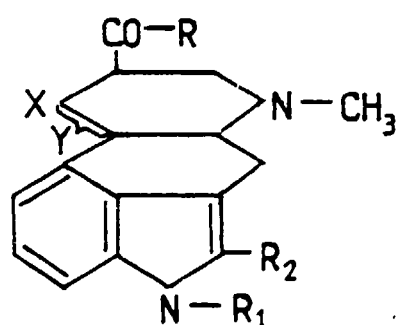


R: reste peptidique, alcool-aminique, -amidique des alcaloïdes naturels ou des produits de semi-synthèse:

x - y = -CH₂-CH< ou -CH=C<

R₁: alkyle avec 1-5 atomes de carbone, aralkyle, alkenyle, etc.

5. Produits de substitution par halogénéation en position C₂



R: reste peptidique

x - y = -CH₂-CH< ou -CH=C<

R₁ = H, alkyle

R₂ = Cl, Br, I

B. Méthodes générales de préparation des principaux groupes de produits de semi-synthèse à noyau lysergique

Comme matière première pour préparer les produits de semi-synthèse de type lysergique, on peut utiliser les alcaloïdes naturels de l'ergot de seigle comme tels, ou l'acide lysergique, intermédiaire obtenu de l'extrait brut alcaloïdique isolé de l'ergot de seigle. Nous présentons, ci-après, les méthodes générales de préparation de quelques groupes

principaux de ces produits de semi-synthèse.

1. Produits hydrogénés

Les méthodes décrites dans la littérature pour obtenir les dihydrodérivés lysergiques consistent dans le traitement des alcaloïdes comme tels ou sous forme de sels, avec de l'hydrogène, dans certaines conditions de pression, de pH, de température, d'agitation et en présence de catalyseurs et de solvants appropriés. Les recherches de Stoll et Hofmann (24) ont apporté une contribution considérable à l'élucidation des problèmes de l'obtention des produits hydrogénés du groupe ergotoxinique et ergotaminique. Ces auteurs, par leurs recherches sur la saturation par l'hydrogène de la double liaison de la position 9-10 du noyau lysergique, ont établi la condition de la réalisation d'une réduction stéréo-spécifique pour éviter la formation d'isodérivés dont la proportion par rapport à l'isomère "normal" dépend du catalyseur utilisé. Comme catalyseurs on recommande: du nickel-Raney (30), le chrome, le platine, le palladium sous forme d'éponge (7), le palladium sur sulfate de baryum (7,76), le palladium sur amiante (81), le palladium sur oxyde d'aluminium, le noir de palladium (77), l'hydroxyde de palladium (52).

Les solvants utilisés dans la réaction d'hydrogénation sont: l'alcool, l'éther éthylique, des hydrocarbures dont les plus usités sont: le dioxane (76,77), mélange de dioxane avec de l'alcool méthylique 9:1 (30,53), mélange de dioxane avec de l'eau à 50% (81), alcool méthylique. On doit retenir que le solvant doit être choisi de façon à obtenir un produit de réduction homogène, tout en évitant des dégradations ou des isomérisations.

Les hydrogénations ont été réalisées à haute pression, de 10 à 80 atm. (7,76,77,81), mais aussi à la pression normale (30,53).

La température de réaction est très variée: 20°C (30, 53,81), 40°C (7), 60°C (77) ou 80°C (7,76).

Les indications concernant le temps de l'hydrogénation diffèrent de 0,5 (30), 2 (77), 5 (7,76), 10 (53) jusqu'à 24 heures (7).

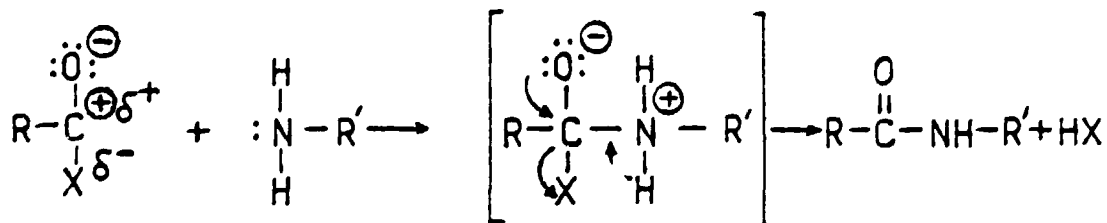
Par ces méthodes on réalise l'hydrogénation des alcaloïdes naturels de l'ergot de seigle mais aussi de nombreux produits de semi-synthèse de l'acide lysergique.

Pour isoler le produit hydrogéné du milieu de réaction, il est nécessaire de faire une filtration pour éliminer le catalyseur. Pour éviter la cristallisation du produit hydrogéné en milieu de réaction certains auteurs recommandent à la fin de la réaction, l'addition de solvants adéquats comme: dioxane-alcool méthylique (30), chloroforme (75), chloroforme-alcool éthylique (8,7,14), dioxane-eau (69), etc. Après élimination du catalyseur, la solution filtrée se concentre et on obtient le produit hydrogéné sous forme d'un résidu qui est purifié par chromatographie sur colonne de Al_2O_3 (69,76), ou il cristallise directement d'un certain solvant approprié, comme le benzène (7,30,53,76), l'alcool absolu, l'acétone (77), l'acétone-eau (69), etc.

Pour transformer en sels les produits hydrogénés, ceux-ci sont traités avec des acides organiques comme: méthansulfonique, tartrique, maléique, etc., obtenant des produits stables, solubles dans l'eau (13,29).

2. Produits de substitution au carboxyle en C_8

Au cours des dernières années la plupart des auteurs indiquent des techniques de la chimie des peptides pour l'obtention des amides de substitution au carboxyle en C_8 . La méthode le plus fréquemment signalée consiste en l'activation de la fonction carboxyle de l'acide lysergique par l'introduction d'un groupement de remplacement qui, tout en positivant le carbone du carboxyle, favorise l'attaque nucléophile du composant aminique et implicitement la formation de la liaison amidique, conformément au mécanisme de réaction suivant:



L'activation du groupe carboxyle a été réalisée par différents auteurs par l'intermédiaire:

- . d'hydrazides (25,26,66,74);
- . d'anhydrides mixtes (19,26,27,50);
- . de chlorures acides (29,59-60);
- . d'agents activateurs du type carbodiimides N,N'-dialkylés ou des amides hétérocycliques (19,54).

Cette réaction entre l'acide lysergique et les produits aminiques se fait dans des solvants organiques inertes avec des rendements variables en fonction du procédé utilisé.

Ainsi, la littérature consultée indique une valeur diminuée du procédé par l'intermédiaire des hydrazides à cause des réactions secondaires d'isomérisation qui conduisent à de rendements de l'ordre de 25 à 55%.

Au cours du procédé réalisé par l'intermédiaire d'anhydrides mixtes de l'acide lysergique avec d'autres acides, comme trifluoracétique (50), méthansulfonique (19), des difficultés surgissent dans le sens que la réaction est incomplète, parce qu'elle est réalisée dans les conditions de pH incompatibles avec l'acide lysergique et il se produit une acylation non-spécifique (19,50) conduisant à des rendements très diminués. Dans un seul cas on signale un rendement de 61% par la réaction entre le produit aminique et l'anhydride mixte avec l'acide sulfurique (19).

Pour obtenir les amides de l'acide lysergique par la méthode du chlorure acide on mentionne les rendements de réaction de 45 jusqu'à 85%. Dans ce cas, les phénomènes d'isomérisation sont réduits au minimum.

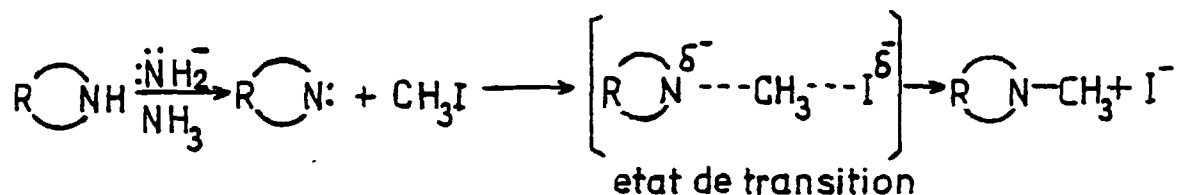
En ce qui concerne le procédé par l'intermédiaire d'agents activateurs du type carbodiimides N,N'-dialkylés, comme dicyclohexyl-carbodiimide (19), il existe différentes indications dans la littérature, l'un des auteurs mentionnant un rendement réduit (19), alors que d'autres indiquent jusqu'à 85% (54), estimés en isomère normal .

Les transformations des amides en sels stables se réalisent par le traitement avec un acide organique: tartrique, maléique, métasulfonique, etc. (25-27,29).

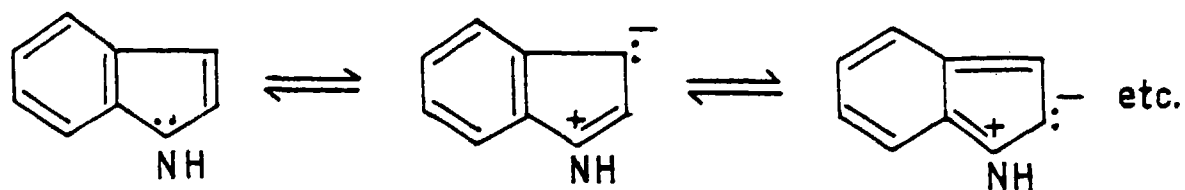
3. Produits de substitution à l'azote en position -1

Les indications de la littérature dans ce domaine prévoient la transformation de l'acide lysergique en sel et l'alkylation par le traitement avec du bromure ou du iodure d'alkyle tel que bromure ou iodure de méthyle.

Le mécanisme de réaction du type S_N2 (1) est le suivant:



L'acide lysergique est un dérivé de l'indole ayant une nucléophilie réduite de l'atome d'azote, déterminée par l'implication d'électrons non-participants à la conjugaison aromatique du noyau et c'est pourquoi pour alkyler l'azote il est nécessaire de convertir ce type de produits en leurs sels.



A cause de l'acidité réduite, la formation de sels peut se réaliser seulement en présence de bases très fortes.

En effet, les auteurs qui ont obtenu ces dérivés - la matière première pouvant être l'acide lysergique (29,55), les alcaloïdes de l'ergot de seigle (79) ou des produits de semi-synthèse à noyau lysergique (4) - prévoient une transformation initiale en sel du produit respectif par traitement avec l'amidure d'un métal alcalin en milieu d'ammoniaque liquide (4,29,55).

L'alkylation proprement dite se réalise entre le sel du produit lysergique et un agent d'alkylation comme, par exemple, les iodures (29,55) ou les bromures (29) d'alkyle.

Le temps de réaction spécifié diffère de 10 minutes à 8 heures (29,55).

Pour l'isolation du milieu de réaction du produit N-substitué, tous les auteurs indiquent une concentration du milieu de réaction jusqu'à obtenir le résidu, qui se reprend avec de l'eau (29), les mélanges binaires des solvants, l'alcool éthylique dilué avec de l'eau (55), l'alcool méthylique alcalinisé (20), etc. Après filtration, effectuée directement en cas d'une seule phase (29) ou après la séparation des phases, la solution extractive est amenée au résidu.

L'un des auteurs indique pour la dissolution du produit brut ou bien une cristallisation directe de celui-ci ou après une purification préalable.

On peut effectuer la purification soit par un traitement avec de l'alcool méthylique (4) ou par la chromatographie sur oxyde d'aluminium. La cristallisation du produit N-substitué se réalise dans un solvant choisi en fonction des propriétés physiques et chimiques de la substance respective, comme, par exemple: alcool méthylique: acide acétique à pH=6 (29), eau: acide acétique à pH=4-6 (29), alcool éthylique: acide acétique (55), acétate d'éthyle, chloroforme, chloroforme : éther de pétrole, etc.

En ce qui concerne les transformations des produits N-substitués en sels cristallisés, les auteurs signalent le traitement avec différents acides (29,55): acide chlorhydrique, acide bromhydrique, acide malique, acide tartrique, etc., choisis en fonction des propriétés du produit respectif.

4. Produits halogénés

Concernant l'obtention des produits halogénés et en particulier des bromures d'alcaloïdes naturels de l'ergot de seigle, ou des produits de semi-synthèse à noyau lysergique, dans la littérature on trouve un seul procédé dans lequel diffèrent seulement l'ordre de l'halogénéation (5,63).

La manière d'obtenir ce type de produits consiste en l'action d'un agent d'halogénéation sur l'alcaloïde, dans un solvant inerte, à des températures variant entre 20°C et 30°C.

Parmi les agents de l'halogénéation on cite le plus souvent: le brome sous forme de N-bromosuccinimide, N-bromacétamide, N-bromocaprolactame et hydrotribromure de pyrrolidine.

On peut faire la purification du produit bromuré par chromatographie sur colonne d'oxyde d'aluminium, ou sur du verre microporeux, suivie de récrystallisation dans un solvant.

Les rendements indiqués vont de 38 à 72%.

Pour obtenir les sels des produits bromurés, les auteurs décrivent les méthodes usuelles, comme la dissolution de la base dans un solvant approprié; puis, on ajoute la quantité d'acide nécessaire quand le sel cristallise à basse température. La réaction doit être protégée de l'action de la lumière (63).

IV. ACTION PHARMACOLOGIQUE ET UTILISATIONS THERAPEUTIQUES

La pharmacologie des constituants naturels de l'ergot de seigle et des produits de semi-synthèse à noyau lysergique est très complexe, ces produits ayant une gamme variée d'actions qui affectent le système nerveux central et périphérique, le corde et les vaisseaux sanguins, les fonctions neuromusculaires, les muscles lisses, etc.

A. Cerletti (3,9,11,12,28) a systematisé d'une manière tout à fait originale la gamme variée d'actions de ces alcaloïdes, tous les effets étant réduits à 6 types fondamentaux, réunis en trois groupes principaux d'actions: périphériques, neurohormonales et centrales.

Les nombreux produits naturels ou de semi-synthèse du type lysergique peuvent être intégrés dans l'un de ces groupes d'effets pharmacologiques. Pourtant, on peut remarquer un degré plus limité de l'activité biologique des produits de semi-synthèse, puisque certaines des actions pharmacologiques établies par A. Cerletti sont absentes, alors que d'autres sont

plus accentuées, ce qui confère à ces produits une sélectivité plus grande et un degré de toxicité moins élevé.

Les effets périphériques de l'action directe sur les muscles lisses sont responsables des contractions vasculaires et de la contraction utérine. Ces effets de constriction vasculaire sont utilisés en clinique pour le traitement des migraines et occasionnellement pour baisser la pression sanguine. Ergotamine, ergotamine plus caféine et dihydroergotamine sont les produits pharmaceutiques les plus utilisés dans ces cas.

Les effets utérotoniques s'utilisent en obstétrique et en gynécologie. Les produits utilisés dans ce but sont l'ergométrine, la méthylergométrine et l'ergotamine, pour prolonger ces effets.

Les effets antisérotiniques que possède le produit l-méthylbutanolamide de l'acide lysergique sont utilisés en clinique en cas de migraine, de troubles vasculaires, en syndrome carcinoïde et en différentes affections rhumatismales. L'effet de blocage adrénergique est utilisé dans le traitement de l'hypertension, des troubles circulatoires cérébrales et fonctionnels ou oblitératifs et vasculaires périphériques. Dans ce but on utilise le complexe des alcaloïdes hydrogénés: dihydroergocristine, dihydroergocornine et dihydroergocryptine sous forme de méthansulfonate en mélange 1:1:1.

Les effets centraux sont plus compliqués à la suite de la stimulation ou de l'inhibition des chémo-récepteurs, conduisant à des effets bulbo-médullaires ou mésodiencéphaliques. Les effets bulbomédullaires sont utilisés en clinique en administrant les alcaloïdes de l'ergot de seigle comme tels dans un but sédatif, ou pour augmenter les effets sédatifs et hypnotiques, en particulier ceux des barbituriques ou bien des tranquillisants.

La dihydroergotamine et le complexe hydrogéné de l'ergotoxine présentent aussi des effets sédatifs et neuroleptiques.

Les effets mésodiencéphaliques ont été observés pour l'une des amides de semi-synthèse dérivées de l'acide lysergique, la diéthylamide de l'acide lysergique, qu'on utilise en psychothérapie analytique et en recherches expérimentales

des psychoses.

Pour l'avenir, les études des pharmacologistes sur des nouveaux produits de synthèse ajouteront, probablement, des nouveaux effets fondamentaux au spectre actuel.

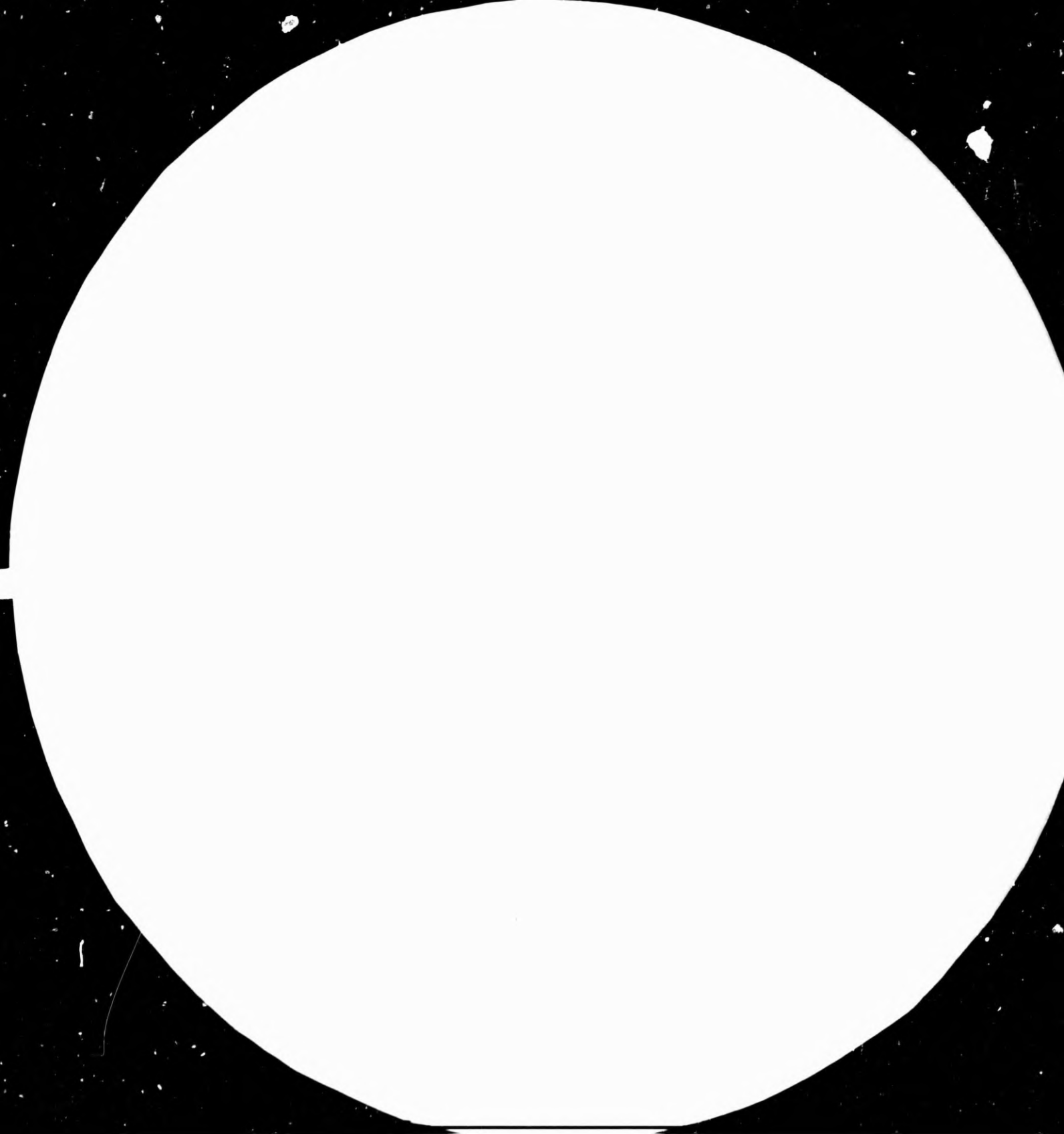
V. REALISATIONS ROUMAINES

En Roumanie on a abordé des recherches pour obtenir des produits de toutes les substances à noyau lysergique, les alcaloïdes naturels, ou les produits de semi-synthèse. On a élaboré les technologies de préparation pour les produits suivants qui sont fabriqués par l'industrie des médicaments:

1. Extrait brut alcaloïdique (Ergoton), d'après une technologie élaborée par ICCF⁺) (15,39).
2. Tartrate d'ergotamine, préparé selon une méthode de ICSMCF⁺⁺) et une technologie de ICCF⁺) (40-42,45), ainsi que les alcaloïdes hydrogénés du groupe de l'ergotamine - substance et produit conditionné (Cornhydrate).
3. Alcaloïdes purs du groupe de l'ergotoxine comme tels ou des produits hydrogénés, substance et produit conditionné (méthansulfonate de dihydroergocristine, -ergocornine, -ergocryptine, 1:1:1) (Ergoceps), d'après une technologie mise au point par ICCF⁺) (20,21,43,44,48,49).
4. Maléate d'ergométrine et maléate de méthylergométrine, d'après un procédé de semi-synthèse établi par ICCF⁺) (56, 59-61), qui utilise comme matière première intermédiaire l'acide lysergique, obtenu également d'après une technologie élaborée par ICCF⁺) (46,57,58,82-84). Cet intermédiaire est préparé du total alcaloïdique isolé de l'ergot de seigle indigène (Ergoton).
5. Méthansulfonate de brom-ergocryptine, selon une technologie en cours d'application industrielle, élaborée par ICCF⁺) (17,47,62).

ä+) Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques

++) Institut pour le Contrôle d'Etat des Médicaments et de Recherches Pharmaceutiques





MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO) TEST CHART No. 2

B I B L I O G R A P H I E

1. Badea F. (1973) - Mecanisme de reacție în chimia organică, Ed. de Stat (R.S.R.), ed. II, 139
2. Bankovski A.I., Bankovskaia A.N., Vechanova L.D., Chuklebov K.S. (1972) - Brevet d'invention, France, Nr.2124106
3. Berde B., Cerletti A. (1956) - Helv. physiol. pharm. Acta, 14, 325
4. Bernardi L., Gofredo O., Bosisio G. (1963) - Brevet d'invention, Belgique, Nr. 625342
5. + + + (1969) - Brevet d'invention, R.F. d'Allemagne, Nr. 1263279
6. + + + (1980) - Brevet d'invention, R.F. d'Allemagne, Nr.2103102
7. + + + (1951) - Brevet d'invention, R.P. de Pologne (SANDOZ Ltd.), Nr.34300
8. + + + (1944) - Brevet d'invention, Suisse (SANDOZ Ltd.), Nr.231014
9. Cerletti A., Konzett H. (1956) - Arch. exp. Path. Pharm., 228, 146
10. Cerletti A., Rathlin L. (1955) - Nature (London), 176, 785
11. Cerletti A. (1958) - Helv. Med. Acta, 25, 330
12. Cerletti A. (1958) - Planta Medica, 4, 413
13. Cerny A., Semonsky M. (1961) - Brevet d'invention, R.S. Tchecoslovaque, Nr.105954
14. Cerny A., Semonsky M. (1971) - Die Pharmazie, 42, 740
15. Cionga E., Facler S. (1954) - Communication à la session scientifique de l'Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest
16. Cionga E., Cucu V. (1959) - Farmacia (R.S.R.), (3), 209
17. Damian E., Ianas O., Oprescu M., Sas I., Brotea Gh. (1979) - Volume dédié à 30 ans d'activité de l'Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest
18. Dudley H.W., Moir C. (1955) - Brit. Med. Jr., I, 520 (cité par 24)
19. Garbrecht L.W. (1959) - J. Org. Chem., 24, 368
20. Gavrilesco H., Pintilie G., Ciucă C., Măscov V., Roșca L., Uricaru N., Nichiforescu E. (1979) - Volume dédié à 30 ans d'activité de l'Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest

21. Gavrilesco H., Pintilie G., Măşcov V., Ciucă C., Roşca L., Uricaru N., Nichiforescu E. (1978) - Brevet d'invention, R.S. de Roumanie, Nr. 92885
22. Hegnauer R. (1963) - Chemotaxonomie der Pflanzen, Birkhauser Verlag, 481
23. Helberg H. (1953) - Farm. Revy., (52), 535; CA, 1958, 47, 12760 f
24. Hofmann A. (1964) - Die Mutterkornalkaloide, Ferdinand Enke Verlag (Stuttgart)
25. Hofmann A., Rutschmann J., Stadler P., Troxler F. (1966) - Brevet d'invention, U.S.A., Nr. 3239530
26. Hofmann A., Troxler F., Ott H. (1964) - Brevet d'invention, R.F. d'Allemagne, Nr. 1 219 492
27. Hofmann A., Troxler F. (1966) - Brevet d'invention, R.S. Tchecoslovaque, Nr. 123544
28. Hofmann A. (1961) - Austral. J. Pharm., Jan. 30
29. Hofmann A., Troxler F. (1966) - Brevet d'invention, U.S.A., Nr. 3249617
30. Imr A. (1960) - Brevet d'invention, R.S. Tchecoslovaque, Nr. 95133
31. Jacobs W.A., Craig L.C. (1934) - J. Biol. Chem., 104, 547
(cité par 24)
32. Jacobs W.A., Craig L.C. (1936) - J. Biol. Chem., 106, 393
(cité par 24)
33. Kukzinski L., Zawiska T. (1960; 1958) - Acta Pol. Pharm., 17 (2), 117; Brevet d'invention, R.P. de Pologne, Nr. 40884
34. Koristek S., Puncocart L. (1959) - Brevet d'invention, R.S. Tchecoslovaque, Nr. 88829
35. Lorincz C., Sasz K., Bitter E. (1964) - Brevet d'invention, R.P. de Hongrie, Nr. 151784
36. Mantle P.G., Waicht E.S. (1968) - Nature, 213, 581
37. Măşcov V., Nichiforescu E., Roşca L., Rizescu C., Velea I. (1973) - Brevet d'invention, R.S. de Roumanie, Nr. 57019
38. Măşcov V., Nichiforescu E., Roşca L., Rizescu C., Velea I. (1973) - Farmacia (R.S.R.), 21 (9), 557
39. Măşcov V., Roşca L. (1973) - Farmacia (R.S.R.), 21 (5), 281
40. Măşcov V., Roşca L., Nichiforescu E., Iliescu C., Cojocaru M.,

- Moldoveanu I. (1977) - Brevet d'invention, R.S. de Roumanie, Nr. 90538
41. Mășcov V., Roșca L., Pintilie G., Gavrilăscu H., Nichiforescu E. (1977) - Sixième Symposium sur la recherche et la valorisation des produits médicamenteux et biostimulateurs, Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie
42. Mășcov V., Roșca L., Ciucă C., Gavrilăscu H., Nichiforescu E. (1978) - Symposium: Nouvelles orientations dans la valorisation des plantes médicinales et aromatiques, Tușnad, Roumanie
43. Mășcov V., Roșca L., Ciucă C., Pintilie G., Gavrilăscu H., Uricaru N., Iliescu C., Nichiforescu E. (1979) - Volume dédié à 30 ans d'activité de l'Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest
44. Nichiforescu E., Roșca L., Mășcov V., Ciucă C., Pintilie G., Gavrilăscu H., Uricaru N., Iliescu C. (1979) - VII^e Congrès National de Pharmacie, Bucarest
45. Nichiforescu E., Mășcov V., Roșca L., Ciucă C., Pintilie G., Gavrilăscu H., Uricaru N., Iliescu C. (1979) - VII^e Congrès National de Pharmacie, Bucarest
46. Nichiforescu E., Velea I., Ciucă C., Roșca L., Gavrilăscu H., Ionescu V., Uricaru N. (1973) - VI^e Congrès National de Pharmacie, Bucarest
47. Oprescu M., Simionescu L., Sas I., Brotea G. (1979) - Volume dédié à 30 ans d'activité de l'Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest
48. Pintilie G., Mășcov V., Roșca L., Ciucă C., Nichiforescu E., Uricaru N., Moldoveanu I., Chirilă E. (1979) - Brevet d'invention, R.S. de Roumanie, Nr. 96648
49. Pintilie G., Gavrilăscu H., Mășcov V., Ciucă C., Roșca L., Uricaru N., Nichiforescu E. (1978) - Brevet d'invention, R.S. de Roumanie, Nr. 92886
50. Floch R.P. (1954) - Brevet d'invention, U.S.A., Nr. 2 736 728
51. Pitra J., Sapara V. (1956) - Czech. Farm., 5, 585
52. Pitra J. (1956) - Brevet d'invention, R.S. Tchécoslovaque, Nr. 85997
53. Pöhm M. (1957) - Brevet d'invention, Autriche, Nr. 192546
54. Pöhm M. (1961) - Brevet d'invention, Autriche, Nr. 216679

55. Richter G. (1971) - Brevet d'invention, Grande Bretagne,
Nr.1227006
56. Roşca L. Sas I., Tudor G., Nichiforescu E. (1973) - VI^e
Congrès National de Pharmacie, Bucarest
57. Roşca L., Nichiforescu E., Ciulei I. (1977) - VI^e Sympo-
sium sur la recherche et la valorisation des
produits médicamenteux et biostimulateurs,
Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques,
Bucarest, Roumanie
58. Roşca L., Gavrilescu H., Ciucă C., Uricaru N., Nichiforescu
E. (1972) - Communication présentée à la réunion
dédiée au 40^e anniversaire de l'Union Médicale
Balcanique, Bucarest
59. Sas I., Roşca L., Gavrilescu H., Ciucă C., Tudor G., Uricaru
N. (1973) - VI^e Congrès National de Pharmacie,
Bucarest, Roumanie
60. Sas I., Roşca L., Gavrilescu H., Tudor G., Velea I., Nichi-
forescu E. (1973) - Brevet d'invention, R.S.
de Roumanie, Nr. 61415
61. Sas I., Gavrilescu H., Uricaru N., Roşca L., Pintilie G.,
Nichiforescu E. (1974) - Brevet d'invention,
R.S. de Roumanie, Nr.80185
62. Sas I., Brotea G., Uricaru N., Nichiforescu E. (1979) -
Volume dédié à 30 ans d'activité de l'Institut
de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest
63. Schneider H.R. (1977) - Experientia, 33, 1412
64. Semonsky M., Zikan V. (1960) - Coll. Czech. Chem. Commun.,
25, 2038
65. Semonsky M., Cerny A., Zikan (1956) - Coll. Czech. Chem.
Commun., 21, 382
66. Semonsky M., Cerny A. (1957) - Brevet d'invention, R.S.
Tchécoslovaque, Nr. 88852
67. Semonsky M., Cerny A. (1957) - Chem. Listy, 51, 654
68. Semonsky M., Beran M. (1965) - Brevet d'invention, R.S.
Tchécoslovaque, Nr. 85395
69. Semonsky M., Cerny A. (1965) - Brevet d'invention, R.S.
Tchécoslovaque, Nr. 86046
70. Smith S., Timmis G.M. (1937) - J. Chem. Soc. (London), 396
71. Stoll A., Burckhardt E. (1935) - C.R. Acad. Sci. Paris,
200, 1620 (cité par 24)

72. Stoll A., Hofmann A. (1943) - *Helv. Chim. Acta*, 26, 1570
73. Stoll A., Hofmann A. (1955) - *Helv. Chim. Acta*, 38, 421
74. Stoll A., Hofmann A. (1937) - *J. Physiol. Chem.*, 25C, 7
75. Stoll A. (1945) - *Helv. Chim. Acta*, 28, 1283
76. Stoll A. (1944) - Brevet d'invention, Suisse, Nr. 231015
77. Stoll A. (1944) - Brevet d'invention, Suisse, Nr. 231016
78. Thompson M.R. (1935) - *Science (Lancaster)*, 81, 636 (cité par 24)
79. Troxler F., Hofmann A. (1957) - *Helv. Chim. Acta*, 40, 1706
80. Troxler F., Hofmann A. (1957) - *Helv. Chim. Acta*, 40, 2160
81. Trzebinski J., Wichlinski L. (1961) - *Acta Pol. Pharm.*, 9, 18
82. Velea I., Nichiforescu E., Tănase C., Roșca L., Gavrilescu H., Ionescu V. (1970) - 39-ème Congrès International de Chimie Industrielle, Bucarest
83. Velea I., Nichiforescu E., Tănase C., Roșca L., Gavrilescu H., Ionescu V. (1971) - Communication à la session scientifique de l'Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie
84. Velea I., Nichiforescu E., Tănase C., Roșca L., Gavrilescu H., Ionescu V. (1971) - Brevet d'invention, R.S. de Roumanie, Nr. 56612
85. Wichlinski L. (1962) - *Diss. Pharm.*, 14 (1), 58
86. Zehnder K., Cerletti A. (1956) - *Helv. phys. pharm. Acta*, 14, 264
87. Zikan V., Semonsky M., Cerny A. (1957) - *Chem. Listy*, 51, 123.

LES STEROÏDES VEGETAUX - SOURCE DE MATIERES
PREMIERES POUR LA SEMISYNTHESE DES HORMONES
STEROÏDIQUES

Ludmila Popa +)

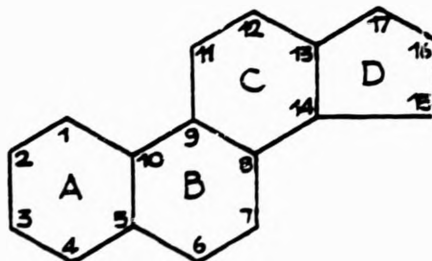
+) Pharmacienne, chercheur à l'Institut de Recherches
Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

I. INTRODUCTION

Les besoins croissants de la thérapeutique en hormones stéroïdiques (sexuelles et corticosurrénales) ont déterminé, dans le monde entier, de nombreuses recherches phytochimiques, pour trouver les matières premières les plus rentables pour la semisynthèse de ces importants médicaments.

Le noyau stérolique, caractérisé par le système tetracyclique du 1,2-cyclopentanoperhydrophénanthrène (formule I), a pris une importance grandissante en biochimie et en thérapeutique.

Le monde végétal se montre assez riche en dérivés de cette structure, qui diffèrent entre eux par le degré de saturation du noyau, le nombre et la nature des substituants qui y sont fixés; le carbone 17 possède, à cet égard, une position privilégiée et peut servir d'attache à de chaînes latérales plus ou moins compliquées cependant que les autres carbones ne supportent, généralement, que l'addition de fonctions oxygénées: hydroxyles, aldéhydes ou cétones, exception faite des carbones 10 et 13, porteurs habituellement d'un groupe méthyle, pouvant lui même être substitué:



I.

Le règne animal possède également des dérivés stéroïdiques et certains d'entre eux présentent - du fait de leur fonction physiologique et de leur action pharmacodynamique - un intérêt capital, à savoir les hormones sexuelles et cortico-

surrénales, dont la production industrielle s'est accrue constamment depuis quelques décennies.

Or, pour être rentables, les synthèses organiques servant à leur obtention ont besoin d'une matière première de nature stéroïdique que les animaux ne peuvent que difficilement fournir en quantité suffisante.

Il était donc nécessaire de trouver chez les végétaux les matières de départ indispensables et, parmi les diverses solutions proposées, un certain nombre a déjà été adopté par l'industrie des hormones stéroïdiques.

II. PRESENTATION DES PRINCIPALES MATIERES PREMIERES VEGETALES A STRUCTURE STEROÏDIQUE

Les nombreux dérivés stéroïdes végétaux actuellement connus peuvent être subdivisés en 4 groupes, différant entre eux essentiellement par la nature de la chaîne latérale fixée sur le carbone 17, chacun d'entre eux présentant une certaine homogénéité tant par ses propriétés physico-chimiques que par ses effets physiologiques ou pharmacologiques.

Ainsi, existe-t-il des:

A. Stérols végétaux, semblables au cholestérol animal et auxquels on peut rattacher les méthyl-stérols, composés triterpéniques de structure et de propriétés très voisines.

B. Génines cardiotoniques caractérisées, en premier lieu, par leur action sur la fibre cardiaque.

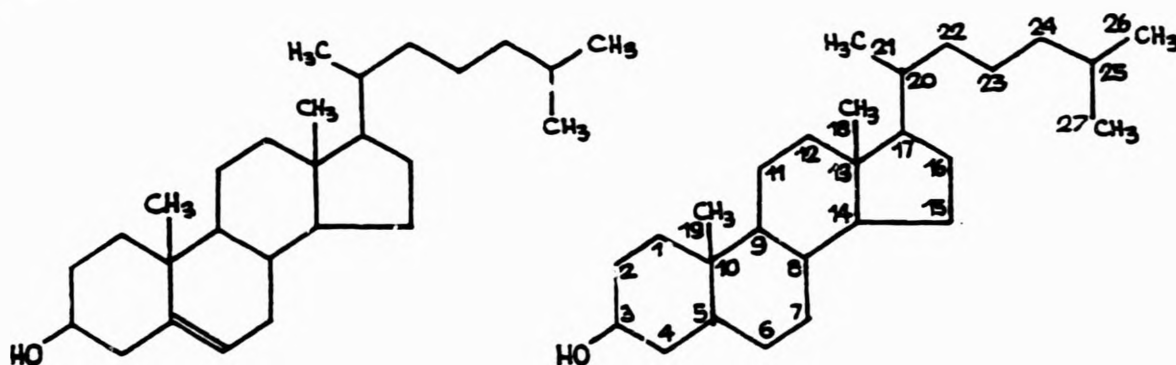
C. Sapogénines stéroïdiques, connues pour leur influence sur la tension superficielle, d'où découlent leurs pouvoirs moussant et hémolytique.

D. Alcaloïdes stéroïdiques se distinguant par la présence de l'azote dans leur molécule, groupe plus hétérogène dont certains éléments, les glycoalcaloïdes des Solanacées, sont souvent rattachés au groupe précédent.

Par la suite, on présente succinctement chacun de ces quatre groupes de dérivés.

A. Stérols végétaux

Comme le cholestérol animal (II), ils sont caractérisés, du point de vue chimique, par l'existence d'une fonction alcoolique en C₃, celle éventuelle, de doubles liaisons et la présence d'une longue chaîne carbonée aliphatique en C₁₇, plus ou moins non-saturée et ramifiée:



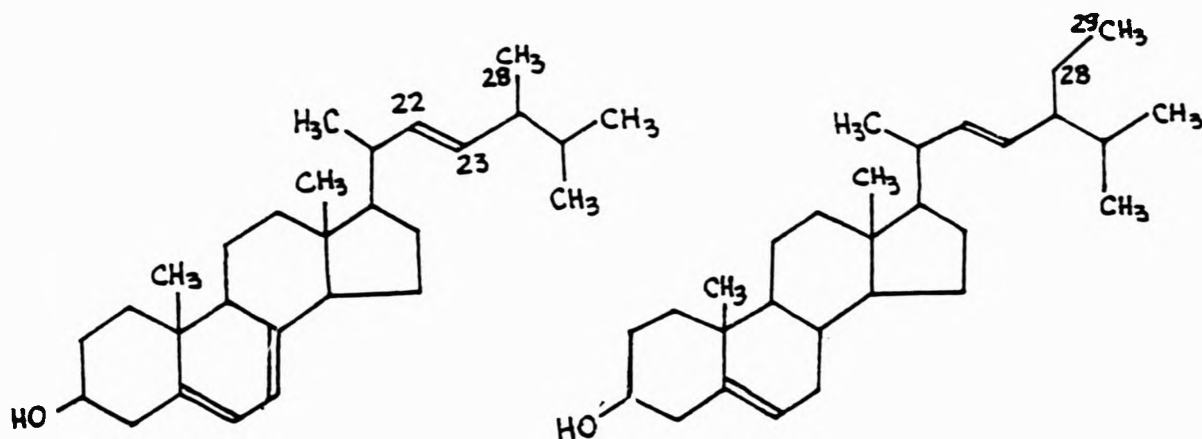
II. Cholestérol

III. Cholestane-3-β-ol

Les stérols isolés des végétaux, tant supérieurs qu'inférieurs, sont actuellement fort nombreux, mais seulement ceux appartenant à la structure Cholestane-3-β-ol (III) présentent de l'intérêt.

(a) Ergostérol

L'un des mieux connus est l'ergostérol (IV), découvert par Tarelet (21), au siècle dernier, dans l'ergot de seigle (Claviceps purpurea, Champignon Ascomycète), en même temps que le fungistérol et retrouvé ultérieurement dans la levure de bière (Saccharomyces cerevisiae, Champignon Protoascomycète) et d'autres espèces de champignons qui constituent d'ailleurs une source plus accessible. Il a été trouvé, en faibles quantités, dans les algues marines et dans de nombreux tissus végétaux. Il constitue une matière première d'accès facile et traditionnelle dans la chimie des stéroïdes, bien connu du fait de son emploi pour l'obtention du calciférol par irradiation.



IV. Ergostérol

V. Stigmastérol

(b) Stigmastérol

Découvert par Windaus et Hauth (24) en 1906 dans la fève de Calabar (Physostigma venenosum), le stigmastérol a été retrouvé ultérieurement dans le mélange des stérols de l'huile de soja (Soja hispida). On trouve de 12 à 25% de stigmastérol (V) dans l'insaponifiable de l'huile de soja, à côté d'un mélange de sitostérols qui sont des Δ^5 -stérols monoéthyléniques.

Les études faites par le groupe Upjohn, en vue de l'utilisation du stigmastérol dans la synthèse des hormones, ont montré que l' α -naphtylcarbamate était l'ester qui convenait le mieux à l'obtention du stigmastérol, avec un rendement de 85%, d'un produit à 90% de pureté. La mise au point de ce procédé de préparation - concurremment avec l'amélioration des procédés de synthèse - a permis au stigmastérol de devenir compétitif dans la semisynthèse des hormones stéroïdes.

B. Génines - cardiotoniques

De nombreux hétérosides connus d'abord par leurs propriétés cardiotoniques et isolés d'espèces très diverses, appartenant à différentes familles, donnent par hydrolyse acide ou diastasique, aux côtés de sucres variables en nature et en nombre, des génines dont la constitution chimique s'est

avérée montrer une grande similitude et présente, fixée en C₁₇ sur le noyau stéroïdique, une chaîne latérale cyclique lactonique pentagonale pour le plus grand nombre (les cardénolides) et hexagonale pour quelques-unes (les bufadiénolides ou bufanolides).

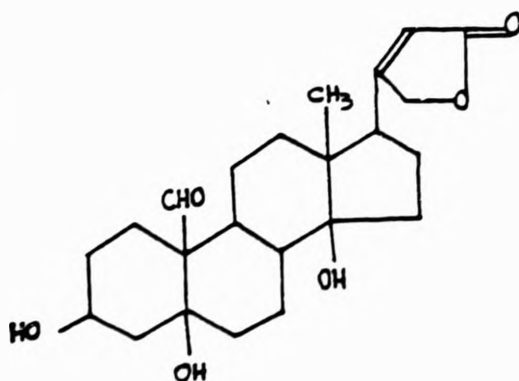
Les différences entre les génines de chaque groupe résultent du nombre et de la position des substituants oxygénés qu'elles présentent, toutes possédant le groupe hydroxyle en C₃, habituel pour les dérivés stéroïdiques, et un autre en C₁₄.

Parmi les génines cardiotoniques, les seules qui ont fait l'objet de recherches en vue d'une semisynthèse sont la strophantidine et la sarmentogénine.

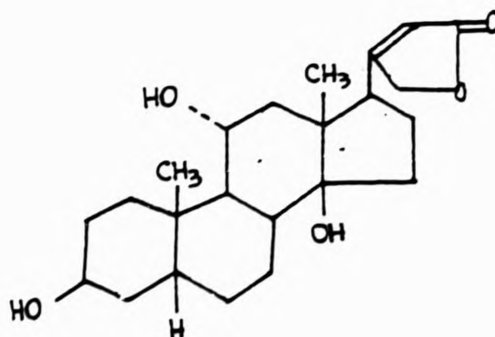
(a) Strophantidine

Génine assez largement répandue, elle présente la particularité de posséder en C₁₀ une fonction aldéhyde, ce qui pouvait laisser espérer un accès plus facile aux dérivés oestrogéniques à cycle A aromatique et ne possédant plus de substituant en C₁₀.

En fait, les recherches chimiques n'ont guère abouti qu'à l'obtention des 19-nor-progestérone et 19-nor-désoxycorticostérone, qui n'ont trouvé que récemment un emploi en thérapeutique et ne semblent pas être des intermédiaires utiles dans la préparation d'autres dérivés stéroïdiques.



VI. Strophantidine



VII. Sarmentogénine

(b) Sarmentogénine

Elle attira l'attention par sa fonction hydroxyle en C₁₁, à une époque où il était difficile d'accéder aux hormones 11- α -oxygénées du type de la cortisone.

Isolée auparavant de graines attribuées à Strophanthus sarmentosus, par Jacobs et Heidelberg (10), en 1929, sa structure a été définitivement établie par Katz (11), en 1948, qui montrait que la sarmentogénine était hydroxylée en 3- β et 11- α notamment, ce qui en faisait une substance particulièrement favorable pour la synthèse cortisonique.

L'espèce Strophanthus sarmentosus pousse dans différentes régions du monde et particulièrement au Sénégal, au Soudan et dans le Nord du Nigéria. Elle contient des glycosides qui sont, en vertu de leur polymorphisme, de différentes structures; c'est pourquoi les études faites n'ont pas réussi encore à identifier la variété qui puisse servir de matière première pour l'obtention de la sarmentogénine.

C. Sapogénines stéroïdiques

Dans un certain nombre de familles de plantes existent des saponines, caractérisées par leur toxicité envers les animaux à sang froid, en particulier les poissons, par leurs propriétés hémolytiques et surtout par leur pouvoir moussant qui les faisaient employer comme poisons dans la pêche et comme détergents.

Ces substances se sont révélées à l'analyse être des hétérosides qui fournissaient par hydrolyse, aux côtés de divers sucres, des génines particulières, les sapogénines, dont la structure chimique a été l'objet de nombreux travaux.

Ceux-ci ont tout d'abord établi la nature de leur noyau, qui permet de les classer en deux catégories:

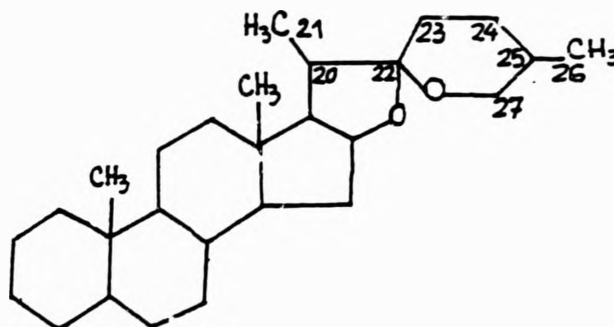
(a) les génines terpéniques qui possèdent, comme noyau de base, celui d'un triterpène pentacyclique, et

(b) les génines stéroïdiques, dont la structure est dérivée du noyau stérol; mais la constitution de la chaîne

latérale fixée en C₁₇, assez complexe, est restée longtemps mal connue.

Elle n'a été définitivement établie que par les travaux de Marker et de ses collaborateurs, à la suite d'études entreprises pour l'utilisation de ces génines stéroïdiques comme matière première dans la synthèse partielle des hormones sexuelles.

Cette chaîne latérale est constituée par un cycle complexe comprenant deux anneaux lactoniques, l'un pentagonal, l'autre hexagonal, réunis par un carbone spiro, suivant la formule (VIII) qui fait de ces produits des dérivés du noyau spirane:



VIII.

Les sapogénines stéroïdiques actuellement connues sont déjà fort nombreuses. Elles diffèrent entre elles par le nombre, la nature et la position des substituants oxygénés sur le noyau stéroïdique et aussi par diverses isoméries. La première porte sur la position de l'hydrogène fixé en C₅, qui peut être en α ou en β , sauf le cas de l'existence d'une double liaison en 5-6. Il existe aussi une isomérie plus particulière, jouant sur la substitution du carbone 25 de la chaîne latérale, qui porte un groupement méthyle pouvant se trouver en position α (forme "iso") ou β (forme "néo"), le passage d'une forme à l'autre pouvant être obtenu par chauffage en milieu acide.

Ces différentes sapogénines, du fait de leur intérêt comme matière première, ont fait l'objet d'études très poussées,

tant du point de vue de l'établissement de leur structure exacte, que de la recherche des diverses espèces susceptibles de les fournir.

Les sapogénines stéroïdiques constituent actuellement une des sources les plus importantes de matières premières nécessaires à la synthèse hormonale; leur étude a donné lieu à de recherches systématiques qui sont encore poursuivies aujourd'hui dans certains pays.

Seules les sapogénines monohydroxylées en C₃ sont actuellement utilisables: diosgénine, hécogénine, tigogénine, gentrogénine ou botogénine, smilagénine et sarsasapogénine.

(a) Diosgénine

Elle a été découverte en 1936 dans les racines d'une plante japonaise, Dioscorea tokoro, fam. Dioscoréacée et représentait le premier dérivé Δ^5 de cette série de sapogénines, dont les termes jusque là connus étaient tous saturés.

De formule brute C₂₇H₄₂O₃, sa structure a été étudiée dans divers travaux japonais (22), qui établirent qu'elle représentait le dérivé 5,6-déhydro de la tigogénine.

Elle montrait donc une parenté évidente avec l'androstenolone, mais la source japonaise était insuffisante et les procédés de conversion n'existaient pas encore.

Ils furent mis au point par Marker et ses collaborateurs (13), dans une série de travaux (près de 200 communications) et au cours desquels la structure définitive de la chaîne latérale et sa dégradation pour obtenir le passage à des stéroïdes en C₂₁ ont été établies.

Ces études portèrent ensuite sur la recherche de sources pratiques. Diverses espèces ont été successivement exploitées: Dioscorea mexicana (répandue au Mexique) et Dioscorea macrostachya.

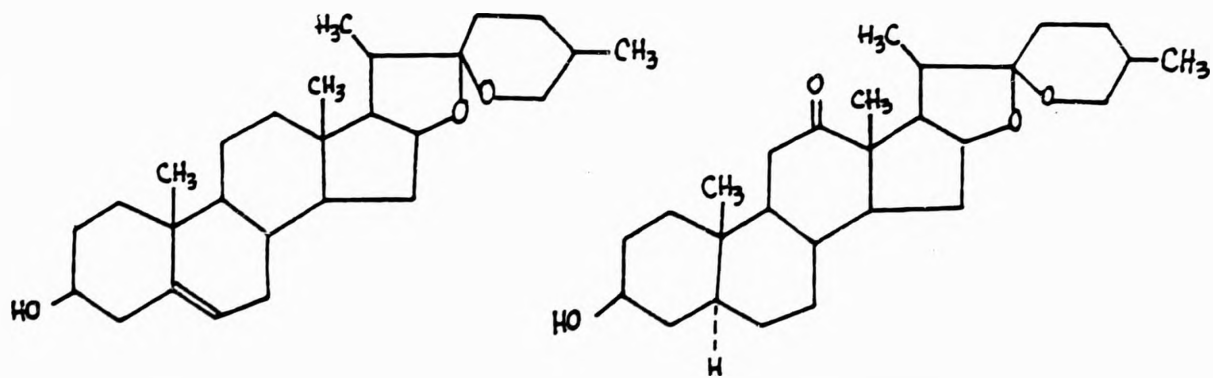
D'après Wall (23), les espèces exploitées actuellement seraient Dioscorea composita et Dioscorea floribunda, qui en contiennent de 4 à 5% de diosgénine. On utilise les tubercules de la plante sauvage, qui sont mis à sécher après un début de

fermentation, ce qui permet un enrichissement de la drogue en diosgénine.

La poudre sèche est extraite selon divers procédés: elle peut être épuisée par l'eau chaude ou l'alcool et les solutés de saponosides obtenus sont hydrolysés par l'action des acides (chlorhydrique ou sulfurique 1,5 N, à la pression atmosphérique, ou 0,5 N, sous pression plus élevée). Le précipité de sapogénine est purifié par cristallisation dans l'heptane ou par acétylation au moyen de l'anhydride acétique et cristallisation dans ce solvant.

Une variante consiste en l'hydrolyse des saponines directement dans la drogue traitée avec un solvant acidulé; la diosgénine étant alors obtenue par extraction de la drogue à l'aide d'un solvant organique (ex. heptane), d'où on la fait cristalliser.

Les essais faits par Sannié (17) lui permirent de retrouver cette sapogénine dans le Fénu grec (Trigonella foenum graecum), en régions méditerranéennes, ce qui, joint à l'utilisation industrielle possible de l'huile (40% du poids de la graine), pourrait faire de cette plante une source intéressante.



IX. Diosgénine

X. Hécogénine

(b) Hécogénine

Découverte par Marker dans Hechtia taxensis, Broméliacée, au cours de ses recherches et signalée par lui dans 19 espèces d'Agaves, elle fit l'objet de recherches plus poussées du fait

de la présence dans sa structure d'un oxygène en C_{12} .

Elle devenait en effet au début de l'ère de la cortisone, une matière première équivalente aux acides biliaires.

Les travaux des auteurs anglais permirent d'établir sa présence dans le Sisal (Agave rigida var. sisalana) et les espèces voisines, plante cultivée pour sa fibre sur une large échelle (plus de 100.000 tonnes par an), en Afrique Orientale.

Elle a été retrouvée dans des espèces très voisines (Agave fourcroydes, en particulier) et actuellement l'extraction de l'hécogénine est sans doute plus importante à partir du Sisal du Yucatan qu'à partir du Sisal africain; il en existe également à Java, en Haïti et à la Jamaïque, où ces espèces d'origine américaine ont été importées.

Les teneurs de ces plantes en hécogénine sont assez faibles (0,1 à 0,2%) et les procédés d'extraction mis au point doivent être associés à l'utilisation des fibres, pour devenir économiques.

Ils reposent sur l'entraînement des saponosides dans les jus et pulpes provenant du traitement des feuilles dans des appareils qui dilacèrent les fibres. Après pressage des pulpes, les jus sont recueillis dans de grands réservoirs et soumis pendant une semaine environ à une fermentation spontanée où interviennent des diastases (saponases) présentes dans les plantes ainsi que des enzymes microbiennes.

On obtient un dépôt de boues, assez difficiles d'ailleurs à récupérer, dans lesquelles l'hécogénine a précipité et d'où elle est extraite, après hydrolyse acide, par l'heptane à chaud.

La séparation de la tigogénine, présente surtout dans le Sisal du Yucatan, s'obtient par cristallisation fractionnée dans l'éther de pétrole ou par chromatographie.

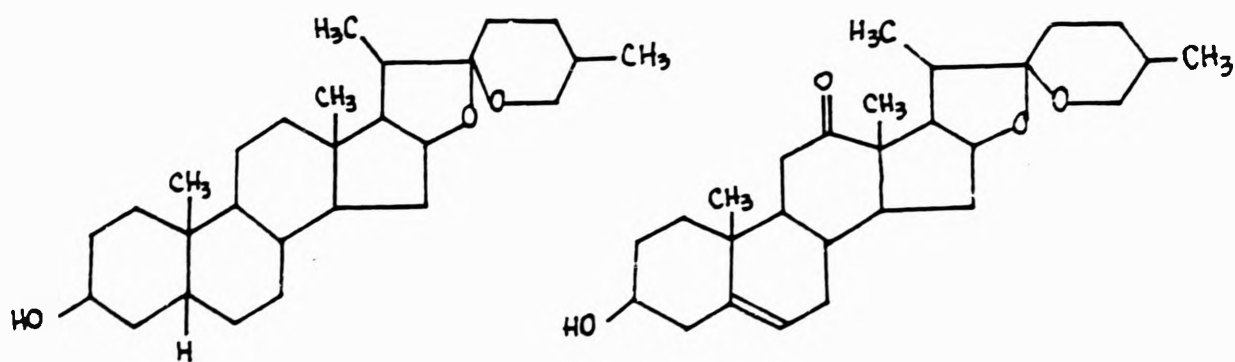
(c) Sarsapogénine et smilagénine

Ce sont les deux isomères "néo" et "iso" qui appartiennent à la série 5- β , et qui permettent de parvenir à la progestérone.

La sarsasapogénine a été découverte dans Smilax ornata (Liliacée) et retrouvée dans diverses Salsepareilles, dans quelques Agave et Smilax et dans de nombreux Yucca. Elle peut atteindre des taux de 1% dans certaines espèces: Yucca elata, Yucca baccata, Yucca schidigera. Ces deux dernières espèces, particulièrement intéressantes, se rencontrent en Arizona et en Californie, la récolte annuelle des feuilles inférieures permettant plusieurs cueillettes sur la même plante.

La smilagénine, isolée elle aussi de Smilax ornata, a été retrouvée dans de nombreuses espèces appartenant surtout au genre Yucca. Les feuilles d'Agave lecheguilla en contiennent de 1 à 1,5%. Cette plante possède des fibres utilisables en broserie, où leur emploi est cependant limité en raison des difficultés de récolte.

La préparation, semblable pour les deux produits, est voisine de celle de la diosgénine: épuisement par l'eau chaude ou l'alcool, hydrolyse partielle insolubilisant un monoside, isolement et purification de ce produit, hydrolyse acide forte, et cristallisation dans l'heptane.



XI. Sarsasapogénine

XII. Botogénine

(d) Botogénine ou gentrogénine

Dérivé cétonique en C₁₂ et non-saturé en 5-6, elle représente une matière première particulièrement intéressante.

Découverte par Marker dans Dioscorea mexicana, avec son C₂₅-épimère, la néobotogénine, elle n'avait pu être retrouvée,

malgré les efforts de recherche, dans aucune plante à de taux convenables.

Récemment, Walens et ses collaborateurs (25) isolèrent d'une plante du Mexique, la Dioscorea spiculiflora, deux dérivés de constitution chimique identique, mais dont les différences importantes des propriétés physiques les firent dénommer gentrogénine et correllogénine. La teneur en sapogénines de cette plante serait suffisante pour justifier une exploitation industrielle.

D. Alcaloïdes stéroïdiques

Depuis deux décennies, un nouveau groupe de dérivés stéroïdiques est venu s'ajouter à ceux déjà connus, celui des alcaloïdes, qui a donné lieu à de recherches considérables et tend à prendre une importance de plus en plus grande.

Les alcaloïdes stéroïdiques varient d'une part par leur constitution chimique et notamment selon l'emplacement de l'azote qui les caractérise et d'autre part, selon les familles où ils sont décelés.

Actuellement deux familles fournissent des dérivés importants: les Solanacées et les Apocynacées.

1. Glycoalcaloïdes des Solanacées

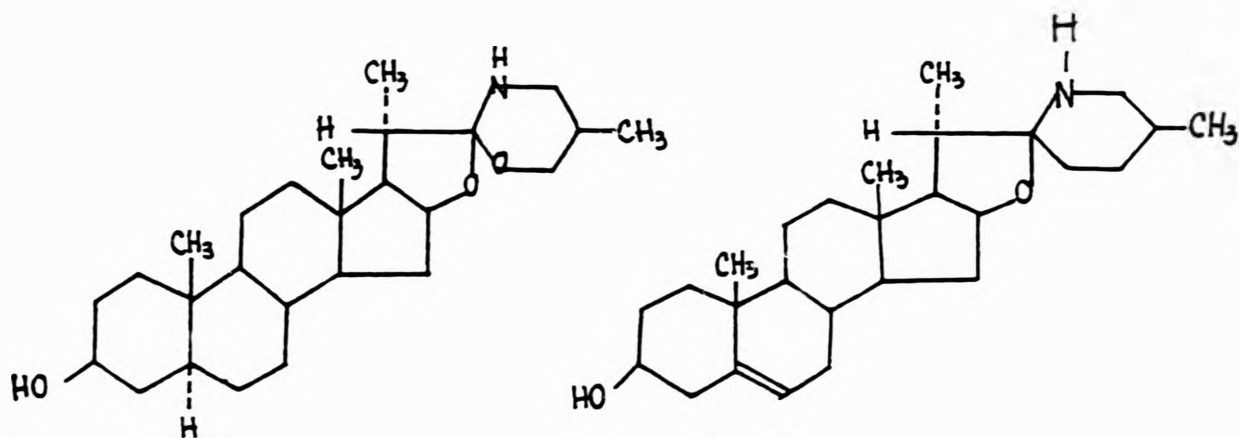
La présence de ces dérivés est connue depuis longtemps (4,9), mais les travaux sur ces composés ont été entrepris en 1942 par Briggs et ses collaborateurs (4,5).

Longtemps considérés comme des saponines, dont ils sont très proches par leurs propriétés et par la structure chimique, ces produits ne s'en différencient guère que par la présence de l'azote qui leur donne leur caractère alcaloïde. Comme les saponines, ils se trouvent sous forme d'hétérosides dans diverses espèces de Solanum et notamment: Solanum tuberosum, Solanum lycopersicum, Solanum aviculare, Solanum racemigerum etc.

L'hydrolyse de ces dérivés, assez difficile, libère plu-

sieurs sucres (tels que glucose, galactose, xylose ou rhamnose) et une génine azotée, possédant la structure stéroïdique et l'hydroxyle en C₃, mais pouvant présenter deux types structuraux différents: le cholestane (série "allo") et le coprostane (série "normale").

Dans la série du type cholestane, citons la tomatidine (XIII) et dans la série du type coprostane - la solasodine (XIV).



XIII. Tomatidine

XIV. Solasodine

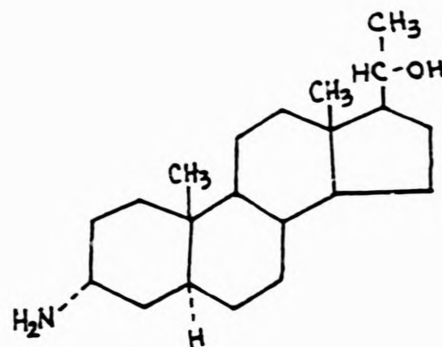
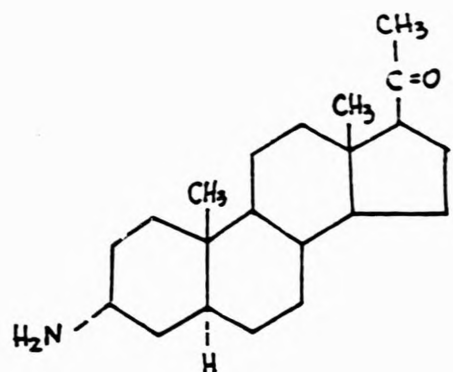
2. Alcaloïdes des Apocynacées

Cette famille, particulièrement riche en principes actifs variés, présente, aux côtés des hétérosides cardiotoxiques et des alcaloïdes indoliques du type de la yohimbine et de la réserpine, une série d'alcaloïdes stéroïdiques.

Deux genres sont importants à ce point de vue: les alcaloïdes des Funtumia et des Holarrhena.

(a) Alcaloïdes des Funtumia

Les feuilles de deux Funtumia, Funtumia latifolia et Funtumia africana, arbres poussant en Afrique, ont une teneur très élevée en alcaloïdes de l'ordre de 4% de la matière sèche, et on y rencontre, pour la première espèce, la funtumine (XV) et la funtumidine (XVI), toutes deux présentant une structure très voisine:

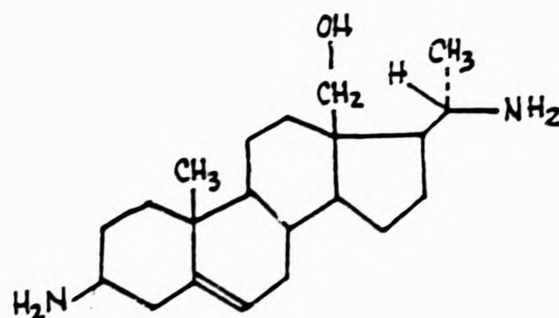
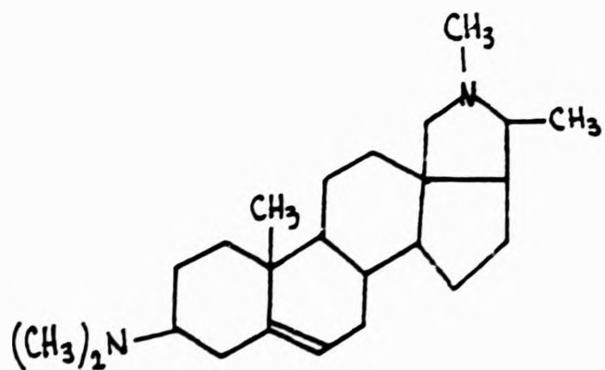


XV. Funtumine

XVI. Funtumidine

(b) Alcaloïdes des Holarrhena

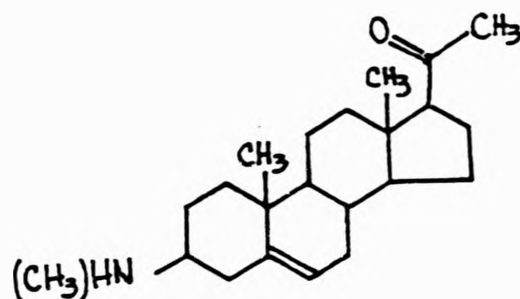
Deux espèces ont été étudiées: Holarrhena antidysenterica (répandue en Inde) et Holarrhena floribunda (d'origine africaine). Ces alcaloïdes ont d'abord été extraits des écorces; leur type est la conessine (XVII), dont la structure présente des particularités intéressantes: c'est une des rares substances naturelles ayant un substituant au carbone 16 et qui forme un pont avec le carbone 20; ce substituant constitue un hétérocycle pentagonal qui peut rester ouvert dans certains dérivés voisins, telle l'holarrhimine (XVIII). D'autre part, la fonction alcoolique placée en C₃ et habituelle chez les dérivés stéroïdiques est remplacée par une fonction amine, substituée ou non; de plus, il existe une double liaison en C₅-C₆.



XVII. Conessine

XVIII. Holarrhimine

Aux côtés de ces dérivés, des feuilles d'Holarrhena floribunda, des amines cétoniques plus simples ont été isolées et dont la structure se rapproche de celle de la progestérone. Ces dérivés ont été dénommés holaphylline (XIX), holaphyllamine et holamine:



XIX. Holaphylline

Les alcaloïdes des Holarrhena ne semblent pas avoir trouvé encore une utilisation à l'échelle industrielle. L'holarrhimine qui se prête particulièrement bien à l'obtention de la 18-hydroxy-progestérone est une matière peu abondante; l'utilisation de l'holarrhénine, hydroxylée en 12 β , semblerait intéressante dans la semisynthèse des hormones stéroïdiques.

III. CONDITIONS ET POSSIBILITES D'EMPLOI DES MATIERES PREMIERES STEROÏDIQUES D'ORIGINE VEGETALE DANS LA SEMISYNTHESE DES HORMONES STEROÏDIQUES

Parmi les différentes matières premières stéroïdiques proposées pour parvenir aux dérivés hormonaux, le choix est certainement guidé par la facilité et le rendement des opérations chimiques nécessaires à leur transformation, mais il est aussi largement dépendant des possibilités d'approvisionnement.

Les conditions que l'on doit demander aux matières

premières végétales sont bien définies:

- . la plante doit exister en quantité abondante ou doit être facilement cultivable;
- . la récolte ne doit pas détruire les gisements naturels;
- . la teneur en principes actifs doit être assez élevée et ne doit pas trop varier;
- . les substances isolées doivent être facilement transformables. Il est préférable de n'isoler qu'un seul produit dans un état de pureté avancé;
- . les sous-produits doivent trouver leur utilisation.

Dans un rapide passage en revue des différentes substances proposées, il faut définir dans quelle mesure elles répondent à ces impératifs et d'expliquer ainsi l'importance que certaines ont pu ou pourraient prendre.

A. Stérols végétaux

Connus depuis longtemps, ils furent les premières substances auxquelles on s'adressait pour obtenir des dérivés stéroïdiques de semisynthèse et, malgré la relative complexité des procédés employés et leur rendement souvent faible, certains stérols sont encore actuellement des sources utilisées industriellement.

L'ergostérol reste une matière première traditionnelle dans la chimie des stéroïdes et le stigmastérol est aussi toujours compétitif dans la semisynthèse des hormones stéroïdiques.

B. Génines cardiotoniques

Ils sont aujourd'hui sans importance pratique à cause des difficultés botaniques énumérées antérieurement.

C. Sapogénines stéroïdiques

La diosgénine constitue la matière première la plus intéressante pour l'industrie, l'augmentation importante de

la demande se basant sur sa transformation facile en progestérone, qui s'est révélée être un intermédiaire possible dans la préparation de la cortisone et d'autres hormones.

L'hécogénine est aussi très utilisée industriellement notamment en Angleterre et constitue, à côté de la diosgénine, un des produits de base qui dominent actuellement le marché des substances stéroïdiques.

Les possibilités offertes par les sapogénines sont donc importantes et leur valeur comme matière première est grande et justifie les travaux poursuivis encore aujourd'hui.

Mais il semble qu'une nouvelle orientation soit donnée aux recherches avec l'étude des possibilités d'utilisation des alcaloïdes stéroïdiques.

D. Alcaloïdes stéroïdiques

Sur l'utilisation des alcaloïdes stéroïdiques des Solanacées, il semble évident, du fait de leur structure même, très voisine des sapogénines déjà vues, que leur transformation ne pose pas de problèmes chimiques difficiles.

Les substances les plus intéressantes sont la solasodine et la tomatidine.

La solasodine, notamment, obtenue à partir de Solanum laciniatum ou Solanum aviculare, a fait l'objet d'une utilisation sur le plan industriel en Hongrie, en Tchécoslovaquie et en U.R.S.S. (18, 20, 26).

Les alcaloïdes des Funtumia sont des matières premières intéressantes et facilement accessibles; l'espèce Funtumia latifolia est abondante et la cueillette des feuilles pourrait dès maintenant atteindre plusieurs centaines de tonnes par an. Il existe des possibilités de culture d'autant plus aisée que la récolte des feuilles laisse intacte la plantation et qu'en cas d'abattage, les arbres repoussent à partir de la souche.

La teneur en alcaloïdes est suffisamment élevée (4%) pour justifier l'extraction industrielle, tout en pouvant conduire à des dérivés hormonaux ou à des intermédiaires utilisables.

IV. RECHERCHES ROUMAINES POUR TROUVER UNE MATIERE
PREMIERE VEGETALE INDIGENE, UTILISABLE DANS
L'INDUSTRIE DES HORMONES STEROÏDIQUES

A. Solasodine de *Solanum laciniatum*, acclimaté en Roumanie

La consommation de plus en plus grande d'hormones stéroïdiques a rarefié les matières premières nécessaires à leur semi-synthèse. Les pays qui ne les possèdent pas en quantités suffisantes ont essayé de mettre en valeur la solasodine, alcaloïde stéroïdique obtenu par hydrolyse de la fraction glycoalcaloïdique de *Solanum laciniatum* Ait., plante originaire des pays chauds (Australie), mais qu'on peut cultiver également dans les régions tempérées.

L'étude de l'espèce *Solanum laciniatum* en Roumanie a eu pour but d'élaborer des méthodes d'acclimatation agrobiologique, d'estimer la teneur des alcaloïdes dans la plante et d'établir une méthode industrielle avantageuse d'isolation de la solasodine (7,8,12,14,15,16).

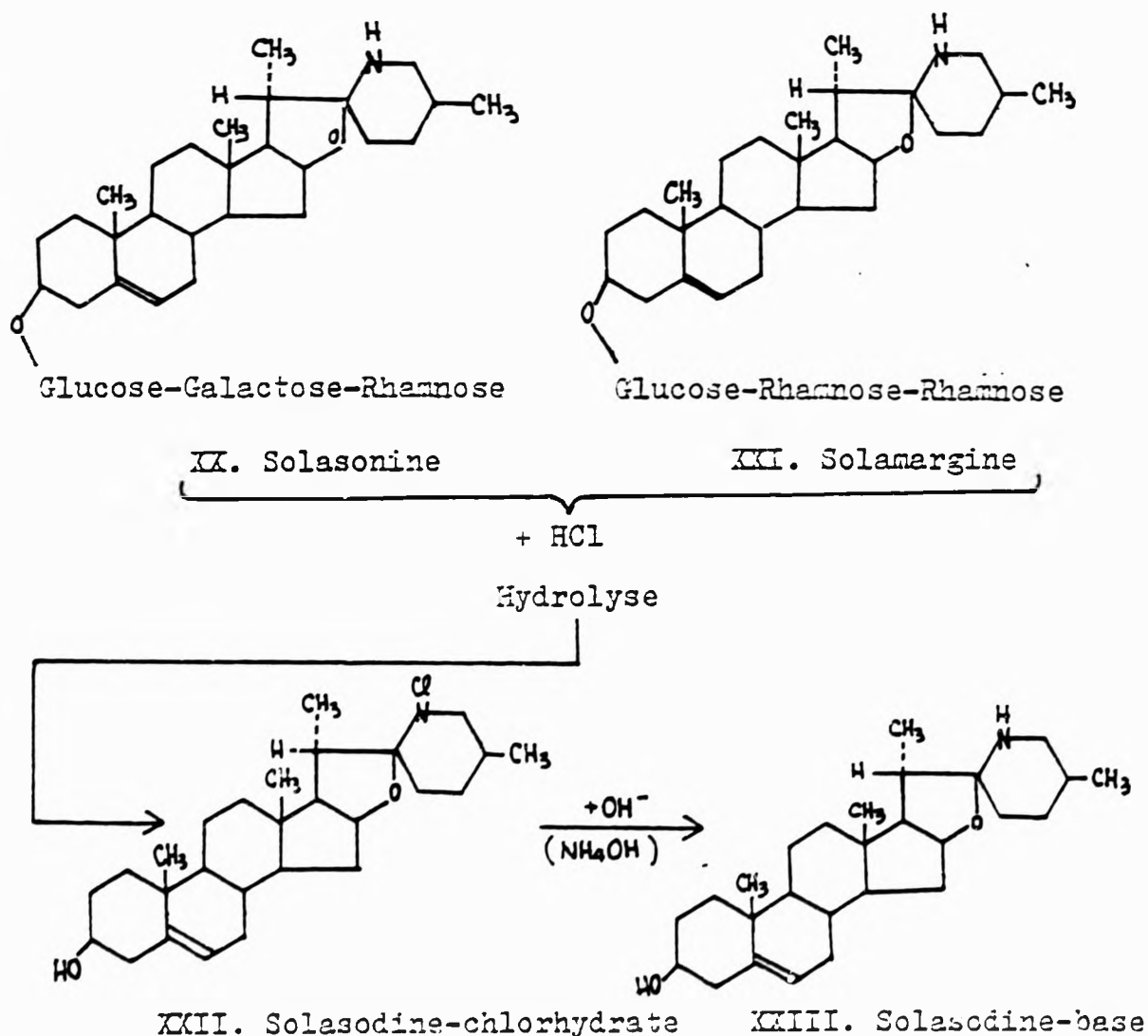
Les travaux agrobiologiques ont conduit à l'acclimatation de cette espèce et à l'obtention d'une matière première constituée par les parties aériennes (Herba), avec une teneur en solasodine d'environ 1 à 1,3% (rapportée à la plante sèche).

Afin d'établir une méthode industrielle de préparation de la solasodine, on a étudié au niveau du laboratoire les facteurs qui influencent le rendement d'extraction des glycoalcaloïdes à partir des parties aériennes de la plante sèche et le rendement en chlorhydrate de solasodine, obtenu par l'hydrolyse en milieu acide des glycoalcaloïdes (7,8).

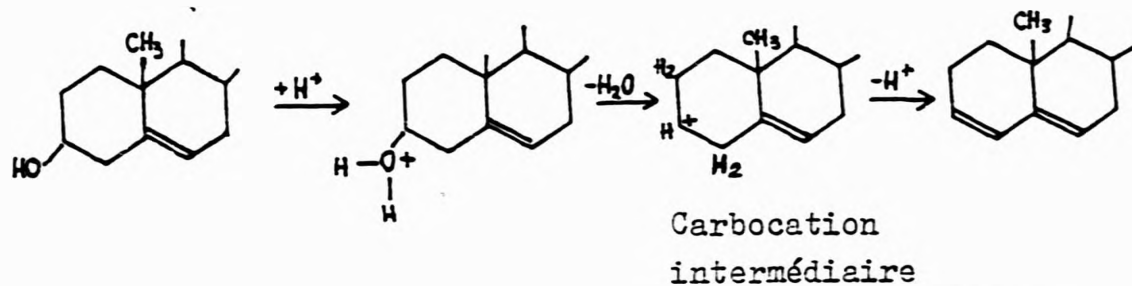
Au cours de la phase d'extraction de la plante sèche, avec une solution aqueuse de H_2SO_4 , on a suivi l'obtention d'extraits aussi concentrés que possible de glycoalcaloïdes en appliquant l'extraction solide-liquide à contre-courant. On a établi par voie expérimentale les valeurs optima pour les paramètres suivants: le degré d'effritement de la plante; le temps et le rapport d'imbibition; le temps et le pH optima d'extraction; le rapport de solvant; le nombre minimum d'extractions par récipient; la concentration en H_2SO_4 du solvant d'extraction (13).

En appliquant ces paramètres à l'extracteur à contre-courant sur un nombre de 20-25 récipients on a abouti à l'obtention d'un rendement d'extraction de 95%, la concentration moyenne des extraits en glycoalcaloïdes étant de 0,15 à 0,20% et permettant l'obtention des glycoalcaloïdes avec des rendements satisfaisants.

La phase d'hydrolyse des glycoalcaloïdes (XX et XXI) n'a pas fait l'objet d'une étude systématique dans la littérature et par conséquent on a cherché à élucider les facteurs qui influencent le rendement en chlorhydrate de solasodine (XXII) et aussi la formation de la 3,5-solasodiène (XXIV) - produit de déshydratation de la solasodine et qui est considérée comme une impureté indésirable pour les réactions de semisynthèse:



Mécanisme de la réaction de déshydratation de la solasodine avec formation de solasodiène pendant l'hydrolyse acide :



Solasodine

XXIV. 3,5-solasodiène

Pour l'étude expérimentale on a utilisé un total de glycoalcaloïdes à l'état brut (avec un contenu moyen en solasodine de 15 à 20%), extrait par l'alcool (MeOH, EtOH) et la solution alcoolique a servi à l'étude des facteurs qui conditionnent l'hydrolyse en milieu acide (HCl, H₂SO₄).

Le rendement en chlorhydrate de solasodine a été déterminé par la différence entre les valeurs obtenues pour les alcaloïdes totaux (solasodine et solasodiène) par la méthode photocolormétrique à la Tropéoline OCO (18) et celle de la solasodiène, par la méthode spectrophotométrique (18,19).

On a suivi, en outre, par la chromatographie en couche mince (7) le clivage des glycoalcaloïdes pendant l'hydrolyse acide, ce qui a permis de tirer certaines conclusions intéressantes.

Les résultats obtenus ont conduit aux conclusions suivantes:

1. La déshydratation de la solasodine, avec formation de 3,5-solasodiène est favorisée par:
 - (a) la nature de l'acide utilisé pour la réaction d'hydrolyse (à normalité égale, la déshydratation de la solasodine est plus grande en présence de HCl que de H₂SO₄);

(b) la nature et la concentration de l'alcool (MeOH, EtOH) utilisé comme milieu de l'hydrolyse (l'abaissement de la concentration en alcool détermine l'accroissement du solasodiène);

(c) la concentration en glycoalcaloïdes du milieu d'hydrolyse (si l'on utilise HCl comme agent de l'hydrolyse, le degré de déshydratation de la solasodine s'abaisse avec l'accroissement de la concentration en solasodine du milieu de réaction, fait que l'on n'observe pas si l'hydrolyse est effectuée avec du H_2SO_4);

(d) la température et le temps de l'hydrolyse (le rendement de la réaction de l'hydrolyse s'accroît jusqu'à trois heures et se stabilise au-delà de cette durée autour de 95 à 96%; en même temps la quantité de solasodiène formé croît proportionnellement avec le temps, spécialement avec la prolongation de l'hydrolyse au-delà de trois heures).

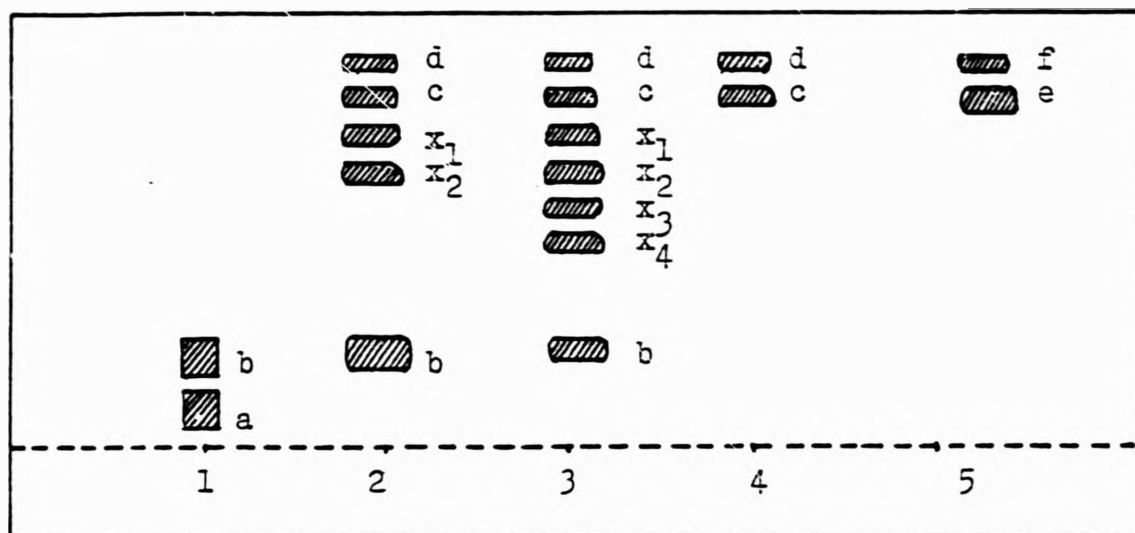
2. La chromatographie en couche mince du chlorhydrate de solasodine et des liqueurs-mères après hydrolyse a permis de constater que le solasodiène se forme dès la première heure d'hydrolyse, dans le cas où cette réaction a lieu dans l'alcool méthylique à 90°, contenant 3 à 5% de HCl.

3. Concernant la dynamique de la réaction d'hydrolyse des glycoalcaloïdes on a constaté, par chromatographie en couche mince, que la solasoline se décompose plus facilement que la solamargine, qui ne s'hydrolyse pas, même après deux heures à une concentration du milieu de 3% en HCl.

Si l'on opère à une concentration de 5% en HCl, cette différence entre les deux glycoalcaloïdes disparaît; les glycoalcaloïdes initiaux sont vite décomposés et on ne retrouve plus dans le milieu d'hydrolyse de traces de glycoalcaloïdes non-hydrolysés (solasonine, solamargine); mais, en échange, on observe une série de "spots" correspondant aux fractions glycoalcaloïdiques partiellement hydroxylées (voir la figure en page suivante).

La méthode de chromatographie en couche mince (7) utilise comme support le silicagel Merck à 10% de sulfate de calcium; système de solvants: acétate d'éthyle, pyridine, eau (5:1:4); temps d'irrigation: soixante minutes; réactif pour révéler: solution chloroformique saturée de trichlorure d'antimoine.

Chromatographie en couche mince, sur l'hydrolyse des glycoalcaloïdes dans le chlorhydrate de solasodine



- 1.- a,b: Glycoalcaloïdes - substances de référence:
 - a. Solasonine ($R_f = 0,05$)
 - b. Solamargine ($R_f = 0,23$)
- 2.- Après une heure d'hydrolyse avec de l'HCl à 3%:
 - x_1, x_2 : Glycoalcaloïdes partiellement hydrolysés
 - c. Chlorhydrate de solasodine ($R_f = 0,79$)
 - d. Chlorhydrate de solasodiène ($R_f = 0,83$)
- 3.- Liqueurs-mères d'hydrolyse:
 - x_1, x_2, x_3, x_4 : Glycoalcaloïdes partiellement hydrolysés
- 4.- Chlorhydrate de solasodine, isolé après hydrolyse
- 5.- Solasodine-base, obtenue par transformation du chlorhydrate:
 - e. Solasodine-base ($R_f = 0,84$)
 - f. Solasodiène-base ($R_f = 0,86$)

Les conclusions des études expérimentales ont permis d'établir les meilleures conditions d'hydrolyse pour obtenir le chlorhydrate de solasodine par l'hydrolyse acide des glycoalcaloïdes:

- . la concentration de 90° en alcool méthylique du milieu de réaction et celle en glycoalcaloïdes de 3 à 4% (exprimée en solasodine);
- . la concentration de 5% en HCl, du milieu d'hydrolyse;
- . le temps d'hydrolyse de trois heures.

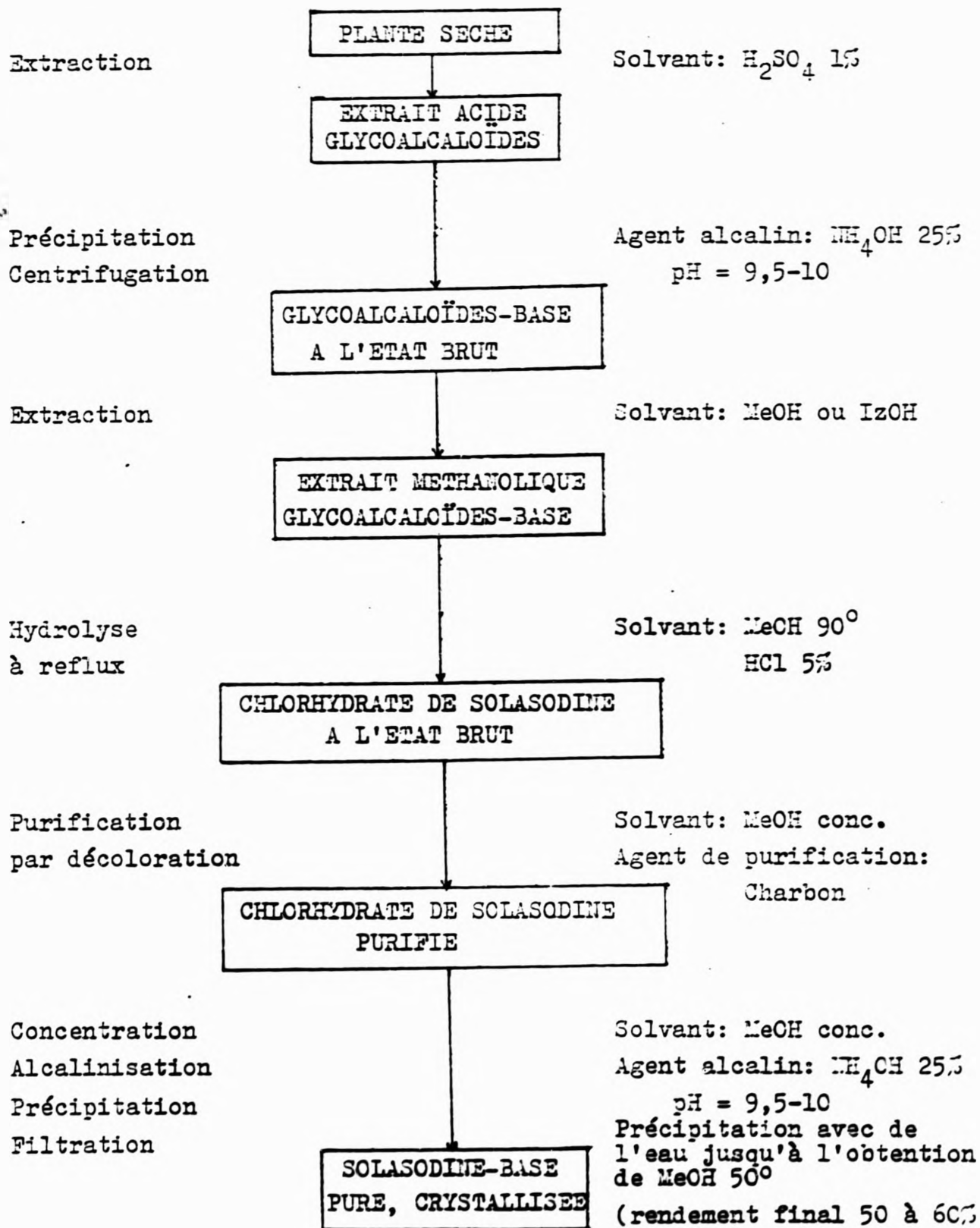
Dans ces conditions on obtient un chlorhydrate de solasodine contenant 60 à 85%, qui renferme moins de 3% de solasodiène; le rendement de l'hydrolyse, exprimé en solasodine, est de 95%.

A partir de ce chlorhydrate de solasodine, après sa purification par décoloration avec du charbon et alcalinisation avec du NH_4OH au pH = 9,5 à 10, on obtient la solasodine base, pure, cristallisée (XXIII), qui contient moins de 3% de solasodiène.

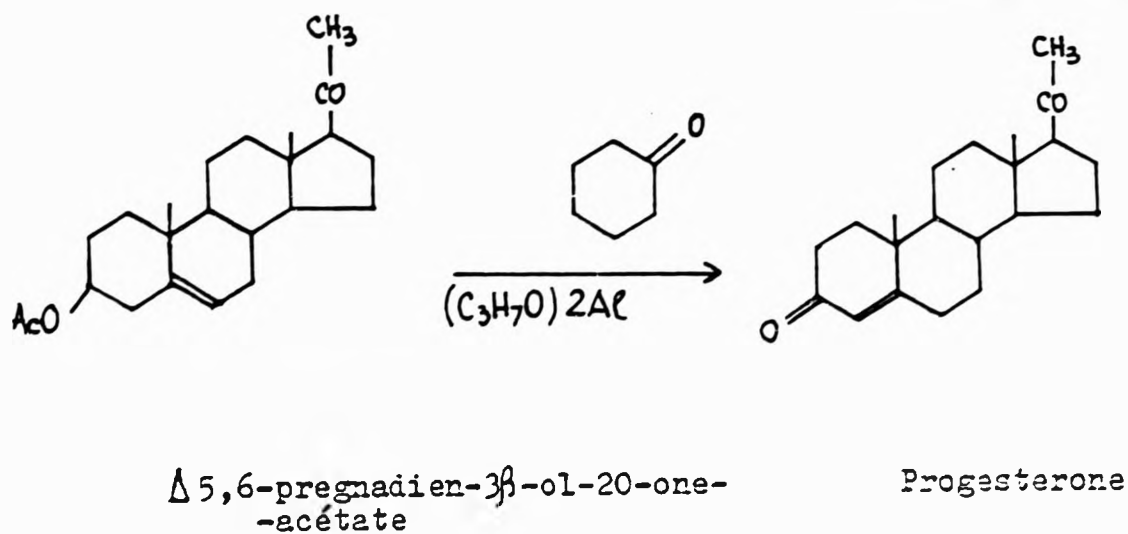
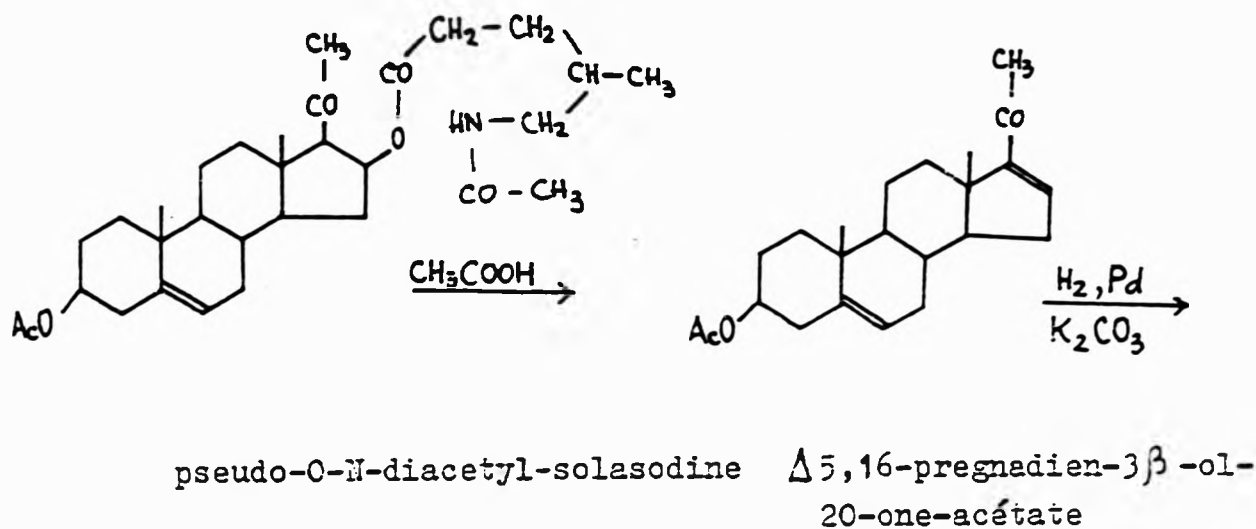
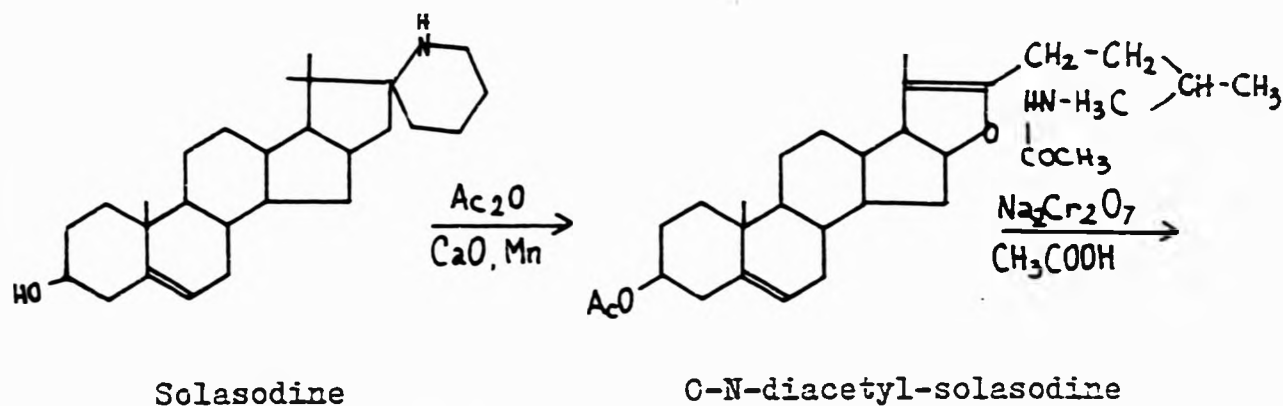
La méthode industrielle pour isoler la solasodine à partir de la plante sèche est basée sur ces résultats et comporte les phases suivantes:

- (a) extraction de la plante avec une solution aqueuse de H_2SO_4 à 1%, précipitation des glycoalcaloïdes par NH_4OH à 25%, au pH = 9,5 à 10, et leur séparation par centrifugation;
- (b) extraction des glycoalcaloïdes à l'état brut, par l'alcool méthylique, hydrolyse en milieu hydro-méthanclique par l'acide chlorhydrique à 5% et séparation du chlorhydrate de solasodine, à l'état brut;
- (c) purification du chlorhydrate de solasodine et sa transformation en solasodine-base pure (95%) (voir diagramme en page suivante).

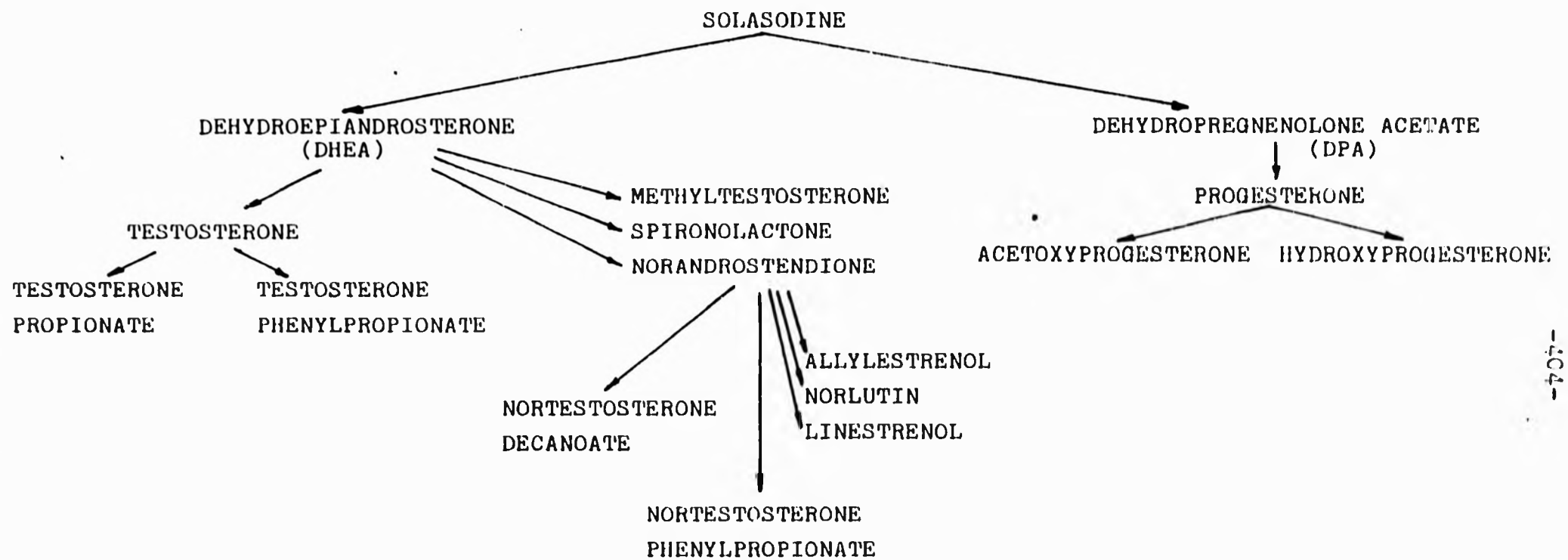
DIAGRAMME DE L'ISOLATION DE LA SOLASODINE A PARTIR
DE SOLANUM LACINIATUM



3. PREPARATION DE LA PROGESTERONE
A PARTIR DE LA SOLASODINE



TECHNOLOGIES DE FABRICATION D'HORMONES STEROÏDIQUES
 A PARTIR DE LA SOLASODINE OU DE LA DIOSGENINE (ELABOREES EN ROUMANIE)



V. CONCLUSIONS

La fabrication industrielle d'hormones stéroïdiques et des dérivés apparentés exige des quantités importantes de matières premières et pose un problème assez ardu, la chimie des stéroïdes étant fort compliquée.

La synthèse totale de ces produits est très laborieuse et donne des rendements très faibles. c'est pourquoi il faut s'adresser à une matière première déjà élaborée dans la nature, donc aux dérivés stéroïdiques présents dans le règne animal ou végétal.

Les quantités limitées de dérivés animaux ont orienté la plupart de recherches vers le domaine végétal, où il est souvent plus facile de trouver des produits en quantités pratiquement inépuisables, grâce aux possibilités de culture et au renouvellement des végétaux.

Le grand rôle joué par les stéroïdes végétaux dans la semi-synthèse des hormones stéroïdiques (sexuelles et corticosurrénales) a donné lieu à un grand développement des recherches d'ordre phytochimique et à d'importants progrès dans la connaissance de la constitution des dérivés végétaux et de la composition de nombreuses espèces.

Ces travaux ont fait ressortir d'autre part l'intérêt primordial d'une connaissance approfondie des données botaniques et des possibilités de culture des végétaux intéressants.

Parmi les matières premières stéroïdiques d'origine végétale, les plus utilisées, citons: les stérols végétaux (ergostérol, stigmastérol) et les sapogénines stéroïdiques (diosgénine et hécogénine).

Pour les pays qui ne possèdent pas ces matières premières, les alcaloïdes stéroïdiques des Solanacées (solasodine et tomatidine) présentent de l'intérêt.

C'est ainsi que l'on a introduit en Roumanie des cultures de Solanum laciniatum, qui donne un matériau contenant 1 à 1,5% de solasodine; une technologie d'extraction de la solasodine a également été élaborée; de même des technologies industrielles d'obtention d'hormones stéroïdiques et de leurs intermédiaires à partir de solasodine ou de diosgénine ont de même été élaborées.

B I B L I O G R A P H I E

1. Baup M. (1826) - Ann. Chim., (2), 31, 108
2. Bodea C., Ciurdaru V., Indrea D. (1963) - Rev. Chim., Bucarest, 14, 398-399
3. Bloom H. et Briggs L.H. (1952) - J. Chem. Soc., 3591-3592
4. Briggs L.H. et Harvey W.E. (1950) - J. Chem. Soc., 3013-3020
5. Briggs L.H. et Brooker E.G. (1952) - J. Chem. Soc., 3587-3590
6. Cicotti I., Ionică A., Contz O. (1970) - Brevet roumain No. 64.557
7. Cionga E., Ecaterina Nichiforescu, V. Măscov, Nina Uricaru, S. Arizan (1967) - Ann. pharm. franç., nr.2, 139-146
8. Cionga E., Ecaterina Nichiforescu, V. Măscov, Ludmila Popa, (1974) - Farmacia (Bucarest), 2, 79-84
9. Desfosses M. (1821) - J. Pharm., 7, 414-417
10. Jacobs W.A. et Heidelberger M. (1929) - J. Biol. Chem., 81, 765-779
11. Katz A. (1948) - Helv. Chim. Acta, 31, 993-1004
12. Laza A. et Ecaterina Nichiforescu (1967) - Probleme agricole, 4, 58-61
13. Marker R.E., Wagner R.B. (1943) - J. Amer. Chem. Soc., 65, 1199
14. Nichiforescu Ecaterina, Gh. Velescu, E. Cionga, V. Măscov, V. Andronescu, L. Roșca (1968) - Brevet roumain No. 57.899
15. Nichiforescu Ecaterina, Ludmila Popa, Liliana Cotenescu (1972) XI-ème Semaine Médicale Balkanique, Bucarest
16. Niștelea I., E. Creangă, Ludmila Popa, I. Mușetescu, C. Tănase (1969) - Brevet roumain No. 51.731
17. Sannié C.H. (1955) - J. Agric. trop. Bot. appl., 2, 28-39
18. Sasz K. et Gracza L. (1961) - Acta pharm. hung., 31, 211
19. Schreiber K. et Ripperger H. (1963) - Arch. Pharm., 11, 792-6
20. Syhora K. (1962) - Planta Medica, 10, 318
21. Tanret Ch. (1889) - C.R. Acad. Sci., 108, 98
22. Tsukamoto T., Ueno J. (1936) - J. Pharm. Soc. Japan, 56, 802-807; 931-940
23. Wall M.E. (1960) - Amer. Perfum. Arom., 75, 63-73
24. Windaus A. et Hauth A. (1906) - Chem. Ber., 39, 4378
25. Walens H.A., Serota S. et Wall M.E. (1955) - J. Amer. Soc. Chem. 77, 5196
26. Zeifman V.I. - Med. Prom. (URSS), 14, 8, 24

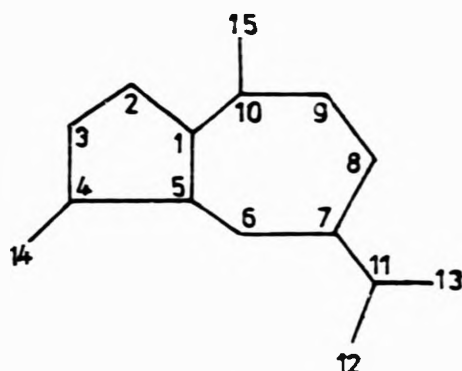
PSEUDOGUAÏANOLIDES DES PLANTES

Costin Ștefănescu +)

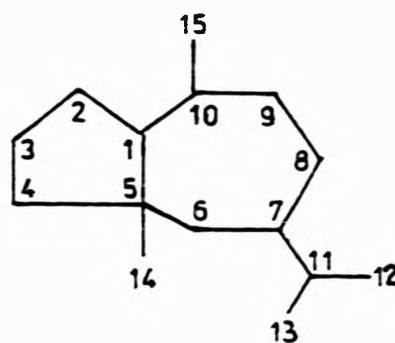
+) Chimiste, Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

I. INTRODUCTION

Sous la dénomination des "pseudoguaïanolides" est comprise une série de lactones des sesquiterpénoïdes bicycliques ayant une structure semblable à celle des guaïanolides.



(1)



(2)

La différence entre la guaïanne et la pseudoguaïanne consiste dans la position d'un groupement méthyle en C₄ dans le premier et en C₅ dans le deuxième cas.

Les premières substances découvertes de ce groupement ont été considérées des guaïanolides.

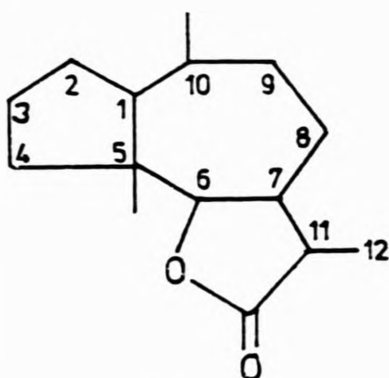
Leur structure correcte et leur inclusion dans une nouvelle classe de composants naturels a été faite par Hertz et ses collaborateurs en 1961-1963 [16,20,22,26].

Tenant compte de leur nombre en continue croissance, ainsi que de leur activité biologique, nous nous proposons de faire leur description du point de vue de la structure chimique et d'énumérer les plantes dont elles ont été isolées, ainsi que de présenter leurs isolement et séparation, ainsi que leur activité biologique.

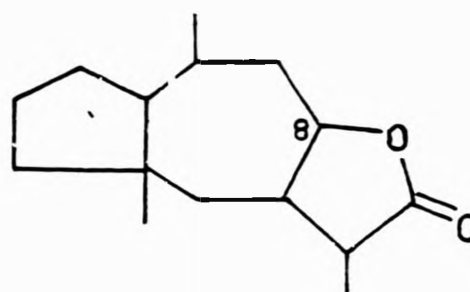
Remarque: Au cours de l'exposé les nombres indiqués entre parenthèses () se rapportent aux formules chimiques, alors que ceux entre parenthèses [] sont des renvois à la bibliographie figurant à la fin de l'exposé.

II. STRUCTURE CHIMIQUE

Les pseudoguaïanolides sont des dérivés lactoniques de la pseudoguaïanne (2). Le cycle lactonique peut être fermé en C₆ (3) ou en C₈ (4).



(3)



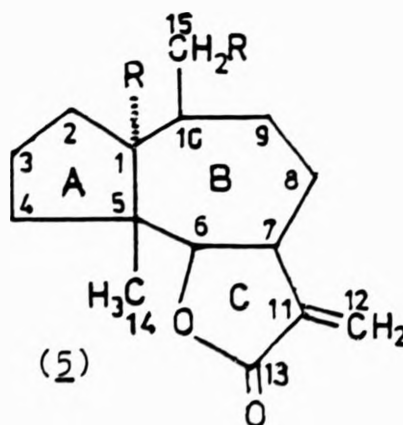
(4)

Quant à la nomenclature, dans Chemical Abstracts elles sont considérées des dérivés de l'azuléno-(4,5-b) furanne ou de l'azuléno-(6,5-b) furanne.

La nomenclature est assez difficile et on utilise couramment la dénomination dérivée de la plante dont elles ont été isolées pour la première fois. Dans notre exposé nous utiliserons le numérotage conformément à la pseudoguaïanne (2).

Notre but est de présenter systématiquement le nombre assez grand de dérivés de cette classe.

1. Pseudoguaïanolides à cycle fermé en C₆

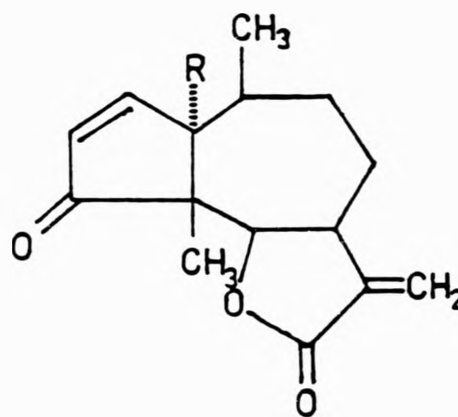
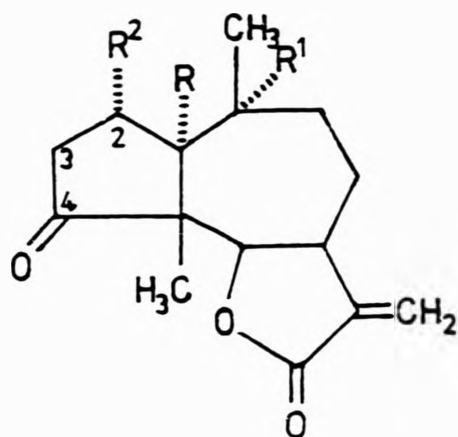


(5)

En ce qui concerne la stéréochimie du squelette, les cycles A et B sont réunis en trans, alors que B et C le sont en cis. Le groupement méthyle de C₅ est en position β. En outre dans la position β se trouve le groupement C-O en C₆.

R peut être H ou OH et R₁ : CH₃ ou CH₂OH.

La partie cyclopentanique peut être saturée ou non-saturée et peut contenir les groupements carbonyle ou hydroxyle en C₂, C₃ ou C₄.



(6) Formule générale pour les composés (8), (9) et (10)

(7) Formule générale pour les composés (11) et (12)

(8) R = R¹ = R² = H

- Damsine [1]

(9) R¹ = R² = H

- Coronopyline [2]

R = OH

(10) R = R¹ = H

- Ivoxantine [3]

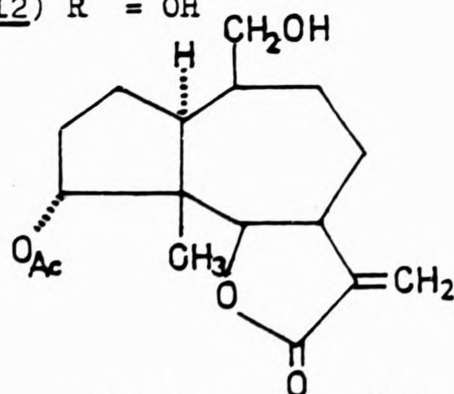
R² = OH

(11) R = H

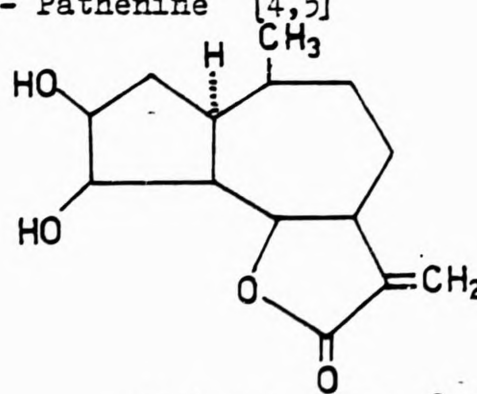
- Ambrosine [20,67]

(12) R = OH

- Pathenine [4,5]

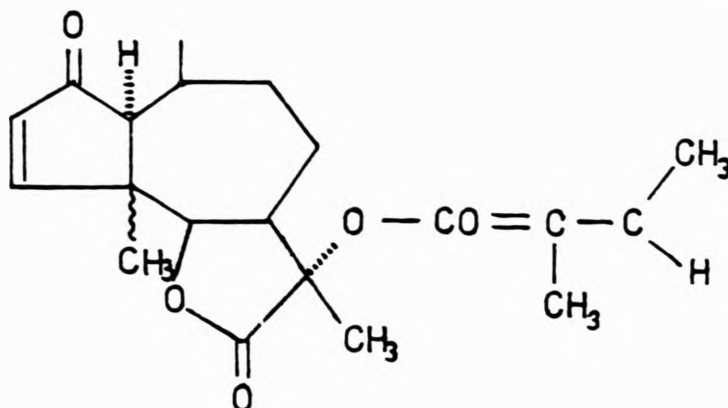


(13) Histerine [62]



(14) Ambrosile [47]

Un cas différent est la structure de Décipienine (15) [48].



(15)

2. Pseudoguaianolides à cycle lactonique fermé en C₈

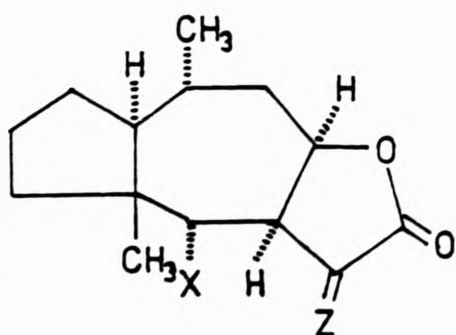
Il faut préciser que la majorité de ces composants naturels fait partie de ce groupement.

Les cycles A et B sont liés toujours en trans ayant le groupement méthyle en C₅ orienté en β .

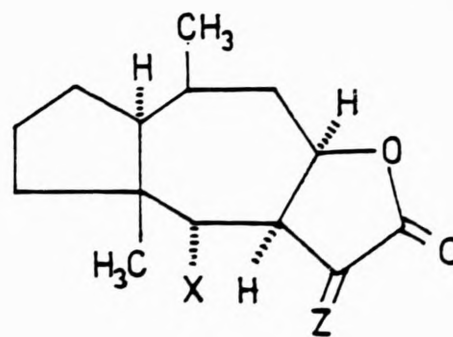
Le cycle lactonique peut être lié en cis à l'orientation β ou en trans à l'orientation α en C₈.

(a) Cycle lactonique lié en cis

Le groupement méthyle du C₁₀ peut être orienté en α (16) ou en β (17).



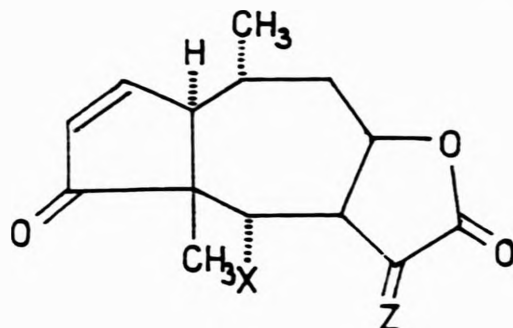
(16)



(17)

La partie cyclopentanique peut être saturée ou non-saturée et peut contenir les groupements carbonyle et hydroxyle ou hydroxyle acilé en C₆ avec orientation α ou β .

Dans les tableaux I et II nous présentons les pseudo-guaïanolides correspondant aux formules (18) et (19) dont le groupement méthyle en C₁₀ a une orientation α .

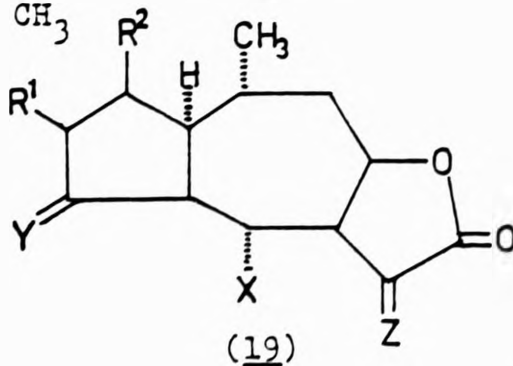


(18)

Tableau I

Dénomination	X	Z	Bibliographie
Aromatine (20)	H	CH ₂	[61]
Hymenoflorine (21)	H	\sim CH ₃ \sim H	[14]
Hélénaline (22)	OH	CH ₂	[22]
Méxicanine (23)	OH	α CH ₃ β H	[25]
Plénoline (24)	OH	β CH ₃ α H	[36]
Microhélénine B (25)	O-R ¹ +)	β CH ₃ α H	[35]
Microhélénine C (26)	O-R ¹ +)	β H α CH ₃	[35]
Amblyodine (27)	β OH	CH ₂	[24]
Balduyline (28)	β O-Ac	CH ₂	[22,25]
Bréviline (29)	H	H, CH ₃	[35]

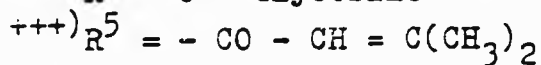
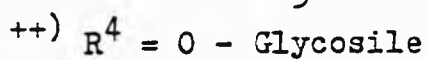
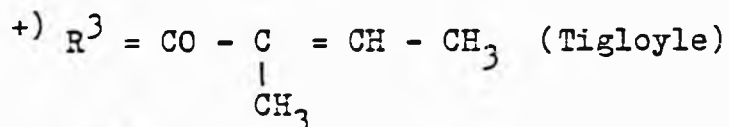
+) R¹ = - CO - C $\begin{matrix} | \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ = CH - CH₃ (Tigloyle)



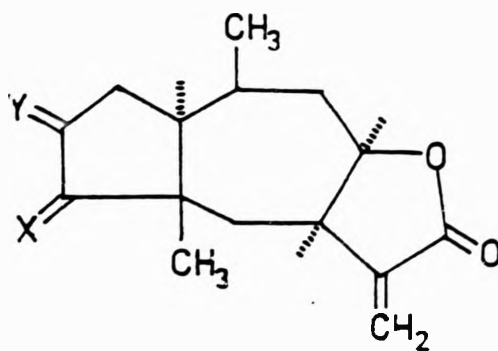
(19)

Tableau II

Dénomination	X	Y	R ¹	R ²	Z	Bibliographie
Néopulcheline(30)	H	αOH, βH	H	CH	CH ₂	[70]
Hyménolane (31)	H	αH, βO-Ac	O-Ac	CH	CH ₂	[54]
Florigrandine(32)	H	O	H	OR ³ +)	CH, CH ₂ OH	[14]
Hyménograndine(33)	H	αOH, βH	βO-Ac	βO-Ac	CH ₂	[14]
Paucine (34)	H	O	H	OR ⁴ ++)	CH ₂	[5]
Picrohélénine(35)	CH	αH, βO-Ac	H	αO-Ac	CH ₂	[29]
Fléxuosine (36)	OR ⁵ +++)	O	H	OH	βCH ₃ , αH	[18]



Dans le tableau III sont données les pseudoguaïanolides dont le groupement méthyle en C₁₀ a l'orientation β .

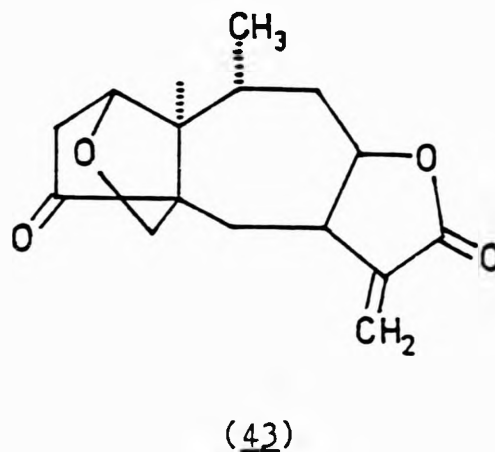
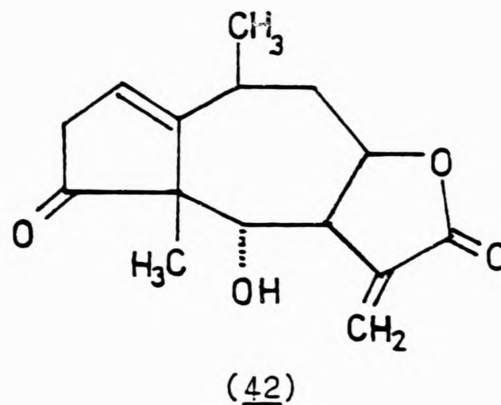
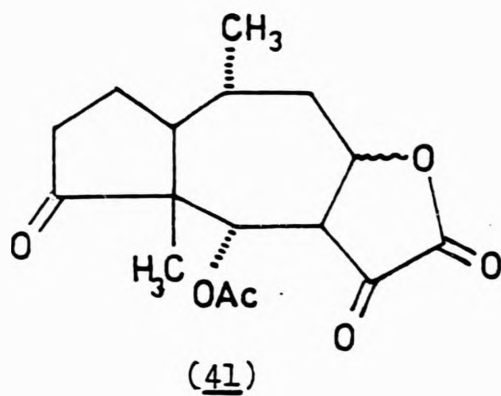


(37)

Tableau III

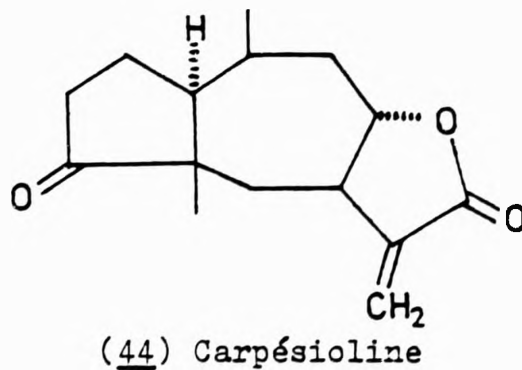
Dénomination	X	Y	Bibliographie
Péruvine (38)	O	H ₂	[49,66]
Péruvine (39)	H, OH	O	[49,66]
Cumanine (40)	H, OH	H, OH	[50]

Il faut y mentionner la lynifoline B (41) [13] , la mexicanine A (42) [12] et la microhélénine A (43) [45] .

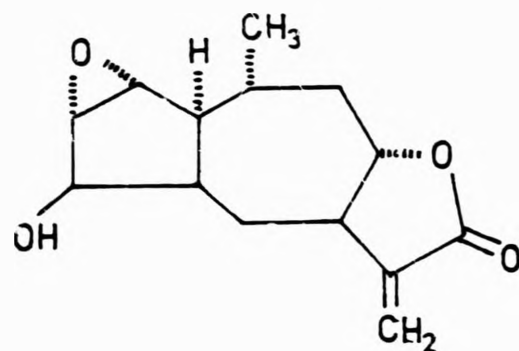


(b) Cycle lactonique lié en trans

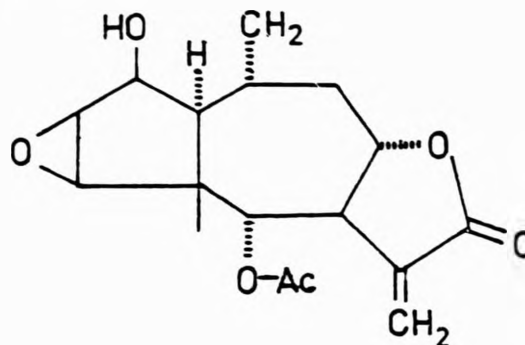
Avec une seule exception (44), où en C₁₀ le groupement méthyle est orienté en β , les autres dérivés de ce groupement sont orientés en α .



La partie cyclopentanique peut contenir un groupement α -époxy en C₂, C₃ suivi d'un groupement OH en C₄ (45) [46] ou β -époxy en C₃, C₄ et OH en C₂ (46) [28].

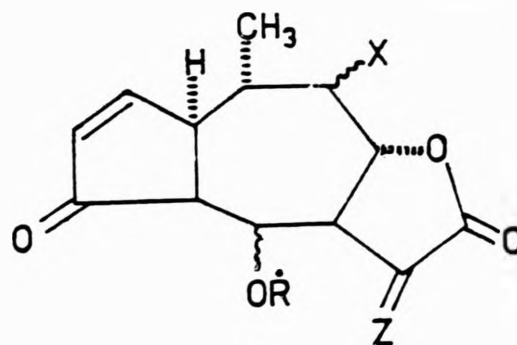


(45) Amariline



(46) Gaylardine

Y sont incluses la Tubériline (47) et la Fastigiline A, B, C.



(47)

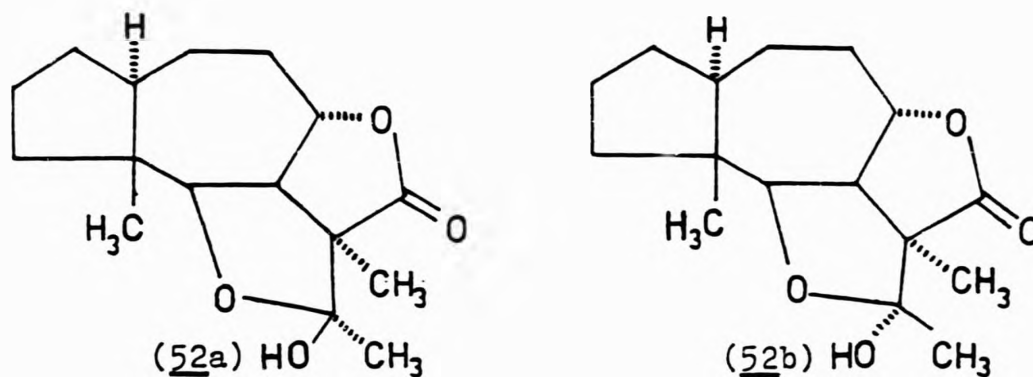
Tableau IV

Dénomination	R	Z	X	Bibliographie
Tubériline (47)	Tigloyle	α CH ₃ β H	H	[19]
Fastigiline A(48)	α "	β CH ₃ α H	OH	[15]
Fastigiline B(49)	α CO-CH= =C(CH ₃) ₂	β CH ₃ H	OH	[15]
Fastigiline C(50)	α "	CH ₂	OH	[15]
Bygelovine (51)	Ac(OR)	CH ₂	H	[50]

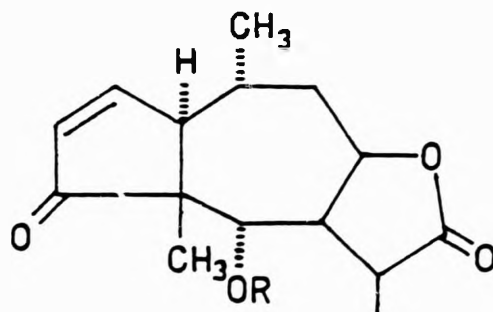
Nous avons introduit ici les Fastigiline B et C quoique certains auteurs [58] présentent leur structure avec le cycle

lactonique en cis.

On a elucidé la structure de la Tenuline dans le sens qu'elle est un mélange de deux isomères (52a, 52b) [23].



De l'Arnica montana a été isolée une série de pseudo-guaïanolides désignées arnicolides [55] et qui sont des dérivés acylés de la 11,12-dihydrohélénaline.



R = acétyl

Arnicolide A (53)

R = CO-CH₂-CH(CH₃)₂

Arnicolide B (54)

R = CO-CH(CH₃)₂

Arnicolide C (55)

R = CO - C = CH₂

Arnicolide D (56)

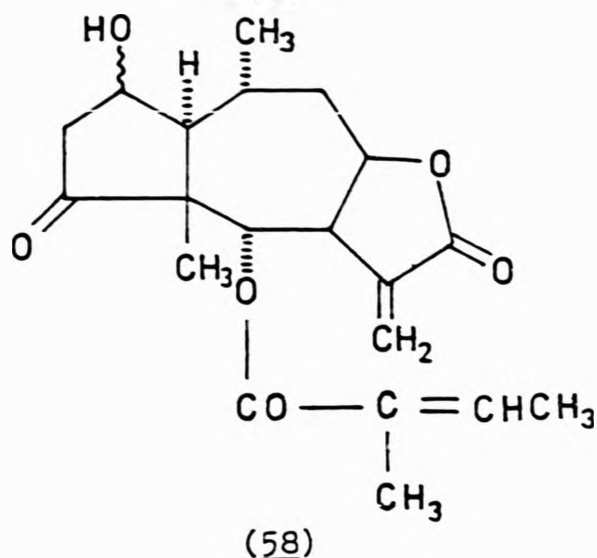
CH₃

R = H

Arnicolide E (57)

L'Arnicolide E est en fait identique avec la pléno-line (24) et l'Arnicolide A avec la microhélénine (25).

Une autre pseudoguaïanolide isolée de Arnica montana est l'Arnifoline (58) [8,55,58].



III. ISOLEMENT DES PSEUDOGUAÏANOLIDES DES PLANTES

Les pseudoguaïanolides ont été isolées des plantes de la famille des Compositae faisant partie des genres Ambrosia Iva, Partenum et Helenium Gaylardia, Balduina qui appartient aux sousfamilles Heliantheae, respectivement Heleniae, très répandues aux USA et au Mexique. En Europe ont été étudiées l'Arnica montana [8,55] et l'Arnica foliosa [8] .

Les pseudoguaïanolides ont été trouvées dans les feuilles et les fleurs des plantes étudiées.

L'extraction de la plante se fait de l'état sec avec du chloroforme, à la température ambiante [60,1,34,17,25] , par reflux ou en extraction continue sur soxhlet [16,13,25,1,34] pour isoler la fraction pseudoguaïanolidique, le résidu chloroformique étant dissout dans l'éthanol à chaud et traité avec une solution aqueuse d'acétate de plomb. Après 24 heures on filtre et on extrait au chloroforme. Le résidu chloroformique résulté a un aspect de gomme [16,49,60,13,17,25,1,25] ou d'huile [50] .

La séparation des substances unitaires est faite par cristallisation [13, 50] ou par chromatographie sur colonne: on utilise comme phase stationnaire Al_2O_3 [16,49,13,17,1] ou du silicagel [25, 63].

Comme éluant on utilise l'éther de pétrole, le benzène, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le méthanol ou l'éthanol. Dans le cas de la séparation chromatographique, la polarité

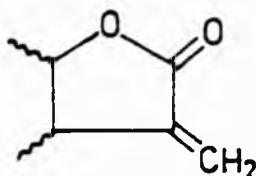
des solvants est modifiée dans le sens de sa croissance. Parfois, les fractions isolées se rechromatographient une fois ou plusieurs fois en isolant l'un ou plusieurs dérivés.

Pour l'Arnica montana le procédé est modifié, l'isolement étant fait par des extractions successives à l'eau à 70°C [8] ou à l'éther de pétrole [58] . La solution aqueuse [8] est extraite avec du chloroforme et après concentration de la solution chloroformique on précipite à l'éther éthylique et on purifie par chromatographie à l'oxyde d'aluminium. Quand on fait l'extraction par l'éther de pétrole [55] , le résidu résultant après élimination du solvant est extrait à l'éthanol 60% ou la solution aqueuse est extraite à l'éther éthylique et on chromatographie sur silicagel en obtenant les arnicolides A - E.

IV. ACTIVITE BIOLOGIQUE

Quelques programmes initiés sur le plan mondial pour combattre le cancer ont montré l'intérêt pour l'activité cytostatique ou antitumorale des principes actifs isolés des plantes.

Parmi les substances qui ont fait l'objet de ces recherches on compte les sesquiterpénoïdes, qui contiennent un groupement α -méthylen- δ -lactonique [7]



à savoir les germacranolides, guaïanolides [31] , santanolides [39] et pseudoguaïanolides.

Du nombre assez grand de dérivés naturels, la santonine était connue en antiquité grâce à son action antihelminthique [10] et l'attention était dirigée vers l'obtention de dérivés qui doivent avoir l'activité mentionnée [12] .

Parmi les représentantes des pseudoguaïanolides qui ont

fait l'objet des screenings concernant la cytotoxicité compte aussi l'hélénaline. L'attention donnée à cette substance a été déterminée par son activité remarquable montrée par les tests préliminaires et aussi par sa très grande accessibilité, elle se trouvant en grandes quantités (2,3%) dans certaines espèces végétales des USA.

L'activité cytostatique a été étudiée in vitro sur des cultures de cellules cancéreuses et aussi in vivo.

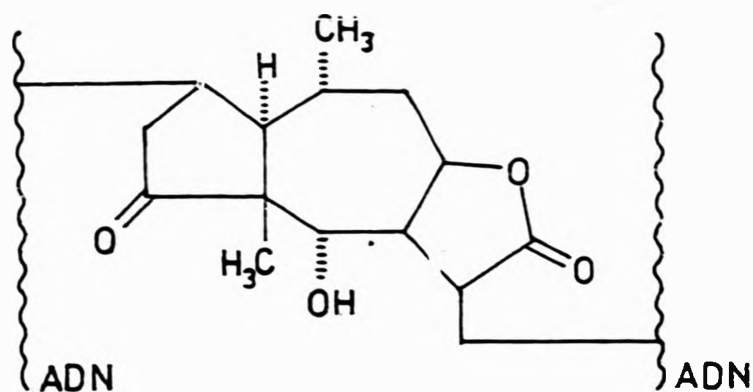
Pour les tests in vitro on a utilisé les cultures de cellules suivantes:

- cellules de carcinome humain du larynge (H-Ep-2) [11,43,39,28,42] ;
- cellules d'origine humaine transformées par le virus Simian-40 ($W_{18} Va_2$) [39,28] ;
- cellules de carcinome humain nasopharyngien (KB) [28,51] .

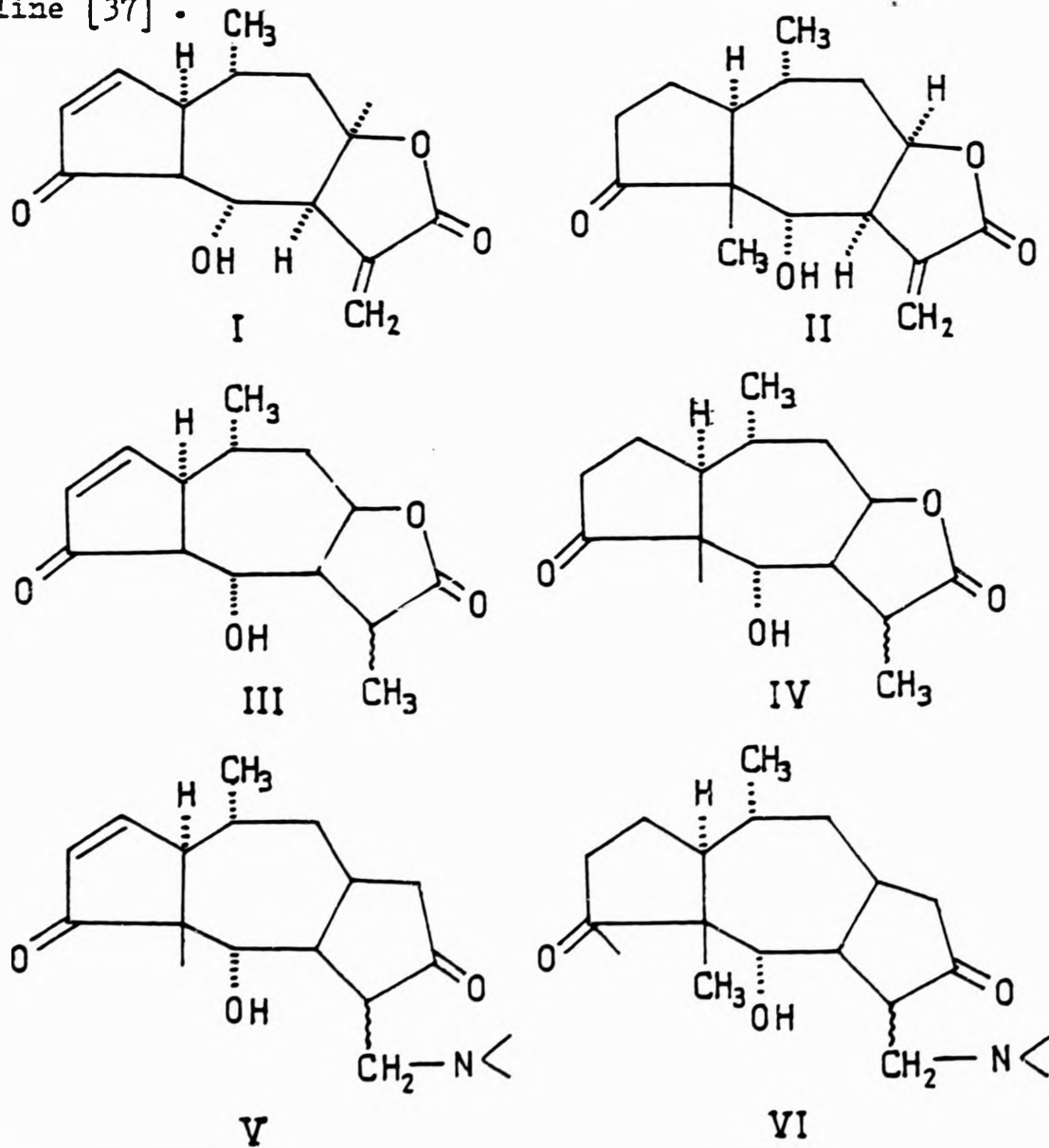
Les tests in vivo ont été faits sur souris lesquels ont été inoculés de certaines tumeurs:

- carcinome ascitique Ehrlich [52,38,43] ;
- carcinome Walker (souscutané) ou ascitique (WA) [44, 11,51] ;
- carcinome Lewis du foie [51] ;
- mélanocarcinome B-16 [51] ;
- leucémie lymphocytaire P-388 (PS) [52,44, 69] ;
- leucémie lymphoïde L 1210 [51] .

L'étude comparée de l'activité cytostatique de la hélénaline avec d'autres lactones sesquiterpéniques sur trois séries de cultures de cellules [39] a relevé son activité remarquable. Les spécialistes supposent que la cytotoxicité est donnée par la capacité d'alkylation des deux groupements carbonyliques non-saturés qui pourraient reticuler les deux chaînes ADN en inhibant leur répliation.



Ultérieurement on a déterminé que la présence de certains groupements carbonyliques non-saturés est très importante pour le maintien de l'activité cytotoxique de la hélénaline [37]



Les tests ont été faits sur les cultures H-Ep-2. Les résultats ont été exprimés en LD₅₀ (µg/ml) (pour l'hélénaline LD₅₀ = 0,083).

Tableau 7

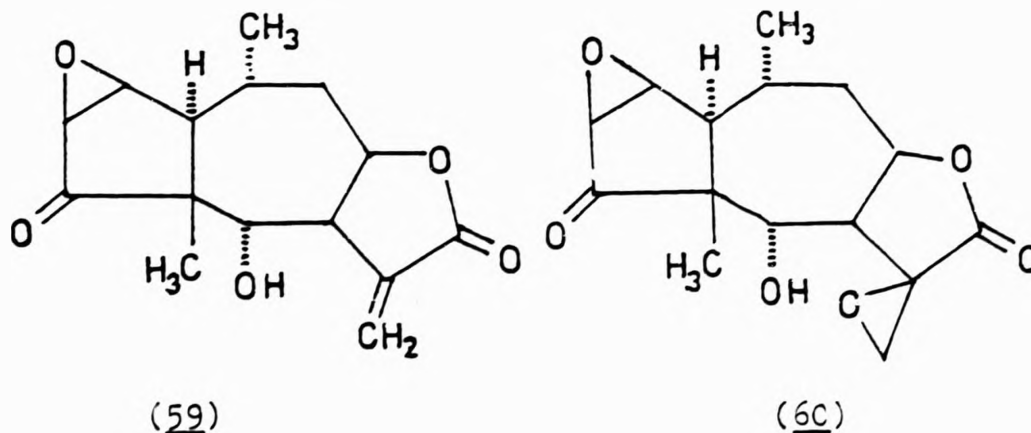
X	I	II	III	IV	V	VI
LD ₅₀ (X)	1	46,8	9,8	481	5,2-9,2	30,5-72,7
LD ₅₀ (hélénaline)						

La présence d'une double liaison dans la partie cyclopentanique est plus importante que la présence du groupement α-méthylénique du cycle lactonique.

L'absence de la double liaison Δ_{2,3} et Δ_{11,12} conduit à la diminution de l'activité cytotoxique de 500 fois.

Il est intéressant que des additions à l'hélénaline d'amines secondaires en Δ_{11,12} conduisent à une activité plus grande que celle des dérivés saturés correspondants.

Les dérivés époxydés de l'hélénaline (59, 60) [42,32] ont une activité semblable à l'hélénaline, étant connue la propriété alkylante des époxydes. Aussi connaît-on une série de médicaments cytostatiques de nature diépoxydique [4].



Par estérification du groupement OH en C₆ en fonction de la nature du radical acide, l'activité cytotoxique a présenté des fluctuations. Les expériences *in vitro* ont été faites

sur le même type de cultures des cellules. Les conclusions sont les suivantes:

Dans le cas de l'acylation avec les acides α , β non-saturés l'activité augmente par 2-5 fois. La croissance des groupements α , β non-saturés détermine la croissance de la capacité alkylante du composant et par conséquent de la cytotoxicité.

Par alkylation avec des acides aliphatiques saturés dans le cas des premiers termes (acétyl, propionyl) on constate une diminution de la cytotoxicité.

La croissance du caractère lypophile du radical acide conduit en même temps à la croissance de la cytotoxicité (stéroïl, -CO-adamantil) [39, 51, 43].

Les expériences in vivo sur le carcinome d'Ehrlich de type ascitique, dans le cas de l'hélénaline et des dérivés acilés [44, 38, 11, 43], ont montré une grande activité des doses de 38,2 unités mol/kg, l'ascitocrite ayant la valeur 0, les cellules tumorales disparaissant [43]. Néanmoins, une toxicité accrue s'est manifestée pour les doses utilisées. Les résultats ont été exprimés en T/C x 100 (T = le nombre des animaux survivants du groupement testé et C = le nombre des animaux survivants du groupement de contrôle).

Des recherches ultérieures [38, 11] ont montré que l'hélénaline n'inhibe pas la répllication ADN par la réticulation de celle-ci, mais elle bloque l'activité ADN de la polymérase par l'alkylation des groupements SH de celle-ci. On a constaté récemment une croissance du AMP-cyclique dans les cellules Ehrlich et celles du carcinome Walker 256 du type ascitique, en intervenant dans les processus de phosphorylation oxydative [38].

L'hélénaline présente une activité remarquable dans le cas du carcinosarcome Walker 256 ascitique (T/C = 316) [44, 11].

Dans le cas de la leucémie lymphocytaire P 388 une action pour ainsi dire insignifiante a lieu [11, 43]. Le même fait pour le carcinome humain nasopharyngien, la leucémie lymphoïde L 210, le carcinome du foie Lewis et le mélanocarcinome B-16 [11].

La cytotoxicité élevée montrée par certains auteurs [43] est déterminée également par la solution utilisée pour dissoudre l'hélénaline (0,9% NaCl : DMSO - 9:1) rapportée à celle d'autres auteurs [11] qui utilisent une solution de Tween-80 à 0,05%.

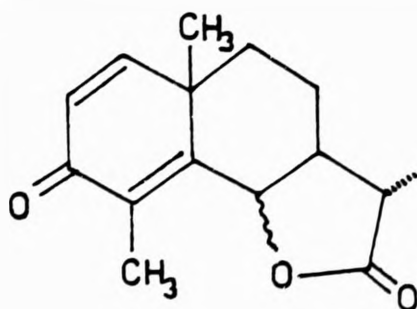
En ce qui concerne l'activité antitumorale des autres pseudoguaïanolides il faut mentionner la ténuline (52 a et b) et la plénoline (24)[11] avec une efficacité semblable à celle de l'hélénaline en ce qui concerne les carcinomes Ehrlich et Walker 256 du type ascitique. La plénoline (11,12-dihydrohélénaline) (CH₃ en C₁₁) a eu le même effet sur le carcinome nasopharyngien [11] .

La fastigiline C a donné de bons résultats in vivo et in vitro dans le cas de la leucémie lymphocytaire P 388.

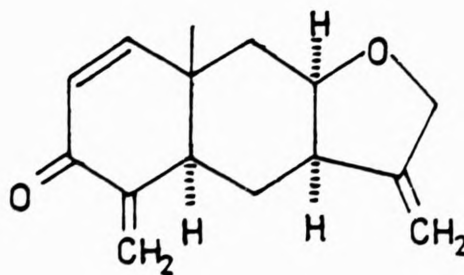
On doit remarquer la paucine (34) qui ne contient pas une double liaison dans la partie cyclopentanique et qui a des effets semblables à l'hélénine in vitro [39] .

Les autres résultats fournis par la littérature ne sont pas concluants en ce qui concerne l'activité de l'ambrosyne [69] , de la dansyne [28] , de la microhélénaline B et C. L'hyménoflorine (21) et la paucine (34) sont actives dans le cas de la leucémie lymphocytaire [14] .

Nous considérons que les recherches sont à leurs débuts et les corrélations ne sont pas encore faites concernant la stéréochimie des composants pseudoguaïanolidiques et leur activité biologique. Nous considérons que l'orientation du cycle lactonique en C₆ ou C₈ est assez importante, tenant compte de l'activité manifestée par la γ -santonine (61) et l'enceline (62), la dernière étant 400 fois plus active que la première.

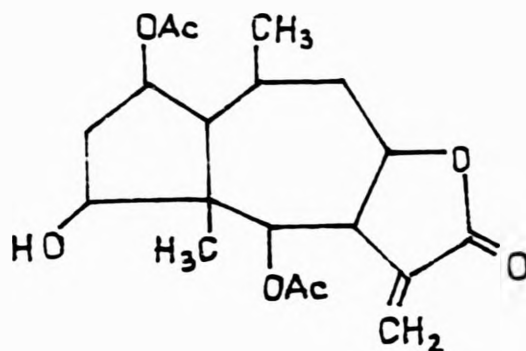


(61) Santonine



(62) Enceline

Les activités amoebicide et protozoaricide des lactones sesquiterpéniques naturelles ont également été testées. Parmi les composants aux effets puissants montrés dans des expériences réalisées in vitro sur Entamoeba histolytica et Trichomonas vaginalis on englobe aussi la britanine (63) [57] .



(63) Britanine

On a également signalé des activités fongicide [3,56] , bactéricide [41] , analgésique [46] et ocytocique [8] . L'activité ocytocique peut être corrélée avec l'activité cytotatique [9] .

On a constaté que la parténine est un inhibiteur de la croissance des plantes [2] .

En ce qui concerne les pseudoguaïanolides de l'Arnica montana, on a signalé l'activité ocytocique de l'arnifoline [8] .

B I B L I O G R A P H I E

1. Adams R. et Hertz W. (1949) - J. Am. Chem. Soc., 71, 1546
2. Carciduenas M.R. et Dominguez F.A. (1976) - Turrialba, 26,
10, cf. CA 85, 15275 x (1976)
3. Char M.B.S. et Shankarabhat S. (1975) - Experientia, 31, 1164
4. Cionga E. et Avram L. (1978) - Medicamente chimioterapice,
pp. 588-757, Ed. Dacia, Cluj-Napoca
5. Cox P.J. et Sim A.G. (1977) - Biol., 259
6. Dominguez X.A., Gutierrez M., Aragón R. (1976) - Planta Med.,
30, 356
7. Doskotch R.W. et Huffort C.D. (1969) - J. Pharm. Sci., 58, 186
8. Evstratova R.I., Seicenko V.I., Rybalko K.S., Vanikovski A.I.
(1969) - Khim. Farm. Zhur., 3, 39
9. Farasworth N.R., Bingel A.S., Cordell G.A., Crane F.A. et
Fong H.H.S. (1975) - J. Pharm. Sci., 64, 717
10. Goodman R.S. et Gilman A. (1969) - Bazele farmacologice ale
terapeuticii, p.953, Ed. Medicală, Bucarest
11. Hall H.R., Lee K.H., Mar E.G., Starnes C.O. et Waddell T.G.
(1977) - J. Med. Chem., 20, 333
12. Haynes L.J. (1948) - Quart. Rev., 2, 46
13. Hertz W. (1964) - J. Org. Chem., 29, 2553
14. Hertz W., Aota K., Haal H.R. (1974) - J. Org. Chem., 39, 2013
15. Hertz W. et collab. (1966) - Biol., 22, 1907
16. Hertz W. et Högenauer G. (1961) - J. Org. Chem., 26, 5011
17. Hertz W., Jayaraman P. et Watanabe H. (1960) - J. Am. Chem. Soc.,
82, 2276
18. Hertz W., Kishida Y. et Lakshmikantan M.V. (1964) - Tetrahedron,
20, 979
19. Hertz W., Lakshmikantan M.V. (1965) - Biol., 21, 1711
20. Hertz W., Miyazaki M. et Kishida Y. (1961) - Tetrahedron Lett.,
82
21. Hertz W., Rajappa S. et Lakshmikantan M.V. (1966) - Tetrahedron,
22, 1693
22. Hertz W., Romo de Vivar A., Romo J. et Viswanathan N. (1963) -
J. Am. Chem. Soc., 85, 19, 1963
23. Hertz W. et Sharma P.R. (1975) - J. Org. Chem. Soc., 40, 2577
24. Hertz W. et Srinivasan A. (1972) - Phytochem., 11, 2093
25. Hertz W. et Sumi Y. (1964) - J. Org. Chem., 29, 3438

26. Hertz W., Watanabe H., Miyazaki M. et Kishida H. (1962) -
J. Am. Chem. Soc., 84, 2601
27. Hladon B. et collab. (1975) - Immunol. Ther. Exp., 23, 345
28. Huang E.S., Lee K.H., Piantadosi C., Geisman T.A. et
Pagano H.S. (1972) - J. Pharm. Sci., 61, 1360
29. Kondo Y. et collab. (1977) - Heterocycles, 6, 19
30. Kupchan S.M. (1970) - Trans. N.Y. Acad. Sci., 32, 85
31. Kupchan S.M. et collab. (1966) - J. Am. Chem. Soc., 88, 5292
32. Lee K.H. (1973) - J. Pharm. Sci., 62, 1023
33. Lee K.H., Anuforo D.C., Huang E.S. et Piantadosi C. (1972) -
J. Pharm. Sci., 61, 626
34. Lee K.H. et collab. (1973) - J. Med. Chem., 16, 299
35. Lee K.H. et collab. (1977) - Phytochem., 16, 393
36. Lee K.H. et collab. (1975) - Tetrahedron Lett., 11
37. Lee K.H., Furakawa H. et Huang E.S. (1972) - J. Med. Chem.,
15, 609
38. Lee K.H., Hall H.R. et collab. (1977) - Science, 196, 5330
39. Lee K.H., Huang E.S., Piantadosi C., Pangori S. et Geisman T.A.
(1971) - Cancer Res., 31, 1649
40. Lee K.H., Ibuka T., Wu R.Y. (1974) - Chem. Pharm. Bull.,
22, 2206
41. Lee K.H., Ibuka T., Wu R.Y., Geisman T.A. (1977) - Phytochem.,
16, 1177
42. Lee K.H., Khim S.H., Furakawa H., Piantadosi C. (1975) -
J. Med. Chem., 18, 59
43. Lee K.H., Meck E., Piantadosi C., Huang E.S. (1973) -
J. Med. Chem., 16, 299
44. Lee K.H., Mitsumasa M., Huang E.S., Wu R.Y., Hall H.R. (1977) -
J. Pharm. Sci., 66, 1194
45. Lee K.H., Wasuhiro T. (1976) - J. Pharm. Sci., 65, 1410
46. Lucas R.A. et collab. (1964) - J. Org. Chem., 29, 1549
47. Mabry T.J., Renold W., Miller H.E. et Kagan H.B. (1966) -
J. Org. Chem., 31, 681
48. Marshall A.J., Snyder W.R. (1975) - J. Org. Chem., 40, 1656
49. Nathan P.J. et Romo J. (1966) - Biol., 22, 1723
50. Parker B.A. et Geisman T.A. (1962) - J. Org. Chem., 27, 4127
51. Pettit G.R. et collab. (1974) - J. Med. Chem., 17, 1013
52. Pettit G.R. et collab., Cragg M.G. (1973) - Experientia,
29, 781

53. Pettit G.R., Herald C.L., Judo G.F., Bolliger G. et Thayer S.P. (1975) - J. Pharm. Sci., 64, 2023
54. Petersen R.C. et Khim H. (1976) - J. Chem. Soc., Perkin Trans., 2, 1399
55. Poplavský J., Holub M., Samec Z., Herout V. (1971) - Coll. Czech. Chem. Comm., 35, 2189
56. Rodriguez E. et collab. (1975) - Experientia, 31, 1164
57. Rubinchik M.A. et collab. (1976) - Rastit. Resur., 12, 170
58. Rybalko K.S. (1971) - Khim. Prirod. Soedin., 7, 2705
59. Romo J., Nathan P.J., Romo de Vivar A. et Alvarez C. (1967) - Tetrahedron, 23, 529
60. Romo J., Nathan P.J. et Siadde G. (1966) - Tetrahedron, 22, 1499
61. Romo J., Romo de Vivar A. (1967) - en: Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, Vol. 25, p.116, Springer Verlag, Wien
62. Romo de Vivar A., Bratoef E.A. et Rios T. (1966) - J. Org. Chem., 31, 681
63. Romo de Vivar A., Romo J. (1961) - J. Am. Chem. Soc., 83, 2326
64. Samec Z. et collab. (1970) - Coll. Czech. Chem. Commun., 36, 3818
65. Schreiber K. (1975) - Environ. W. Saf. Suppl., 3 (Pesticides), 485, cf. CA 1976, 85, 105-260 t.
66. Soria E. (1975) - Bol. Soc. Quím. Perú, 41, 52, cf. CA 1976, 84, 28052 b
67. Shorm F., Suchý M. et Herout V. (1959) - Coll. Czech. Chem. Commun., 24, 1548
68. Suchý M., Herout V. et Shorm F. (1963) - Coll. Czech. Chem. Commun., 28, 2257
69. Torrance S.J., Wiedhopf R.M., Cole J.R. (1975) - J. Pharm. Sci., 64, 387
70. Znavaha S., Tawanata T., Yanagita M. (1963) - Phytochem., 12, 1741
71. Zacharov P.I., Evstratova R.I. et Rybalko K.S. (1971) - Khim. Prirod. Soedin., 7, 527

MISE EN VALEUR A L'ECHELLE INDUSTRIELLE DES
PLANTES MEDICINALES

Adrian Iuganu +)
Octavian Contz ++)

-
- +) Pharmacien, Chef de Secteur à l'Entreprise de Médicaments
"Biofarm", Bucarest, Roumanie
- ++) Docteur en Pharmacie, Chef de Laboratoire à l'Institut
pour le Contrôle d'Etat des Médicaments et de Recherches
Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

I. INTRODUCTION

Depuis des temps immémoriaux les plantes médicinales ont été utilisées dans le traitement de diverses affections.

L'utilisation des plantes était alors empirique et, au fur et à mesure du développement de la science, on est arrivé à expliquer scientifiquement:

- . pourquoi certaines plantes ont une action sur l'organisme;
- . la manière dont elles agissent pour guérir;
- . comment elles doivent être utilisées pour prévenir des effets nocifs;
- . comment il faut les administrer pour obtenir un maximum d'effets positifs;
- . quelle est la forme d'administration la plus adéquate;
- . quelle est la durée du traitement;
- . quelles sont les mesures de précaution à prendre pendant le traitement;
- . quelles sont les voies pour obtenir des médicaments à base de plantes ayant des effets thérapeutiques efficaces, etc.

Actuellement, plus de 30% des médicaments ont dans leur composition des principes actifs provenant des plantes, utilisés seuls ou associés à des substances minérales ou de synthèse et la tendance est à la diversification de plus en plus grande des produits à base d'extraits végétaux, et cela d'autant plus que les plantes médicinales utilisées actuellement en industrie constituent encore une petite partie de ce que la nature peut offrir.

La flore a été particulièrement étudiée du point de vue médical dans les pays développés, où les sciences ont atteint un haut degré de développement, mais même ici les chercheurs ont encore beaucoup à travailler avant de pouvoir être satisfaits de leurs connaissances dans le domaine des plantes médicinales.

En ce qui concerne les pays en développement, où la flore est riche et diversifiée, la recherche dans le domaine des plantes est en général à ses débuts. Dans nombre de ces pays il

convient de déployer des efforts pour développer une industrie pharmaceutique à base de plantes parce que la matière première y est abondante, il y existe une main d'oeuvre disponible qui est facile à former et les coûts d'investissement ne sont pas très élevés. En plus, l'industrie pharmaceutique de ces pays est le plus souvent peu développée et en général dépendante des matières premières d'importation.

La demande de médicaments dans les pays en développement est grande, la croissance de la population est en général forte et l'assistance médicale encore insatisfaisante.

La préparation des médicaments à base de plantes implique des technologies d'extraction à partir des plus simples jusqu'à des technologies assez compliquées.

II. MATIERE PREMIERE

Les plantes médicinales existant dans la flore spontanée d'un pays qui désire édifier une industrie d'extraction végétale, du fait qu'elles sont bien acclimatées, peuvent assurer une base sûre de matière première.

Il convient de préciser qu'au début il faut prendre en considération les plantes bien étudiées et qui sont mentionnées dans la littérature comme ayant des effets thérapeutiques prouvés, ce qui permet une utilisation immédiate pour la préparation de médicaments, sans qu'une recherche approfondie soit nécessaire.

Le fait que les plantes poussent dans la flore spontanée donne la garantie que ces espèces peuvent être introduites en cultures et assurer ainsi les quantités nécessaires à l'exploitation de l'installation d'extraction.

Les analyses de laboratoire, pour déterminer la teneur en principes actifs, peuvent donner des indications précises sur la qualité des plantes et, par conséquent, sur le choix de la technologie d'extraction et les équipements adéquats.

Les principes actifs existant en prépondérance dans les plantes (glucides, saponines, tannins, huiles essentielles,

résines, alcaloïdes, glycosides, vitamines, etc) et qui devront être isolés sont également un facteur important pour le choix de l'installation industrielle.

Les quantités qu'on peut ramasser de chaque plante de la flore spontanée, sans détruire l'équilibre écologique, peuvent déterminer l'emplacement de l'installation et, par conséquent, la rentabilité de celle-ci.

Pour une plante qui n'a pas encore été étudiée et qui pousse dans la flore spontanée d'un pays en développement il est nécessaire d'effectuer les études suivantes:

- . botaniques, ce qui suppose l'existence d'un laboratoire spécialisé et de chercheurs d'un haut niveau;

- . pharmacognostiques, c'est-à-dire des analyses physico-chimiques pour déterminer les qualités et quantités des principes actifs existant dans les plantes;

- . pharmacodynamiques, ce qui suppose l'existence d'un laboratoire pourvu d'un appareillage spécifique, d'une section pour l'élevage des animaux de laboratoire et de chercheurs, de préférence des médecins, pour interpréter les résultats.

A part les espèces qui poussent dans la flore spontanée, il est possible de prendre en considération l'introduction en cultures des espèces de plantes importées, mais bien étudiées et qui ont - dans le pays où se trouve l'installation - des conditions pédo-climatiques favorables à leur culture.

Etant donné qu'une industrie de constructions mécaniques n'existe pas en général ou est peu développée dans nombre de pays en développement, au début les équipements pour les installations d'extraction végétale devront être importés.

Naturellement, au fur et à mesure du développement de cette industrie, de tels équipements pourront être construits sur place et, par conséquent, on renoncera à l'importation.

III. PERSONNEL

Un autre aspect important de la mise en valeur des plantes

médicinales est la formation d'un noyau de spécialistes en extraction végétale.

Une équipe, même restreinte, de spécialistes en extraction végétale doit être présente dès le début de l'exploitation d'une installation. Ces spécialistes doivent avoir les qualifications suivantes:

. botanistes-agronomes, qui devront:

- . connaître les plantes à traiter, la période favorable au ramassage et la manière de conservation si les plantes ne sont pas traitées à l'état frais;
- . introduire en cultures les plantes médicinales qui poussent dans la flore spontanée et développer ces cultures pour obtenir des récoltes abondantes et à haute teneur en principes actifs;

. analystes spécialisés en pharmacognosie, devant déterminer la qualité d'une plante par analyses qualitative et quantitative ainsi que l'analyse des produits finis (médicaments) du point de vue physico-chimique;

. technologistes pour l'exploitation de l'installation industrielle d'extraction végétale, connaissant le fonctionnement des équipements et pouvant intervenir en cas de défauts.

Ces spécialistes doivent être formés avant la mise en exploitation de l'installation d'extraction dans le domaine de l'extraction végétale et par des exercices pratiques sur l'installation à exploiter, sous la surveillance de spécialistes qui connaissent l'installation et les technologies applicables.

IV. INSTALLATION PILOTE

La mise en route d'une unité de production - dans une première phase d'une installation pilote (pour adopter des technologies adéquates et pour une production à petite échelle) - doit être précédée par la détermination de la matière première disponible (plantes médicinales), l'approvisionnement des solvants nécessaires et la formation d'une équipe de spécialistes en extraction végétale, formation qui continuera sur l'installation en exploitation et dans les laboratoires indigènes pour

la mise au point des nouvelles technologies. Il convient également d'avoir sur place les utilités nécessaires (eau, électricité, vapeur d'eau).

Une installation pilote doit être composée d'équipements en état d'être utilisés dans divers flux technologiques pour assurer la préparation des produits pharmaceutiques d'extraction simples, à utiliser tels quels, ou bien comme semiproducts pour des médicaments plus sophistiqués.

Les équipements suivants ne doivent pas manquer d'une installation pilote d'extraction:

- . hachoir de plantes fraîches;
- . hachoir de plantes séchées;
- . réacteur versatile (extraction avec agitation, concentration, distillation à la vapeur d'eau);
- . échangeur de chaleur;
- . pompe à transvaser les liquides;
- . pompe à vide;
- . étuve à vide;
- . récipients collecteurs pour extraits;
- . récipients de stockage pour les solvants d'extraction.

En plus, pour une installation pilote plus complexe il faut prévoir :

- . une colonne de rectification des solvants;
- . une unité de concentration sous vide (type rotavapeur);
- . un appareillage de filtration sous pression;
- . une unité de refroidissement pour l'eau technologique;
- . un monorail électrique;
- . une étuve à vide;
- . un générateur de vapeur;
- . un malaxeur.

Les équipements mentionnés ci-dessus doivent être pourvus d'appareils de mesure et de contrôle et de la tuyauterie de liaison - pourvue de brides et de robinets à multiples voies - pour permettre une adaptation facile à divers flux technologiques, sans modifications mécaniques.

Le matériau le plus approprié pour la construction des

équipements pour l'extraction végétale est l'acier inoxydable.

Les utilités nécessaires pour une installation pilote d'extraction végétale sont : eau, vapeur et électricité. Quand ils'agit du traitement de plantes fraîches, il est recommandable que l'installation soit emplacée près du lieu de ramassage ou des cultures, à condition que les utilités soient disponibles sur place.

Si les plantes à traiter sont séchées, alors il est recommandable que l'installation soit placée près d'une unité de conditionnement des médicaments sous forme de solutions, sirops, dragées, tablettes, onctions, suppositoires, etc. Dans ce cas, il faut prévoir, également, un entrepôt pour les plantes, condition nécessaire pour assurer une production rythmique et pour éviter la dégradation de la matière première par des intempéries.

L'installation pilote peut être construite - en fonction des conditions climatiques locales - soit à l'intérieur d'un bâtiment, soit en plein air. Les plus simples produits obtenus sur une installation pilote sont : huiles essentielles, teintures, extraits fluides, mous et secs. Certaines teintures et certains extraits fluides peuvent être utilisés tels quels pour le traitement de certaines affections, mais seulement après la détermination exacte de leur qualité, qui doit être entre les limites prévues dans la littérature de spécialité. La grande majorité des teintures et des extraits représente la matière première pour la préparation de médicaments complexes : solutions, sirops, tablettes, onctions, suppositoires. Les huiles essentielles sont également utilisées dans les industries cosmétique et alimentaire. Une exploitation judicieuse d'une installation pilote peut assurer une microproduction de solutions extraites qui conduit à la production de divers médicaments. L'exploitation consiste dans le fait que dans des solutions, sirops, tablettes, dragées, etc., les quantités de teintures et extraits utilisées dans les formules sont très réduites, mais ayant une action pharmacodynamique importante.

7. INSTALLATION INDUSTRIELLE

Au fur et à mesure que l'industrie chimique se développe - quand celle-ci est à même de produire en grandes quantités les solvants de base pour l'extraction végétale, ainsi que d'autres substances chimiques - on peut passer à l'érection d'installations industrielles complexes, spécialisées dans le traitement des plantes pour obtenir des principes actifs à l'état pur. Dans ce cas et pour assurer la matière première nécessaire il convient d'organiser de grandes cultures de plantes médicinales.

Nous considérons que la création d'installations industrielles complexes, de grande capacité, est risquée, sans l'existence de cultures de plantes médicinales, étant donné que la flore spontanée, comme base unique de matière première, soulève des incertitudes et des difficultés car :

- . il faut avoir une organisation de ramassage très efficace;

- . il y a danger d'un ramassage irrationnel dans certaines zones d'accès facile et provoqué par la tentation des revenus plus grands et immédiats sans une véritable préoccupation pour le maintien de l'équilibre écologique de l'avenir;

- . la flore spontanée n'assure pas une teneur uniforme et constante en principes actifs dans les plantes ramassées.

Un autre facteur important dans le choix de l'emplacement de l'installation est l'aspect économique, devant assurer une rentabilité de l'investissement. Si les conditions d'exploitation assurent l'obtention d'une substance pure dont la qualité correspond aux normes internationales, il est normal que cette substance soit utilisée pour la préparation de médicaments dans le pays respectif. Dans ce but, il est recommandable, dès la conception de l'étude de l'installation d'extraction, de prévoir également une unité de conditionnement adéquate pour la préparation des diverses formes pharmaceutiques.

Etant donné que les quantités de substances pures obtenues à partir des plantes ne sont pas grandes ni volumineuses, elles peuvent être facilement offertes à l'exportation, même par les pays sans un réseau routier développé ou

sans issue à la mer. Le transport aérien en petits containers est également possible.

Pour l'entretien et la réparation des équipements mécaniques et électriques, il est nécessaire d'organiser une équipe d'ouvriers qualifiés pour assurer une exploitation efficace de l'installation.

Une installation à l'échelle industrielle est composée d'équipements spécifiques de haut rendement à savoir les suivants :

- . appareil d'extraction liquide-liquide;
- . séparateur de liquides;
- . filtres à vide ou à pression;
- . station de transformation électrique;
- . extracteur en continu à contre-courant;
- . lyophilisateur;
- . atomiseur;
- . réservoir pour l'eau industrielle;
- . réservoirs pour les solvants, sous-terrains ou pourvus d'installations de refroidissement, etc.

En ce qui concerne le personnel d'exploitation de l'installation, il doit :

- . avoir des connaissances de chimie, botanique et mécanique;
- . être instruit dans le bon fonctionnement des équipements;
- . connaître les normes de sécurité du travail;
- . connaître les modalités d'intervention en cas d'avarie ou d'accident du personnel.

Tous les équipements doivent être dotés d'instructions sur :

- . le mode d'emploi;
- . la sécurité du travail;
- . la protection contre l'incendie.

En Figure 1 on montre l'emplacement des ateliers, des laboratoires, des offices dans une fabrique de produits pharmaceutiques à base de plantes médicinales.

Dépôt spécial pour produits inflammables

3

Générateur de vapeur d'eau	Atelier mécanique
	Menuiserie
	Atelier pour l'usage du verre

2

1

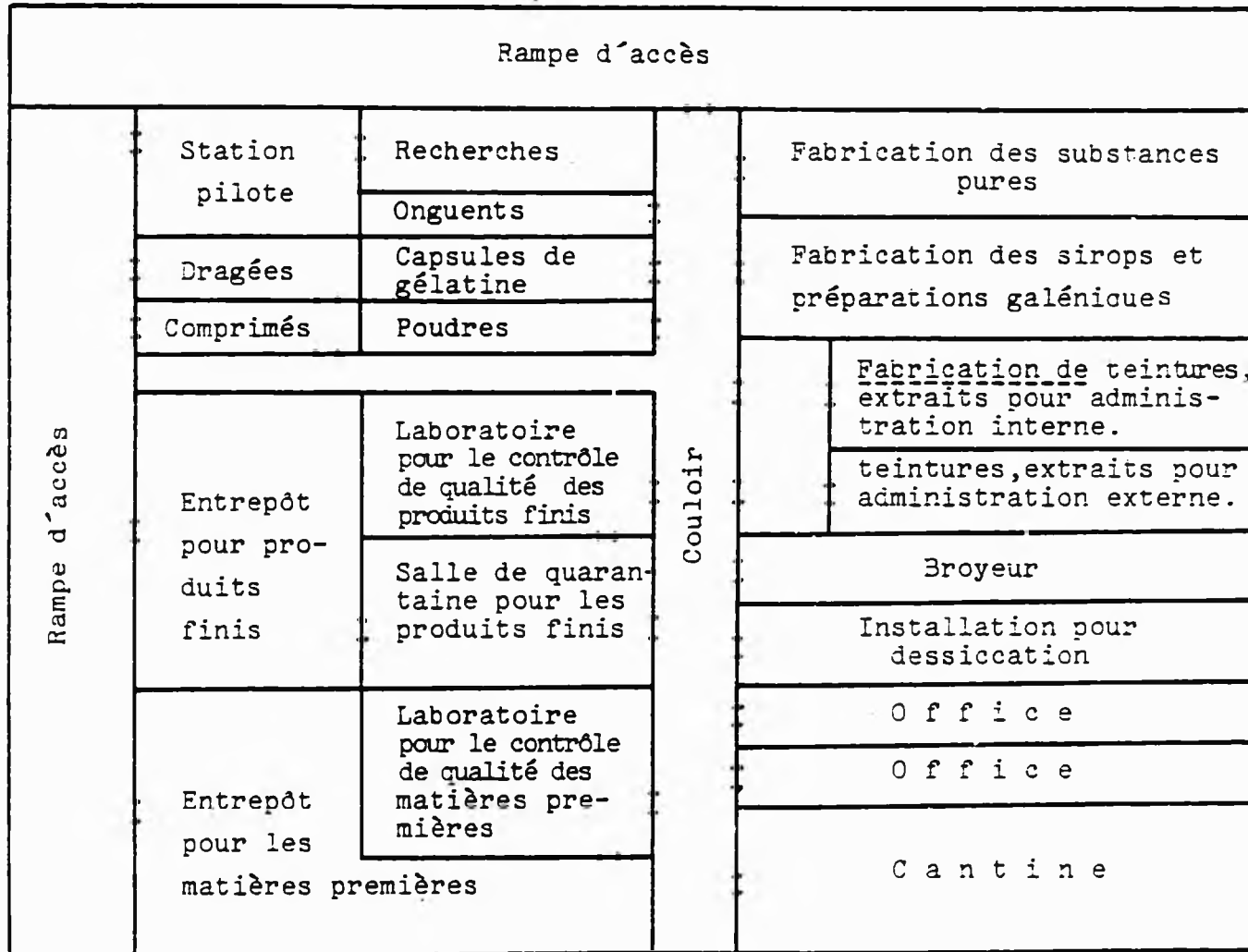


Fig. 1. L'emplacement des ateliers, des laboratoires, des offices dans une usine de produits pharmaceutiques à base de plantes médicinales.

- 1. Pavillon central
- 2 et 3. Constructions annexes

PART IX

CONSIDERATIONS SUR L'ELABORATION DE L'ETUDE
POUR UNE INSTALLATION-PILOTE D'EXTRACTION ET
DE SEPARATION DES PRODUITS DERIVES DES PLAN-
TES MEDICINALES

Constantin Turbatu +)

Mihail Diaconescu ++)

+) Ingénieur mécanicien, chef de l'atelier d'études près
la Centrale industrielle de médicaments, Bucarest, Roumanie

++) Ingénieur chimiste au même atelier d'études

I. INTRODUCTION

Les techniques d'extraction et de séparation des principes actifs des plantes ont évolué au cours du temps; à présent, on connaît de nombreuses technologies de traitement des plantes médicinales.

Les premières utilisations des plantes médicinales dans des buts curatifs ont pris la forme de tisanes; plus tard, par des opérations de pressage, on a obtenu des jus de fruits et des huiles à partir de graines.

Par macération avec de l'eau à froid ou à chaud et ensuite avec de l'alcool éthylique on a obtenu les premiers extraits liquides utilisés comme tels.

Après la découverte des substances actives des plantes médicinales et de leurs vertus curatives des technologies de leurs extraction et séparation ont commencé à se développer.

Dans le tableau présenté en annexe 1 sont inventoriés 85 types de plantes médicinales étudiées dans de pays en développement et indiquées l'utilisation de leurs principes actifs et les technologies nécessaires pour les obtenir.

II. PRESENTATION DES PROCÉDES D'EXTRACTION ET DE SEPARATION DES PRODUITS DERIVES DES PLANTES MEDICINALES

A. Procédés d'extraction

Les procédés d'extraction diffèrent en fonction de:

1. La partie de la plante et des caractères physico-chimiques des plantes médicinales soumises au traitement par:

(a) pressage: par exemple, les fruits des agrumes ou les graines de ricin;

(b) percolation: pour les herbes, fleurs, feuilles et racines;

(c) extraction par mélange: pour les herbes, feuilles, racines et graines;

(d) extraction du type Soxhlet: pour les herbes, feuilles, racines et graines;

(e) entraînement à la vapeur: pour les herbes, feuilles, racines et graines.

2. Agent d'extraction

(a) eau: (1) à froid; (2) à chaud;

(b) vapeur: entraînement à la vapeur;

(c) eau acidulée: (1) à froid; (2) à chaud;

(d) eau alcalinisée: (1) à froid; (2) à chaud;

(e) alcool éthylique: (1) à froid; (2) à chaud;

(f) solution d'alcool éthylique dans l'eau: (1) à froid; (2) à chaud;

(g) solvants aromatiques: benzène, toluène, essence: (1) à froid; (2) à chaud;

(h) solvants chlorurés: chloroforme, tétrachlorméthane: (1) à froid; (2) à chaud.

B. Procédés de séparation

On emploie les procédés de base suivants:

1. concentration;
2. extraction liquide-liquide;
3. extraction solide-liquide;
4. cristallisation;
5. distillation fractionnée.

III. CONSIDERATIONS GENERALES SUR UNE STATION PILOTE POUR L'EXTRACTION DES PRINCIPES ACTIFS DES PLANTES MEDICINALES

A. But de la construction d'une installation-pilote

Les installations pilotes pour l'extraction de principes actifs des plantes médicinales sont nécessaires pour élaborer des technologies d'extraction des principes actifs et leur séparation. Elles peuvent également servir à une fabrication à échelle réduite.

Les données qu'on peut obtenir au cours des expérimentations à l'échelle pilote pour élaborer l'étude d'une installation industrielle de grande capacité sont les suivantes:

1. détermination du procédé d'extraction;
2. détermination du procédé de séparation des principes actifs;
3. choix de la capacité optimale des charges et des recettes de fabrication;
4. choix et dimensionnement des appareils de production;
5. détermination des paramètres technologiques de travail :
 - (a) durée des opérations;
 - (b) température de régime par phases et opérations;
 - (c) pression de régime par phases et opérations.
6. détermination des quantités spécifiques de matières premières et d'utilités;
7. données physico-chimiques des semi-fabriqués, des déchets et des produits finis (densité, viscosité, point d'ébullition, chaleur spécifique, etc.);
8. données concernant les nuisances et les eaux résiduaires (débits, teneur en substances toxiques, méthodes de traitement et d'épuration, etc.);
9. méthodes d'utilisation des déchets de fabrication;
10. détermination de la main d'oeuvre nécessaire;
11. finalisation des méthodes d'analyse physico-chimiques déterminées en phase de laboratoire.

L'installation pilote doit être conçue de sorte que sur ses appareils puissent être réalisée la plupart des procédés d'extraction et de séparation des principes actifs; on obtiendra ainsi une installation pilote universelle multifonctionnelle.

B. Installations et constructions annexes

Pour le fonctionnement dans de bonnes conditions de l'installation pilote proprement dite, des installations et constructions annexes sont nécessaires, à savoir:

1. Installations pour les utilités
 - (a) centrale thermique pour la production de la vapeur de

- basse pression et de l'eau chaude;
- (b) station de refroidissement et de recyclage de l'eau;
 - (c) station de production de vide;
 - (d) alimentation en énergie électrique.
2. Entrepôts de matières premières, de produits semi-fabriqués et finis.
 3. Laboratoires pour analyses physico-chimiques.
 4. Station de traitement des eaux résiduaires.

IV. DONNEES CONCERNANT L'ELABORATION DE L'ETUDE

A. Matières premières

1. Plantes médicinales

Les plantes médicinales peuvent être livrées à l'état frais ou sec. Il est préférable que les plantes soient achetées à l'état sec pour économiser des frais de transport; elles peuvent provenir des cultures ou de la flore spontanée.

2. Solvants

Les solvants sont transportés en citernes de voie ferrée, en camion-citerne ou en tonneaux.

Vu les problèmes que pose l'acquisition de solvants pour de nombreux pays en développement, il est recommandé d'employer des technologies d'extraction se basant surtout sur l'alcool éthylique. Celui-ci peut être aisément obtenu par fermentation dans une station emplacée près de la station pilote.

B. Produits finis

Dans l'installation pilote on peut obtenir les produits suivants à partir des plantes médicinales:

1. jus;
2. teintures et extraits fluides;
3. huiles végétales du type huile de ricin;
4. extraits mous;
5. extraits secs.

Les produits dérivés des plantes médicinales peuvent être

utilisés pour la fabrication de certains médicaments: sirops, teintures, dragées, capsules, onguents et suppositoires.

On fera attention à la qualité des produits dérivés des plantes qui devra correspondre aux normes de qualité nationales et internationales.

C. Capacité de l'installation

On considère qu'une installation pilote doit avoir une capacité minimale de traitement de la plante sèche de 15 à 25 kg par charge.

D. Description des technologies

Les technologies d'extraction et de séparation varient suivant le procédé choisi expérimentalement au laboratoire.

1. Technologie par pressage

Les parties de la plante (fruits, semences) sont soumises au pressage en utilisant une presse hydraulique. Le liquide obtenu par pressage sera filtré pour éliminer les impuretés.

Le produit obtenu peut être utilisé comme tel ou après purification.

Une méthode de purification est le barbotage à la vapeur pour faire précipiter les impuretés. Après précipitation, la solution sera filtrée.

Une autre méthode de purification - séparation des principes actifs par distillation - est la rectification. On peut obtenir ainsi des produits de pureté supérieure.

2. Technologie par extraction

L'extraction des produits dérivés des plantes médicinales peut être faite par les procédés indiqués au chapitre II.A.

Pour l'extraction on utilise plusieurs types d'appareils:

- (a) pour l'extraction statique: des percolateurs, des extracteurs du type Soxhlet et des extracteurs par entraînement à la vapeur;
- (b) pour l'extraction dynamique: des extracteurs à mélange en

discontinu ou en continu.

Mentionnons que pour une installation pilote l'utilisation d'extracteurs en continu n'est pas justifiée.

Pour améliorer le rendement de l'opération d'extraction il faut au préalable que la plante soit finement hachée. Pour cette opération on emploie, avec de bons résultats, les broyeurs à marteaux.

Les solutions obtenues après extraction sont soumises aux opérations de sédimentation-filtration pour éliminer les impuretés.

Afin d'assurer une sédimentation rapide des impuretés, il est nécessaire que les récipients de sédimentation-décantation soient refroidis à $+5^{\circ}$, $+10^{\circ}\text{C}$. Plus la sédimentation des impuretés est complète, plus courte sera la durée de filtration.

L'opération de filtration des mucilages extraits contenant les principes actifs peut durer longtemps. C'est pourquoi le choix du filtre (filtre-presse ou filtre sous vide) et du matériau filtrant est très important.

Après filtration, on obtient des teintures ou des extraits fluides selon la nature de l'agent d'extraction.

Les teintures et les extraits peuvent être utilisés tels quels à des fins médicaux ou entrent dans la composition de diverses formes pharmaceutiques.

Les extraits fluides peuvent être concentrés, en obtenant, fonction de l'humidité résiduelle, des extraits mous ou secs.

Pour obtenir des extraits secs il faut sécher le produit pour le débarrasser complètement de l'humidité. Comme la plupart des produits extraits des plantes médicinales sont labiles à une température élevée, la concentration et la dessiccation se font sous vide à des températures modérées.

Quand on désire séparer un certain principe actif d'une plante, les opérations nécessaires dans ce but peuvent être :
(1) extraction liquide-liquide, extraction liquide-solide, cristallisation, distillation fractionnée, etc.

3. Principaux appareils

En vue d'assurer le fonctionnement de l'installation pilote conformément au schéma de la Fig. 1 (voir annexe 2) et au schéma des opérations de la Fig. 2 (voir annexe 3), les appareils suivants sont nécessaires:

1. Moulin à marteaux, d'une capacité de 50 kg/h, pour moulinde les plantes. Le moulin sera doté de tamis interchangeables pour obtenir une mouture de dimension requise.
2. Presse hydraulique pour presser les fruits et les semences; capacité recommandée: 100 kg/h.
3. Réservoirs pour solvants utilisés à stocker les solvants frais ou récupérés dans l'installation pilote; capacité recommandée: 1000 l.
4. Pompe centrifuge employée à transvaser les solvants et les extraits fluides; débit recommandé: 2 mc/h et pression de 1 à 3 bars.
5. Percolateur basculant, utilisé pour extraire par percolation, d'une capacité de 150 l et ayant une chemise pour chauffage-refroidissement.
6. Condensateur multitubulaire, utilisé pour condenser les solvants obtenus par percolation à chaud. Il est indiqué que la surface d'échange de chaleur soit de 2 à 5 m².
7. Récepteur collecteur des solvants condensés par percolation à chaud, ayant une capacité de 50 l.
8. Récepteur collecteur pour les extraits fluides résultant du percolateur, d'une capacité de 50 l.
9. Concentrateur sous vide, pour concentrer les extraits fluides et récupérer les solvants, muni d'un mélangeur du type ancre à 30 rotations/minute, d'une chemise de chauffage-refroidissement et ayant une capacité de 100 à 500 l.
10. Condensateur, utilisé pour les vapeurs de solvant après concentration, ayant une superficie d'échange de la chaleur de 2 m².
11. Récepteur dans lequel on collecte les solvants obtenus

par concentration, d'une capacité de 50 l.

12. Récipient de décantation-sédimentation, utilisé pour séparer les grandes particules des extraits fluides ou concentrés résultant dans l'installation pilote. Le récipient a un fond incliné et des raccords latéraux pour collecter le produit décanté à différents niveaux. Il a une capacité de 250 l et est muni d'une chemise de refroidissement pour assurer une décantation-sédimentation plus rapide.

13. Filtre-presse, nécessaire pour filtrer les extraits fluides ou les concentrés obtenus par décantation-sédimentation; surface de filtrage 2 m^2 .

14. Pompe centrifuge, utilisée pour former la pression dans le filtre. Elle doit avoir un débit de 0,5 mc/h et une pression de 4 à 6 bars.

15. Filtre à vide, nécessaire pour filtrer les extraits fluides ou les concentrés obtenus par décantation-sédimentation.

Suivant les caractéristiques physiques du produit filtré, on peut employer le filtre-presse ou le filtre à vide. Pour une installation pilote la surface de filtration pour le filtre à vide doit être de $0,5 \text{ m}^2$.

16. Extracteur pour l'extraction par mélange. C'est un cylindre vertical, ayant une capacité de 350 l, muni d'un mélangeur à ancre ou à palettes à 30 tours/minute environ et une chemise de chauffage-refroidissement.

En faisant barboter la vapeur au fond de l'extracteur, les produits dérivés des plantes sont entraînés et ensuite condensés.

17. Condensateur pour les vapeurs sorties de l'extracteur; superficie de 2 à 5 m^2 .

18. Récipient florentin, utilisé pour séparer les huiles essentielles par entraînement à la vapeur. Il peut avoir une capacité de 20 l et il est recommandable qu'il soit en verre.

19. Appareil du type Soxhlet, utilisé pour l'extraction basée sur le principe de Soxhlet. Il est muni d'une corbeille pour placer les plantes et d'un col de cygne pour vider l'extrait dans l'extracteur; la capacité indiquée pour l'installation

pilote est de 150 l.

20. Evaporateur pelliculaire rotatif, utilisé pour concentrer les extraits sous vide. La capacité optimale pour une installation pilote est de 20 l. Il est connu sous l'appellation de "rotavapeur".

21. Chaudière de distillation pour les solvants récupérés dans l'installation, d'une capacité de 500 l et munie d'un serpentín chauffant.

22. Colonne de rectification des solvants de l'installation. On peut utiliser des colonnes à remplissage ou à plateaux. Les caractéristiques techniques et fonctionnelles de la colonne de rectification varient suivant le solvant récupéré dans l'installation. Une colonne de rectification pour une installation pilote peut atteindre 6 m de hauteur et 350 mm de diamètre.

23. Condensateur pour condenser les vapeurs du solvant de la colonne de rectification; il peut être similaire à celui du point 17.

24. Récepteur collecteur pour le solvant condensé; il doit avoir une capacité de 100 l.

L'ensemble de l'installation de rectification fonctionnera également sous vide.

25. Mélangeur pour préparer les mélanges des extraits, d'une capacité de 10 à 20 l.

26. Séchoir à plateaux, pour sécher les extraits mous. A cette fin on utilise l'air chaud. Toutes les parties des appareils venant en contact avec la plante, les solvants, les semi-produits ou les produits finis seront en acier inoxydable, pour éviter l'impurification des produits par des oxydes de fer.

Le schéma comprenant les appareils mentionnés, présenté en Fig. 1, explique clairement le mode de fonctionnement d'une installation pilote multifonctionnelle.

Comme il résulte du schéma, l'installation pilote peut fonctionner par sections partielles pour un ou plusieurs types de plantes ou simultanément.

Les quantités approximées d'utilités pour une installation

pilote comme celle décrite sont les suivantes:

- (a) énergie électrique: puissance installée - 25 kw;
- (b) vapeur saturée: 200 kg à 4 bars/heure;
- (c) eau de refroidissement: 20 m³/h d'eau recyclée;
- (d) vide à 40-50 mm Hg: 50 Nm³/h.

F. Données concernant le montage d'une installation pilote

La plupart des appareils d'une installation pilote seront montés à même le sol, en assurant ainsi une utilisation facile.

Les jonctions entre appareils seront faites de préférence à l'aide de conduites flexibles et interchangeables.

On préférera aussi les pompes montées sur véhicules (chariots).

G. Temps de fonctionnement

L'installation pilote peut travailler en 1, 2 ou 3 équipes, chacune pendant 8 heures, en fonction de la durée maximale des opérations et du personnel disponible.

Tout arrêt conduit à une augmentation de consommation d'utilités (eau refroidie, énergies électrique et thermique) et à la diminution du rendement des opérations interrompues.

H. Choix de l'emplacement

L'emplacement de l'installation pilote sera choisi selon les critères suivants:

1. A proximité des sources d'utilités

Comme l'installation pilote consomme peu d'utilités, le mieux serait de l'emplacer près d'une autre unité industrielle à laquelle elle peut être raccordée pour recevoir les utilités nécessaires.

2. A proximité des sources de matières premières

Pour réduire le coût du transport des matières premières,

surtout des plantes médicinales, on peut prendre en considération un emplacement près des sources de matières premières.

3. A proximité des localités

Pour assurer la main d'oeuvre nécessaire à l'exploitation de l'installation pilote, elle sera emplacée de préférence dans des localités ou dans leur voisinage.

4. Conditions géotechniques et hydrotechniques

L'installation pilote sera emplacée sur un terrain adéquat à une construction, à savoir sur un sol résistant et ayant en sous-sol une nappe phréatique aussi profonde de la surface que possible.

I. Main d'oeuvre

Pour l'exploitation de l'installation pilote on a besoin du personnel suivant par équipe de 8 heures par jour:

1. 1 chef de l'installation pilote: ingénieur chimiste spécialiste en technologie;
2. 2 opérateurs chimistes;
3. 1 laborantin;
4. 2 manoeuvres pour la manipulation des matériaux;
5. 1 électromécanicien pour les opérations d'entretien.

J. Indices de mécanisation des opérations et des transports

Vu la grande variété des plantes et des technologies employées, il est préférable que la mécanisation et l'automatisation ne dépassent les limites d'une installation simple, interchangeable, opérable surtout manuellement.

K. Matériaux récupérables et réutilisables

Tous les solvants utilisés seront récupérés par distillation et rectification et reintroduits dans la fabrication.

Certaines plantes usées peuvent être utilisées après extraction et après avoir été séchées et broyées, comme fourrages.

L. Mesures pour prévenir les incendies

Comme dans l'installation pilote on travaille avec des solvants inflammables, l'équipement, les installations technologiques et électriques, la construction seront tels qu'ils puissent éliminer le danger d'un incendie.

On pourvoira l'installation de moyens à éteindre un éventuel incendie avec des agents adéquats aux solvants utilisés et conformément à la législation en la matière.

M. Mesures de sécurité du travail

Pour prévenir les accidents on prendra toutes les mesures adéquates pour un travail sur parties mobiles d'équipements, sur installations électriques et sur appareils fonctionnant à de températures au-dessus de $+50^{\circ}\text{C}$.

N. Organisation du laboratoire pour analyses physico-chimiques

Le laboratoire pour les analyses physico-chimiques de l'installation pilote doit être doté d'une façon adéquate à la complexité des analyses à effectuer.

On considère qu'un laboratoire pour une installation pilote pour l'obtention des extraits de plantes doit avoir l'appareillage suivant:

- . spectrophotomètre en UV;
- . pH-mètre;
- . centrifugeuse de laboratoire;
- . microscope;
- . appareil d'extraction du type Soxhlet pour laboratoires;
- . pompe à vide;
- . évaporateur du type "Rotavapeur";
- . verrerie diverse;
- . thermomètres;
- . balances analytiques;
- . burettes.

Le laboratoire sera de préférence emplaced dans l'immédiat voisinage de la station pilote.

PLANTES BIOLOGIQUEMENT ACTIVES

Légende : Entraînement à la vapeur..... A
 Extraction à l'eau B
 Extraction à l'alcool C
 Extraction avec d'autres solvants D

Nom de la plante	Parties de la plante utilisée	Produit	Utilisation du médicament	Méthode d'extraction
1. Acacia arabica	Tiges	Gomme	Contre les brûlures, ulcères, indigestions et maux de gorge	C
2. Acacia senegal.	Tiges	Gomme	" "	C
3. Aconitum sp.	Racines	Extrait total	Dans les douleurs menstruelles, antidiarrhéique, antirhumatismal	C
4. Acorus calamus	Rhizomes	Huile essentielle	Actions antispasmodique, carminative, antitussive	A
5. Aesculus	Semences	Aescine et extrait total	Analgésique, anti-pyrétique	C
6. Agave sisalana	Jus	Hécogénine	Hormones	D
7. Alce sp.	Jus de la feuille	Aloïne	Laxatif	D
8. Ammi majus	Semences	Xanthoxine	Maladies de la peau	D
9. Ammi visraga	Fruits	Visnagine, Khelline	Antihypertensif	C
10. Ammomum subulatum	Fruits	Huile essentielle		A
11. Ammomum xanthioides	Fruits	Huile essentielle	Pour la teinture de cardamome, anti-tussif	A
12. Andira araroba	Tiges	Extrait total		C

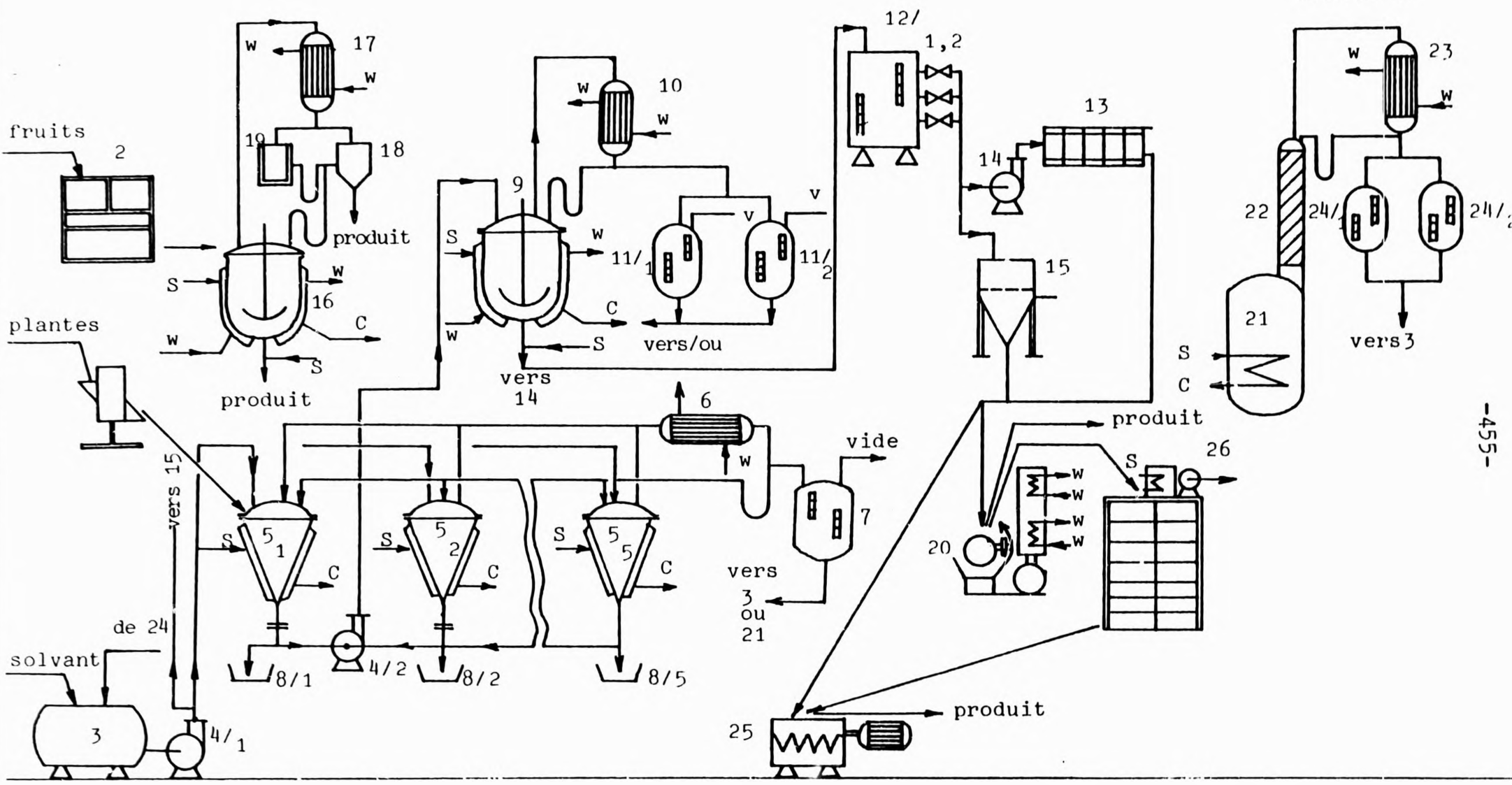
13.	Anethum sp.	Fruits	Huile essen- tielle		A
14.	Anis	Fruits	Huile essen- tielle		A
15.	Artemisia maritima	Sommets fleuris	Sanato- nine	Antihelminthique	D
16.	Atropa belladonna	Feuilles et racines	Alcalo- ïdes totaux	Antispasmodique	C
17.	Berberis anitata, B. asiatica, B. ycium	Racines, écorces	Berbé- rine	Antidiarrhéique, dans la jaunisse	B
18.	Betula alnoides	Ecorces			B
19.	Capsicum annum	Fruits	Capsi- cine, oléo- résine		D
20.	Carica papaya	Jus des fruits	Papaïne		B,C
21.	Carum carvi	Fruits	Huile essen- tielle		A
22.	Cassia acutifolia	Feuilles et cosses	Sennosi- des	Cathertique	C
23.	Cassia an- gustifolia	" "	"	"	C
24.	Cassia italica	" "	"	"	C
25.	Catharan- thus roseus	Feuilles et racines	Vinblas- tine, vincris- tine, rouba- sine	Antitumoral	D
26.	Centella asiatica	Plantes entières		Maladies de la peau	C
27.	Centella acuminata	Racines	Emétine	Amoebiase	D
28.	Cephaëlis ipêcacuanha	Racines	"	"	D
29.	Ceratonia siliqua	Fruits	Extrait	Antidiarrhéique	C
30.	Cnenopodium ambrosioides	Sommets fleuris et plante entière	Huile essen- tielle		A

31.	<i>Cinchona</i> sp.	Tiges et écorces	Quinine, quinidine	Antipaludéen, antiarhytmique	D
32.	<i>Claviceps purpurea</i>		Ergotamine, ergotoxine, ergométrine	Antimigraigneux, oxytocique	D
33.	<i>Cola nitida</i>	Semences	Extrait total		B
34.	<i>Cambretum nicronthum</i>	Feuilles	"	Antidote, chélateur, chologogue	C
35.	<i>Commiphora mukul</i>	Résine	Gomme		D
36.	<i>Costus speciosus</i> , <i>C. citratus</i>	Rhizomes	Diosgénine	Hormones	D
37.	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Feuilles	Huile essentielle, citrallé		A
38.	<i>Datura</i> sp.	Feuilles	Atropine ou scopolamine	Antispasmodique	D
39.	<i>Derris elliptica</i>	Racines	Roténone	Antipaludéen	D
40.	<i>Digitalis lanata</i>	Feuilles	Digoxine et lanatosides	Régulateur de la circulation sanguine	C,D
41.	<i>Dioscorea</i> sp. <i>D. leichartii</i>	Tubercules	Diosgénine	Hormones	D
42.	<i>Duboisia myoporoides</i>	Tiges	Hyoscyamine, hyoscine	Antispasmodique	D
43.	<i>Ephedra gerardina</i>	Plante entière	1-Ephédrine	Antiasthmatique, contre l'inflammation des bronches	D
44.	<i>Eucalyptus globulus</i>	Feuilles	Huile essentielle		A
45.	<i>Glaucium flavum</i>	Feuilles	Glaucine	Médicament agissant sur les voies respiratoires	C
46.	<i>Glaucium simplex</i>	Rhizomes	Colchicine		D
47.	<i>Gloriosa superba</i>	Rhizomes	Colchicine	Anti-inflammatoire non-stéroïdique, anti-goutteux	D
48.	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Rhizomes	Extrait total	Colites, ulcères	B
49.	<i>Heracleum candidans</i>	Racines	Xanthoxone		D

50.	Hibiscus sabdariffa	Fleurs	Fleurs séchées	
51.	Holarrhena floribunda		Concesine et alcaloïdes totaux	D
52.	Hydnocarpus kurzii	Semences	Huile fixe, acide hydnocar- pique	
53.	Hydnocarpus wightiana	Semences	Acide chaulmo- grique	
54.	Hyoscyamus sp.	Racines	Hyoscyamine et autres alca- loïdes	Antispasmodique
55.	Lippia chevatiari	Plante entière	Camphre et huile essen- tielle	A
56.	Lobelia pyramidalis	Feuilles, sommets en fleurs	Lobéline et extrait total	Antispasmodique D
57.	Mentha sp. Mentha piperita	Plante entière	Huile essentiel- le	A
58.	Mucuna pruriens	Semences	1-Dopa	Antiparkinson- nien B
59.	Oncoba echinata	Semences	Huile fixe	
60.	Papaver somniferum	Capsules et latex	Morphine, co- déine, mosca- pine, papavé- rine	Analgésique, antipyrétique D
61.	Passiflora sp.	Plante entière	Extrait total	C
62.	Pausinystal- lia yohimba	Ecorces	Yohimbine et extrait total	D
63.	Physostigma venenosum	Graines	Physostigmine, stigmastérole	D
64.	Psysochlaina praealta			Antispasmodique C,D
65.	Pilocarpus sp.	Feuilles	Pilocarpine	Préparations ophtalmolo- giques D
66.	Plantago ovata	Graines, gousses	Ispaghula; psyllium	Antidysenté- rique
67.	Podophyllum hexandrum	Tuber- cules	Podophylline, podophyllo- toxine	Pour les affec- tions du foie et du chole- cyste D
68.	Polygala senega	Racines	Résine	
69.	Prunus africana	Ecorces	Extrait total	Anticancéreux C

70.	<i>Psoralea corylifolia</i>	Semences	Psoralène	Préparations dermatologiques	D
71.	<i>Rauwolfia heterophylla</i> <i>R. serpentina</i> <i>R. vomitoria</i>	Racines	Résérpine, ajmaline, deserpidine, rescinnamine, résorpinine	Hypnotique, sédatif, anti-hypertensif, psychothérapeutique	D
72.	<i>Rhamnus purshiana</i>	Ecorces	Extrait cru	Purgatif	C
73.	<i>Rheum emodi</i> <i>R. palmatum</i>	Rhizomes	Extrait total		
74.	<i>Ricinus communis</i>	Graines	Huile fixe		
75.	<i>Solanum sp.</i>	Baies	Solasodine	Hormones	D
76.	<i>Sterculia setigera</i>	Exsudats d'écorces	Gomme		
77.	<i>Strophantus gratus</i>	Graines	Strophantine strophantidine	Tonicardiaque	D
78.	<i>Strychnos nux vomica</i>	Graines	Strychnine		D
79.	<i>Tabernanthe iboga</i>	Ecorces	Ibogaine		D
80.	<i>Taraxacum officinale</i>	Racine	Résine et extrait total	Diurétique; dans les troubles chroniques rénaux et hépatiques	D
81.	<i>Thevetia nertifolia</i>	Semences	Peruvoside	Tonicardiaque	D
82.	<i>Urginea indica</i> <i>U. scilla</i>	Bulbes	Proscillaridine	Tonicardiaque	C
83.	<i>Valeriana officinalis</i> <i>V. wallichii</i>	Rhizomes	Extrait total	Contre les troubles nerveux	C
84.	<i>Voacanga thoursii</i> <i>V. africana</i>	Graines	Tabersonine	Antihypertensif	D
85.	<i>Vinca minor</i>	Feuilles	Vincamine	Antihypertensif	D

Ce tableau est basé sur les informations du "Rapport des consultations techniques sur les médicaments des plantes médicinales dans les pays en développement", tenu à Lucknow - Inde, de 13 à 20 Mars 1978, publié par l'ONU DISCUS ID/222 (ID/WG 271/6).



- S - vapeur
- C - condensé
- w - eau
- v - vide

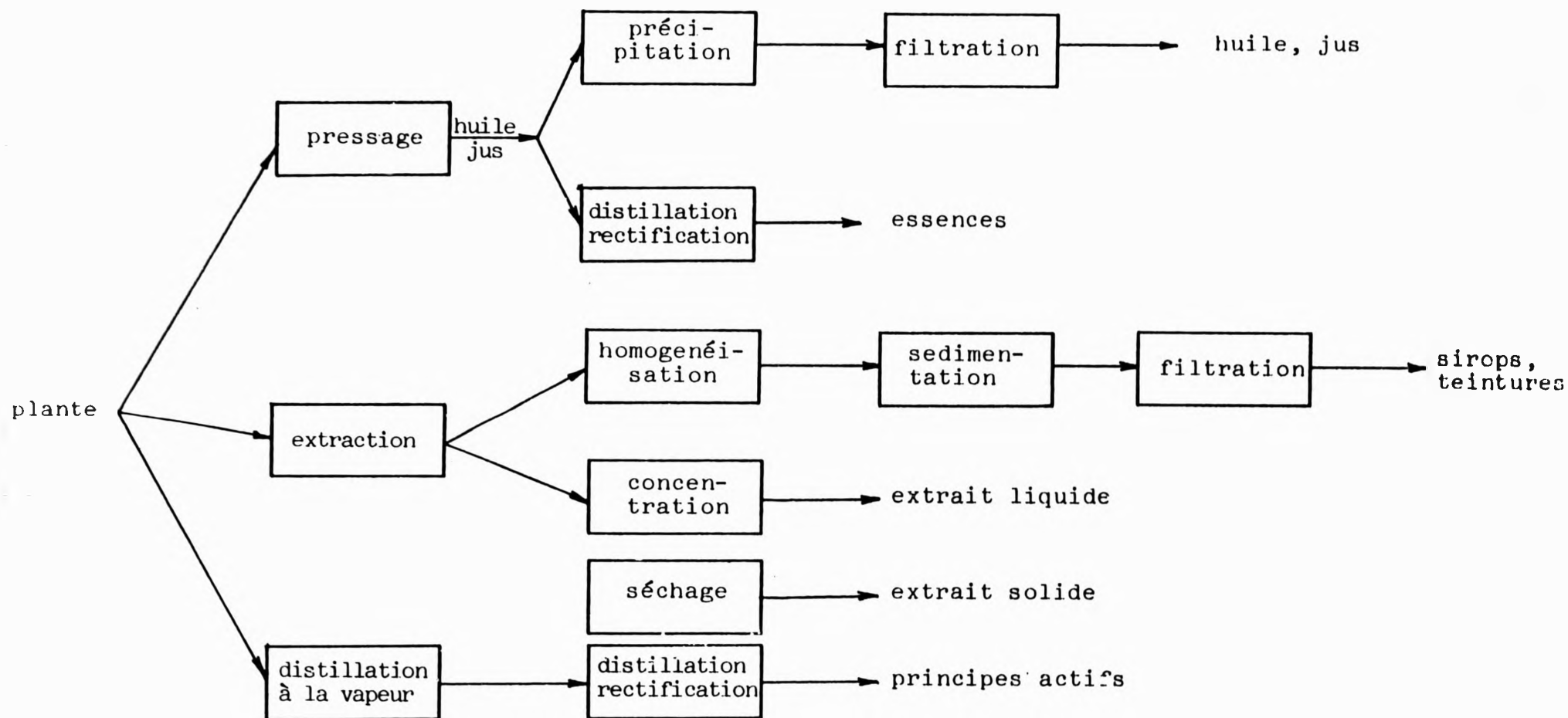
Pour la légende des nombres voir page suivante

INSTALLATION PILOTE POUR EXTRACTION - SCHEMA

INSTALLATION PILOTE POUR EXTRACTION - SCHEMA

L é g e n d e

1. Broyeur à marteaux
2. Presse hydraulique
3. Réservoir de stockage pour solvant
4. Pompe centrifuge
5. Percolateur
- 6,10,17,23. Condensateur tubulaire
- 7, 8,11,24. Récipient collecteur
9. Concentrateur sous vide
12. Récipient de décantation
13. Filtre presse
15. Filtre à vide
16. Extracteur
18. Récipient florentin
19. Appareil soxhlet
20. Evaporateur
21. Chaudière de distillation
22. Colonne de rectification
25. Mélangeur
26. Séchoir



SCHEMA D'OPERATIONS POUR L'OBTENTION DES PRINCIPES ACTIFS A PARTIR DE PLANTES

CONSIDERATIONS CONCERNANT UNE INSTALLATION
POUR L'EXTRACTION D'HUILES ESSENTIELLES

Gheorghe Rădoiaș⁺)

Traian Cadariu⁺⁺)

⁺) Ingénieur au Trust "Plafar", Bucarest, Roumanie

⁺⁺) Chimiste à l'entreprise "Plafar", Crăstie, Roumanie

I. BREF HISTORIQUE DES PROCÉDES UTILISÉS POUR EXTRAIRE LES HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de différents composés chimiques à l'état liquide ou solide, dissous l'un dans l'autre, formant des solutions homogènes. Les principaux composants des huiles essentielles sont des substances chimiques de la classe des terpénoïdes (hydrocarbures terpéniques et leurs dérivés oxygénés: alcools, aldéhydes, cétones, phénols et esters phénoliques, éthers, acides, esters de ceux-ci etc.), substances spécifiques du règne végétal. Aux côtés de ceux-ci on trouve, en quantités plus réduites, des hydrocarbures aliphatiques saturés, oléfiniques et acétyléniques, hydrocarbures aromatiques, tropolones, alcools, aldéhydes, cétones, phénols, acides organiques, esters, lactones, lignanes, substances à azote ou à soufre etc.

La caractéristique fondamentale des huiles essentielles est leur odeur agréable, spécifique des plantes ou des organes végétaux dont ils proviennent, et qui leur confère une valeur économique comme matière première pour l'industrie des parfums et des cosmétiques, l'industrie alimentaire en tant que condiments et aromatisants. Par leur valeur thérapeutique, découverte encore dans l'antiquité, de nombreuses huiles essentielles figurent dans les pharmacopées en tant que matières premières de l'industrie des médicaments.

La technologie d'extraction des huiles essentielles représente une des plus anciennes technologies chimiques.

4000 ans avant notre ère, les Egyptiens extrayaient déjà, par distillation sèche, une huile du bois de cèdre. Des techniques semblables étaient également connues dans l'antiquité par les Chinois, les Indiens, les Perses, les Grecs et les Romains. L'entraînement à la vapeur d'eau, découvert au Moyen Âge par les Arabes, permettait le développement et la diversification de la production d'huiles essentielles.

La production d'huiles essentielles connaît un essor

particulier à partir du XIX^e siècle, comme suite de l'intérêt économique pour les produits dérivés des huiles essentielles (parfums, cosmétiques, aromatisants, médicaments), ainsi qu'en raison des progrès faits dans la connaissance de leur composition chimique. À partir de 1818, on savait déjà que les huiles essentielles sont des mélanges de plusieurs substances qui font partie d'une nouvelle classe de composés organiques naturels, désignés plus tard par Kékulé (1866) sous le nom de terpènes.

Les techniques d'isolation des huiles essentielles se sont depuis améliorées et diversifiées.

Les techniques analytiques, telles que chromatographie en phase gazeuse, celle de liquides à haute pression, en couche mince, la spectroscopie en ultraviolet, en infrarouge, ou de masse, utilisées couramment dans la chimie des terpènes, ont permis de grands progrès dans la connaissance des huiles essentielles. On connaît aujourd'hui la composition de plus de 3000 huiles essentielles, dont environ 150 sont produites pour des intérêts commerciaux, la production mondiale d'huiles essentielles (exceptant l'huile de térébenthine) dépassant 20.000 tonnes/an.

II. METHODES D'OBTENTION DES HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles sont produites dans le protoplasme cellulaire des plantes et représentent des produits du métabolisme cellulaire. Elles s'accumulent dans des glandes spécialisées ou sont retenues dans les tissus. On les trouve soit à l'intérieur d'un ou de plusieurs organes de la plante, soit dans toute la plante. Généralement, dans les différents organes d'une même plante se trouve le même type d'huile. Mais il y a également des exceptions, comme par exemple la canelle (Cinnamomum zeylanicum), qui produit trois différentes huiles essentielles, dans les feuilles, dans la racine et dans l'écorce.

Pour libérer les huiles essentielles d'une plante, on utilise les procédés suivants: entraînement à la vapeur d'eau,

extraction par solvants, pressage ou enfleurage.

Le choix d'un procédé ou de l'autre est déterminé en premier lieu par les caractéristiques physiques et chimiques de l'huile essentielle. Si la stabilité de l'huile essentielle est grande, c'est-à-dire qu'elle ne subit pas de transformations chimiques sous l'influence de la température et de l'air, la méthode d'extraction la plus indiquée est l'entraînement à la vapeur d'eau, ou à la vapeur surchauffée. Il existe des huiles essentielles très stables, ayant dans leur composition des composés lourds, de nature non-terpénique, qui sont localisés d'habitude dans les parties ligneuses des plantes, que l'on peut extraire également par distillation sèche.

Si la stabilité de l'huile est réduite, ne pouvant supporter la température de la vapeur d'eau sans subir des modifications dans sa composition, on peut utiliser la distillation par entraînement à la vapeur sous une pression inférieure à la pression atmosphérique. Dans cette situation on a recours souvent à l'extraction par solvants organiques.

Les huiles essentielles très sensibles, comme celles existant dans certaines fleurs (jasmin, violette, tuberose, etc.), s'obtiennent par extraction aux corps gras (enfleurage).

A. Entraînement à la vapeur d'eau

La vapeur d'eau formée dans le vase d'entraînement, ou introduite dans celui-ci sous forme de vapeur vive, forme avec l'huile essentielle contenue dans la plante un système non-miscible. L'huile essentielle sera chauffée par la vapeur d'eau et disloquée du tissu végétal, se mélangeant avec la vapeur d'eau. Les composants d'un système non-miscible, bien agité, se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est-à-dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du composant pur, à la pression du mélange. Le système bouillira donc à la température à laquelle la somme des pressions partielles, égale à la pression de vapeur des composants, coïncidera avec la pression sous laquelle on fait l'entraînement à la vapeur d'eau.

$$p_A = P_A$$

$$p_{cl} = P_{cl}$$

.....

$$p_{cn} = P_{cn}$$

$$p_A + p_{cl} + \dots + p_{cn} = P_A + P_{cl} + \dots + P_{cn} = p$$

où:

$P_{A,cl\dots cn}$ - pressions partielles

$P_{A,cl\dots cn}$ - pressions de vapeur à la température d'ébullition

p - pression totale sous laquelle se fait l'entraînement

(voir Fig. 1, Diagramme $t - p$)

Par l'addition des ordonnées des courbes d'ébullition correspondant à chaque composant de l'huile essentielle avec l'ordonnée de la courbe d'ébullition de l'eau, on obtient le faisceau de courbes $P_A + P_{cl}$, ... $P_A + P_{cn}$. Les points d'intersection de ces courbes avec l'horizontale en $p = 760$ torr correspondent sur l'abscisse à la température d'entraînement de chaque composant de l'huile essentielle. Ces températures sont inférieures aux températures t_A , t_c , ... t_{cn} auxquelles les composants purs du mélange auraient bouilli sous la même pression.

Donc, l'avantage principal de l'entraînement à la vapeur est la réduction de la température d'ébullition. Par la réduction de la pression (entraînement à la vapeur sous vide), on peut abaisser encore la température d'ébullition, au cas où la sensibilité thermique de l'huile essentielle l'exige.

Ce procédé, pratiquement le plus utilisé, comporte les variantes suivantes :

(a) L'eau d'entraînement est introduite dès le début dans l'appareil en même temps que le matériau végétal. Après fermeture de l'appareil, on chauffe celui-ci au feu direct. La vapeur d'eau et l'huile entraînée sont condensées dans le condensateur; les phases sont séparées dans un vase séparateur. Ce procédé simple, souvent employé dans le passé,

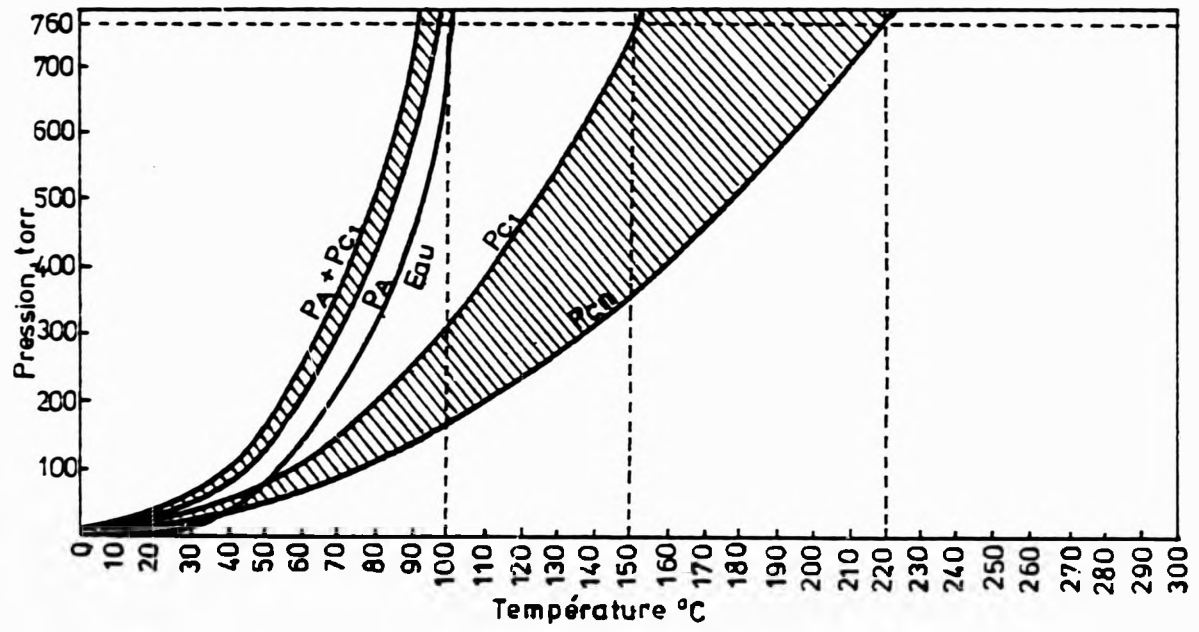


Fig. 1. Diagramme t - p pour le système eau-huile essentielle

présente certains désavantages, tels que impossibilité de mécaniser et d'automatiser le processus, manque de précision du procédé, temps trop long nécessaire pour faire bouillir l'eau, possibilité d'une dégradation partielle du matériau végétal, etc.

(b) Pour éliminer certains de ces inconvénients, le chauffage de l'appareil se fait indirectement, avec de la vapeur venant d'un générateur et introduite dans l'appareil par un serpentín placé à sa base, le matériau végétal étant placé soit sur une grille au-dessus du serpentín, soit dans un récipient à la base perforée. La vapeur du serpentín chauffera l'eau introduite dans l'appareil et la vapeur provenant de l'eau à l'ébullition entraînera l'huile.

(c) L'entraînement de l'huile essentielle se fait directement par la vapeur d'eau introduite de l'extérieur par un serpentín perforé, ou par un distributeur de vapeur dans la masse végétale, sans addition d'eau dans l'appareil. Dans ce cas, on obtient normalement une pression supérieure à la pression atmosphérique. Ce procédé permet de réduire le temps d'entraînement de l'huile essentielle, étant donc indiqué pour des installations de grande capacité, pour les huiles essentielles à solubilité réduite dans l'eau et résistant à l'action de la température. Certaines huiles essentielles, comme par exemple l'huile essentielle des fleurs de rose, ont une solubilité partielle et différenciée - pour certains composants - dans l'eau, ce qui conduit à la modification de la composition et à la diminution du rendement.

Dans ce cas, l'eau qui distille, contenant la partie soluble de l'huile, est récirculée du vase séparateur dans l'appareil d'entraînement, une quantité déterminée d'eau dissolvant seulement jusqu'à la limite de solubilité des composants à solubilité plus grande dans l'eau. Cette opération peut être appliquée aux deux premières variantes décrites plus haut.

3. Extraction de l'huile essentielle par solvants

Le solvant choisi pour l'extraction dépend du matériau

végétal. Les feuilles, les fruits, les racines, les résines et les baumas sont extraits avec du benzène, additionné ou non d'acétone ou d'éther de pétrole, à froid ou au point d'ébullition.

Les fleurs sont extraites d'habitude avec de l'éther de pétrole ou du butane liquéfié.

L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu ou en discontinu. Après extraction, le solvant est éliminé par distillation, laissant un résidu semi-solide, appelé "concret". Celui-ci est extrait de nouveau avec une grande quantité d'alcool. L'extrait alcoolique est refroidi, ce qui fait précipiter les cires, ensuite il est filtré et distillé sous basse pression, afin d'éliminer l'alcool. L'huile essentielle obtenue est appelée "absolu" et, en général, n'a pas une composition identique à celle obtenue par entraînement à la vapeur.

Le procédé est très coûteux à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation de solvants, n'étant appliqué que pour certaines huiles essentielles, qu'on ne peut obtenir par entraînement à la vapeur d'eau. Le procédé n'est pas indiqué pour des grandes quantités de matériau végétal.

C. Extraction de l'huile essentielle par pressage

Le procédé n'est utilisé que pour obtenir les huiles essentielles des rutacées (citrons, oranges etc.), qui ont l'huile essentielle distribuée dans des glandes spéciales, réparties uniformément dans le péricarpe. Le procédé consiste dans la libération de l'huile végétale par pressage du zeste des fruits. L'huile mélangée à l'eau cellulaire est décantée, centrifugée et filtrée.

D. Extraction des huiles essentielles par des corps gras (enfleurage)

Le procédé est appliqué à l'extraction de l'huile essentielle des fleurs ayant une teneur réduite en huile et

qui, étant très sensible à l'action de la température, ne peut être obtenue par entraînement à la vapeur d'eau.

La méthode est très laborieuse; elle consiste dans l'application d'une couche uniforme de graisse animale, traitée préalablement pour éliminer son odeur. On pose les pétales sur des plaques, ensuite on entrepose une pile de quatre plaques superposées dans des chambres obscures et froides. En fonction des fleurs, on maintient plus ou moins les plaques dans ces conditions (24 heures pour le jasmin, 72 heures pour la tubérose). Pendant ce temps, la plus grande partie de l'huile est absorbée par la graisse. On enlève les pétales et on répète le procédé sur la même plaque par 30 fois, jusqu'à saturation. On extrait à l'alcool la graisse saturée après l'avoir enlevée de la plaque et l'on sépare l'extrait par décantation.

La solution alcoolique est concentrée par distillation sous vide jusqu'à ce que l'on trouve dans un litre d'alcool le contenu en huile de 100 kilos de graisse d'extraction. Cette solution s'appelle "parfum concentré de pommade 3000". Des pétales extraites à la graisse on obtient encore, par extraction à l'alcool et concentration, une huile appelée "absolu de pommade" ou "absolu d'enfleurage".

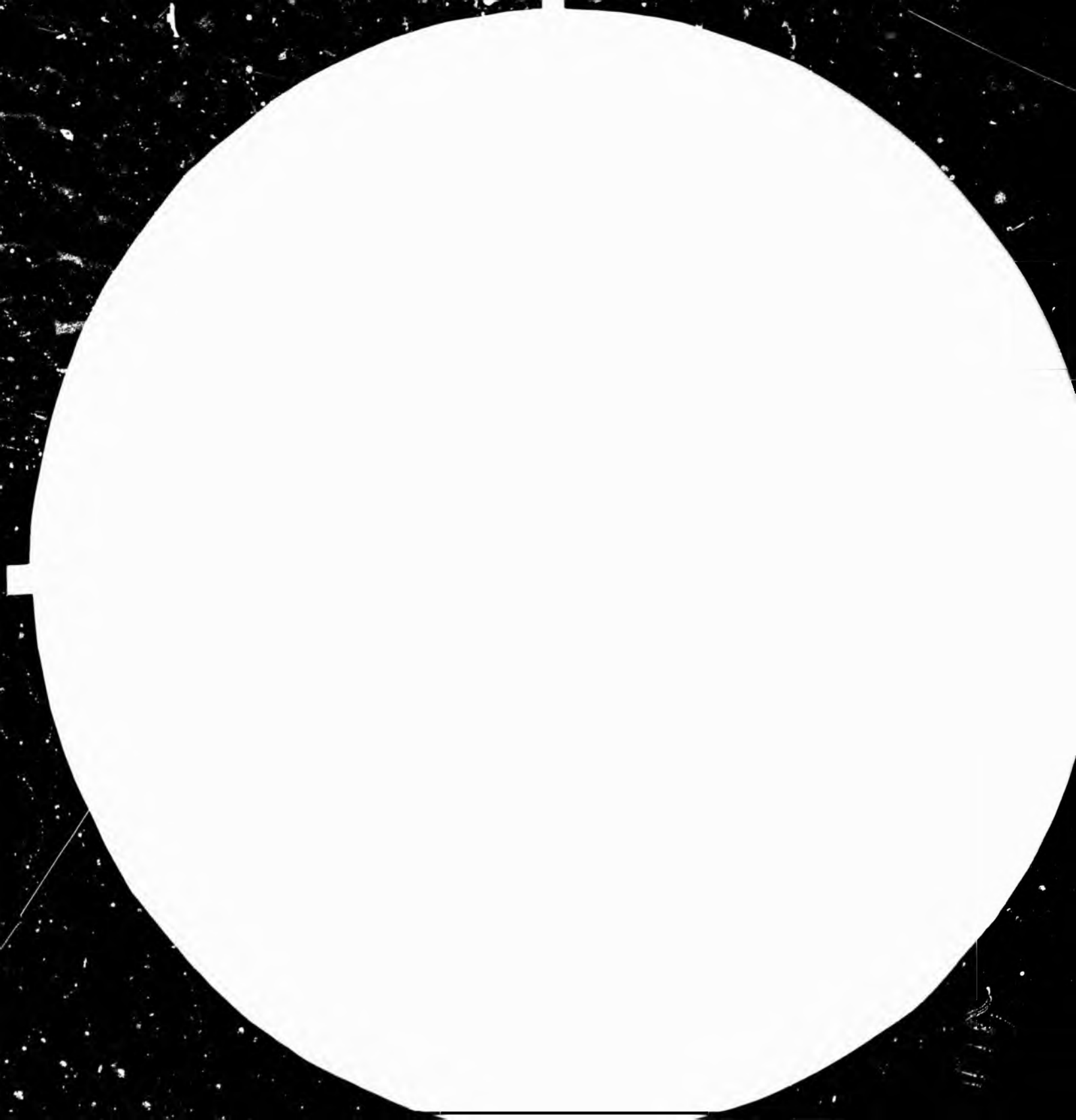
Le procédé ne s'applique aujourd'hui que pour certaines huiles essentielles de fleurs (jasmin, tubérose, violettes).

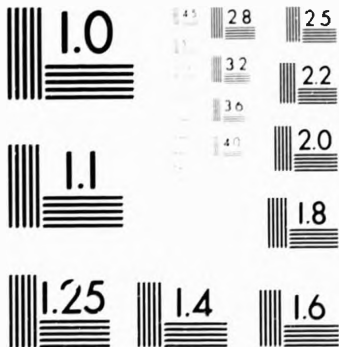
Une simplification du procédé représente la macération, qui consiste en l'immersion des pétales des fleurs dans la graisse, chauffée à 40-60°C, pendant 1-2 heures, en fonction de la fleur. Après ce traitement, on filtre la graisse, répétant l'opération 10-20 fois. Par la suite, on répète la succession des opérations décrites antérieurement.

III. DONNEES PRELIMINAIRES POUR UNE ETUDE D'INSTALLATION D'EXTRACTION D'HUILES ESSENTIELLES

De la présentation faite dans le chapitre précédent, il résulte que les huiles essentielles ne sont pas toutes

84.08.21
AD.85.0





MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART

NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
 STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
 (ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

obtenues de la même manière et, par conséquent, il faut connaître les caractéristiques des matières premières, de même que celles des huiles essentielles qu'on a l'intention d'obtenir.

Généralement, on conçoit une installation apte à extraire un nombre aussi grand que possible d'huiles essentielles.

Pour satisfaire aux conditions de multi-fonctionnalité, d'économie, de fiabilité, de résistance dans le temps, de maintien des qualités naturelles des huiles essentielles, lors de l'élaboration de l'étude d'une installation d'extraction d'huiles essentielles il faut tenir compte des facteurs suivants:

A. Mature du matériau végétal

Les matières premières utilisées dans l'extraction des huiles essentielles peuvent être classifiées de la manière suivante :

- (a) semences et fruits (coriandre, cumin, fenouil, anis, noix de muscade, poivre, genévrier, etc.);
- (b) feuilles et herbes (menthe, absinthe, basilic, géranium, eucalyptus, citronnelle, sauge, thym, sapin, épicéa, pin, etc.);
- (c) fleurs et pétales (lavande, lavandin, sauge sclarée, romarin, fleurs d'oranger, camomille, rose, ylang-ylang);
- (d) racines et rhizomes (iris, calamus, gingembre).

Généralement, les semences, les fruits, les racines et rhizomes ne se dégradent pas par stockage; c'est pourquoi leur usinage est possible même longtemps après la récolte. Pour certains de ces produits végétaux on recommande justement un stockage prolongé, afin de favoriser les processus enzymatiques qui augmentent la teneur en huile essentielle (cumin, iris). Le fait que ces matières premières peuvent être stockées longtemps n'influence pas trop

les dimensions de l'équipement de fabrication.

Les herbes, les feuilles et surtout les fleurs, par contre, ne peuvent être stockées ou conservées sans se dégrader, même une période courte après la cueillette. L'installation doit être emplacée le plus près possible des lieux de cultures des plantes aromatiques ou des sources spontanées de matières premières, pour prévenir la dégradation de ces catégories de matières premières (qui représentent en fait la source principale d'huiles essentielles), étant donné que la période optimale de la cueillette, correspondant à l'accumulation maximale d'huiles, est d'habitude très courte (10 à 30 jours).

Pour établir la capacité de fabrication et donc les dimensions de l'équipement, il faut tenir compte de la quantité de matières premières.

Certaines matières premières sont soumises à l'extraction seulement après avoir été soit broyées préalablement, dans le cas des fruits (fenouil, genévrier, poivre, noix de muscade), soit après avoir été hachées, dans le cas des herbes, des racines et des rhizomes (sapin, pin, iris).

Dans ces cas, l'installation doit être pourvue de broyeurs et de hachoirs.

B. Caractéristiques physiques des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles est variée et complexe, de même que leurs propriétés physiques sont différentes. D'habitude, elles sont des liquides à viscosité réduite. Dans certains cas, lorsque les composants majeurs sont des substances à point de fusion élevé, comme c'est le cas de l'anéthol de l'huile essentielle d'anis ou de fenouil (point de fusion 21-22°C), on peut obtenir la cristallisation de l'huile à la température ambiante. Dans ce cas, le condensateur doit être maintenu tout le temps de l'entraînement à une température plus élevée que la température de cristallisation de l'huile, en l'alimentant en eau chaude.

La densité des huiles essentielles est comprise entre 0,8 et 1,1, la majorité ayant la densité moindre que celle de l'eau. Il faut tenir compte de cette densité dans la conception du vase séparateur (vase florentin), les huiles essentielles plus légères que l'eau étant séparées à la partie supérieure du vase florentin, d'où elles seront collectées. Les huiles, comme celles de la noix de muscade, des clous de girofle, de patchouli, de saffran, de piment, de la semence de persil, plus lourdes que l'eau, seront collectées à la partie inférieure du vase séparateur, la construction du vase étant dans ce cas différente.

Les huiles essentielles sont solubles dans les solvants organiques, la solubilité étant en fonction de la composition chimique. Dans l'eau, les huiles essentielles sont insolubles, ou bien ont une solubilité très réduite. Dans certains cas, un ou plusieurs composants de l'huile essentielle ont une solubilité plus grande dans l'eau, ce qui détermine une dénaturation de la composition de l'huile. Un exemple dans ce sens est la solubilité de l'alcool phényl-éthylé de l'huile de rose. Pour récupérer les composants solubles, l'eau condensée après séparation est recirculée dans l'entraîneur, ou bien elle est soumise à une nouvelle distillation.

C. Caractéristiques chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles n'ont pas de propriétés chimiques spécifiques, mais elles englobent les propriétés chimiques de leurs composants. À cause de la présence de composants à réaction acide (acides organiques, alcools, phénols, aldéhydes), les huiles essentielles, surtout à l'état de vapeurs et mélangés à la vapeur d'eau, peuvent provoquer la corrosion chimique de l'équipement, en premier lieu de l'entraîneur et du condensateur, qui viennent en contact avec les vapeurs. Pour empêcher la corrosion qui conduit tant à la dégradation de l'équipement qu'à l'impurification des huiles essentielles, l'équipement sera construit en matériaux résistants à la corrosion (aciers alliés). Comme on a déjà souligné, en présence d'air et à de hautes

températures, certaines huiles essentielles ayant une teneur élevée en hydrocarbures terpéniques ou en composants oxygénés, labiles, subissent des modifications chimiques qui contribuent à la modification des paramètres qualitatifs de l'huile. Ce fait sera pris en considération, en choisissant le procédé qui évite l'action de la température. Par exemple, pour de pareilles huiles on n'utilisera pas l'entraînement à la vapeur surchauffée sous pression, mais l'entraînement à la vapeur sous pression normale ou encore l'entraînement sous vide.

D. Teneur en huiles essentielles du matériau végétal

La teneur en huiles essentielles du matériau végétal peut varier entre des limites très larges - depuis 0,02% d'habitude pour les fleurs, jusqu'à 15% (noix de muscade). Cette caractéristique sera prise en considération lors du dimensionnement du vase séparateur.

La détermination de la teneur en huile essentielle du matériau végétal se fait au stade de l'étude de laboratoire, où l'on détermine aussi les paramètres physiques et chimiques de l'huile essentielle par analyses physiques et chimiques.

E. Conditions géographiques et économiques d'exploitation de l'installation

On a déjà mentionné que les plantes aromatiques se dégradent rapidement après avoir été cueillies, à cause des processus fermentatifs, favorisés par la haute température. C'est pourquoi pour des zones situées en climat chaud on aura en vue de telles capacités que la matière première soit mise en fabrication rapidement sans la stocker longtemps.

Quand il s'agit de l'emplacement de l'installation, à proximité de la source de matières premières, il faut également prendre en considération la possibilité de disposer d'eau, d'énergie et de combustible. De la qualité du combustible dépend le type de générateur de vapeur qu'on choisira.

IV. TECHNOLOGIE D'OBTECTION DES HUILES ESSENTIELLES PAR ENTRAÎNEMENT A LA VAPEUR D'EAU

Toutes les espèces de plantes aromatiques de Roumanie provenant soit des cultures soit de la flore spontanée, sont traitées par le procédé d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau.

Les installations d'extraction sont basées sur deux variantes du procédé de l'entraînement à la vapeur d'eau: entraînement sous pression normale (au dessous de 0,7 atm) et entraînement sous moyenne pression (jusqu'à 3 atm).

On obtient ainsi les huiles essentielles suivantes : sapin, épicéa, pin, basilic, sauge sclarée, lavande, lavandin, thym, anis, menthe, cumin des fruits, cumin de herba, fenouil, genévrier, coriandre, absinthe, hysope, anethum .

Une installation d'extraction par entraînement à la vapeur est composée de l'équipement suivant : chaudière à vapeur, entraîneur, condensateur de vapeurs, vase séparateur des phases, (vase florentin), pont roulant.

A. Chaudière à vapeur

Le choix d'une chaudière à vapeur se fera tenant compte des facteurs suivants :

1. Type de l'installation d'entraînement des huiles

L'installation d'entraînement peut être selon les exigences, une installation fixe, semi-mobile ou mobile. Dans les premiers deux cas, la chaudière à vapeur est fixe, dans le dernier, - mobile. Les installations fixes ou semi-mobiles sont des installations de grande capacité; la chaudière à vapeur sera par conséquent choisie d'une capacité adéquate. Les installations mobiles, pour pouvoir être facilement transportées et mises en route, sont de petite capacité. La chaudière à vapeur alimentera 1-2 entraîneurs, répondant aux mêmes exigences.

2. Type de combustible

En fonction de la nature du combustible, on connaît plu-

sieurs types constructifs de chaudière à vapeur. Les différences les plus importantes se rapportent au brûleur. Pour les sources de vapeur fixes, on peut choisir n'importe quel type de chaudière, en fonction de la source de combustible existante (combustible solide, liquide ou gazeux); pour les sources mobiles, on choisira une chaudière qui fonctionne au combustible solide ou liquide.

3. Débit de vapeur nécessaire et pression à laquelle la vapeur sera livrée

Les dimensions de la chaudière à vapeur seront faites en fonction du débit de vapeur nécessaire et de la pression à laquelle la vapeur sera livrée. Pour une installation d'entraînement ayant une capacité quotidienne de 30 à 35 tonnes de matière première, avec fonctionnement à la pression normale (sous 0,7 atm) une chaudière ayant un débit de 2 tonnes/h de vapeur est suffisante.

La vapeur est produite à une pression approximative de 6 atm. La réduction de la pression jusqu'à 0,7 atm dans le cas des installations qui fonctionnent à la pression normale, ou à 1,5 - 3 atm pour les installations qui fonctionnent sous pression, se fait à l'aide d'un réducteur de pression monté sur le tracé de la vapeur, avant la distribution vers l'entraîneur.

L'alimentation de la chaudière à vapeur se fait avec de l'eau dédurisée. La dédurisation de l'eau se fait dans des installations spéciales de dédurisation pourvues de colonnes à échangeurs d'ions ou par dédurisation chimique. Lorsque l'on dispose de sources naturelles d'eau à dureté réduite, l'installation de dédurisation n'est plus nécessaire.

Lorsque des problèmes concernant la quantité d'eau dédurisée se posent et surtout dans le cas d'installations d'entraînement mobiles, on peut recourir à la recirculation dans la chaudière à vapeur de l'eau d'entraînement séparée dans les vases florentins. La méthode peut être utilisée seulement dans le cas où l'on emploie longtemps la même matière première, pour éviter l'impurification de l'huile essentielle.

B. L'entraîneur

L'entraîneur est un vase cylindrique à couvercle démontable et à fond sphérique ou conique. Au fond du vase il y a un raccord d'échappement avec robinet, le couvercle ayant un raccord d'échappement libre, auquel se raccorde par une bride une conduite au condensateur. Le tube de jonction (col de cygne) réunit d'habitude un tube d'un diamètre plus large à un autre d'un diamètre plus petit.

Au fond de l'entraîneur se trouve un serpentin pourvu d'orifices par lesquels la vapeur circule et est distribuée dans l'entraîneur. L'entraîneur est pourvu de trois raccords - deux pour l'admission et la sortie de la vapeur du serpentin et le troisième pour l'admission directe de la vapeur. Sur le couvercle on monte un manomètre pour surveiller la pression, de même qu'une soupape de sûreté dans le cas des entraîneurs qui travaillent sous pression.

En dehors de ces caractéristiques communes, certains éléments diffèrent en fonction du type constructif de l'équipement.

Les figures 2 et 3 présentent deux types d'entraîneurs : entraîneur pour pression normale et entraîneur sous pression.

Dans le cas de l'entraîneur qui fonctionne à la pression normale, la matière première est posée sur une grille circulaire située dans l'entraîneur à la limite de jonction de la portion cylindrique et de la portion conique ou sphérique. La grille est détachable, pour être périodiquement nettoyée.

Le couvercle est attaché au corps de l'entraîneur par des brides à vis. On peut prévoir aussi d'autres systèmes de liaison comme, par exemple, un système de fermeture hydraulique. L'étanchement du couvercle au corps de l'entraîneur se fait par un joint en amiante, klingerit ou téflon. Les joints en caoutchouc ne sont pas utilisables, n'étant pas résistantes à l'action des vapeurs des huiles essentielles, pouvant impurifier l'huile par dissolution progressive.

Dans le cas de l'entraîneur sous pression, la matière première est introduite dans un conteneur cylindrique à base

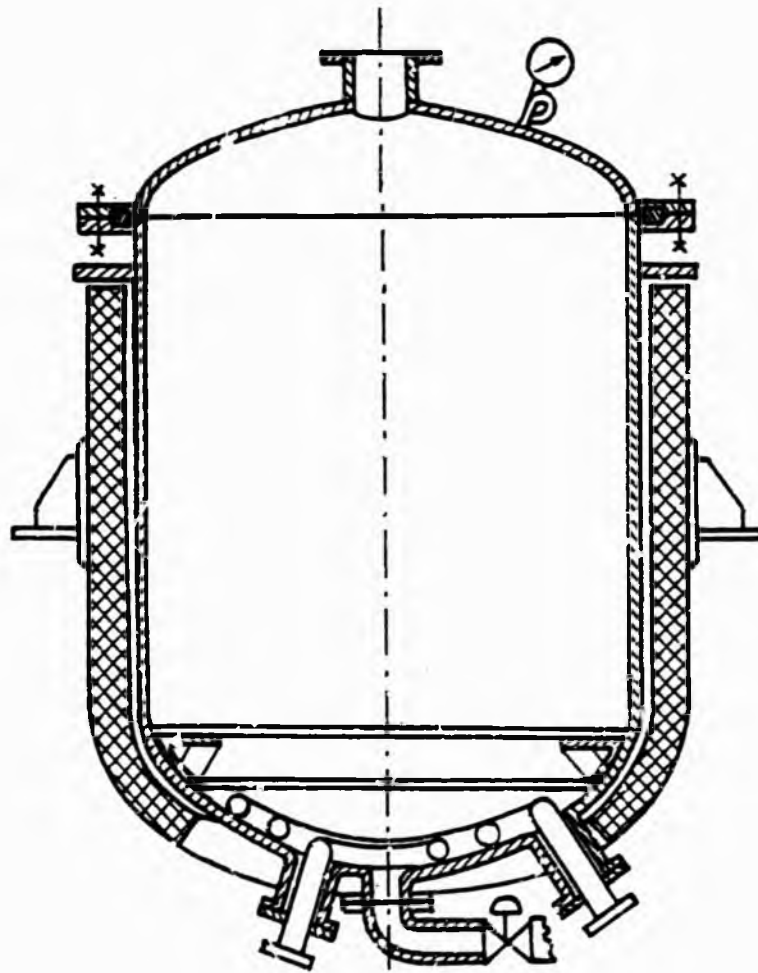


Fig. 2. Entraîneur pour pression normale

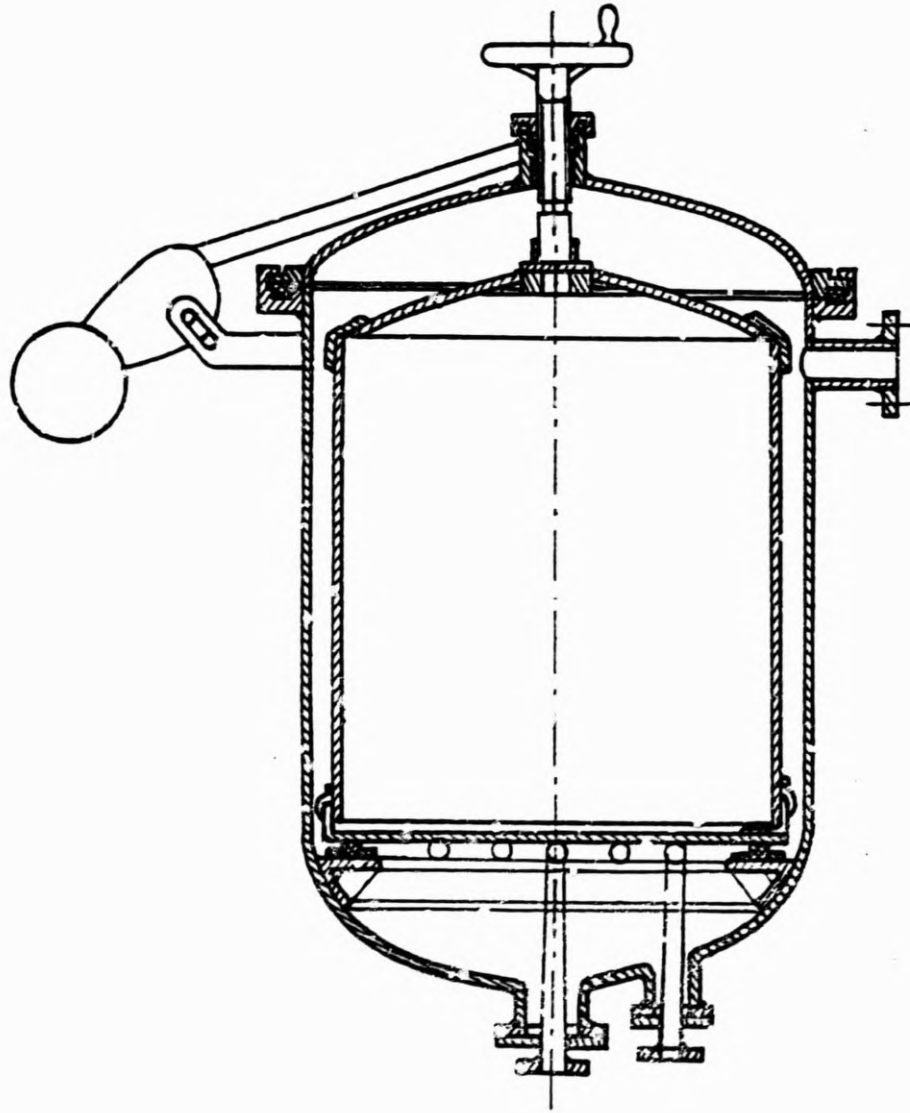


Fig. 3. Entraîneur sous pression

perforée et rabattable, qui à son tour est introduit dans l'entraîneur. Le conteneur est tenu par une couronne circulaire soudée à l'entraîneur à la limite de jonction du corps cylindrique et de la base sphérique. L'étanchement du conteneur, pour ne pas permettre à la vapeur de suivre une autre voie qu'à travers la matière première, se réalise par le joint placé sur la couronne circulaire et par un système de liaison par vissage dans le couvercle. On peut prévoir également un couvercle détachable ou rabattable avec contrepoids. L'étanchement du couvercle se réalise par des brides à vis ou par d'autres systèmes d'étanchement.

Lors du choix du matériau de construction pour l'entraîneur, on tiendra compte du fait que l'huile essentielle mélangée à de l'eau, à l'état de vapeur, est corrosive. C'est pourquoi on recommande des matériaux inoxydables (aciers alliés). Pour économiser des matériaux chers on peut recourir à un revêtement intérieur en tôle d'acier inoxydable.

Lors de la détermination des dimensions de l'entraîneur on aura en vue un rapport hauteur/diamètre de 2 à 1.

L'épaisseur de la paroi de l'entraîneur se détermine en fonction des dimensions de l'entraîneur et de la pression de régime. Pour un entraîneur ayant les dimensions $\varnothing = 1$ m et $H = 2$ m, une épaisseur de paroi de tôle en acier inox de 3 à 4 mm est suffisante, si la pression de fonctionnement est normale. L'épaisseur de la paroi sera proportionnelle à la pression de régime.

C. Condensateur ou réfrigérant

Cet appareil sert à refroidir les vapeurs et à les transformer en phase liquide.

D'habitude, on emploie deux types constructifs de condensateurs: condensateur à serpentin et condensateur de surface à faisceau de tuyaux.

Le condensateur à serpentin est un vase cylindrique à couvercle démontable, pour permettre son nettoyage des dépôts de carbonates, provenus de l'eau industrielle utilisée pour

le refroidissement.

A l'intérieur du vase se trouve un serpentin en cuivre, donc ayant un coefficient élevé de transfert thermique, qui s'accouple par une bride à la partie supérieure avec la conduite de vapeur venant de l'entraîneur. Cet accouplement est démonté après chaque charge pour enlever le couvercle de l'entraîneur. A la partie supérieure du serpentin le condensateur sort librement pour entrer dans le vase séparateur.

Le condensateur est pourvu à sa partie inférieure d'un raccord pour l'entrée de l'eau de refroidissement et à sa partie supérieure d'un raccord pour l'évacuation de l'eau de refroidissement.

Le condensateur de surface est composé d'un faisceau de tuyaux, introduit dans un vase cylindrique à couvercles démontables, pour permettre le détachement et le nettoyage des tuyaux.

L'eau de refroidissement circule entre les tuyaux, en contre-courant des vapeurs qui circulent à l'intérieur des tuyaux.

Les deux types de condensateur sont présentés en fig. 4.

La détermination des dimensions du condensateur se fait en fonction de la surface de refroidissement nécessaire pour condenser les vapeurs et amener le condensat à une température proche de la température ambiante.

La surface de refroidissement nécessaire dépend du débit et de la température des vapeurs à l'entrée du condensateur et du coefficient de transfert thermique du matériau choisi pour la construction du serpentin ou du faisceau de tuyaux.

D. Vase séparateur (vase florentin)

Le vase séparateur sert à séparer l'huile essentielle de l'eau formée par condensation en commun des vapeurs d'huiles essentielles et de la vapeur d'entraînement. La séparation est basée sur le principe de la non-miscibilité et de la différence de densité entre les deux liquides.

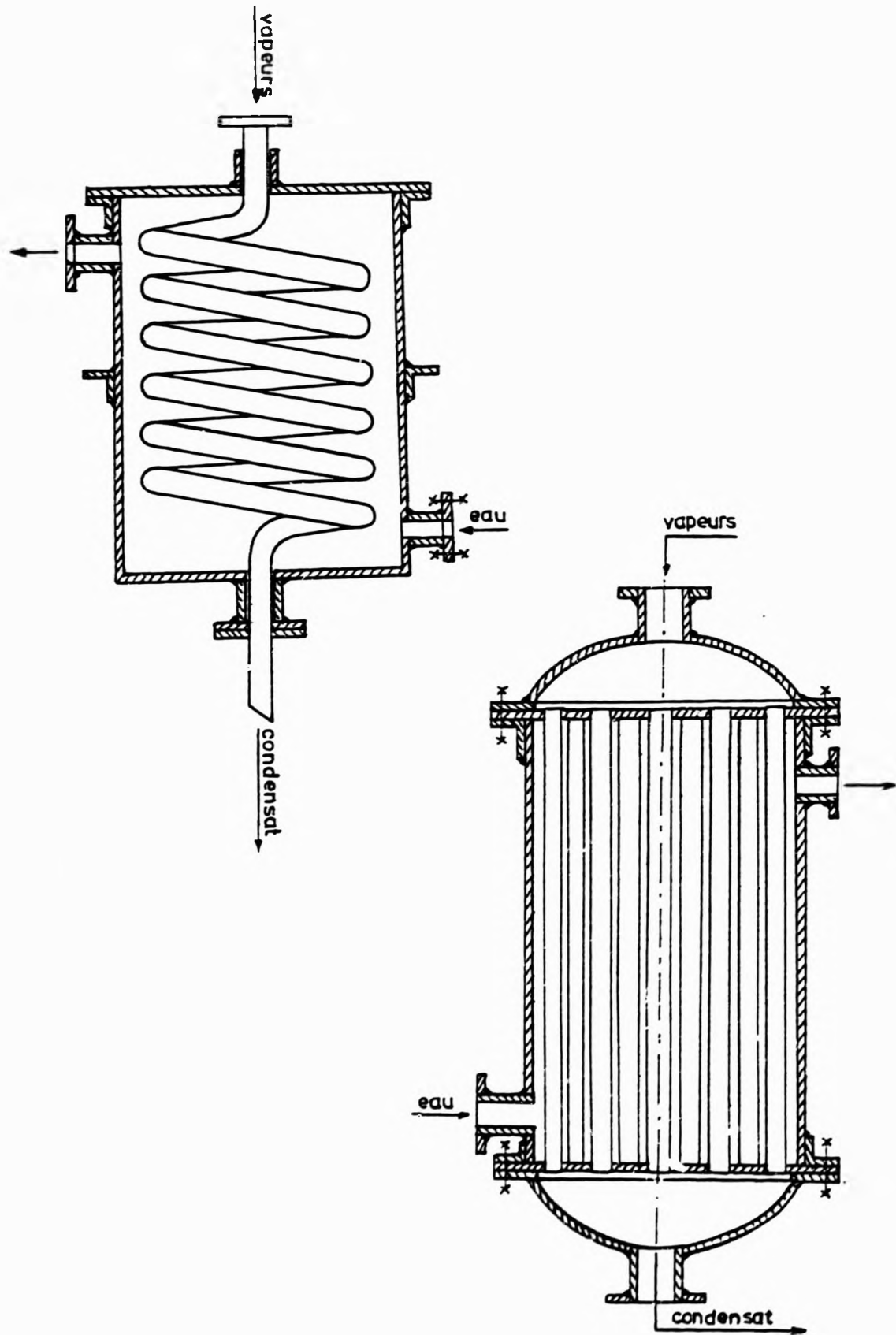


Fig. 4. Types de condensateurs

Le séparateur est un vase cylindrique terminé à sa partie supérieure par une partie conique. La base du vase est démontable, pour permettre son nettoyage périodique.

À la partie inférieure se trouve un raccord pour l'évacuation de l'eau; à la partie supérieure - un autre pour l'écoulement de l'huile, les deux étant pourvus de valves. L'introduction du condensat se fait par une conduite latérale. Le vase est maintenu, pendant le fonctionnement rempli de liquide, à l'aide d'un trop-plein extérieur. Au moment de la mise en marche, le vase est rempli d'eau, et la valve de la conduite du trop-plein est maintenue ouverte pour l'évacuation de l'eau en excès. L'huile est collectée périodiquement par l'ouverture du robinet de la partie supérieure du vase ou à la fin d'une charge. Par l'évacuation périodique on peut déterminer la fin de l'entraînement.

En fig. 5 on présente le schéma d'un vase séparateur.

Dans les cas d'huiles plus lourdes que l'eau, le montage de l'équipement se fait en position inverse.

E. Pont roulant. Système de chargement-déchargement

Cet équipement est nécessaire pour le chargement et le déchargement de l'entraîneur. L'enlèvement de l'entraîneur, dans le cas du premier type d'installation décrite ou du conteneur avec le matériau, dans le deuxième cas, tant pour le chargement que pour le déchargement, se fait à l'aide d'une grue. Le type de grue sera choisi en fonction de la charge.

Le tracé de la voie de roulement sera ainsi fait que la grue puisse servir sur toutes les chaînes d'entraînement disposées dans l'enceinte industrielle.

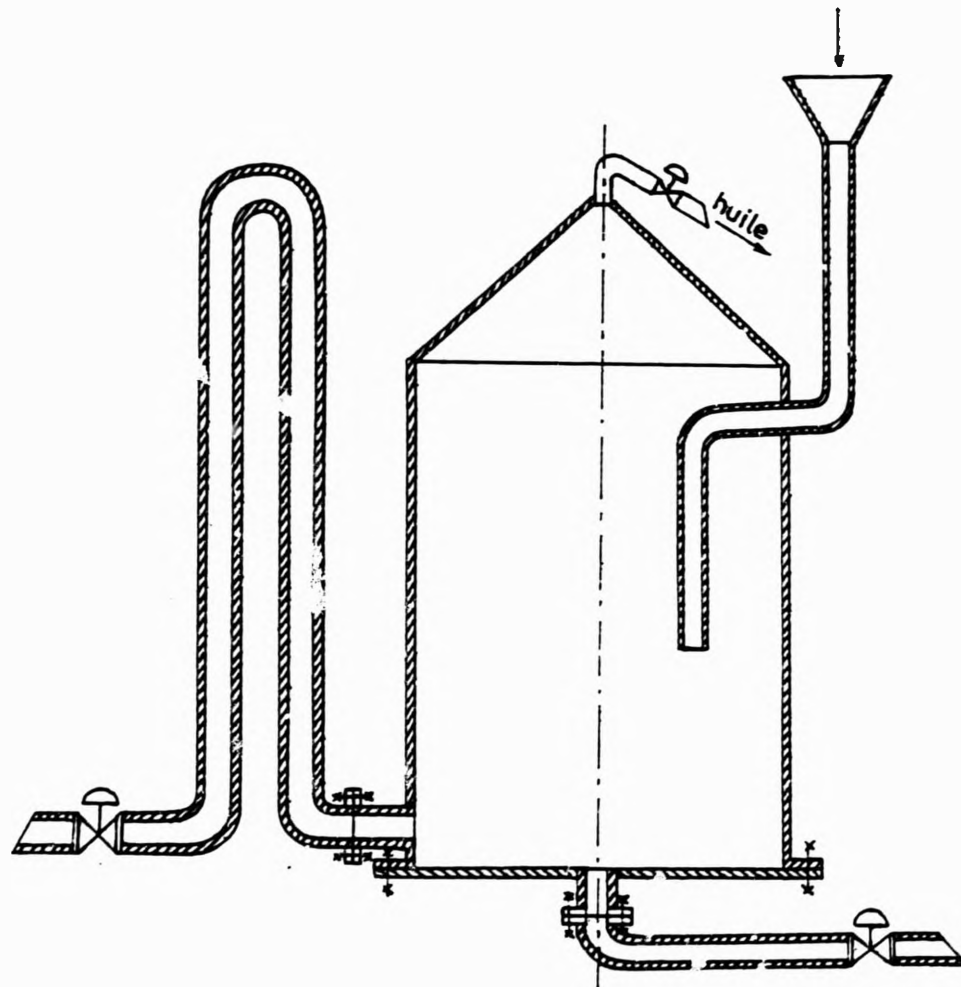


Fig. 5. Le vase séparateur

PART X

METHODOLOGIE D'ANALYSE DES PRODUITS VEGETAUX

Prof.Dr. Ioan Ciulei⁺)

⁺) Chef de la Chaire de Pharmacognosie à la Faculté
de Pharmacie de Bucarest, Roumanie

I. INTRODUCTION

De nombreux principes actifs extraits des plantes sont utilisés couramment dans la médecine moderne. Des constituants tels que: la digitoxine, la papavérine, la réserpine, l'ergotamine, l'ergocristine, l'ergométrine, la cocaïne, la d-tubocurarine, l'ésérine, la pilocarpine, la caféine, la spartéine, la vincamine, la vincalécoblastine, la leurocristine, pour ne mentionner que quelques uns, ont une importante activité pharmacologique.

A la base de plus de 30% de tous les médicaments se trouvent des principes actifs ou des extraits de plantes.

A l'heure actuelle des recherches complexes sont effectuées pour obtenir des substances naturelles, d'origine végétale ou animale, nécessaires à la création du "médicament naturel" envisagé comme le médicament de l'avenir.

A cette fin on accorde un intérêt, qui va croissant, aux recherches de phytochimie, puisque les principes actifs en plus de la possibilité d'obtenir de nouveaux médicaments, présentent aussi l'avantage d'être plus accessibles au biochimisme de l'homme, fait qui réduit les effets secondaires en comparaison du médicament de synthèse.

Je crois que la médecine traditionnelle nous offre encore de nombreuses sources d'inspiration pour des études ayant comme but l'obtention de nouvelles substances pharmacologiquement actives.

Vu la complexité des recherches de la composition chimique d'une espèce non-étudiée, j'ai considéré qu'une méthodologie unitaire pour l'étude des plantes médicinales serait utile aux chercheurs scientifiques dans ce domaine.

La majorité des méthodes de travail choisies font usage de techniques simples et rapides, qui peuvent être effectuées dans un laboratoire de phytochimie pourvu d'appareils usuels.

Bien que la méthodologie proposée pour l'étude des constituants chimiques des plantes ne puisse être complète dans tous les cas, son utilisation sert à obtenir une orientation générale

sur les plus importants groupes de substances qui sont normalement responsables de l'activité biologique.

Terminologie

En général, la dénomination de "plante médicinale" est réservée aux espèces de plantes qui contiennent des composés chimiques à l'action pharmacodynamique certaine (des principes actifs), utilisées dans un but thérapeutique.

Par l'expression de produit végétal ou drogue on entend la matière première végétale utilisée à la préparation de médicaments.

Le produit végétal peut comprendre des: organes souterrains, écorces, feuilles, fleurs, fruits, graines ou la partie aérienne fleurie de quelques plantes herbacées contenant des principes actifs. Les huiles volatiles, les matières grasses, les résines, les baumes, les gommes obtenues de certaines espèces par des méthodes spéciales, comme l'entraînement à la vapeur d'eau, la pression, l'incision, etc, sont considérés pareillement des produits végétaux.

Pour être sûr qu'une matière première végétale est adéquate, il faut d'abord l'analyser. Dans ce but nous présentons une méthodologie simple et adéquate pour établir la qualité des substances végétales et pour étudier de nouvelles plantes de la flore spontanée.

Cette méthodologie contient une totalité de méthodes d'analyses qualitatives et quantitatives pour: identifier, déterminer la pureté et établir la qualité de la matière première végétale.

Les méthodes utilisées à l'étude des substances végétales sont classifiées ainsi:

1. Méthodes qualitatives
 - (a) Examen macroscopique
 - (b) Examen microscopique
- } Pour identifier le produit végétal

- | | | |
|---|---|--|
| (c) Examen histochimique et | } | Pour identifier les principaux groupes de principes actifs |
| (d) Examen chimique qualitatif des constituants extraits à l'aide de solvants ou par microsublimation | | |
| 2. <u>Méthodes quantitatives</u> | } | Pour établir la pureté et la qualité du produit végétal |
| Détermination des impuretés | | |
| Détermination de la teneur en eau | | |
| Détermination des cendres | | |
| Détermination des principes actifs | | |

Les méthodes d'analyse mentionnées sont utilisées différemment suivant le produit végétal qui peut être connu (par exemple: Belladonnae folium, Aloe, etc) ou inconnu (pas encore étudié, c'est-à-dire un produit nouveau).

S'il s'agit d'analyser un produit végétal connu, on effectue seulement les déterminations nécessaires pour vérifier l'identité, établir la pureté et les quantités des principes actifs.

Dans le cas où il faut étudier un produit inconnu (qui provient d'une plante utilisée en médecine populaire ou sélectionnée conformément aux études de chemotaxonomie), ou incomplètement étudié, il est nécessaire d'appliquer intégralement la méthodologie décrite.

II. L'ETUDE PRELIMINAIRE DES PRODUITS VEGETAUX

Cette étude se fait à l'aide des examens: macroscopique, microscopique et histochimique.

A. L'examen macroscopique

Cet examen permet d'établir les caractères morphologiques de l'organe végétal en vue de son identification. Cet examen est effectué à l'oeil nu ou à la loupe, en tenant compte de la nature de l'organe végétal et de la forme sous laquelle il se présente (entier, en fragments ou en poudre).

Par l'examen macroscopique on établit l'aspect, les dimen-

sions, la couleur, l'odeur et la saveur du produit analysé.

Pour effectuer cet examen, les indications du Tableau 1 (en annexe) sont à suivre.

B. L'examen microscopique

Par cet examen on poursuit la détermination exacte des tissus et des éléments anatomiques caractéristiques sur les sections transversales, longitudinales, les préparations éclaircies à partir des poudres ou des fragments de produit (conciissum).

Les caractères anatomiques des différents organes d'une plante servent, dans certains cas, à établir la position taxonomique des espèces d'origine.

Les préparations microscopiques s'obtiennent par des méthodes classiques suivant la nature, l'état, la consistance et même la composition chimique du produit végétal.

1. Obtention des préparations microscopiques

(a) Sections (transversales, longitudinales, radiales et tangentielles): la drogue, en fragments adéquats, est amenée à la turgescence du produit frais par ébullition dans l'eau, puis elle est sectionnée avec un rasoir ou un microtome; suit l'opération d'éclaircissement et de coloration aux vert d'iode et carmin aluné (double coloration) ou avec d'autres colorants.

Mode opératoire:

Les drogues sèches sont mouillées suivant leur dureté, en les trempant dans de l'eau bouillante (feuilles, fleurs), ou en les faisant bouillir plus longtemps (racines, écorces, tiges, etc). Si la drogue végétale contient des mucilages, après avoir été mouillée, elle est maintenue dans de l'alcool, pour acquérir la rigidité nécessaire au sectionnement.

Le sectionnement s'exécute avec un rasoir et les sections sont réunies dans un cristalliseur à l'eau. Si le sectionnement est effectué au microtome, les sections (ou coupes) sont incluses d'habitude préalablement dans de la paraffine.

L'éclaircissement des sections obtenues se fait couramment avec de l'eau de Javel (R) ⁺) (20 minutes au minimum),

⁺) R = réactif

ou avec une solution d'hydrate de chloral à 70%. Les sections ainsi éclaircies sont colorées après avoir été lavées à l'eau.

La coloration des sections peut être effectuée par plusieurs méthodes, à savoir:

. la double coloration au vert d'iode et au carmin aluné; les sections lavées sont immergées pendant une minute environ dans une solution de vert d'iode (R), ensuite elles sont lavées à plusieurs reprises avec de l'eau, puis maintenues pendant 5 à 10 minutes dans une solution de carmin aluné (R) et, enfin, elles sont de nouveau lavées à l'eau. Sur les sections ainsi colorées, les parois lignifiées des cellules apparaissent colorées en bleu ou bleu-vert, et celles cellulosesiques en rouge;

. la coloration au fluoroglucinol: sur les sections éclaircies dans une solution d'hydrate de chloral, on laisse tomber quelques gouttes d'une solution alcoolique à 1% de fluoroglucinol dans un milieu d'acide chlorhydrique (R). Les éléments lignifiés se colorent en rouge.

Les sections ainsi préparées sont examinées au microscope dans une goutte d'eau.

On peut fixer les sections colorées dans de la glycérine neutre; toutefois, pour une conservation plus prolongée on emploie de la gélatine (R) ou du baume de Canada.

(b) Poudres : on obtient une préparation microscopique à partir de la poudre de drogue, en éclaircissant une quantité de poudre sur une lamelle de microscope avec une solution d'hydrate de chloral (R) à 70%, à chaud, puis on continue par la coloration des tissus lignifiés avec 1-2 gouttes de fluoroglucinol (R), ou en traitant directement la poudre avec le réactif Steimetz (R).

(c) Préparations "conciissum" éclaircies: les produits végétaux sont chauffés à l'ébullition dans un tube à essais avec une solution d'hydroxyde de sodium à 5-8% pour les éclaircir, après quoi les fragments sont lavés à l'eau, placés sur une lamelle de verre et étudiés au microscope. Cette méthode est utilisée dans le cas des organes végétaux minces (feuilles, fleurs, herbes) ou de certains tissus (suber, épicarpe, téguments séminaux).

L'examen microscopique confirme d'abord l'organe (identifié par l'examen macroscopique) d'où provient le produit végétal, par l'ensemble des éléments anatomiques qui le composent. Ensuite, on établit les éléments anatomiques particuliers qui servent à le caractériser.

Pour faire l'examen microscopique on utilise les indications présentées dans le Tableau 2 (voir en annexe), pour chaque organe séparément.

C. L'examen histochimique

Cet examen tend à identifier les différents principes actifs dans les tissus végétaux à l'aide de certaines réactions spécifiques.

L'examen est effectué sur des sections transversales, plus rarement sur des poudres préparées dans certaines conditions.

Mode opératoire:

On fait bouillir dans une capsule les fragments de drogue avec une solution saturée de chlorure de sodium ou de sulfate disodique jusqu'à la consistance nécessaire pour le sectionnement. Les coupes obtenues sont placées sur une lamelle de microscope ou dans un cristalliseur et on ajoute le réactif nécessaire jusqu'à ce qu'elles en soient recouvertes. Après quelques minutes on lave les sections avec un solvant approprié et on les examine au microscope pour déterminer les tissus et les cellules dans lesquelles les substances actives ont été localisées à l'aide du réactif adéquat.

On représente le schéma de la section et le dessin des cellules dans lesquelles a eu lieu la réaction de localisation.

Quand il s'agit de poudres, celles-ci peuvent être traitées avec quelques gouttes de réactif sur une lamelle de verre; ensuite, elles sont lavées comme les coupes.

Les réactifs utilisés à l'examen histochimique sont très divers; ils peuvent servir à identifier une seule substance ou

un grand nombre de substances, par exemple le réactif Steimetz (R).

Quelques groupes de composés chimiques qui peuvent être identifiés ainsi sont présentés par la suite (Tableau 3).

Tableau 3

Réactifs de couleur utilisés pour identifier quelques groupes de composés chimiques des drogues

Groupes de composés	Réactif utilisé	Couleur
Huiles volatiles, matières grasses, latex, résines	Sol. de Sudan III (R) Tinctura Alkannae (R) Réactif Steimetz (R)	rouge
Tanins	Sol. FeCl ₃ 1% ou Réactif Steimetz	bleu ou vert
Hydroxy-méthyl-anthraquinones	Sol. 5% de NH ₄ OH ou de NaOH, KOH (R) ⁴	rouge
Flavones	Sol. 5% d'hydroxyde de sodium	jaune
Mucilages	Hématoxyline (R) ou bleu de toluidine	rouge-violet
Lignine (vaisseaux, fibres, etc)	Réactif Steimetz (R)	jaune

III. EXAMEN CHIMIQUE QUALITATIF DES COMPOSES EXTRAITS AUX SOLVANTS

Pour établir la composition chimique générale d'une drogue qui n'a pas encore été étudiée on se sert d'une analyse chimique qualitative, en utilisant l'extraction avec divers solvants.

Dans le processus analytique établi par nous, la séparation des principaux groupes de composés naturels (principes actifs) s'effectue par l'épuisement successif et sélectif de la drogue avec des solvants à polarités différentes.

La drogue végétale (sélectionnée et pulvérisée) est épuisée en premier lieu avec un solvant lipophile (apolaire):

éther éthylique, éther de pétrole, benzène, chloroforme, etc. Ensuite la substance végétale est épuisée à l'éthanol, méthanol (solvants à polarité moyenne) et finalement à l'eau (solvant puissamment polaire). On obtient les extraits suivants:

- (A) Extrait éthérique;
- (B) Extrait alcoolique et
- (C) Extrait aqueux.

Dans l'extrait éthérique se trouvent les composés chimiques lipophiles, et dans les deux autres extraits, les composés chimiques hydrophiles.

Pour identifier les composés chimiques extraits, les trois extraits sont analysés séparément d'après une méthodologie conforme aux caractères physico-chimiques de chaque groupe de principes actifs.

A. Extrait éthérique

Cet extrait contient les composés chimiques liposolubles:

- . huiles volatiles
- . matières grasses, acides gras
- . stéroïdes, triterpènes
- . caroténoïdes
- . alcaloïdes (bases)
- . aglycones flavoniques
- . aglycones des anthracénosides (émoclines = émodols)
- . coumarine, et
- . chlorophylle.

Mode opératoire (voir Tableau 4, en annexe)

On épuise de 10 à 25 g de drogue séchée et pulvérisée avec de l'éther éthylique dans un appareil d'extraction en continu (type Soxhlet), ou par agitation mécanique ou à la main, à plusieurs reprises, dans un récipient approprié, jusqu'à ce qu'en évaporant le solvant il ne reste plus de résidu.

Les extraits éthériques réunis et filtrés seront concentrés jusqu'à 50 ml, dans un appareil de distillation.

Les composés lipophiles sont identifiés comme suit:

1. Identification des huiles volatiles et des matières grasses

(a) Identification des huiles volatiles

On introduit dans un récipient approprié 20 ml d'extrait étherique et on évapore à siccité. Si le résidu obtenu a une odeur agréable, aromatique, on épuise l'huile volatile avec de petites quantités d'alcool, par éluions successives; puis on concentre l'extrait alcoolique dans un appareil à distiller. Si le résidu obtenu a une odeur aromatique, la drogue analysée peut contenir de l'huile volatile.

(b) Confirmation de la présence de l'huile volatile

On soumet de 10 à 50 g de drogue, séchée et divisée, à l'entraînement à la vapeur d'eau ou à la distillation à l'eau dans un appareil approprié pour l'extraction de l'huile volatile; celle-ci est caractérisée par l'aspect, la couleur, l'odeur et certaines propriétés physico-chimiques.

S'il s'agit de l'étude des drogues à huiles volatiles, l'extraction de celles-ci est indiquée d'être effectuée aussi à partir du matériau végétal frais, pour établir les meilleurs rendements et les plus économiques.

Pour déterminer qualitativement et quantitativement les constituants de ces huiles on emploie fréquemment la chromatographie en couche mince (CCM), mais surtout la chromatographie en phase gazeuse.

Dans l'extrait alcoolique, en plus de l'huile volatile, se trouvent aussi des alcaloïdes bases et différents aglycones libres.

Pour identifier ces composés on utilise les méthodes prévues dans le cours du processus analytique de l'extrait étherique, présentées par la suite.

(c) Matières grasses

Elles se trouvent dans le résidu de l'extrait étherique après l'extraction de l'huile volatile avec de l'éthanol.

L'identification des constituants des matières grasses se fait comme suit: on traite le résidu par 10 ml d'une solution

alcoolique 0,5 N d'hydroxyde de potassium et on chauffe jusqu'à l'ébullition au bain-marie, au réfrigérant à reflux, jusqu'à ce qu'on n'observe plus de gouttes d'huile à la surface (1 à 2 heures); on distille l'alcool et on dissout le résidu dans 15 à 20 ml d'eau distillée bouillante, qu'on transfère quantitativement dans une ampoule à décantation; on rince le ballon plusieurs fois avec des petites quantités d'eau distillée bouillante, en les transvasant dans le même ballon à décantation; après, refroidissement, on lave deux fois à l'éther, on ajoute les solutions éthériques dans le ballon à décantation à la solution aqueuse refroidie et on agite pour extraire les constituants insaponifiables.

On répète l'extraction par deux fractions successives de 8 ml d'éther chacune. Les solutés éthériques réunis sont déshydratés avec du sulfate de sodium anhydre (R).

Dans l'extrait éthérique déshydraté (b_1) on peut identifier des stérols, des triterpènes et des caroténoïdes.

La solution aqueuse alcaline est gardée dans le ballon à décantation (b_2).

2. Identification des stérols et des triterpènes

On évapore 10 ml de soluté éthérique (b_1) dans une capsule de porcelaine au bain-marie, on ajoute au résidu 0,5 ml d'anhydride sulfurique et 0,5 ml de chloroforme; on transfère la solution obtenue dans un tube à essais sec; à l'aide d'une pipette on fait couler au fond du tube 1 à 2 ml d'acide sulfurique concentré.

Au niveau de séparation des deux solutions apparaît un anneau rouge-brun ou violet, et la couche surnageante développe une coloration vert-bleu ou violette après 5 à 10 minutes, si le soluté contient des stérols ou des triterpènes (réaction Liebermann-Burchard).

Si la solution obtenue en dissolvant le résidu (dans l'anhydride acétique et le chloroforme) est verte, on la divise en deux tubes d'essais; on utilise un des tubes pour exécuter la réaction et on garde l'autre comme témoin de couleur.

3. Identification des caroténoïdes

On évapore 10 ml d'extrait éthérique (b_1) dans une capsule de porcelaine au bain-marie et on traite le résidu par 2-3 gouttes de réactif Carr-Price (R). Si le soluté contient des pigments caroténoïdiques il se développe une coloration bleue qui vire au rouge. Avec l'acide sulfurique concentré les caroténoïdes développent une couleur bleu intense ou vert-bleu.

Pour identifier les caroténoïdes on peut aussi faire emploi de la chromatographie en couche mince (CCM).

4. Identification des acides gras

On traite la solution aqueuse alcaline (b_2) dans une ampoule à décantation, avec de l'acide chlorhydrique (pH : 3-4). La solution aqueuse acide devient opalescente à cause des acides gras; on extrait ceux-ci en agitant plusieurs fois de suite avec des petites quantités d'éther éthylique.

Les extraits éthériques sont déshydratés avec du sulfate de sodium anhydre.

Des acides gras sont présents si en évaporant l'extrait éthérique on obtient un résidu onctueux.

Pour identifier ces acides gras on peut utiliser la chromatographie sur papier ou la chromatographie en couche mince.

L'extrait éthérique initial (A) qui est resté (30 ml) est utilisé à identifier: les alcaloïdes (bases), les aglycones libres, les stérols, les triterpènes et les pigments caroténoïdiques de la drogue analysée.

5. Identification des alcaloïdes bases

On évapore 10 ml d'extrait éthérique dans une capsule en porcelaine au bain-marie, on fait dissoudre le résidu dans 1,5 ml d'acide chlorhydrique à 2%, en agitant avec une petite baguette en verre, au bain-marie chaud. La solution décantée ou filtrée se divise en volumes égaux dans 3 tubes d'essais.

On ajoute dans le premier tube 2-3 gouttes de réactif Mayer (R). Dans le deuxième tube on ajoute 2-3 gouttes de réactif Bertrand (R). Le dernier tube sert de témoin.

Si les échantillons traités par les réactifs forment des

précipités évidents (blanc-jaunâtre), probablement que des alcaloïdes y sont présents.

7. Identification des aglycones flavoniques

On évapore 3 ml de l'extrait étherique dans une capsule en porcelaine au bain-marie, on fait dissoudre le résidu dans 1-2 ml de méthanol à 50%, au bain-marie chaud, on transfère la solution dans un tube et on ajoute 2-3 fragments de limaille de magnésium métallique et 4-5 gouttes d'acide chlorhydrique concentré.

Le développement d'une coloration rouge-orange ou violâtre indique la présence des aglycones flavoniques (réaction Shibata ou Cyanidin-test).

On pratique pour l'identification la chromatographie en couche mince (CCM).

8. Identification des émодols (les aglycones des anthracénosides)

On transfère 3 ml de l'extrait étherique dans un tube d'essais, on ajoute 1 ml de solution d'ammoniacale à 25% ou 1 ml de solution d'hydroxide de sodium à 10 % et on agite. Si une coloration rouge se développe, des dérivés de l'anthraquinone (émодols) libres ou sous forme oxydée (réaction Bornträger) y sont présents.

On procédera pour l'identification à la chromatographie en couche mince (CCM).

9. Identification des coumarines

On évapore 3 ml d'extrait étherique dans une capsule en porcelaine, au bain-marie, on fait dissoudre le résidu dans 2 ml d'eau distillée bouillante; après refroidissement on divise la solution dans deux tubes; on ajoute 5 ml de solution d'ammoniacale à 10% dans un des tubes, l'autre servant de témoin à l'examen à la lumière ultraviolette.

La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence (bleue, verdâtre ou violette) de la solution alcalinisée, plus intense sous lumière ultraviolette.

La vérification se fait par la réaction Feigl (voir l'iden-

tification des coumarines dans l'extrait alcoolique).

L'identification des stérols, des triterpènes et des caroténoïdes de la drogue se réalise par les réactions décrites plus haut.

Pour éliminer les pigments chlorophylliens de l'extrait éthérique on fait passer celui-ci par une colonne d'adsorbant (silicagel, oxyde d'aluminium, etc).

Dans le Tableau 4 (en annexe) est présenté schématiquement le cours de la séparation et de l'identification des principaux groupes de composés lipophiles.

B. Extrait alcoolique

En épuisant les drogues dégraissées avec de l'éthanol et du méthanol on extrait des groupes importants de composés naturels:

- . polyphénols (tanins, etc)
- . composés réducteurs
- . alcaloïdes (sels)
- . glucosides polyphénoliques (anthracénosides, coumarines, flavonoïdes)
- . glucosides triterpéniques
- . anthocyanosides
- . léucoanthocyanes.

On obtient aussi de très bons résultats par l'épuisement avec de l'alcool dilué (70 - 80 %).

Mode opératoire (voir Tableau 5, en annexe)

On transfère la drogue après l'épuisement à l'éther dans un ballon Erlenmayer de volume moyen ou dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant, on ajoute de 120 à 150 ml de méthanol ou d'éthanol, on introduit dans le col du ballon Erlenmayer un entonnoir (ou le réfrigérant ascendant pour le ballon) et on épuise au bain-marie chaud pendant 30 à 60 minutes; on répète l'épuisement si nécessaire.

On filtre le soluté alcoolique à travers du papier à filtrer, dans un récipient adéquat; on lave la drogue avec des

petites quantités d'alcool chaud et on filtre à travers le même filtre.

On concentre le soluté alcoolique obtenu (B) dans un appareil à distiller jusqu'à 50 ml. Les principes actifs extraits de la drogue sont identifiés à l'aide des réactions spécifiques dans le soluté alcoolique obtenu comme tel, ou hydrolysé au préalable.

1. Réactions effectuées dans le soluté alcoolique

(a) Identification des tanins ou des polyphénols

On prélève 1 ml du soluté alcoolique et on l'introduit dans un tube d'essais, on dilue avec 2 ml d'eau distillée et on ajoute 2-3 gouttes de solution de chlorure ferrique à 1% (R) diluée à 1:10.

Le développement d'une coloration bleu-noirâtre indique la présence des tanins galliques, et une coloration vert foncé celle des tanins catéchiques.

En cas d'un mélange de tanins galliques et catéchiques on les sépare à l'aide du réactif Styassny (R) (voir le soluté aqueux - C).

(b) Identification des composés réducteurs

On introduit 1 ml de soluté alcoolique dans un tube d'essai, on dilue avec 2 ml d'eau distillée, on ajoute 1 ml de solution Fehling I et II et on chauffe jusqu'à l'ébullition pendant 30 minutes.

La formation d'un précipité rouge-brique (qui se dépose au fond du tube) dénote la présence des composés réducteurs.

(c) Identification des alcaloïdes (sels)

On évapore 20 ml de soluté alcoolique dans une capsule au bain-marie (ou bain de sable), on fait dissoudre le résidu dans 10 ml d'acide chlorhydrique à 10%, en mélangeant avec une baguette de verre, au bain-marie à chaud.

On transfère la solution acide décantée ou filtrée dans une petite ampoule à décantation et on ajoute de l'ammoniaque concentré (pH: 8-9).

La solution alcaline est épuisée avec de l'éther ou du

chloroforme (3 x 8 ml).

On lave le soluté étherique ou chloroformique avec de l'eau distillée (dans l'ampoule à décantation), on le sépare et on l'évapore dans une capsule au bain-marie.

On dissout le résidu dans 1,5 ml d'acide chlorhydrique à 10%. On décante la solution acide et on la divise dans 3 tubes à essais en volumes égaux. On ajoute au premier échantillon 2-3 gouttes de réactif Mayer (R). Au deuxième échantillon on ajoute 2-3 gouttes de réactif Bertrand. Le troisième tube sert de témoin.

La formation des précipités (blanc-jaunâtres) dans les solutions traitées avec les réactifs dénote la présence des alcaloïdes dans la drogue analysée.

On fait l'identification par chromatographie en couche mince (CCM).

(d) Identification des alcaloïdes, des bases quaternaires et des amines oxydées

On épuise 20 g de drogue dégraissée avec de l'éthanol ou de l'alcool à 80% en suivant le mode opératoire décrit à l'obtention du soluté alcoolique (B).

Si l'épuisement s'effectue avec de l'alcool à 80%, les solutés hydro-alcooliques obtenus se concentrent jusqu'à la consistance du sirop. On ajoute 8 ml d'acide chlorhydrique à 10%, en mélangeant avec une baguette de verre, à chaud; on ajoute au mélange refroidi du chlorure de sodium (0,5 g) et on mélange le tout, puis on filtre la solution à travers un filtre en papier; on lave après le filtre avec 2-3 ml d'acide chlorhydrique à 10%.

On prélève des prises d'essais de 1 ml de soluté acide aqueux et on effectue les réactions avec les réactifs Mayer et Bertrand.

La formation d'un précipité abondant dénote la présence de: (1) alcaloïdes et (2) sels quaternaires ou amines oxydées.

Pour confirmer la présence des alcaloïdes on transvase le reste du soluté acide aqueux dans une petite ampoule à décantation. On ajoute de l'ammoniaque concentré (pH = 8-9),

puis on agite, avec des petites quantités d'éther ou de chloroforme.

On sépare ensuite les deux solutions:

(a₁) soluté étherique ou chloroformique;

(a₂) solution aqueuse alcaline.

L'identification des alcaloïdes dans le soluté étherique ou chloroformique se fait comme indiquée antérieurement.

Pour effectuer l'identification des bases quaternaires et des amines oxydées, on acidule (pH = 3) la solution alcaline (a₂) avec de l'acide chlorhydrique à 10% et ensuite on filtre à travers du papier filtre.

On prélève des essais de 1-2 ml et on effectue les réactions avec les réactifs Mayer et Bertrand.

La formation des précipités dénote la présence des bases quaternaires et des amines oxydées.

Les bases quaternaires sont identifiées par chromatographie en couche mince : adsorbant - Silicagel G Merck; développant - n-propanol-ammoniaque-eau (4:2:1 v/v); réactif - Dragendorff (R).

2. Réactions effectuées sur l'extrait alcoolique hydrolysé

On introduit 25 ml d'extrait alcoolique (3) dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant et on ajoute 15 ml d'acide chlorhydrique à 10%, puis on chauffe à l'ébullition à reflux pendant 30 minutes.

On distille l'alcool dans un récipient approprié, on transfère la solution acide aqueuse, qui devient souvent opalescente, dans une ampoule à décantation et on agite à plusieurs reprises avec de l'éther (3 x 15 ml).

De la séparation il résulte: (a) un extrait étherique, qu'on déshydrate avec du sulfate de sodium anhydre; (b) une solution acide aqueuse.

(a) L'extrait étherique (40 ml)

Dans cet extrait on peut identifier les groupes suivants de principes actifs: anthracénosides, coumarines, glycosides stéroliques et triterpéniques, par des réactions caractéristiques aux aglycones obtenues par hydrolyse.

L'identification des anthracénosides se fait comme il est décrit dans la méthode indiquée pour l'identification des émouls dans l'extrait éthérique (A).

L'identification des coumarines se fait comme il est indiqué dans la méthode décrite pour le cas de l'extrait éthérique(A).

Par la réaction Feigl-Frehden-Anger on peut mettre en évidence la lactone hexatomique de la structure des coumarines, comme il suit: on transfère les solutés aqueux, étudiés à la lumière ultraviolette, dans une capsule, on ajoute 3-4 gouttes d'une solution 0,5 N de chlorhydrate d'hydroxylamine et de l'hydroxyde de potassium à 10% (pH = 8-9), on concentre au bain de sable, on ajoute au résidu de l'acide chlorhydrique à 10% p.a. (pH = 3-4) et 1-2 gouttes de solution de chlorure ferrique à 3% (R).

La présence des dérivés lactoniques produit le développement d'une coloration violette passagère.

Identification des glucosides stéroliques (cardiotoniques, saponines)

Identification des hétérosides cardiotoniques

Pour identifier le noyau du stérol on utilise la réaction Liebermann-Burchard, décrite pour l'extrait éthérique (A).

Pour identifier la lactone pentatomique non-saturée caractéristique aux glucosides cardénolidiques on effectue la réaction Keddee:

On évapore 10 ml de l'extrait éthérique dans une capsule au bain-marie, on dissout le résidu dans 1-2 ml de méthanol, on ajoute 1-2 ml de solution alcoolique 1 N d'hydroxyde de potassium et 3-4 gouttes de solution à 1% d'acide 3,5-dinitrobenzoïque (R). En chauffant, on obtient une coloration violette passagère.

Dans le même but on peut utiliser le réactif Balyet (2,4,5-trinitrophénol en milieu alcalin), le réactif Legal (nitroprussiate de sodium en milieu alcalin), le réactif Raymond (m-dinitrobenzène en milieu alcalin), qui réalisent des réactions de couleur.

Pour la part glucidique on peut utiliser la réaction Keller-Kiliani (chlorure ferrique - acide acétique - acide sulfurique), la réaction Pesez (Xanthidrol), qui sont caractéristiques pour les 2-désoxyoses. L'identification se fait par chromatographie en couche mince (CCM).

L'identification des saponines stéroliques et triterpéniques: Pour le noyau de stérol (triterpène) on effectue la réaction Liebermann-Burchard. Ensuite, on peut continuer avec le test de Salkowski (à l'acide sulfurique) pour les stérols non-saturés. Au niveau de séparation des deux liquides se développe une coloration rouge-violâtre qui dénote la présence des stérols non-saturés.

Les saponines sont identifiées par l'indice de mousse et le test d'hémolyse, en utilisant la solution aqueuse du résidu obtenu du soluté extractif alcoolique non hydrolysé (voir, par la suite, le soluté extractif aqueux).

L'identification des flavonosides s'effectue d'après la méthode décrite pour l'extrait étherique (A).

On peut également identifier les flavonosides à partir de l'extrait alcoolique non hydrolysé: on évapore 3 ml de soluté dans une capsule (au bain-marie). Si le résidu est vert, on triture à plusieurs reprises avec de l'éther de pétrole (3 x 12 ml), pour extraire la chlorophylle et les résines.

On fait dissoudre le résidu ainsi purifié dans de l'alcool (20 ml à 70%) et on effectue la réaction Shibata ou le Cyanidin-test.

La coloration rouge est caractéristique pour les flavonols, l'orange pour les flavones et la couleur violette pour les flavonones.

L'identification des léucoanthocyanes: A une prise d'essai de 5 ml de soluté extractif alcoolique à 30% on ajoute 0,5 ml d'acide chlorhydrique concentré et on chauffe pendant 5 minutes. Une coloration rouge-violâtre indique la présence des léucoanthocyanes.

(b) Solution aqueuse acide

Identification des anthocyanosides (pigments anthocyaniques): Les anthocyanosides sont présents si la solution acide présente une coloration rouge, qui au pH = 7 vire au violet et en milieu alcalin au bleu ou vert.

Le cours de la séparation et de l'identification des principaux groupes de composés naturels de la solution extractive alcoolique est présenté schématiquement dans le Tableau 5 (en annexe).

C. L'extrait aqueux

Par épuisement des substances végétales à l'eau on obtient les composés hydrosolubles suivants:

- . glucides (oses, polyoses, polyuronides),
- . glucosides (hétérosides),
- . alcaloïdes (sels).

Généralement, quand l'épuisement par l'éthanol ou le méthanol de la drogue a été total, on ne peut plus identifier les mêmes composés chimiques dans l'extrait aqueux.

L'épuisement par l'eau est adéquat pour les substances végétales vertes, la chlorophylle n'étant pas extraite.

Mode opératoire (voir Tableau 6, en annexe):

La drogue restée après l'épuisement par l'alcool, séchée, est épuisée par l'eau distillée à chaud (pendant 20 à 30 minutes). L'extrait aqueux filtré est concentré jusqu'à 50 ml.

Les principes actifs extraits sont identifiés à l'aide de réactions spécifiques, en utilisant l'extrait aqueux initial et le soluté hydrolysé.

1. Réactions effectuées dans l'extrait aqueux

Identification des polyuronides (mucilages, pectines et gommes)

On fait couler en filet mince 2 ml de l'extrait aqueux dans un tube à essais contenant 10 ml d'alcool ou d'acétone. Si la solution précipite abondamment, on sépare le précipité par filtration ou centrifugation, on lave à l'alcool ou à l'acétone et on colore avec un réactif spécifique (hématoxylène, bleu de toluidine, etc).

Les mucilages, très répandus d'ailleurs, sont présents si une coloration bleue ou violette se produit.

Pour les autres polyuronides on devra effectuer des réactions spécifiques.

Identification des composés réducteurs

On transfère 2 ml de l'extrait aqueux dans un tube d'essai

puis on applique la méthode indiquée pour l'extrait alcoolique (B)

Identification de certains glucides (oses et polyoses)

On évapore 2 ml de l'extrait aqueux dans une capsule en porcelaine, on ajoute au résidu 2-3 gouttes d'acide sulfurique concentré, on laisse reposer pendant 3 à 4 minutes, puis on ajoute 3-4 gouttes de solution saturée de thymol (R). Le développement d'une coloration rouge dénote la présence des oses ou des polyoses. On décante 1 ml de l'extrait aqueux et on traite avec 1-3 gouttes de réactif Lugol (R); il devra se développer une coloration bleue si l'amidon est présent.

Identification des saponines

(a) La réaction Liebermann-Burchard (voir l'extrait éthérique (A)).

(b) Indice de mousse: on dilue 1 ml de l'extrait aqueux avec 49 ml d'eau, on transvase 4 ml de cet extrait dilué dans un tube à essais (\emptyset 1 cm) et on agite pendant 15 secondes.

La formation d'une colonne de mousse, haute de minimum 1 cm et qui persiste pendant 15 minutes au minimum dénote la présence hypothétique des saponines.

(c) Ensuite, on effectue le test d'hémolyse par la méthode gélatine-sang (R).

Si toutes les trois réactions sont positives, les saponines sont présentes dans la drogue analysée.

Identification des tanins

Voir l'extrait alcoolique (B).

Si l'extrait aqueux contient des tanins, on fait bouillir au réfrigérant à reflux 10 ml de soluté avec 3 ml de réactif Styassny (R). Dans ces conditions a lieu la condensation des tanins catéchiques (un précipité rouge), qu'on sépare par filtration. A la solution filtrée, après neutralisation avec de l'acétate de sodium, on ajoute 1 goutte de solution à 1% de chlorure ferrique. Le développement d'une coloration bleue dénote la présence des tanins galliques.

2. Réactions effectuées dans l'extrait aqueux hydrolysé

On suit le mode opératoire indiqué pour l'extrait alcoolique (3), tant pour l'hydrolyse du soluté aqueux, que pour l'identification des anthracénosides, coumarines, glucosides flavoniques, stéroliques et triterpéniques. Ces réactions devront être effectuées si on n'a pas obtenu des résultats positifs dans le soluté alcoolique (3).

Le Tableau 6 (voir en annexe) représente schématiquement les méthodes analytiques pour les composés hydrosolubles.

L'analyse de la composition chimique des substances végétales selon la méthodologie décrite conduit à des résultats orientatifs importants.

En cas d'une association de composés qui peuvent mener à la superposition des couleurs, empêchant leur identification (par exemple les dérivés d'oxyméthylanthraquinone avec les flavones), on a recours à d'autres méthodes, comme la microsublimation, et surtout aux méthodes chromatographiques.

IV. MICROSUBLIMATION

La microsublimation est une méthode qui permet d'isoler certains composés naturels des drogues. Elle peut être utilisée seulement pour les substances qui ont la qualité de passer à l'état de vapeur en les chauffant et puis de cristalliser sur une surface refroidie.

Mode opératoire:

On place une prise d'essai (environ 0,10 g) de drogue pulvérisée sur une lamelle de microscope, placée sur un tamis d'amiante posé sur un trépied. Sur un bout de la lamelle on pose une tige de verre ayant une longueur de 5 à 6 cm, sur laquelle repose une autre lamelle. Sur la lamelle supérieure (inclivée) on place un tampon de coton hydrophyle imbibé d'eau, qui tient le rôle de réfrigérant. On chauffe le système à l'aide d'un bec Bunsen, à petite flamme, située à une distance d'environ 10 cm du tamis d'amiante. Dans ces conditions, certaines substances de la drogue peuvent sublimer sur la lamelle supérieure, au niveau du tampon de coton hydrophyle, généralement sous forme de cristaux.

Analyse du sublimé

On détermine l'aspect, la couleur, le système de cristallisation, la solubilité, éventuellement la fluorescence à la lumière ultraviolette, le point de fusion, puis on passe aux réactions d'identification.

Les principes actifs présentés dans le Tableau 7 peuvent être identifiés par microsublimation.

Tableau 7

Réactifs de couleur utilisés à l'identification des substances obtenues par microsublimation

Substance sublimée (aspect)	Réactifs utilisés	Couleur obtenue
Atropine (cristaux incolores en aiguilles)	Réaction Vitali (R)	violet
Berbérine (masses cristallines jaunes)	dissoutes dans l'acétone	cristaux verts
Bornéol	dissout dans benzène + acide ferricyanique	cristallise
Coumarine	Réaction Feigl (R)	violet
Caféine (cristaux incolores en aiguilles)	Réaction du murexide (R)	rouge
Emodol (cristaux jaune-orangé en aiguilles)	en milieu alcalin	rouge
Gentisine (cristaux jaunes)	en milieu alcalin	jaune
Hydroquinone (cristaux incolores)	+ 1 gtte sol. FeCl ₃ à 1% (R)	cristaux bruns
Héléanine (cristaux orangés en aiguilles)	+ vanilline sulfurique (R)	rouge-violet
Santonine (cristaux incolores en lamelles)	+ sol. méthoxyde de sodium (R)	rouge
Strychnine (masses cristallines incolores)	+ H ₂ SO ₄ et sol. bichromate de potassium	bleu-violet

V. DETERMINATION DE LA PURETE DES PRODUITS VEGETAUX

Elle s'effectue conformément aux règles des pharmacopées, des standards, des normes en vigueur ou des dossiers techniques,

où sont spécifiés: la détermination quantitative des inou-
retés provenant de la plante source (des produits dégradés,
assaillis par les insectes, les maladies, etc); la déter-
mination quantitative des corps étrangers (fragments provenant
d'autres plantes, substances minérales, etc).

VI. DETERMINATION DE LA QUALITE DES PRODUITS VEGETAUX

Elle comporte:

A. Les déterminations quantitatives préliminaires

1. Détermination de la teneur en eau: s'effectue par les méthodes prévues par les pharmacopées (Pharmacopée Internatio-
nale, 1er vol., Pharmacopée Européenne, 1er vol., Pharmacopée
Roumaine, IXe éd., p.774) (2,5,6).
2. Détermination des cendres totales et des cendres insolubles
dans l'acide chlorhydrique à 10% (conformément aux spécifica-
tions des pharmacopées).
3. La détermination des extraits (à l'aide de divers solvants)
est importante pour calculer les rendements, surtout dans l'indus-
trie extractive et celle de certaines préparations pharmaceuti-
ques (teintures, etc).

B. Détermination quantitative des principes actifs

La valeur thérapeutique d'une drogue dépend du contenu
en substances actives du point de vue pharmacologique. Le contenu
en principes actifs est établi par des méthodes physiques, chi-
miques et biologiques. Ces méthodes sont décrites dans les phar-
macopées, les fiches des normes ou les normes en vigueur pour
chaque substance végétale.

Pour le dosage des principes actifs des certaines drogues
on peut consulter les pharmacopées (voir Tableau 8 - annexe).

VII. INDICATIONS CONCERNANT L'ISOLATION DES PRINCIPES ACTIFS

La qualité de la drogue étant une fois établie, on passe
au choix de la méthode d'extraction la plus avantageuse, en tenant

compte du degré de pulvérisation, de la solubilité et de la thermolabilité de la substance active.

Suivant la nature de la substance à extraire (solide ou liquide), les extractions se divisent en deux catégories:

- . extraction solide-liquide, dans la plupart des cas, et
- . extraction liquide-liquide, c'est à dire l'extraction d'un liquide ou des principes actifs se trouvant dans un liquide (le résultat d'une première phase d'épuisement) à l'aide d'un autre liquide non miscible.

La drogue fraîche ou séchée est pulvérisée ou amenée à un degré de division adapté au mode d'extraction utilisé.

Le choix du solvant est déterminé par:

- . la nature des principes actifs,
- . les propriétés physico-chimiques du solvant (densité, viscosité, inflammabilité),
- . la sélectivité du solvant, et
- . les considérations économiques.

Les informations fournies par l'examen chimique qualitatif de la drogue sont utilisées dans l'extraction des principes actifs.

L'eau, le méthanol, l'éthanol, l'acétone, etc. sont utilisés comme solvants hydrophyles, et l'éther de pétrole, l'éther éthylique, le chloroforme, le benzène, etc. comme solvants lipophiles (apolaires).

Généralement, les substances thermolabiles doivent être épuisées à froid par percolation ou agitation.

Pour l'épuisement à chaud on peut utiliser plusieurs méthodes, en fonction du régime d'extraction (au réfrigérant à reflux, continu, solide-liquide ou liquide-liquide).

Les meilleurs résultats sont obtenus par l'extraction à contre-courant.

Les substances actives isolées sont généralement impures. Pour les purifier on utilise couramment la séparation sélective à l'aide de solvants, mais surtout la chromatographie sur colonne (alumine, silicagel, résines échangeuses d'ions, etc).

. Après avoir obtenu les substances pures on détermine les particularités physiques (point de fusion ou d'ébullition, solubilité, système de cristallisation, pouvoir rotatoire spécifique, etc.), puis on établit la structure chimique (analyse élémentaire, spectres d'absorption dans l'ultraviolet et l'infrarouge, R.M.N., spectre de masse).

A la fin, pour des substances actives nouvelles on doit vérifier la structure chimique par leur synthèse.

Après les études de laboratoire on établit les technologies pour l'épuisement en station-pilote, puis à l'échelle industrielle.

EXAMEN MACROSCOPIQUE

Organes végétaux	Radix, Rhizoma, Bulbus, Tuber	Cortex	Folium	
Description	Forme	Forme	Glabres ou pubescentes	
	Décortiqué ou non	Mondé ou non		
	Strié ou lisse	Surface externe	Minces ou coriaces	
	Cassure (fibreuse, nette, granuleuse, farineuse)	(stries, lenticelles, lichens)	Sessiles ou pétiolées	
	Consistance	Surface interne (striée, lisse)	Forme Bords	
	Coupe transversale (+ sol. fluoroglucinol (R), on détermine la disposition des fibres libéro-ligneuses et le rapport des tissus)	Cassure Consistance Coupe transversale (rapport des tissus, éléments mécaniques)	Nervation (feuilles minces)	
	On détermine l'organe			
	Dimensions	Longueur	Longueur	<u>Matériau humecté</u> (Feuilles minces)
		Largeur	Largeur	<u>Matériau séché</u> (Feuilles coriaces)
		Diamètre	Epaisseur	Longueur Largeur
Couleur (du matériau séché)	A l'extérieur et à l'intérieur après cassure	Surfaces externe et interne	Surfaces dorsale et ventrale	
Odeur et saveur	du matériau séché, broyé ou sous forme d'extrait (décoction)			

(Tableau 1, Examen macroscopique, suite)

Flores	Herba	Fructus	Semen
Isolées ou en inflorescences (type d'inflorescence)	On caractérise chaque organe séparément (Cauli, Folium, Flores, Fructus)	Type	Forme
Degré de développement	<u>Matériau humecté</u>	Forme	Consistance
Entières ou non	Disposition des feuilles et des fleurs sur la tige	Consistance	Coupes transversale et longitudinale (rapport entre le tégument, l'endosperme et l'embryon)
<u>Matériau humecté</u>		Coupe transversale (rapport des tissus)	
Analyse florale		Présence ou absence de graines	
Diamètre après humectation	Voir chaque organe séparément	Longueur	Sur papier millimétrique (longueur, largeur)
		Largeur	
		Diamètre	
Pour la corolle	Pour chaque organe séparément	à l'intérieur et à l'extérieur	

Tableau 2

EXAMEN MICROSCOPIQUE

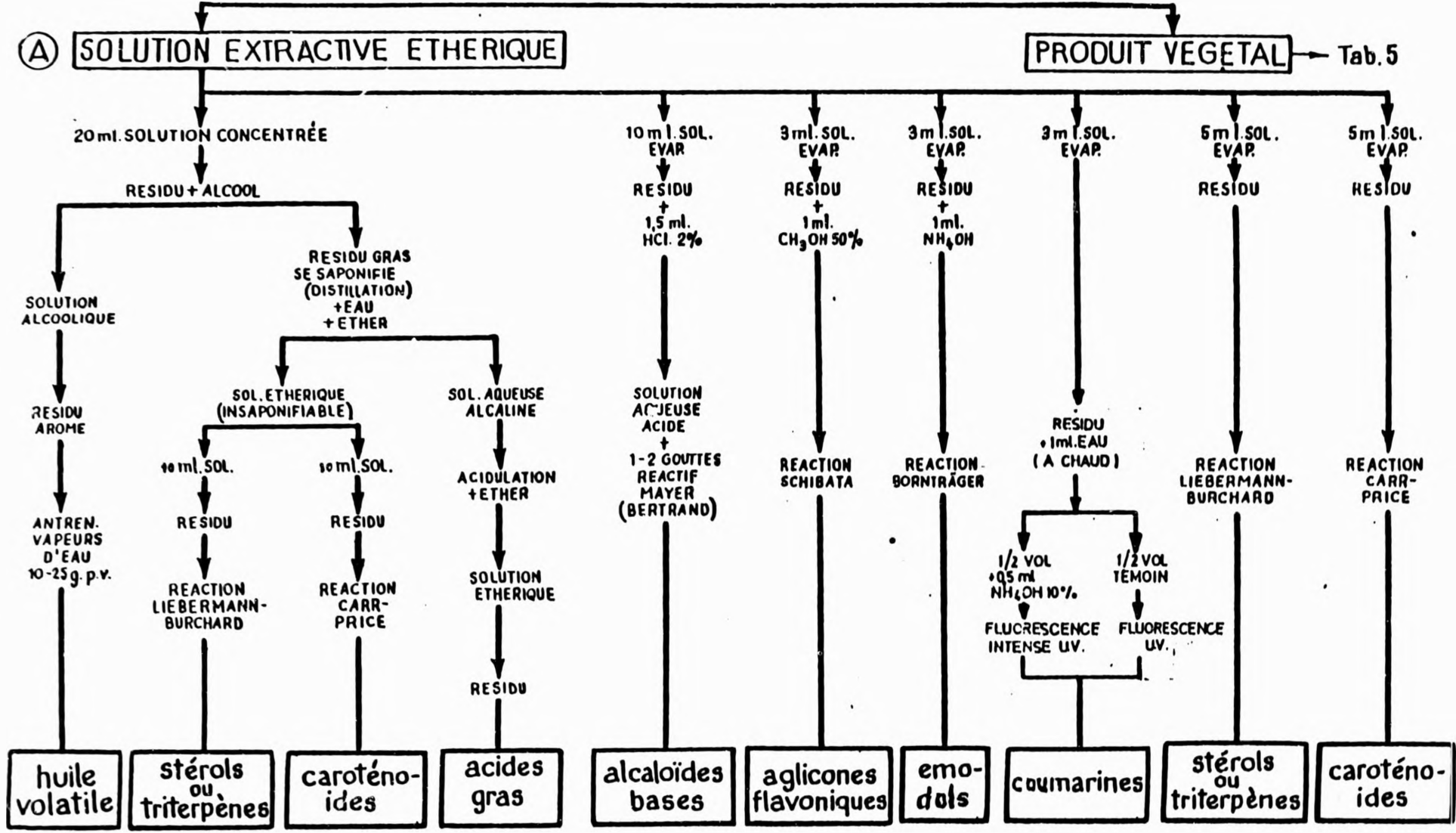
Organe végétal	Radix, Rhizoma Tuber, Bulbus	Cortex	Folium
Coupes transversales, longitudinales, radiales et tangentielles	Type de structure	Aspect général	Structure du
	Disposition des zones libéro-ligneuses	(rayons médullaires, tissu sclérifié-fibres, cellules scléreuses, appareil sécrétoire, oxalate de calcium, etc)	limbe
Poudre et préparation "conciissum" éclaircie	Eléments et tissus caractéristiques (amidon, oxalate de calcium, tissu sclérifié-fibres, cellules scléreuses, appareil sécrétoire, etc)	Eléments et tissus communs (fragments de vaisseaux de bois de grandes dimensions, réticulés, ponctués, scalariformes, fragments de suber, fragments de parenchymes)	Type du fascicule; nature du péricycle
	Eléments et tissus caractéristiques (fibres simples ou accompagnées de tubes cristalligènes, amidon, huile fixe, huile volatile, cellules scléreuses, oxalate de calcium)	Eléments et tissus caractéristiques (fibres simples ou accompagnées de tubes cristalligènes, cellules scléreuses, fragments de parenchyme, oxalate de calcium, amidon)	Appareil sécrétoire (poches, cellules, poils glanduleux, canalicules, laticifères)
			Oxalate de calcium Poils tecteurs
			Tissus communs: fragments de tissus chlorophylliens, de vaisseaux spirales, annelés, rarement réticulés, de petite dimension, fragments d'épiderme)
			Eléments et tissus caractéristiques (type des stomates, stries cuticulaires, poils tecteurs et sécréteurs, oxalate de calcium, fibres simples ou accompagnées de tubes cristalligènes)

(Tableau 2, Examen microscopique, suite)

Flores	Herba	Fructus	Semen
	Pour chaque organe séparément	Structure du péricarpe (tissu mécanique, pigmentaire, canalicules sécrétoires, laticifères, etc) Pour les fruits à graines voir Semen	Structure des téguments (spermoderme, tissu mécanique, pigmentaire) Structure de l'endosperme Structure des cotylédons (inclusions cellulaires)
Eléments et tissus communs (fragments d'endotelium, papilles, pollen, vaisseaux de bois spiralés et annelés, fragments d'épiderme) Eléments et tissus caractéristiques (poils glanduleux, tecteurs, stries cuticulaires, oxalate de calcium, fibres Cellules scléreuses petites, aspect de l'exine du grain de pollen)	Pour chaque organe séparément	Tissus communs (fragments d'épicarpe, de vaisseaux annelés et réticulés, petits fragments de méso-carpe à huile volatile, huile fixe) Eléments et tissus caractéristiques (fibres, cellules scléreuses, fragments de tissus pigmentaires, poils tecteurs, oxalate de calcium, amidon)	Tissus communs (fragments d'endosperme, de cotylédons, avec de l'huile fixe et grains d'aleurone, fragments de vaisseaux annelés ou réticulés petits) Eléments et tissus caractéristiques (fragments de tissu pigmentaire, fibres, cellules scléreuses, oxalate de calcium, amidon)

ANALYSE CHIMIQUE QUALITATIVE DES PRODUITS VEGETAUX

25 gr PRODUIT VEGETAL EPUISE A L'ETHER
CONCENTRATION 50 ml.



PRODUIT VEGETAL EPUISE A L'ETHER

EPUISEMENT AVEC CH₃OH PAR REFLUX 20-40 minutes ET CONCENTRATION

(B) SOLUTION EXTRACTIVE ALCOOLIQUE (50 ml)

PRODUIT VEGETAL EPUISE A L'ALCOOL • Tab. 6.

(1) REACTIONS DIRECTES SUR SOLUTION (25 ml)

(2) REACTIONS SUR SOLUTION HYDROLYSEE (25 ml)

REFLUX 30' AVEC 15 ml. HCl 10%. REFROIDISSEMENT ET EXTRACTION 3-15 ml. ETHER

SOLUTION EXTRACTIVE ETHERIQUE

SOLUTION AQUEUSE ACIDE

20 ml SOL. CONCENTREE
EUMINATION DE L'ALCOOL
RESIDU (RNH)⁺R-COO⁻
+ 10 ml. HCl 10%
SOL. AQUEUSE (RNH)⁺Cl⁻
+ NH₄OH 10% (pH 8-9)
ETHER
SOL. ETHERIQUE (RNH)⁺
RESIDU + 15 ml. HCl 2%
(RNH)⁺Cl⁻

1 ml SOL.
+ 2 ml EAU
+ 2-3 GOUTTES
SOL. FeCl₃
DILUEE

1 ml SOL.
+ 2 ml EAU
+ 20 GOUTTES
R. FEHLING
(CHAUFFAGE)

BLEU
FONCE

VERT
FONCE

p.p. ROUGE
BRIQUE

0,5 ml SOL.
+ 2-3 GOUTTES
R. MAYER
p.p. BLANC
JAUNATRE

0,5 ml SOL.
TEMOIN

0,5 ml SOL.
+ 2-3 GOUTTES
R. BERTRAND
p.p. BLANC
JAUNATRE

tanins
galliques

tanins ca-
théchiques

composés
réducteurs

alcaloïdes
sels

R. BORNTÄGER

antra-
cénosides

3 ml.
SOLUTION

5 ml SOL.
CONCENTRATION
RESIDU
+ 1-2 ml EAU
(A CHAUD)

1/2 VOL.
TEMOIN
FLUORESCENCE
U.V.

1/2 VOL.
+ 0,5 ml.
NH₄OH 10%
FLUORESCENCE
INTENSE

coumarines

10 ml SOL.
CONCENTRATION
RESIDU
+ 0,5 ml. ANHYDRIDE
ACETIQUE + 0,5 ml.
CHLOROFORME

R. LIEBERMANN
BURCHARD

hétérosides
stéroliques

hétérosides
triterpeniques

5 ml SOL.
CONCENTRATION
RESIDU
+ 1 ml.
CH₃OH 50°
(A CHAUD)

R. SHIBATA

flavo-
nosides

ROUGE
ANTROCENONES
OU TANINS
CATECHOLQUES

VIRAGE COULEUR
PH DIFFERENT

anto-
cyanosides

-572-

PRODUIT VEGETAL EPUISE A L'ETHER ET A L'ALCOOL

EPUISEMENT AVEC DE L'EAU A CHAUD

(C) SOLUTION EXTRACTIVE AQUEUSE (50 ml)

PRODUIT VEGETAL EPUISE

(1) REACTIONS DIRECTES SUR SOLUTION (25 ml.)

(2) REACTIONS EN SOLUTION HYDROLYSEE

(VOIR SOLUTION EXTRACTIVE ALCOOLIQUE)

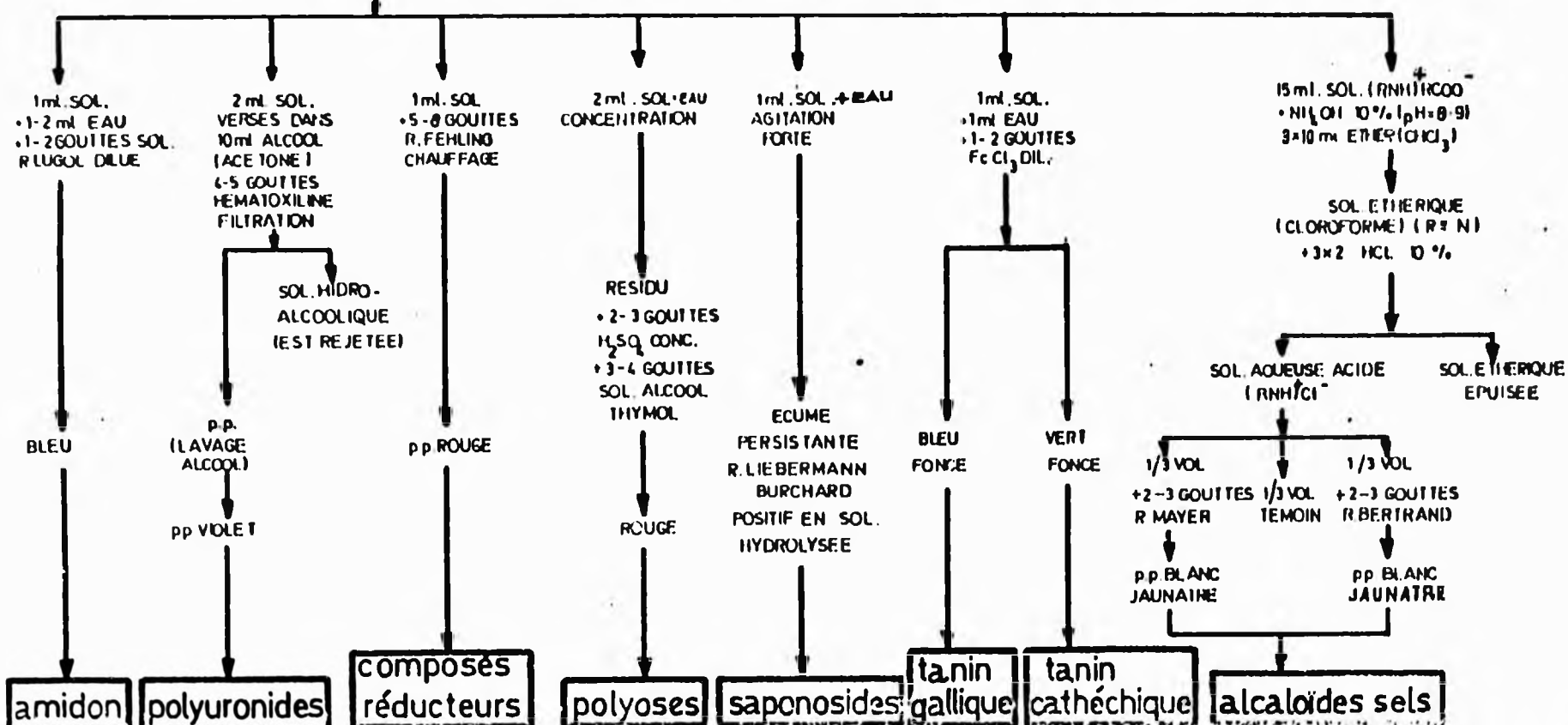


Tableau 3

Produit végétal	P h a r m a c o p o e a				
	Américaine	Européenne	Française	Suisse	Roumaine
	(1) page	(2) page	(3) page	(4) page	(6) page
1	2	3	4	5	6
Aconiti tuber	-	-	I, 18	II, 1464	70
Aloe	21	III, 151	-	II, 119	97
Anisi vulgaris fructus	-	III, 155	-	II, 638	819
Arachis hypogae fructus	1241	-	-	-	-
Aurantii pericarpium	1240	-	II, 303	II, 548	819
Belladonnae radix et fol.	67	I, 271	I, 79	-	133, 135
Benzoe tonkinense	74	III, 167	-	-	-
Calami rhizoma	-	-	-	II, 1296	-
Capsici fructus	-	-	-	II, 640	-
Carvi fructus	1216	-	-	II, 643	819
Cacao semen	1223	-	-	-	-
Cardamomi fructus	1217	-	-	-	-
Chamomillae flos	-	III, 280	II, 262	II, 560	819
Citrus pericarpium	1243	-	-	-	-
Chinae cortex	-	III, 199	I, 523	II, 413	179
Colae semen	-	-	I, 366	II, 1330	219
Crataegi folium	-	-	-	II, 594	-
Cynarae folium	-	-	-	-	259
Digitalis pur- purae folium	237	III, 219	-	II, 597	278
Eucalypti folium	1228	III, 68	II, 303	-	819
Foeniculi fructus	1228	-	-	II, 646	819
Frangulae cortex	-	II, 237	I, 105	II, 420	324
Gentianaes radix	-	I, 310	-	-	332

Tableau 8, suite

1	2	3	4	5	6
Hyoscyami folium	-	I, 315	I, 358	-	359
Ipeca radix	417	I, 323	I, 351	-	404
Juniperi fructus	436	-	-	II, 1257	-
Liquiritiae radix	1230	II, 303	-	-	434
Menthae folium (Ol. Menthae)	1242	III, 69, 283	I, 395	II, 614	450
Millefolii flos	-	-	-	II, 570	-
Myristicae semen	-	-	-	II, 1338	-
Myrtilli fructus	-	-	-	II, 649	-
Opium	565	-	-	-	522
Oleum Ricini	122	-	-	-	-
Pini montanae Ol.	1244	-	-	-	-
Podophyllum	635	-	I, 530	II, 1203	-
Ratanhiae radix	-	I, 367; III, 36	I, 526	II, 1284	-
Rauwolfiae radix	703	-	-	-	-
Rhei rhizoma	-	-	I, 534	II, 1286	588
Rosae gallicae fructus	1252	-	-	-	-
Saponariae radix	-	-	-	-	604
Secale cornutum	-	-	I, 230	-	608
Sennae folium et fructus	722	I, 382; III, 20	I, 544 I, 547	-	-
Sirapis nigrae	-	-	I, 417	II, 1342	610
Stramonii folium	-	I, 388	I, 205	-	-
Strychni semen	-	-	I, 431	II, 1344	-
Theae folium	-	-	I, 366	-	-
Thymi folium	1266	-	-	II, 630	-
Vanillae fructus	1267	-	-	-	-
Valerianae radix	-	III, 379	-	II, 1306	733
Vitis idaeae fol.	-	-	-	-	736

B I B L I O G R A P H I E

1. + + + The United States Pharmacopoea,
Twentieth revision, Washington, 1975
2. + + + Pharmacopée Européenne, vol. I, II, III,
Ed. Maisonneuve, S.A., France, 1975
3. + + + Pharmacopée Française, IX^e édition,
Paris, 1972
4. + + + Pharmacopoea Helvetica, Ed. Sexta, Bern, 1971
5. + + + Pharmacopée Internationale, III^e édition,
vol. I, OMS, Genève, 1980
6. + + + Farmacopeea Română, ed. IX, Ed. Medicală,
București, 1976

IDENTIFICATION DES PRODUITS
VEGETAUX MEDICINAUX

Elena Tarpo +)

+) Docteur en pharmacie, chercheur à l'Institut pour le
Contrôle d'Etat des Médicaments et de Recherches
Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

L'identification et la caractérisation d'un produit végétal en vue de sa mise en valeur imposent des examens macroscopique, microscopique, histochimique et chimique.

I. EXAMEN MACROSCOPIQUE

L'identification d'un produit végétal impose tout d'abord un examen macroscopique (1, 2, 3).

Cet examen a pour but de préciser les caractères visibles à l'oeil nu ou au moyen d'une loupe, ou détectables par l'odeur et le goût. L'examen macroscopique précisera l'aspect, les dimensions, la couleur, l'odeur et le goût.

La variété des produits végétaux, déterminée par la nature des organes végétaux dont ils proviennent et par leur forme de présentation: entiers - in toto; fragmentés - concisum; pulvérisés - pulveratum - impose certaines particularités à l'examen macroscopique.

A. Les produits végétaux entiers peuvent souvent être identifiés seulement par cet examen.

L'examen macroscopique (organoleptique) des organes souterrains (radix, rhizoma, tuber, bulbus) doit aider à préciser les caractères et à établir l'organe (racine ou tige souterraine).

La caractérisation de l'aspect se réfère à la forme du produit, la manière dont il a été récolté et conditionné (entier, coupé longitudinalement, transversalement, nettoyé ou non du suber), à la présence ou à l'absence de stries (longitudinales, transversales), la profondeur de celles-ci, à la présence de certaines cicatrices (de radicelles, racines ou bourgeons foliaires), à la fracture (lisse, granuleuse, lignifiée, spongieuse, pulvérulente, fibreuse etc.), à la surface transversale y compris la description de la disposition des fascicules conducteurs.

L'examen macroscopique d'un organe souterrain entier s'effectue sans aucune préparation préalable. La disposition des fascicules peut être précisée plus facilement en utilisant

un réactif de couleur, pour la lignine par exemple, qui permet d'observer comment sont disposés les fascicules de bois. A ces fins on peut utiliser la solution alcoolique de fluoroglucine en milieu d'acide chlorhydrique, qui teint les tissus lignifiés en rouge.

A la suite de cet examen on peut différencier, dans de nombreux cas, une racine d'une tige souterraine et établir jusqu'à un certain point l'appartenance systématique de la plante productrice.

Les dimensions (longueur et épaisseur) sont établies au moyen d'une règle graduée, dans la région la plus développée de l'organe souterrain. La couleur sera observée sur le produit sec, tant à la surface du produit végétal qu'à son intérieur, sur la fracture sécante, l'odeur étant perçue après avoir frotté le produit ou la raclure entre les doigts.

1. Les tiges aériennes (stipules) comme telles représentent rarement des produits végétaux; le plus souvent, elles représentent une partie constituante des produits connus sous le nom d'Herba. La caractérisation macroscopique de ces organes se réfère à l'aspect, respectivement à la forme, la surface (pubescence de la striation), la fracture (lisse, fibreuse, granuleuse, pulvérulente etc.), la section transversale (rapport entre les tissus, la structure, la disposition des fascicules conducteurs, tissus sécréteurs), les dimensions (longueur, diamètre), la couleur extérieure et intérieure, l'odeur (appréciée sur la raclure du produit sec) et le goût (déterminé sur un fragment de produit végétal ou une décoction).

2. L'examen macroscopique de l'écorce (cortex) tend à caractériser les surfaces externe et interne (présence ou absence du suber, des striations, des lenticelles, des lichens - les écorces des racines sont exemptes de lenticelles et de lichens), la fracture transversale (lisse, fibreuse, spongieuse etc.), les dimensions (longueur, largeur, épaisseur), la couleur sur les deux faces, l'odeur (la raclure du produit végétal sec).

3. L'examen macroscopique des feuilles et des folioles (folia) n'exige pas une préparation préalable et s'effectue sur le produit sec ou humecté, dans le cas des feuilles minces.

Lorsqu'on caractérise l'aspect, on établit la pubescence sur les deux faces, l'épaisseur des nervures, leur proéminence ou invagination sur la face supérieure ou inférieure de la feuille, la couleur des deux faces. La forme et les dimensions sont déterminées sur le produit végétal humecté et étendu sur une plaque de verre.

4. L'examen macroscopique des fleurs (flores) devra établir d'abord s'il s'agit de fleurs complètes ou incomplètes, isolées, ou réunies en inflorescences, et leur stade de développement. Dans ce cas également, l'examen macroscopique est effectué sur le produit sec ou humecté. Cet examen implique l'analyse florale, par laquelle on identifie la position systématique de la plante dont on a collecté ou récolté le produit végétal. Les particularités d'un produit végétal représenté par des fleurs seront établies par l'examen séparé de chaque pièce florale. Sur le produit végétal sec on peut observer la pubescence, la couleur, l'odeur (après avoir écrasé un petit fragment entre les doigts), ou le type d'inflorescence; sur le produit humecté, étendu sur une plaque de verre, on détermine les dimensions (diamètre de la fleur ou de l'inflorescence, longueur et largeur des pièces florales).

5. L'examen macroscopique des fruits (fructus) tend à préciser d'abord le type de fruit, le stade où il a été récolté (mûr ou pas mûr), à caractériser ensuite la forme du fruit entier ou du fragment, la surface (stries, côtes, formations diverses, pubescence), les dimensions (longueur, largeur, épaisseur, diamètre), déterminées à l'aide d'une règle graduée, ou du papier millimétrique, la couleur, le goût, l'odeur.

6. Les graines (semen) représentent des produits végétaux utilisés tels quels, ou bien elles accompagnent les fruits. On établit la forme de la graine et on caractérise la surface du tégument extérieur (pubescence, présence ou absence de stries, hile, le point d'insertion de la graine au funicule), le raphé - petite proéminence longitudinale - d'éventuelles annexes (caroncule, arille, aigrette, etc.). Les dimensions s'établissent à l'aide du papier millimétrique ou d'un tamis dont les mailles ont un diamètre connu. L'examen macroscopique permet également d'observer la structure de la graine, le rapport

entre les tissus et, dans ce but, on sectionne longitudinalement la graine, après l'avoir plongée quelques minutes dans de l'eau chaude.

7. Les produits végétaux connus sous la dénomination d'Herba sont représentés par les parties supraterrrestres fleuries, parfois partiellement fructifiées, de certaines plantes herbacées. L'examen macroscopique comprendra la description de chaque organe.

B. Les produits végétaux fragmentés ou coupés ont des formes variées et des dimensions variables. L'examen macroscopique de ces produits s'effectue par des méthodes similaires utilisées pour les produits entiers. La forme des fragments devra toujours être mentionnée. Pour les produits connus sous le nom d'Herba, il est nécessaire de grouper les fragments par organes avant de les décrire.

C. L'examen macroscopique (organoleptique) des produits végétaux pulvérisés aide à préciser leurs finesse, couleur, odeur et goût. La réponse définitive ne sera fournie que par l'examen microscopique.

De ce qui précède il résulte que l'examen macroscopique des produits végétaux entiers, fragmentés et, en moindre mesure, des produits pulvérisés, aide à établir l'organe et de nombreux caractères, qui doivent être ensuite confrontés avec les données de l'examen microscopique, étude plus approfondie de l'analyse pharmacognostique.

L'appréciation du goût d'un produit végétal, malgré ses nuances subjectives, peut toutefois donner une orientation sur l'origine du produit analysé. Appliqué sur des produits végétaux fragmentés ou pulvérisés, l'examen macroscopique sera continué par l'examen microscopique, qui approfondit et atteste les nombreuses observations faites à l'œil nu ou sous la loupe.

II. EXAMEN MICROSCOPIQUE

A. Généralités

L'examen microscopique, étape plus approfondie de l'analyse

pharmacognostique, est très utile, surtout pour identifier les produits végétaux qui ne sont pas entiers, ou pour connaître les détails anatomiques de certains organes végétaux.

Les caractères anatomiques d'un organe végétal permettent souvent d'établir la position taxonomique de la plante productrice et, dans ce cas, présentent de l'intérêt la structure du faisceau libéroligneux, le type d'appareil sécréteur (quand il est présent), le type des stomates, l'aspect des poils tecteurs et glandulaires etc. (3).

Un produit végétal ou un organe végétal quelconque peut être examiné au microscope seulement après avoir subi une certaine préparation. On utilise diverses méthodes qui varient suivant l'état du produit (entier, fragmenté ou pulvérisé), sa consistance et sa composition chimique. Quels que soient ces facteurs, la préparation microscopique doit être transparente pour permettre d'observer la nature et la disposition des tissus, leurs particularités grâce auxquelles un même tissu puisse être différencié, en vertu de ses caractéristiques individuelles, dans différents produits.

L'examen microscopique des produits végétaux (1, 5, 6) peut s'effectuer sur des coupes. Les coupes peuvent être pratiquées sur les produits végétaux amenés à une certaine consistance, que l'on obtient après avoir fait bouillir l'eau contenant le produit. La durée de l'ébullition varie selon l'organe végétal, sa consistance et sa composition chimique. Parfois l'ébullition peut être remplacée par une simple imbibition du produit dans de l'eau bouillie (organes végétaux minces), ou par macération dans un mélange d'alcool et glycérine pendant 24 heures (produits avec des mucilages).

La coupe d'un produit peut être transversale, longitudinale (radiale ou tangentielle). Pour de nombreux produits végétaux l'examen microscopique de la section transversale est concluant.

Les sections sont obtenues au moyen d'un rasoir ou du microtome.

Les coupes ne seront pas effectuées près d'un noeud ou d'une ramification, car la structure est différente dans ces régions.

Quand on pratique une coupe transversale dans une feuille on sépare un fragment qui comprend la nervure médiane et un peu du mésophylle au voisinage du pétiole.

Le fragment du produit végétal à couper sera inclus dans de la moelle de sureau, coupée longitudinalement avec une lame à raser et dans laquelle on aura pratiqué une excavation au centre. Le diamètre de chaque moitié de l'excavation sera plus petit que la moitié de l'épaisseur du fragment à inclure. Les coupes seront mises dans un cristalliseur avec de l'eau, ou dans une goutte d'un réactif convenable. Dans le premier cas, on couvre le cristalliseur avec un verre de montre et l'on fait s'écouler l'eau.

La clarification des coupes s'effectue en utilisant des agents de clarification. La nécessité de clarifier les coupes s'explique par le fait qu'il est parfois difficile d'observer la structure anatomique à cause de l'abondance du contenu cellulaire. On utilise couramment de l'eau de Javel - solution d'hypochlorite de calcium - en quantité suffisante pour couvrir les coupes. On laisse le matériau végétal coupé en contact avec cette solution jusqu'à ce qu'il soit complètement décoloré.

Le processus de clarification a lieu dans ces conditions, dans un intervalle de temps variable, entre 15 minutes et quelques heures. Après avoir écoulé le liquide, on lave les coupes à plusieurs reprises avec de l'eau distillée, jusqu'à ce que l'odeur de chlore ne soit plus perçue. L'eau de Javel détruit le contenu cellulaire, à l'exception des cristaux d'oxalate de calcium, de silicium et, dans une certaine mesure, l'amidon. Elle fait revenir les parois cellulaires à leur position initiale. Au lieu de l'eau de Javel, une solution d'hydroxyde de potassium à 5% peut également être utilisée avec de bons résultats; elle dissout rapidement l'amidon, les protéines et détermine le gonflement des parois cellulaires.

Quand on examine une section d'un produit végétal qui contient une grande quantité d'huiles grasses (graines, fruits), on recommande de le dégraisser avant de le soumettre au processus de clarification. Les huiles grasses, les résines, les huiles volatiles, les tannins et la chlorophylle peuvent être

éliminés en lavant les coupes avec un mélange d'éther-alcool.

La coloration des coupes peut se faire par plusieurs procédés dont nous présenterons quelques-uns, plus usuels dans la pratique pharmacognostique (1, 2, 6).

La solution alcoolique de fluoroglucine en milieu d'acide chlorhydrique teint les parois lignifiées des cellules en rouge. Outre la coloration caractéristique de la lignine, on obtient également une clarification des coupes grâce à l'action de l'acide chlorhydrique, qui dissout une grande partie du contenu cellulaire, surtout les inclusions d'oxalate de calcium.

La double teinture au vert d'iode et au carmin d'alun est usuelle en pharmacognosie. Les coupes clarifiées et bien lavées sont traitées avec une solution de vert d'iode dans laquelle elles sont maintenues 1 minute environ. On écoule ensuite le colorant du cristalliseur couvert d'un verre de montre, on lave plusieurs fois les coupes avec de l'eau distillée, jusqu'à la disparition complète du colorant de l'eau de lavage. On applique ensuite sur les coupes une solution de carmin d'alun, on maintient 5-10 minutes et on lave à nouveau jusqu'à la disparition complète du réactif. Les coupes colorées sont examinées au microscope, après une préalable inclusion dans de l'eau, de la glycérine, dans une masse gélatineuse ou dans du baume du Canada. Dans ces conditions, les parois lignifiées sont teintées en bleu ou bleu-vert et les parois celluloses en rose ou rouge. Les solutions des colorants seront filtrées avant utilisation.

Les graines devront toujours rester dans du liquide, pour prévenir un séchage rapide et l'inclusion de nombreuses bulles d'air, qui rendraient difficile l'examen microscopique. Les coupes destinées à être examinées au microscope seront placées dans un liquide ou un autre milieu et couvertes d'une lamelle de verre.

Les préparations sont montées dans de la glycérine neutre ou dans une masse gélatineuse.

La glycérine neutre est le plus souvent utilisée. Les coupes à double coloration peuvent ainsi être conservées pendant de nombreuses années; elles ont toutefois l'inconvénient

d'absorber l'humidité de l'air. La glycérine, en augmentant ainsi son volume, peut dépasser la surface de la lamelle, ce qui est un autre inconvénient; un dernier désavantage est celui d'imposer la conservation des coupes en position horizontale.

La masse gélatineuse se prépare avec de la gélatine blanche, de l'eau et de la glycérine. On obtient une masse parfaitement homogène, solide, jaunâtre, translucide. Pour assurer une bonne conservation de la masse gélatineuse glycéri-
née, on peut ajouter une petite quantité de phénol à 2%. On peut aussi monter les coupes dans du baume du Canada, qui est une oléo-résine obtenue par des incisions dans Abies balsamea Mill. et Abies canadiensis, Fam. Pinaceae. Avant d'être montées dans le baume, les coupes seront d'abord déshydratées avec de l'alcool de 90° et, à deux reprises, avec de l'alcool absolu. Elles seront ensuite tenues dans du xylène, qui ne doit pas se troubler, et, pendant quelques minutes, dans de l'huile de clous de girofle (Aetheroleum caryophylli), qui les rendra claires. On place une goutte de baume sur la lame et on chauffe légèrement, pour éliminer l'huile volatile. La résine restée sera dissoute dans du xylène, du benzène, du chloroforme, ou de l'éther, la solution qui en résulte servant à monter les coupes.

La préparation est examinée d'abord à l'œil nu, au-dessus d'une source lumineuse, puis on rend son contour sur une feuille de papier. La coupe sera examinée au microscope pour préciser des détails de structure. Dans ce but, on représente sous forme de dessin une zone étroite de 3 à 4 cellules, en faisant attention à la succession des tissus et à leurs particularités. Le dessin sera interprété.

L'examen microscopique des produits végétaux pulvérisés s'effectue en vue de déterminer l'identité d'un produit végétal comme tel ou associé avec d'autres ingrédients d'une formule pharmaceutique.

Les produits végétaux sont pulvérisés par écrasement ou mouture, la poudre étant tamisée ensuite pour la rendre homogène.

La préparation microscopique s'obtient en utilisant un réactif ou un liquide de clarification, choisis suivant le but

poursuivi, exprimé par la clarification de la poudre végétale ou l'obtention de certaines réactions de couleur, caractéristiques pour la composition chimique des parois cellulaires ou du contenu des cellules qui forment divers tissus.

Mode opératoire :

On place une goutte de la solution à examiner sur une lame de microscope et dans la goutte une petite quantité de poudre végétale avec le bout de la lancette. Quand on utilise la solution aqueuse d'hydrate de chloral, on chauffe doucement, à feu nu, jusqu'à la perception d'une odeur faible de réactif; on laisse refroidir et on couvre d'une lamelle. Quand on désire mettre en évidence certains éléments lignifiés, on peut ajouter, avant de couvrir avec la lamelle, 1-2 gouttes d'une solution de fluoroglucine dans de l'acide chlorhydrique.

L'examen microscopique d'une poudre végétale doit conduire à l'identification de l'organe qui constitue le produit végétal, des éléments anatomiques dominants et caractéristiques.

Les caractères macroscopiques (organoleptiques) et microscopiques d'une poudre végétale permettent assez facilement de préciser l'organe végétal et sa structure.

Nous présenterons ci-après certains caractères microscopiques des poudres obtenues de divers organes végétaux.

3. Les organes souterrains (racines, rhizomes) en poudre - présentent à l'examen microscopique de nombreux fragments de parenchyme avec des matières de réserve (amidon, insuline, gouttes d'huile grasse etc.) et des grands vaisseaux de bois (ponctués, réticulés, scalariformes). Ces tissus, qui permettent d'identifier l'organe, présentent parfois des particularités grâce auxquelles on peut différencier divers organes souterrains.

L'épaisseur des parois cellulaires du parenchyme (Rh. Iridis), les espaces intercellulaires (Rh. Calami), l'aspect particulier des vaisseaux ligneux (Rad. Liquiritiae), la nature chimique des substances de réserve constituent des caractères importants.

Les organes souterrains pulvérisés peuvent être distingués par la présence des divers éléments anatomiques, examinés

isolément ou ensemble. En ce sens, l'aspect de l'amidon, les cristaux d'oxalate de calcium, les éléments mécaniques (fibres, cellules, collenchyme), les tissus sécréteurs, laticifères, le contenu cellulaire diversement coloré de certains tissus sont importants pour identifier les produits végétaux.

Pour les tiges, les éléments caractéristiques sont: les fragments d'épiderme, sur lesquels on peut observer des stomates, les poils tecteurs et glandulaires, les fragments de parenchyme, avec ou sans substances de réserve, les grands vaisseaux de bois, la présence des laticifères, les cristaux d'oxalate de calcium.

C. Les écorces pulvérisées peuvent être reconnues grâce à la présence d'éléments mécaniques (fibres, cellules pier-reuses), à côté de nombreux fragments de parenchyme. Le suber est présent dans la plupart des écorces, mais les vaisseaux ligneux manquent, à peu d'exceptions près, tel. C. Viburni. L'aspect et la structure des éléments mécaniques, les tissus sécréteurs sont les caractères qui différencient les différentes écorces.

D. Les feuilles pulvérisées sont reconnues au microscope grâce à la présence des fragments verts du parenchyme chlorophyllien, accompagnés le plus souvent d'épiderme et de tissus conducteurs.

Pour caractériser les feuilles, il faut préciser la forme des cellules de l'épiderme, la présence ou l'absence de la cuticule des poils tecteurs, des poils glandulaires et leur aspect, respectivement. D'autres éléments caractéristiques pour les feuilles sont les éléments mécaniques associés ou non à des cristaux d'oxalate de calcium. La structure des stomates est également importante pour caractériser un produit végétal formé de feuilles.

E. Les fleurs pulvérisées peuvent être reconnues:

(1) par la présence des nombreux fragments d'épiderme, d'aspect varié, à cause du grand nombre de pièces florales;

- (2) par les fragments d'endothèques et les papilles plus ou moins développées, en provenance surtout du stigmate;
- (3) par le pollen et les petits vaisseaux ligneux, spiralés ou annelés;
- (4) par les poils tecteurs, très variés comme aspect, nombre et disposition des cellules, l'épaisseur des parois cellulaires;
- (5) par les éléments mécaniques, particulièrement les fibres provenant souvent des bractées.

F. Dans les poudres provenant des fruits et graines, on observe une variété de tissus, dont certains sont invariablement présents (à l'exception des fruits non-accompagnés de graines), par exemple des fragments d'endosperme, de cotylédons et d'embryon. Ces tissus peuvent être différenciés par certaines particularités, à savoir les dimensions des parois cellulaires, les substances de réserve emmagasinées.

Les amidons et les gommes - poudres végétales blanches - seront examinés dans l'eau et dans la solution de Lugol diluée, respectivement. Les poudres d'amidon ont un aspect homogène; on précisera la forme, l'aspect du hile, ses dimensions et d'éventuelles zones d'hydratation.

Une autre catégorie de poudres végétales sont représentées par des latex concrétisés (Opium), des extraits concrétisés (Aloès), des excréctions (Chrysarobinum), des poils sécréteurs (Glandulae Lupuli), des poils sécréteurs et tecteurs (Kamala), des formations pathologiques (Gallae). Excepté les Gallae, les poudres ont un aspect homogène.

L'identification d'un produit végétal est possible par une étude complexe, dans laquelle les examens macro- et microscopique sont associés à l'examen chimique.

Pour préciser la composition chimique d'un produit végétal il faut utiliser une grande variété de méthodes, en choisissant la méthode la plus adéquate au but poursuivi. C'est ainsi que l'examen chimique appliqué sur un produit végétal connu, imposera l'exécution des réactions chimiques qualitatives, spécifiques pour le principe actif dominant.

Les déterminations chimiques qualitatives sur les produits végétaux peuvent être effectuées directement sur des coupes, ou sur le principe actif dominant, après isolement. Dans le premier cas, les réactions de couleur ou de précipitation (cristallisation) ont lieu au niveau de certains tissus, dont les cellules représentent le siège des principes actifs ou de certains composants d'accompagnement caractéristiques pour le produit respectif.

III. EXAMEN HISTOCHEMIQUE

On distingue ainsi l'examen histochemique et l'examen chimique effectués sur le principe actif ou sur le groupe de principes actifs isolés du produit végétal à l'aide de quelques solvants sélectifs ou par sublimation.

L'examen histochemique permet de localiser un certain principe actif d'un produit végétal. Il s'effectue sur des coupes (longitudinales ou transversales), plus rarement sur le produit végétal pulvérisé. Le produit végétal, dans les coupes duquel il faut effectuer un examen chimique, sera préparé d'une certaine manière permettant au constituant d'être maintenu dans les tissus.

Dans ce but on fait bouillir des fragments de produit végétal dans une capsule avec une solution saturée de chlorure ou de sulfate de sodium, jusqu'à la consistance exigée pour la coupe.

On place les coupes sur une lame de microscope ou sur un verre de montre et on couvre avec le réactif choisi pour une certaine réaction. Après quelques minutes, on lave les coupes avec un liquide approprié (elles doivent être lavées de l'excès de réactif sans agir sur le composant résultant de la réaction chimique). On prélève ensuite les coupes préparées avec une spatule et on examine au microscope dans une goutte de glycérine ou d'huile de paraffine. On observe d'abord l'aspect général de la coupe, où l'on a localisé un certain composant chimique, ensuite les détails dans les cellules où a eu lieu la réaction chimique.

Lorsque l'examen histochimique s'effectue sur un produit végétal pulvérisé, la technique est plus simple.

On place sur une lame de microscope, avec une spatule, un peu de poudre végétale et une goutte du réactif choisi. On couvre avec une lamelle. Après quelques minutes, on lave la préparation (le liquide de lavage est choisi d'après les critères énoncés plus haut), en inclinant légèrement la lamelle, de sorte que la poudre ne soit pas entraînée par le liquide. Lorsque les gouttes du liquide de lavage deviennent incolores, on couvre complètement la poudre d'une lamelle, on essuie avec de la gaze ou du papier-filtre et on examine la préparation au microscope.

On observe divers fragments de tissus, dont certains spécifiquement colorés à cause des réactions chimiques qui ont eu lieu dans les cellules. Parfois on observe aussi des formations cristallisées dans certaines cellules ou en dehors des cellules. Les réactifs utilisés pour l'examen histochimique sont très variés. Ils sont choisis suivant les propriétés physico-chimiques du principe actif à identifier.

On peut utiliser des réactifs unitaires, quand on veut obtenir une seule réaction spécifique, ou des réactifs complexes (globaux), qui permettent simultanément plusieurs réactions chimiques qui mettent en évidence un grand nombre de constituants chimiques.

La localisation nette des constituants chimiques, à la suite de l'examen histochimique, est possible dans les organes végétaux frais. Les coupes sont examinées dans de la glycérine, de l'huile de paraffine ou même parfois, s'il n'y a pas d'indications spéciales, dans de l'eau.

On peut également effectuer l'examen chimique qualitatif sur le principe actif ou le groupe des principes actifs séparés par épuisement succesif avec des solvants à polarité différente.

Dans la pratique pharmacognostique courante on utilise le principe de l'épuisement sélectif et succesif du produit végétal avec différents solvants, en commençant par le plus lipophile ou, au contraire, par le plus hydrophile pour séparer

Les grands groupes de composants naturels.

Parmi les solvants lipophiles citons l'éther de pétrole, l'éther éthylique, l'hexane et parmi les solvants hydrophiles l'eau; les alcools éthylique ou méthylique sont utilisés comme solvants intermédiaires.

Les solvants lipophiles extraient du produit végétal les composants chimiques liposolubles: huiles grasses et volatiles, vitamines, divers aglucones libres, alcaloïdes-base, proazulènes, etc. Dans la solution d'extraction à l'éthanol ou méthanol, on peut identifier divers glucosides, sels d'alcaloïdes ou certains alcaloïdes-bases, oses, acides organiques, substances amères, etc. L'eau extrait les composants polyuroniques (mucilages, substances pectiques, certaines gommes), divers glucosides, oses, sels d'alcaloïdes ou sels minéraux, substances protéiques, etc.

IV. EXAMEN CHIMIQUE

L'examen chimique qualitatif peut également s'effectuer sur le principe actif isolé par sublimation (microsublimation).

Cette méthode de séparation peut s'appliquer aux constituants chimiques solides qui ont la propriété de sublimer, c'est-à-dire de passer en vapeurs, lorsqu'ils sont chauffés, et de cristalliser quand ils sont placés sur une surface refroidie.

La microsublimation, ayant lieu dans un intervalle de temps relativement bref, avec des appareils simples, avec une petite quantité de produit végétal et, souvent, avec une efficacité certaine, représente dans de nombreux cas un procédé convenable et concluant pour identifier les produits végétaux.

Les principes actifs peuvent aussi être identifiés par la chromatographie d'adsorption, de partage ou par échange d'ions, le choix du type de chromatographie dépendant des buts préparatifs ou analytiques de la recherche.

B I B L I O G R A P H I E

1. Ciulei I., Sommer Lia, Istudor Viorica (1979) - Farmacognozie, Institutul de Medicină și Farmacie, București
2. Cucu Viorica (1978) - Farmacognozie, Institutul de Medicină și Farmacie, Cluj-Napoca
3. Hegnauer R. (1973) - Chemotaxonomie der Pflanzen, Ed. Birkhäuser, Basel und Stuttgart
4. Madaus G. (1938) - Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Ed. Georg Thieme, Leipzig
5. Planchon L., Bretin Ph. (1946) - Précis de matière médicale, Ed. Maloine, Paris
6. + + + (1976) - Farmacopeea Română, ed. IX, Editura Academiei R.S.R., București

DOSAGE DES ALCALOÏDES DE SECALE CORNUTUM,
LE SCLEROTE DU CLAVICEPS PURPUREA

Silvia Gruia +)

+) Biologiste, chercheur à l'Institut pour le Contrôle d'Etat
des Médicaments et de Recherches Pharmaceutiques, Bucarest,
Roumanie

Secale cornutum (ergot de seigle) représente la forme de résistance du champignon Claviceps purpurea (Fr.) Tul., famille des Hypocreaceae, qui pousse dans l'ovaire des fleurs de seigle (Secale cereale).

Les principes actifs spécifiques sont les alcaloïdes qui ont, comme structure de base, l'acide lysergique (lévo-gyre), physiologiquement actif, ou l'acide isolysergique (dextrogyre), inactif. Les deux acides sont des dérivés de l'ergoline, qui résulte, à son tour, de la condensation de l'indole avec la quinoline hydrogénée.

Ces deux acides forment 8 paires d'alcaloïdes groupés en alcaloïdes du type alcanolamine et alcaloïdes du type polypeptide.

Les alcaloïdes du type alcanolamine ont un aminoalcool lié au groupe carboxyle de l'acide lysergique ou isolysergique. À ce groupe appartiennent l'ergométrine et son isomère, l'ergométrinine.

Les alcaloïdes du type polypeptide ont un polypeptide formé par l'union de trois acides aminés dans une structure cyclique, liée au groupe carboxyle de l'acide lysergique ou isolysergique. Ces alcaloïdes peuvent être divisés, à leur tour, en deux groupes:

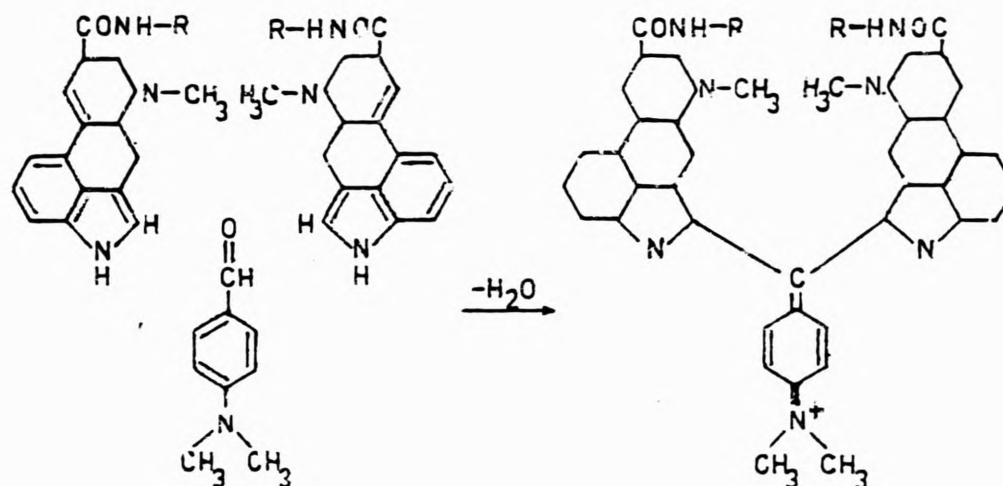
- (a) alcaloïdes du type ergotamine (ergovaline, ergosine et ergotamine);
- (b) alcaloïdes du type ergotoxine (ergocornine, ergocryptine et ergocristine).

Par l'hydrolyse des alcaloïdes du type peptidique on obtient l'acide lysergique ou isolysergique, la l-proline (communs pour les deux groupes), l' α -hydroxyalanine (pour le groupe de l'ergotamine), ou l' α -hydroxyvaline (pour le groupe de l'ergotoxine) et la l-valine (pour l'ergovaline et l'ergocornine), la l-leucine (pour l'ergosine et l'ergocryptine) et la l-phénylalanine (pour l'ergotamine et l'ergocristine).

Les alcaloïdes de Secale cornutum peuvent être dosés colorimétriquement grâce à la réactivité du noyau indolique.

Deux molécules d'alcaloïde à noyau indolique réagissent avec une molécule de p-diméthylaminobenzaldéhyde, en présence d'un agent oxydant, et donnent une coloration bleu-violet.

La réaction est très sensible et permet des déterminations quantitatives de l'ordre gamma des alcaloïdes.



Les principales méthodes que nous utilisons pour doser les alcaloïdes de Secale cornutum sont:

1. Le dosage des alcaloïdes conformément à la méthode indiquée dans la Pharmacopée Roumaine, IX^e édition.
2. Le dosage des alcaloïdes d'après la méthode semi-quantitative proposée par Thielmann et ses collaborateurs.
3. L'identification et le dosage des alcaloïdes par chromatographie en couche mince.

I. DOSAGE DES ALCALOÏDES CONFORMÉMENT À LA MÉTHODE DE LA PHARMACOPEE ROUMAINE, IX^{ème} EDITION

15,00 g de poudre de Secale cornutum sont dégraissés à l'éther de pétrole, dans un appareil à extraction continue. à cette poudre dégraissée et séchée on ajoute 150 ml d'éther (R) dans un ballon à bouchon rôdé et on laisse reposer 10 minutes. On y ajoute 1 g d'oxyde de magnésium (R) fraîchement

calciné, trituré à l'eau (30 ml) et on agite la mixture pendant 3 heures. On ajoute ensuite 2 g de tragacante (R), on agite et on laisse reposer jusqu'à la séparation des couches. On décante la couche étherique et l'on filtre sur de la ouate. 100 ml de solution étherique sont extraits 4 fois avec 10 ml d'acide tartrique 1% (R). Les solutions aqueuses réunies sont filtrées dans un ballon jaugé et on ajoute de l'acide tartrique 1% jusqu'à 50 ml. à 0,5 ml de cette solution on ajoute 1,5 ml d'acide tartrique 1%, 4 ml p-diméthylaminobenzaldéhyde dans de l'acide sulfurique (R), 5 gouttes d'eau oxygénée fraîchement préparée (5 ml d'eau et une goutte de perhydrol(R) et l'on agite. Au bout de 5 minutes, on y ajoute 0,01 g environ de pyrosulfite de sodium (R) et on détermine l'extinction à 570 nm dans une cuve de 0,5 cm, par rapport à un témoin préparé dans les mêmes conditions que l'échantillon, en remplaçant la solution à analyser par un volume égal d'acide tartrique (R) 1%. La teneur en alcaloïdes est calculée au moyen d'une courbe-étalon établie dans des conditions identiques, à l'aide du tartrate d'ergotamine (s.r. = substance de référence).

II. DOSAGE DES ALCALOÏDES D'APRES LA METHODE SEMI-QUANTITATIVE PROPOSEE PAR THIELMANN ET COLL.

Nous utilisons cette méthode dans les analyses en série destinées à trier les sclérotés pour des travaux de sélection.

On pulvérise les sclérotés et l'on introduit une quantité de 50 mg de poudre exactement pesée dans une ampoule à décantation.

On extrait les alcaloïdes avec 2 ml de solution d'acide tartrique dans du méthanol. L'opération a lieu dans 6 courtes étapes de 30 secondes chacune, dont 3 à chaud (pas plus de 60°C), alternant avec 3 à la température du laboratoire. Quand la solution est encore chaude, on ajoute 2 ml d'acétate de Zn (R) 10% et on laisse reposer pendant 30 minutes. Il se forme un précipité. On mélange 1-2 ml du liquide limpide surnageant avec une quantité double du réactif de Van Urke et l'on laisse reposer pendant 20 minutes. On lit l'extinction à 570 nm dans la cuve de 0,5 cm, par rapport à un témoin préparé dans les

mêmes conditions que l'échantillon, en remplaçant la solution à analyser par un volume égal d'acide tartrique dans du méthanol.

On calcule la teneur en alcaloïdes à l'aide d'une solution-étalon de tartrate d'ergotamine à concentration connue.

1. Préparation de la solution d'acide tartrique dans du méthanol

On dissout 4 g d'acide tartrique (R) dans la quantité minimale nécessaire d'eau et on ajoute 50 ml de méthanol (R).

2. Préparation du réactif de Van Urke

On ajoute graduellement 65 ml d'acide sulfurique (R) à 25 ml d'eau et, pendant que la solution est encore chaude, on ajoute 0,03 ml de chlorure ferrique (R) 50%. On laisse refroidir et on ajoute 0,2 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde (R).

III. IDENTIFICATION ET DOSAGE DES ALCALOÏDES PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

La méthode chromatographique permet la séparation des constituants d'un mélange, grâce à leur capacité de se répartir entre la phase fixe et la phase mobile; cette méthode nous a donné la possibilité d'identifier et de doser les groupes d'alcaloïdes de l'ergot de seigle.

A. Identification et dosage de l'ergométrine, l'ergotamine et l'ergotoxine

On utilise la chromatographie d'adsorption, la technique ascendante. Dans ce but, on aura besoin de:

Plaques de verre de 20 x 20 cm;

Adsorbant: silicagel G (R);

Développant: benzène-chloroforme-alcool éthylique absolu (R) (2:4:1);

Solutions à appliquer:

- (a) Solution a : on ajoute 0,01 g pour cent de maléate d'ergométrine (s.r.) à un mélange de volumes égaux de chloroforme et de méthanol (R) (étalon);

- (b) solution b: on ajoute 0,01 g pour cent de tartrate d'ergotamine (s.r.) à un mélange de volumes égaux de chloroforme et de méthanol (R) (étalon);
- (c) solution c : on ajoute 0,01 g pour cent de méthansulfonate d'ergotoxine (s.r.) à un mélange de volumes égaux de chloroforme et de méthanol (R) (étalon);
- (d) solution d : on utilise la solution étherique obtenue sous le titre "Dosage des alcaloïdes conformément à la méthode de la Pharmacopée Roumaine, IX^e édition" (échantillon).

On applique sur la ligne de départ de la plaque, dans la moitié gauche, aux points a, b, c, les solutions-étalon et sur la moitié droite, sur une distance de 5 cm, la solution d (l'échantillon).

- a : 10 μ l de solution a
- b : 10 μ l de solution b
- c : 10 μ l de solution c
- d : 1 ml de solution d

On plonge la plaque préparée dans la cuve de développement et on laisse le développant migrer jusqu'à une distance de 5 mm du bord supérieur de la plaque; on laisse sécher à la température du laboratoire et on examine la plaque sous lumière ultra-violette à 360 nm.

Après développement, l'échantillon doit se présenter sous forme de taches à fluorescence bleue, ayant le même Rf que les taches des solutions étalon a, b, c, qui caractérisent les alcaloïdes de l'échantillon analysé.

Les taches de l'échantillon seront délimitées avec un instrument pointu.

L'identification et la délimitation des taches du chromatogramme sous lumière ultra-violette doivent s'exécuter dans un très bref intervalle.

Ensuite, le dosage des alcaloïdes est effectué après l'élution des substances de l'adsorbant.

L'élution est effectuée avec un mélange de volumes égaux

de chloroforme et de méthanol (R).

Le dosage après l'élu-tion sera fait colorimétriquement, en utilisant comme réactif chromogène le p-diméthylaminobenzaldéhyde dans de l'acide sulfurique, 5 gouttes d'eau oxygénée, fraîchement préparée de 5 ml d'eau et une goutte de perhydrol (R). La détermination de la teneur sera réalisée en rapportant les extinctions lues à 570 nm à l'extinction d'une solution étalon d'alcaloïde à concentration connue.

B. Identification et dosage des alcaloïdes totaux de l'ergométrine, l'ergotamine, l'ergocristine, l'ergocornine et l'ergocryptine

On utilise la chromatographie de partage en couche mince, technique ascendante, en employant les moyens suivants:

Plaque de verre de 20 x 20 cm;

Adsorbant : silicagel G (R);

Solution d'imprégnation : formamide-acétone (R) (2:8);

Développant : éther éthylique-éther de pétrole (R)
(8,5 : 1,5);

Solutions à appliquer:

- (a) solution a : on ajoute 0,01 % de maléate d'ergométrine (s.r.) à un mélange de volumes égaux de chloroforme et méthanol (R) (étalon);
- (b) solution b : on ajoute 0,01 % de tartrate d'ergotamine (s.r.) à un mélange de volumes égaux de chloroforme et méthanol (R) (étalon);
- (c) solution c : on ajoute 0,01 % d'éthanesulfonate d'ergocristine (s.r.) à un mélange de volumes égaux de chloroforme et de méthanol (R) (étalon);
- (d) solution d : on ajoute 0,01 % d'éthanesulfonate d'ergocornine (s.r.) à un mélange de volumes égaux de chloroforme et de méthanol (R) (étalon);
- (e) solution e : on ajoute 0,01 % d'éthanesulfonate d'ergocryptine (s.r.) à un mélange de volumes égaux de chloroforme et de méthanol (R) (étalon);

(f) solution f : on utilise la solution étherique obtenue sous le titre "Dosage des alcaloïdes conformément à la méthode de la Pharmacopée Roumaine, III^e édition" (l'échantillon).

On introduit la plaque avec la couche de silicagel dans la cuve de développement et on laisse migrer les solvants d'imprégnation jusqu'à 5 mm du bord supérieur de la plaque. On maintient la plaque pendant 5 minutes à la température du laboratoire et on applique ensuite sur la ligne de départ de la moitié gauche, aux points a, b, c, d, e, les solutions-étalon et sur la moitié droite - l'échantillon (solution f), sur une distance de 5 cm.

a : 10 μ l de la solution a
b : 10 μ l de la solution b
c : 10 μ l de la solution c
d : 10 μ l de la solution d
e : 10 μ l de la solution e
f : 1 ml de la solution f

On introduit la plaque préparée dans la cuve et on laisse le développant migrer jusqu'à 5 cm du bord supérieur de la plaque. On sèche à la température du laboratoire et on examine sous lumière ultra-violette à 360 nm.

L'analyse sera continuée ensuite en utilisant la même technique que pour l'"Identification et le dosage de l'ergométrine, l'ergotamine et l'ergotoxine".

B I B L I O G R A P H I E

1. Ciulei I., Sommer L., Istudor V. - Cours de Pharmacognosie, tenu à la Faculté de Pharmacie de Bucarest, 1979, p. 230
2. Cucu V. Cours de Pharmacognosie, tenu à la Faculté de Pharmacie de Cluj-Napoca, 1978, p. 45

DOSAGE DES POLYPHENOLS PRESENTS DANS LES FEUILLES
D'ARTICHAUT (CYNARA SCOLYMUS L.)

Elena Tarpo +)

Venera Popescu ++)

+) Docteur en Pharmacie, chercheur à l'Institut pour le
Contrôle d'Etat des Médicaments et de Recherches Pharma-
ceutiques, Bucarest, Roumanie

++) Docteur en Pharmacie, chercheur à l'Institut pour le
Contrôle d'Etat des Médicaments et de Recherches Pharma-
ceutiques, Bucarest, Roumanie

I. GENERALITES

L'espèce Cynara scolymus L., l'artichaut, appartient à la famille des composées (Compositae).

L'espèce était connue et utilisée dans l'antiquité comme légume chez les Egyptiens et les Romains; elle a été introduite dans toute l'Europe au XVème siècle (1).

L'utilisation thérapeutique de l'artichaut sous forme d'infusion, de décoction ou d'extrait, pour ses vertus diurétiques, hypocholestérolémiantes, cholérétiques-cholagogues de la plante remonte à un passé lointain, mais c'est seulement pendant les dernières décennies que les recherches pharmacologiques et chimiques ont montré que les principes actifs de la plante sont de nature polyphénolique (dérivés oxyflavoniques et dérivés caféyl-quiniques ou orthodihydroxyphénoliques).

Ainsi on a établi que l'action diurétique est due tant aux dérivés caféyl-quiniques qu'aux constituants oxyflavoniques.

Les principes actifs responsables de l'action cholestérolytique ne sont pas encore trouvés, mais on a établi que les préparations à base de feuilles d'artichaut stimulent le métabolisme du cholestérol dans le foie et abaissent par conséquent la cholestérolémie.

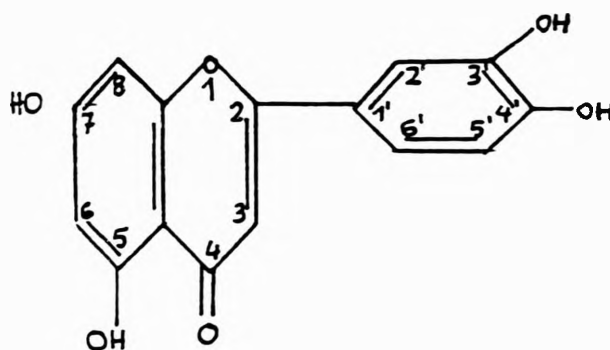
Les feuilles d'artichaut ont aussi une action protectrice contre la dégénérescence graisseuse du foie et une action de régénération des hépatocytes; très récemment on a démontré que les extraits d'artichaut sont bacteriostatiques de certains germes pathogènes.

La plante a été acclimatée aux conditions pédoclimatiques de la Roumanie, ce qui a permis sa culture sur de grandes superficies, fournissant ainsi la matière première nécessaire à l'industrie des médicaments.

L'industrie roumaine des médicaments utilise les feuilles d'artichaut à la préparation d'extraits hydroalcooliques fluides et secs dont on obtient le produit pharmaceutique "Anghirol" - soluté et dragées - largement utilisée comme cholérétique et cholagogue dans certaines affections hépatiques.

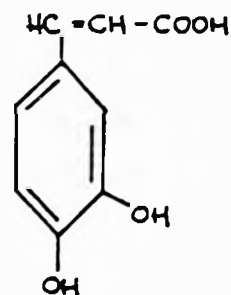
Comme l'on a déjà mentionné, les principes actifs de l'artichaut sont des oxyflavones et des dérivés orthodihydroxyphénoliques.

Les dérivés flavoniques se trouvent dans la plante sous forme non-glycosidée, comme par exemple la lutéoline (5,7,3',4'-tétrahydroxyflavone) et sous forme de dérivés glycosidés de la lutéoline - le cynaroside (la 7-glucosidelutéoline) et le scolymoside (la 7-rutinosidelutéoline). La teneur totale en dérivés flavoniques s'exprime en lutéoline ayant des valeurs comprises entre 0,10 et 0,25%.



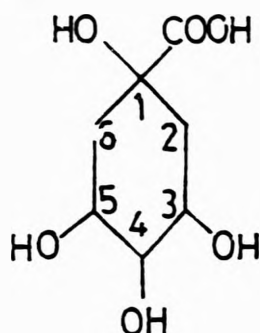
lutéoline

Les dérivés orthodihydroxyphénoliques sont représentés par l'acide caféique comme tel, ou par des dérivés qui résultent de l'estérification d'une molécule d'acide quinique avec une



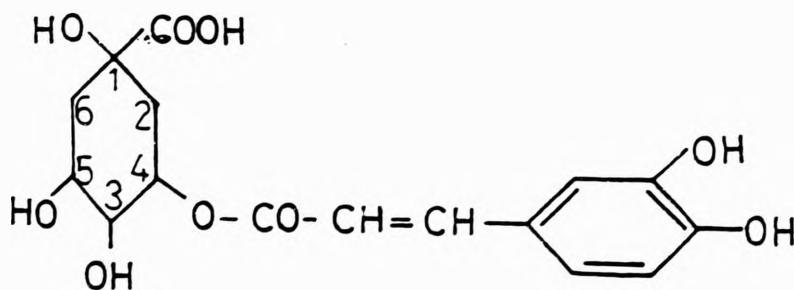
acide caféique

molécule d'acide caféique (dérivés monocaféylquiniques) ou de l'estérification d'une molécule d'acide quinique avec deux molécules d'acide caféique (dérivés dicaféylquiniques).



acide quinique

L'acide caféique libre se trouve dans l'artichaut seulement sous forme de traces. La plus grande partie des substances orthodihydroxyphénoliques des feuilles d'artichaut est formée par les dérivés monocaféylquiniques, parmi lesquels l'acide chlorogénique (3-caféylquinique), prédominant, peut atteindre environ 40% du total des substances orthodihydroxyphénoliques.

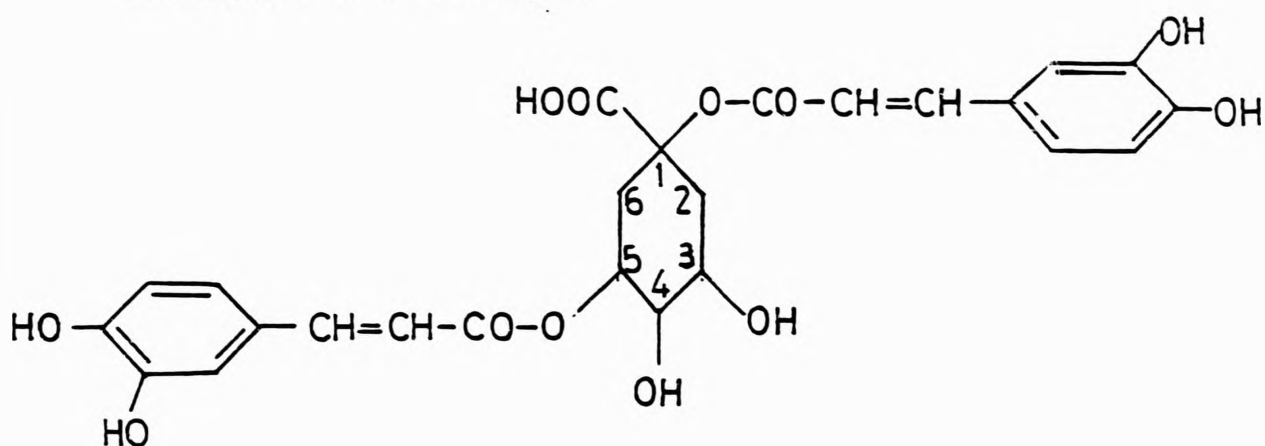


acide chlorogénique (3-caféylquinique)

On a isolé des feuilles d'artichaut l'acide néochlorogénique (5-caféylquinique) et l'acide cryptochlorogénique (4-caféylquinique).

Parmi les dérivés dicaféylquiniques, la cynarine (acide 1,5-dicaféylquinique) est considérée comme étant la substance la plus importante du fait de sa puissante action cholérétique,

cholagogue et diurétique.



Cynarine (acide 1,5-dicaféylquinique)

Les feuilles fraîches d'artichaut sont exemptes de cynarine ou en contiennent de très faibles quantités, mais celle-ci est présente dans la plupart des extraits; la cynarine résulte de la transformation de l'acide 3-caféylquinique pendant l'extraction des feuilles d'artichaut, surtout à l'eau chaude.

Dans les feuilles fraîches on trouve un dérivé dicaféylquinique, l'acide 1,3-dicaféylquinique, lequel, pendant l'extraction, se transforme aussi en cynarine.

Ayant en vue l'importance thérapeutique de la cynarine et le fait que d'autres dérivés caféylquiniques se transforment également en cynarine pendant l'extraction, la teneur en principes orthodihydroxyphénoliques des feuilles d'artichaut s'exprime en cynarine, celle-ci pouvant atteindre environ 1-2% du total de ces substances.

II. DETERMINATION QUANTITATIVE DES PRINCIPES ACTIFS

En tenant compte du fait que les principes actifs de l'artichaut sont les oxyflavones et les dérivés orthodihydroxyphénoliques, pour pouvoir apprécier la valeur thérapeutique des feuilles d'artichaut, la Pharmacopée Roumaine exige la détermination quantitative des deux catégories de substances (3).

A. Détermination quantitative des oxyflavones (3)

Pour déterminer les oxyflavones, on utilise la propriété de ces substances de former avec les ions de Al^{3+} des sels intérieurs (chélates) intensément colorés en jaune; on détermine l'extinction des solutions à la longueur d'onde de 470 nm. Pour déterminer la teneur en oxyflavones, on compare cette extinction avec les extinctions inscrites sur une courbe étalon établie à l'aide d'une solution de rutine à 0,01% dans du méthanol; le résultat obtenu est multiplié par 0,57 qui est un facteur de transformation de la rutine en lutéoline et représente le rapport des poids moléculaires de ces substances. Pour la détermination de la courbe étalon on utilise la rutine, car cette substance, en tant qu'oxyflavone, est largement utilisée en thérapeutique et peut donc être plus facilement procurée que la lutéoline.

On extrait une quantité de 2,000 g de feuilles pulvérisées d'artichaut avec du méthanol dans un appareil à extraction continue (du type Soxhlet) jusqu'à ce que l'alcool devient incolore. On transfère quantitativement l'extrait dans un ballon jaugé et on dilue avec du méthanol à 100 ml (solution A). On traite 10 ml de cette solution avec 10 ml d'acétate de sodium à 10%; on agite et on filtre (solution B).

On traite 5 ml de la solution B avec 3 ml de chlorure d'aluminium à 2,5%, dans un ballon jaugé de 25 ml, on dilue au trait de jauge, on agit et on laisse reposer pendant 45 minutes. On détermine l'extinction au photomètre à la longueur d'onde de 470 nm dans une cuve de 1 cm par rapport à un témoin préparé en ajoutant 20 ml de méthanol à 5 ml de solution B. L'extinction obtenue est transformée en grammes d'oxyflavones au moyen d'une courbe étalon établie comme suit: on transfère 1, 2, 3 et 4 ml d'une solution de rutine à 0,01% dans le méthanol dans 4 ballons jaugés à 25 ml; on ajoute dans chaque ballon 5 ml d'acétate de sodium et 3 ml de chlorure d'aluminium à 2,5% et on dilue avec du méthanol jusqu'au trait de jauge; on agite, on laisse reposer pendant 45 minutes et on détermine l'extinction dans les conditions précisées auparavant, par rapport à des solutions-témoins. Les solutions-témoins s'obtiennent en mesurant très exactement les mêmes volumes de solution de rutine, en

ajoutant 5 ml de la solution d'acétate de sodium et en diluant avec du méthanol jusqu'à 25 ml. A l'aide de la courbe étalon on transforme l'extinction de l'échantillon en grammes de rutine et, pour exprimer en lutéoline la teneur en oxyflavones, on multiplie les grammes de rutine par 0,57.

Conformément à la Pharmacopée Roumaine, les feuilles d'artichaut doivent contenir au moins 0,2% d'oxyflavones, exprimés en lutéoline (3).

Détermination quantitative des orthodihydroxyphénols cynariniques (3)

La méthode utilisée pour doser les polyphénols cynariniques est basée sur la propriété de ces substances de réduire en milieu alcalin le réactif de Folin.

L'extinction de la solution colorée est déterminée à 660 nm et puis on déduit la quantité d'orthodihydroxyphénols en la comparant avec les extinctions d'une courbe étalon établie avec des solutions de cynarine (1,2).

On traite 5 ml de la solution A, obtenue pour la détermination des oxyflavones, avec 5 ml de réactif de Folin, on agite et on filtre.

On dilue 1 ml de filtrat à 10 ml avec du carbonate de sodium à 20% dans un ballon jaugé de 10 ml. On détermine immédiatement l'extinction au photomètre à 660 nm dans une cuve de 1 cm par rapport à une solution de carbonate de sodium à 20%.

L'extinction obtenue est transformée en grammes de cynarine au moyen d'une courbe étalon, établie comme suit:

On transvase dans 4 ballons jaugés de 10 ml chacun 0,20; 0,30; 0,40; et 0,50 ml d'une solution méthanolique de cynarine à 0,01%. fraîchement préparée, on ajoute dans chaque ballon 1 ml de réactif de Folin et on dilue au trait de jauge avec une solution à 20% de carbonate de sodium en petites portions et on agite continuellement.

On détermine immédiatement les extinctions dans les conditions sus-mentionnées par rapport à un témoin préparé avec 1 ml de réactif de Folin et 9 ml de carbonate de sodium à 20%.

On calcule les orthodihydroxyphénols exprimés en cynarine en comparant l'extinction de l'échantillon avec les extinctions inscrites sur la courbe étalon; on la transforme en grammes de cynarine en tenant compte de la dilution de la solution de l'échantillon.

Conformément à la Pharmacopée Roumaine, les feuilles de Cynara doivent contenir au moins 1 g % d'orthodihydroxyphénols exprimés en cynarine.

Réactif de Tolin

On traite 10 g de wolframate de sodium ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) avec 10 ml d'acide phosphorique $d = 1,689$ et 75 ml d'eau distillée; on chauffe pendant 2 heures à l'ébullition dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant. Après refroidissement on complète à 100 ml avec de l'eau.

La Pharmacopée Roumaine est au nombre de pharmacopées, peu nombreuses, qui comprennent la monographie de l'artichaut (Cynara scolymus L.) et elle est l'unique pharmacopée qui exige la détermination quantitative des principes actifs de cette plante.

B I B L I O G R A P H I E

1. Ciulei I. (1979) - Farmacognozie (Pharmacognosie), Institut de Médecine et Pharmacie de Bucarest, vol. I, pp. 93-96
2. Cucu V. (1972) - Farmacognozie (Pharmacognosie), Institut de Médecine et Pharmacie de Cluj, pp. 135-140
3. + + + (1965) - Farmacopeea Română (Pharmacopée Roumaine), VIII^e éd., Editura Medicală, Bucarest, pp. 286-287

CONTRÔLE ANALYTIQUE DES HÉTÉROSIDES DIGITALIQUES

Vasile Calcandi +)

+) Docteur en pharmacie, chercheur à l'Institut pour le
Contrôle d'Etat des Médicaments et de Recherches
Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

Du point de vue pharmacodynamique les glucosides digitaliques représentent un groupe d'hétérosides ayant une certaine structure chimique et un effet pharmacodynamique spécifique sur le myocarde. Leur importance est bien connue, car ils constituent un groupe de médicaments de base dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Les hétérosides cardiotoniques utilisés en thérapeutique appartiennent surtout aux divers espèces de la digitale, ce qui explique leur dénomination.

Les hétérosides digitaliques proprement dits sont des cardénolides, une combinaison entre la génine (aglucone), qui a un noyau cyclopentanoperhydrophénantrénique substitué en position 17 par un cycle lactonique, et une ou plusieurs molécules de sucre, le plus important étant la digitonose.

Les hétérosides digitaliques sont des substances ayant une action pharmacodynamique très énergique et une grande toxicité.

Un contrôle rigoureux de leur qualité s'impose pour garantir une efficacité thérapeutique optimale.

Le contrôle de qualité des hétérosides digitaliques soulève néanmoins des problèmes particulièrement difficiles, à cause de la composition chimique complexe de la matière première dont ils sont extraits et à cause de leur grande labilité, qui peut mener à leur dégradation au cours de leur conservation. Mentionnons que des 19 espèces de la digitale, l'industrie utilise une seule espèce - Digitalis lanata Ehrh. - pour obtenir les hétérosides digitaliques utilisés en thérapeutique.

Le contrôle des hétérosides digitaliques purs ou dans diverses préparations pharmaceutiques comporte les étapes suivantes: l'identification de l'hétéroside, le contrôle de sa pureté et sa détermination quantitative. Nous passerons en revue brièvement ces étapes, en montrant les problèmes particuliers dans chaque cas et comment on peut les résoudre.

A. Identification des hétérosides

Les glucosides digitaliques donnent de nombreuses réac-

tions de couleur, dont certaines sont caractéristiques pour la gémine, et d'autres pour la chaîne glucidique.

Pour la gémine, sont spécifiques la réaction de Baljet et la réaction au dinitrobenzène en milieu alcalin, qui sont aussi utilisées dans la détermination des hétérosides.

Parmi les réactions dues à la chaîne glucidique mentionnons: les réactions au xanthyrol, à la dizanthy-urée et la réaction de Keller-Miliani (acide acétique, acide sulfurique, chlorure ferrique). Ces trois dernières réactions sont spécifiques pour la digitoxose; avec elles on ne peut identifier que les glucosides contenant ce sucre, d'ailleurs les seules hétérosides utilisés en thérapeutique.

Il faut toutefois préciser qu'aucune de ces réactions, - celle de Keller-Miliani étant la plus caractéristique - ne peut préciser quel glucoside digitalique se trouve dans une préparation: digitoxine, digoxine, deslanoside, etc., car tous donnent les mêmes réactions.

Le seul procédé qui permet l'identification précise de chaque glucoside est la méthode chromatographique, raison pour laquelle elle apparaît dans la majorité des pharmacopées. Les pharmacopées plus anciennes recommandaient la chromatographie sur papier, mais il y a une tendance générale d'utiliser la chromatographie en couche mince, car elle est plus rapide et assure des séparations très nettes.

La plupart des pharmacopées recommandent le kieselguhr comme adsorbant, et comme systèmes de solvants le mélange chloroforme-tétrahydrofuranne-formamide pour les glucosides primaires (qui contiennent du glucose au bout de la chaîne glucidique) et le mélange xylène-méthyl-éthylcétone-formamide pour les hétérosides secondaires (exempts de glucose).

Les taches peuvent être identifiés en utilisant comme réactifs l'acide trichloracétique et la chloramine dans l'alcool ou l'acide sulfurique dans l'alcool. On compare la tache de l'échantillon avec la tache de la substance de référence sur la même chromatoplaque.

B. Contrôle de la pureté

Comme nous l'avons déjà montré, les hétérosides digitaliques proprement-dits s'obtiennent à partir des feuilles de Digitalis lanata, où l'on trouve 68 hétérosides et génines. Ces derniers temps certains produits de semi-synthèse ont fait leur apparition, le point de départ étant représenté par les hétérosides naturels auxquels on greffe certains groupes. L'obtention des hétérosides digitaliques à l'état pur exige des opérations difficiles qui font augmenter de beaucoup le prix de revient du produit. On peut d'ailleurs se demander jusqu'à quel point faut-il écarter les autres hétérosides présents dans les feuilles car tous les hétérosides digitaliques ont en principe la même action sur le myocarde malade; les différences résident dans l'intensité de l'action, la rapidité de son installation, sa durée, le danger de l'accumulation dans l'organisme et certaines différences de nuance de l'action elle-même. Tenant compte de ces différences, les pharmacopées admettent une certaine quantité d'autres hétérosides, quantité qui varie d'un cas à l'autre.

Le contrôle de la pureté des digitaliques peut être effectué par plusieurs procédés :

(a) par la chromatographie on peut établir le pourcentage de chaque impureté hétérosidique à l'aide de substances de référence placées dans certaines quantités sur le chromatogramme: la fluorescence de chaque tache doit pas être plus intense que celle de la substance de référence, car cela dénoterait la présence d'une plus grande quantité d'impureté .

(b) les glucosides ayant un oxhydryle fixé sur le carbone 16 (gitoxine, lanatoside B, etc.), étant des impuretés pour les produits utilisés en thérapeutique, peuvent être dosés par spectrophotométrie. On utilise un mélange de glycérine-acide chlorhydrique pour établir le pourcentage des 16 - hydroxyglycosides.

(c) le pourcentage total d'impuretés peut être aussi établi indirectement, en calculant la différence entre le total hétérosides et la substance de base éluée du chromatogramme. Le procédé est présenté plus loin.

3. Détermination quantitative

Pour le dosage des hétérosides la plupart des pharmacopées utilisent la méthode colorimétrique avec un picrate alcalin (le réactif de Baljet). Par cette réaction, on peut doser globalement tous les cardénolides-glucosides et génines. Dans ce même but, on peut utiliser le dinitrobenzène en milieu alcalin. Par les réactions au xanthyrol, à la dixanthyl-urée, ou Kellier-Kilian on peut doser ensemble tous les glucosides qui contiennent de la digitoxose.

Selon certaines pharmacopées modernes l'hétéroside de base est dosé après séparation chromatographique et élution de la tache de la chromatoplaque. Dans ce cas, la mise en évidence de la tache est possible en utilisant des vapeurs d'iode qui n'empêchent pas le dosage. Pour doser, on peut utiliser les réactions au xanthyrol ou à la dixanthyl-urée. Le dosage de l'hétéroside de base peut être complété avec le dosage des hétérosides totaux.

En cas de préparations pharmaceutiques (comprimés, dragées, solutés, solutés injectables, suppositoires) contenant des hétérosides digitaliques, les principes actifs seront extraits d'abord de la composition respective, en continuant ensuite avec les opérations d'identification, de contrôle de la pureté, de dosage, montrées ci-dessus.

Ci-après, nous présentons le texte de la Pharmacopée Roumaine, III^e édition, concernant "l'Identification", les "Conditions de pureté" et la "Détermination quantitative" du Lanatoside C.

1. Identification

(a) on dissout 1 mg. de substance dans 2 ml. d'acide acétique (R) qui contient une goutte de chlorure ferrique (R) et dépose la solution à la surface de 2 ml. d'acide sulfurique (R); au niveau de séparation des 2 liquides apparaît un anneau brun et la couche supérieure d'acide acétique devient d'abord verdâtre et bleue ensuite.

(b) sur le chromatogramme du point b sous "Conditions de pureté" il devra se produire une tache fluorescente bleu-gris

avec le même R_f, d'environ 0,30, que la tache du lanatoside C du chromatogramme a .

2. Conditions de pureté

(a) Aspect de la solution. La solution préparée pour la détermination des "16-hydroxy-glucosides calculés en lanatoside D" doit être limpide et incolore.

(b) Autres hétérosides et génines. On procédera suivant les normes prévues aux "Déterminations chromatographiques".

Adsorbant: Kieselguhr G (R)

Solution d'imprégnation: formamide (R)-acétone (R) (10:90)

Développant: chloroforme-tétrahydrofuranne (R)-formamide(R) (50:50:6). On mélange le chloroforme avec le tétrahydrofuranne, après refroidissement on ajoute du formamide et on agite jusqu'à dissolution.

Solutions:

Solution a : lanatoside C (substance de référence s.r.) 0,1000 g₅ dans du méthanol (R) (étalon)

Solution b : lanatoside C 0,1000 g₅ dans un mélange de volumes égaux de chloroforme et de méthanol(R) (échantillon)

Solution c : désacétyllanatoside C (s.r.) 0,0020 g₅ dans un mélange de volumes égaux de chloroforme et de méthanol (R) (étalon)

Solution d : lanatoside B (s.r.) 0,0080 g₅ dans un mélange de volumes égaux de chloroforme et de méthanol (R) (étalon)

On introduit la plaque avec la couche de Kieselguhr dans une chambre à chromatographie contenant la solution d'imprégnation et développe sur un parcours d'environ 15 cm. On maintient la plaque à la température du laboratoire pendant 5 minutes et dépose sur la ligne de départ, aux points a, b, c et d les solutions :

a: 10 µl. de solution a (10 µg de lanatoside C s.r.)

b: 10 µl. de solution b (10 µg de lanatoside C)

c: 10 µl. de solution c (0,2 µg de désacétyllanatoside C s.r.)

d: 10 μ l. de solution d (0,8 μ g de lanatoside B c.r.)

On introduit la plaque dans la chambre à chromatographie qui contient le développant et laisse jusqu'à ce qu'il ait parcouru 14 cm. par rapport à la ligne de départ. On sèche à 115°C pendant 20 minutes, refroidit à la température du laboratoire et pulvérise uniformément avec un mélange d'acide trichloroacétique-chloramine (R). On maintient de nouveau à 115°C pendant 5 minutes et examine immédiatement sous lumière ultra-violette à 360 nm.

Sur le chromatogramme b, en dehors de la tache du lanatoside C, peuvent apparaître également les taches suivantes :

. une tache à fluorescence bleu-clair qui ne doit dépasser en intensité la fluorescence de la tache du désacétyllanatoside C du chromatogramme c, les deux avec la même valeur R_f (C,10 environ);

. une tache à fluorescence bleue, avec un R_f égal à C,13 environ (lanatoside D);

. une tache à fluorescence bleu-jaunâtre ou jaune, ayant le même R_f (égal à C,45) que la tache du lanatoside B du chromatogramme d;

. une tache avec un R_f égal à C,80 environ, très faiblement fluorescente, à peine visible (lanatoside A).

(c) Les 16-hydroxyglucosides calculés en lanatoside B doivent représenter 8% au maximum.

On dissout 0,0500 g de substance dans 10 ml d'un mélange de volumes égaux de chloroforme et de méthanol (R) dans un ballon jaugé, transvase 1 ml de cette solution dans un ballon jaugé de 25 ml. et évapore au bain-marie chauffé à 40°C, à l'aide d'un courant d'air, jusqu'à un volume de 0,3 - 0,4 ml. On complète ensuite jusqu'à 25 ml. avec un mélange de volumes égaux d'acide chlorhydrique (R) et de glycérine (R) et agite. On lit après 60 minutes l'extinction de la solution au spectrophotomètre à 352 nm., dans une cuve de quartz de 1 cm., par rapport à un mélange de volumes égaux d'acide chlorhydrique (R) et de glycérine (R).

L'extinction de l'échantillon ne doit pas dépasser

l'extinction d'une solution étalon obtenue avec 1 ml de lanatoside B (s.r.) 0,0400 g β en mélange avec des volumes égaux de chloroforme et de méthanol (R), traitée dans les mêmes conditions que l'échantillon.

(d) Perte à la dessiccation. Une quantité de 0,250 g de substance déséchée pendant 24 h sur du pentoxyde de phosphore dans le vide ne perd plus de 7,5% de son poids.

(e) Résidu à la calcination : pas plus de 0,2%.

On calcine avec de l'acide sulfurique la substance utilisée pour déterminer la perte à la dessiccation.

(f) Détermination quantitative. On dissout 0,050 g de substance en 50 ml de méthanol (R), dans un ballon jaugé. 25 ml de cette solution sont dilués avec du méthanol à 50 ml, dans un ballon jaugé. A 10 ml de cette solution on ajoute 5 ml d'acide picrique solution alcaline (R), fraîchement préparée et 5 ml d'eau. On place le flacon avec cette solution en bain-marie à 20°C, à l'abri d'une lumière trop intense; 30 minutes après que le réactif ait été ajouté, on lit l'extinction de la solution à 495 nm, dans une cuve de 1 cm, par rapport à un mélange de 10 ml de méthanol (R), 5 ml d'eau et 5 ml de solution alcaline d'acide picrique (R), préparée dans les mêmes conditions. On lit parallèlement l'extinction d'une solution étalon obtenue avec 10 ml de lanatoside C (s.r.) 0,005 g β dans du méthanol, traitée dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Le lanatoside doit contenir 95-105% d'hétérosides cardiotoniques exprimés en 3 β , 12 β , 14 β trihydroxy-5 β -card-20(22)-enolide-3-monoacétyl-trigitoxoglucosides, rapportés à la substance sèche.

Acide picrique solution alcaline: à 20 ml d'acide picrique 1% (R) on ajoute 2 ml d'hydroxyde de sodium 10% (R). La solution doit être fraîchement préparée.

Acide trichloracétique-chloramine: à 15 ml d'acide trichloracétique 25% en alcool on ajoute 1 ml chloramine B (R) solution 2% en alcool. La solution doit être fraîchement préparée.

B I B L I O G R A P H I E

1. + + + Arzneibuch der Deutschen Demokratischen Republik,
Berlin, 1980, vol. III-IV
2. + + + Farmacopeea Română, ed. III, București, 1976
3. Kaiser F. - Chem. Ber., 1955, 88, p. 556
4. + + + Pharmacopée Européenne, 1969, vol. I, p. 294-300
5. + + + Pharmacopée Française, ed. IX, 1976

CONTRÔLE PHYTOBIOLOGIQUE DE L'ACTIVITE DES
CYTOSTATIQUES ALKYLANTS (RADIOMIMETIQUES)
ET DES ANTIFUSORIAUX

Prof. Dumitru Grigore Constantinescu +)

+) Membre correspondant de l'Académie des Sciences Médicales
de Roumanie,
Membre correspondant de l'Académie de Pharmacie de France

I. NOTIONS GENERALES

Dans l'acception scientifique initiale, la notion de cyto-
statique définissait toute substance chimique, naturelle ou de
synthèse, capable d'inhiber la division des cellules animales
et végétales. A la suite de la mise au point de la chimiothérapie
anticancéreuse, la notion de cytostatique s'est limitée surtout
à définir les produits chimiques aptes à arrêter le développement
des cellules néoplasiques ou même à les détruire.

A. Division cellulaire

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action des cyto-
statiques, quelques notions sur la division cellulaire s'imposent
d'être rappelées.

Toute cellule eucaryote (du grec: eu = vrai; caryos =
noyau) subit dans sa vie au moins une division, à la suite de
laquelle il résulte deux cellules-filles, chacune ayant des pro-
priétés physiologiques et génétiques identiques à celles de la
cellule-mère.

L'examen au microscope photonique (on dit souvent, d'une
manière impropre, optique) montre que la division de la cellule,
fût-elle animale ou végétale, comporte aussi bien la division
du noyau - dénommée caryocinèse ou mitose, que la division du
cytoplasme - dénommée cytodièrese ou cytocinèse. L'examen, tou-
jours au microscope photonique, révèle également que la mitose,
bien que son déroulement soit en réalité continu, comprend quatre
phases, bien distinctes, désignées classiquement: prophase, méta-
phase, anaphase et télophase, qui se succèdent régulièrement
dans les conditions d'une vie normale de la cellule.

La prophase se caractérise par l'apparition des chromosomes
clivés longitudinalement, la disparition des nucléoles et de la
membrane nucléaire et la mise en place du fuseau achromatique.
La métaphase est caractérisée par une disposition régulière des
chromosomes clivés en plaque équatoriale et la formation défini-
tive du fuseau achromatique, dénommé aussi l'appareil fusorial.
De même, on constate qu'à la fin de cette phase chaque chromo-

some donne deux chromosomes-fils, dont chacun est attiré vers l'un des pôles de la cellule; c'est donc un même lot de chromosomes qui subit d'une part et d'autre de l'équateur cellulaire l'ascension polaire. L'anaphase c'est le stade de la montée des chromosomes-fils aux pôles de la cellule. La dernière phase, c'est-à-dire la télophase, matérialise la formation de deux noyaux-fils à partir de deux lots de chromosomes qui se sont séparés durant l'anaphase. Le début de ce stade est marqué par la fin de la migration polaire de deux groupes chromosomiques et par la désorganisation des fibres fusoriales; on assiste aussi à la disparition des chromosomes, à la formation des nucléoles et à la reconstitution de la membrane nucléaire. A la fin de la télophase, la région de l'ancienne plaque équatoriale organise la formation de la future membrane cellulaire (paroi squelettique) qui séparera deux cellules-filles semblables à la cellule-mère (voir Planches 1 et 2).

B. Action exercée par certaines substances chimiques sur la division cellulaire

Les recherches effectuées, surtout pendant les dernières quarante années, ont révélé que de nombreux composés chimiques naturels et de synthèse sont capables d'influencer la division cellulaire, ou plus exactement l'activité mitotique. Toutes ces substances ont été dénommées antimitotiques ou poisons de la mitose. A l'aide des techniques modernes judicieusement combinées (microscopies photonique et électronique, cytophotométrie, autohistoradiographie) on a précisé qu'en fonction de leur structure chimique les antimitotiques ont comme point d'attaque:

- 1) soit l'entrée des cellules en mitose,
- 2) soit le fonctionnement (blocage) du fuseau achromatique,
- 3) soit la chromatine, ou
- 4) soit la cytodièrese.

1. Action exercée sur l'entrée des cellules en mitose

En tenant compte des acquis modernes, il résulte que de nombreuses substances chimiques et de structures différentes sont capables de bloquer l'entrée des cellules en mitose, ce qui

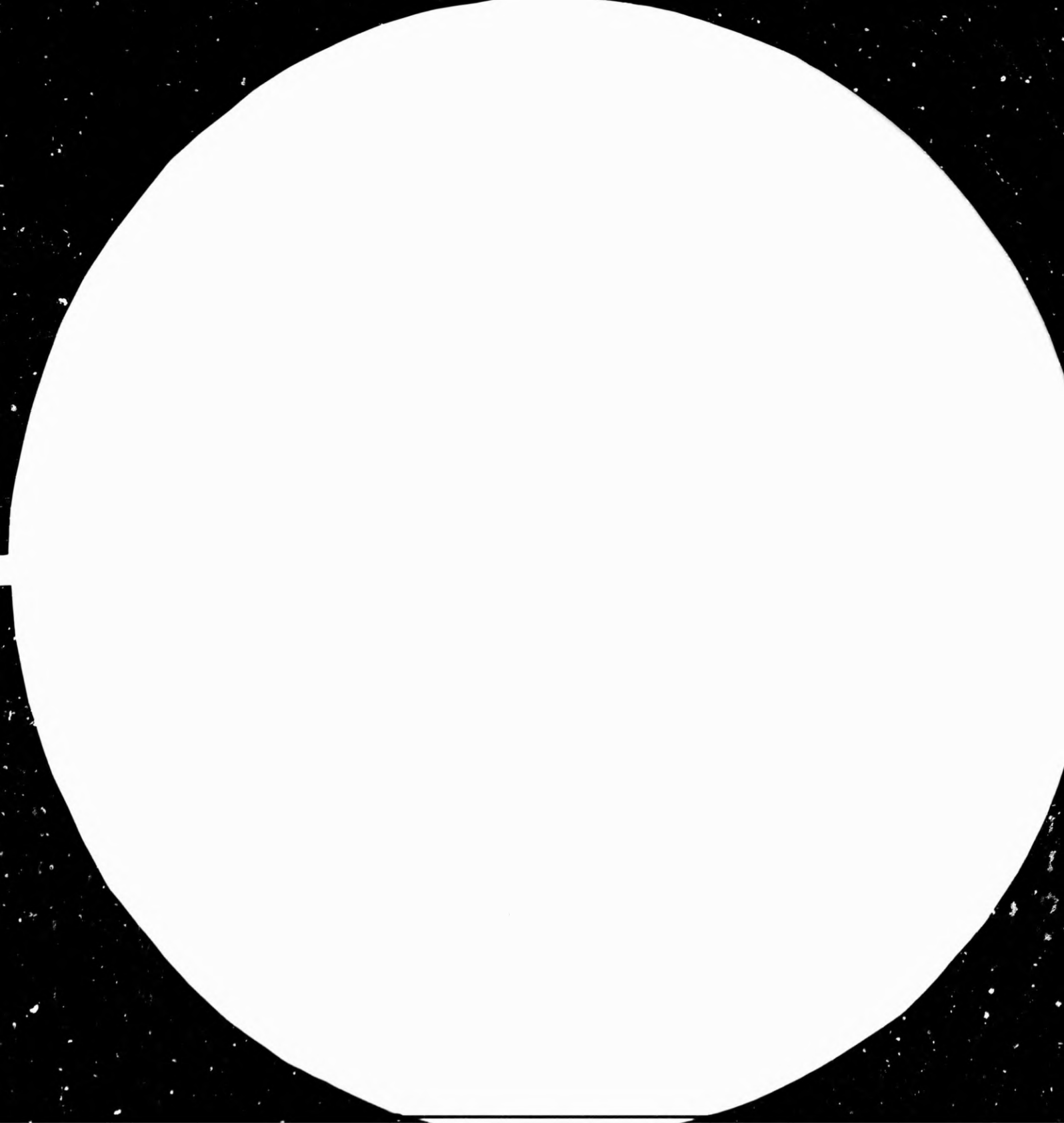
justifie leur dénomination d'agents mitostatiques ou de mito-déresseurs. Cette action se manifeste soit par l'inhibition de la biosynthèse des protéines (exemple: puromycine, chloramphénicol, actidone, etc), soit par le trouble de la réplication du ADN (exemple: hydroxyurée, les dérivés de la méthylhydrazine, etc), ou encore par l'inhibition de la biosynthèse des ARN messager et de transfert (exemple: l'actinomycine D). A la suite de toutes ces actions, la cellule ne se divise plus et finit par mourir.

2. Blocage de l'appareil fusorial

Un certain nombre de produits chimiques (exemple: la colchicine, la vincalécoblastine et la vincristine - alcaloïdes biosynthétisés par Vinca rosea, la podophyllotoxine, ainsi que des sels minéraux de métaux lourds) inhibent le fonctionnement du fuseau achromatique, en lui supprimant le caractère anisotropique et fibrillaire. A la suite de cette action, les chromosomes ne peuvent plus migrer vers les pôles de la cellule, restant répartis au hasard dans le cytoplasme et donnant naissance à des images mitotiques anormales. On a donné à ces composés le nom d'agents mitoclasiques ou antifusoriaux et de stathmocynèse (du grec: stathmos = arrêt) à la mitose aberrante résultée. Les stathmométaphases à chromosomes dispersés, les stathmométaphases en étoile et les stathmométaphases fortement polyploïdes sont les images mitotiques anormales les plus fréquentes révélées par l'examen microscopique (voir Planche III).

Les études au microscope électronique et biochimiques effectuées ces dernières années ont précisé que le fuseau achromatique est constitué d'une série d'infrastructures appelées microtubules dont la tubuline est la substance de base. La tubuline est un hétérodimère de nature protéique formé de tubuline α et de tubuline β . Sous l'action de ces cyostatiques, les deux tubulines α et β ne peuvent plus se combiner pour former l'hétérodimère et, par conséquent, les microtubules ne se forment plus. Comme ils jouent le rôle de cytosquelette et de transporteur d'eau, d'oxygène et d'autres substances indispensables au bon fonctionnement de la cellule, celle-ci dépérit.

84.08.21
AD.85.0

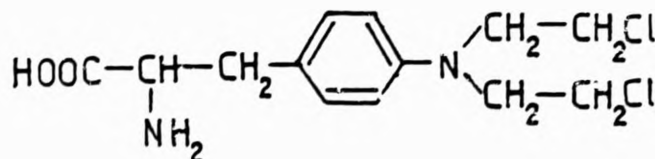
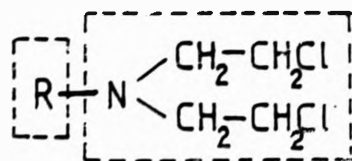




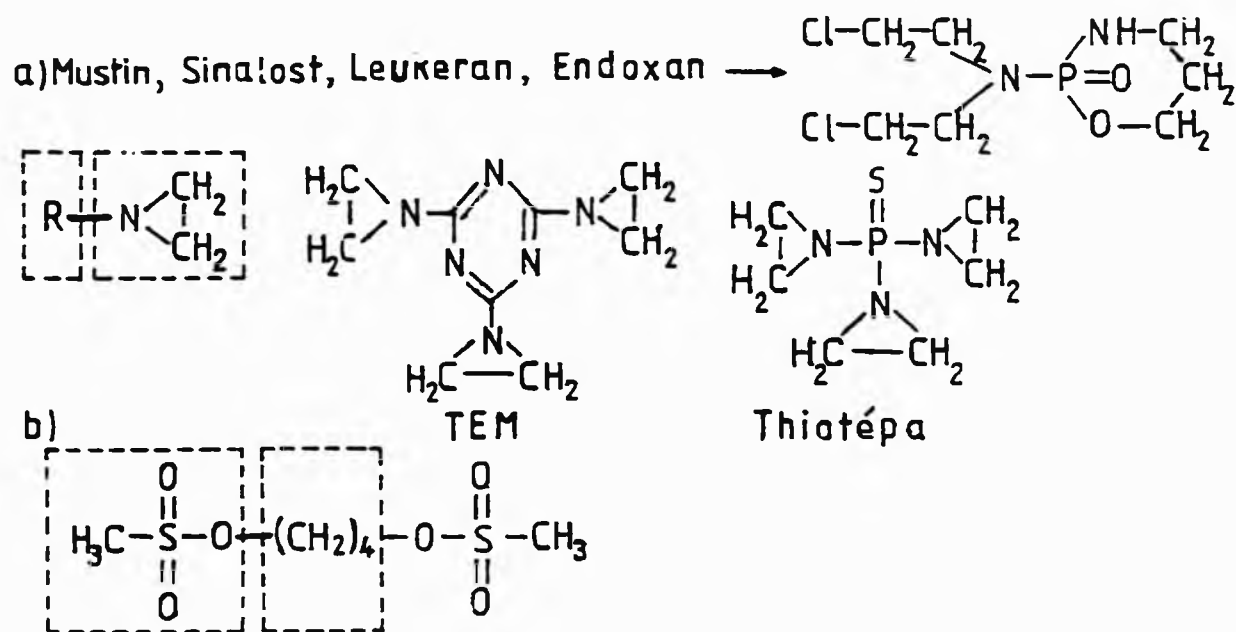
MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

3. Action exercée sur la chromatine

Les expériences effectuées au début avec l'azote-ypérite puis avec d'autres composés de synthèse sur des tissus animaux, ainsi que sur des cultures cellulaires (humaines et animales) ont prouvé que ces substances produisent des lésions chromosomiques observables, notamment la fragmentation des chromosomes, l'apparition des ponts ana- et télophasiques, ainsi que des micronoyaux. Toutes ces altérations chromosomiques rappellent celles produites sur le même matériau par les radiations ionisantes (voir Planche V). L'effet produit par ces composés chimiques est connu sous le nom d'effet chromatoclasique ou action chromatoclasique et les produits respectifs - poisons chromosomiques, agents chromatoclasiques ou encore composés radiomimétiques, par analogie de leur effets sur la division cellulaire avec ceux des rayons X ou des rayonnements émis par les corps radioactifs. L'emploi de ces substances marquées, ainsi que les analyses chromatographiques ont démontré qu'elles ont comme point d'attaque surtout l'ADN chromatinien, le constituant majeur des chromosomes. Des études biochimiques et pharmacologiques ont précisé que les composés radiomimétiques, comme toute substance chimique physiologiquement active, doivent leur action antimittotique à la présence, dans leur structure, d'une molécule support et d'un groupe actif cytotatique. La molécule support confère certaines propriétés physico-chimiques qui manifestent une affinité pour le substrat biologique, tandis que le groupe actif détermine l'activité antimittotique. Il est bien établi que les restes: (a) -bisβ-chloréthyle fixé sur un atome d'azote ($-N \begin{matrix} \diagup CH_2-CH_2Cl \\ \diagdown CH_2-CH_2Cl \end{matrix}$); (b) -éthylèneimine ($-N \begin{matrix} \diagup CH_2 \\ | \\ \diagdown CH_2 \end{matrix}$); (c) -méthanesulfonyl ($-O-SO_2-CH_3$) sont les groupements cytotatiques les plus actifs.



Sarcoclysine



c) Myleran ou Misulban

Bien que le mécanisme d'action des poisons chromosomiques ne soit pas suffisamment précisé, on admet pourtant qu'il s'agit d'une réaction d'alkylation (alcoylation), ce qui vaut à cette catégorie de substances aussi le nom "d'agents ou cytostatiques alkylants", d'ailleurs assez usité. Soulignons finalement que la mitose végétale est moins sensible à l'action des alkylants que les mitoses animale et humaine.

4. Action exercée sur la cytodièrese

De nombreuses recherches effectuées en Roumanie et à l'étranger sur la cellule végétale en division ont démontré que les bases (alcaloïdes) puriques n'inhibent pas la caryocinèse, mais, entre les noyaux-fils le cloisonnement n'a pas lieu, ou n'a lieu que d'une manière incomplète; ces deux noyaux, ou l'un d'entre eux, peuvent, à leur tour, se diviser; d'où la formation, après quelque temps de traitement, de cellules à trois, quatre, six noyaux. Lorsque deux noyaux d'une même cellule entrent simultanément en mitose, il arrive que les deux figures mitotiques se confondent, d'où la formation d'une plaque équatoriale diploïde; ces processus se répétant on finit par obtenir des images métaphasiques géantes (voir Planche IV).

En dehors de ces alcaloïdes il existe également d'autres substances qui inhibent la biogénèse totale, ou partielle du cloisonnement cellulaire; tous ces composés sont connus sous le nom d'agents stathmodiérétiques et la mitose induite par eux

sous le nom de stathmodiérèse.

Bien que les alcaloïdes puriques n'influencent point la division de la cellule animale et humaine, saine ou cancéreuse, nous avons considéré nécessaire de présenter leur action sur les cellules méristématiques végétales puisque, comme il résultera plus loin, la caféine particulièrement sensibilise ces cellules à l'action des cytostatiques alkylants.

II. LA CELLULE VÉGÉTALE - TEST RAPIDE DE L'ACTIVITÉ DES MÉDICAMENTS ALKYLANTS ET ANTIFUSORIAUX

Il résulte des données sus-mentionnées que de nombreux composés sont capables d'influencer la division cellulaire animale et végétale et que l'aspect des images mitotiques produites est en rapport avec la structure chimique de ces composés. Les savants ont accordé une grande importance à ces troubles mitotiques, en vue de l'utilisation de ces substances d'une part en chimiothérapie des états cancéreux et d'autre part pour élaborer des techniques rapides pour tester l'activité cytostatique des médicaments antinéoplasiques, particulièrement dans le cas des produits alkylants, dont les groupements actifs sont très labiles de sorte que les médicaments respectifs perdent leur valeur thérapeutique.

On sait que les procédés qui emploient des animaux porteurs de tumeurs malignes, ainsi que des cultures cellulaires cancéreuses - surtout du type Héla - sont largement utilisés dans les recherches visant à découvrir des nouveaux produits antinéoplasiques. Mais, ces techniques sont moins adéquates pour le contrôle biologique rapide de ces médicaments, puisqu'elles sont laborieuses, coûteuses et nécessitent souvent un long temps pour aboutir à de résultats significatifs.

Depuis une vingtaine d'années nous avons étudié la possibilité de substituer dans le contrôle rapide des cytostatiques des méthodes phytobiologiques aux techniques ci-dessus mentionnées. Nos recherches ont eu comme point de départ les résultats qui ont révélé que les cellules méristématiques végétales, particulièrement celles des pointes des racines, présentent une structure et ultrastructure très proches de celles des cellules

animales.

De nombreuses expériences effectuées sur des plantules de blé, à l'Institut pour le Contrôle d'Etat des Médicaments et à la Faculté de Pharmacie de Bucarest, nous ont permis d'élaborer des méthodes phytobiologiques pour tester l'activité cyto-statique des médicaments alkylants et des antifusoriaux. Nous avons choisi comme réactif phytobiologique les plantules de blé, parce que les méristèmes de leur pointes radiculaires ont un indice mitotique élevé, c'est-à-dire un grand nombre de cellules en division caryocinétique. En plus, ce réactif est très facile à procurer et à manipuler.

Précisons que les méthodes phytobiologiques élaborées en Roumanie ne nécessitent pas plus de 24 à 48 heures d'expérience et conduisent, particulièrement dans le cas des alkylants, à de résultats similaires à ceux fournis par l'emploi de la cellule animale.

A. Méthode phytobiologique pour tester l'activité des cytostatiques alkylants

1. Principe de la méthode

La méthode élaborée par nous consiste à déterminer la concentration minimale active ou CM_A (cf. lat. concentratio minima activa), c'est-à-dire la plus petite quantité de composé, qui, après dissolution dans 100 ml de solution millimolaire de caféine^{†)}, est capable de provoquer l'altération de toutes les figures mitotiques des cellules méristématiques des racines de blé, placées pendant 24 heures à la température de $25^{\circ} \pm 1^{\circ}C$ dans cette solution. Les lésions cytologiques produites doivent se caractériser par l'arrêt des mitoses, la fragmentation des chromosomes, la formation de ponts anaphasiques, l'apparition de micronoyaux et de noyaux de formes aberrantes (voir Planche VI).

Nous considérons comme important de souligner que les lésions biologiques sont identiques à celles qui sont provoquées chez les tissus animaux par les mêmes composés, administrés sans

^{†)} Précisons qu'à la suite de nombreuses études cytologiques nous avons démontré que la caféine en faibles concentrations sensibilise les cellules méristématiques des racines du blé à l'action des alkylants sans altérer ni la caryocinèse, ni la cytocinèse.

caféine, ainsi que par les radiations ionisantes.

L'examen cytologique du matériel végétal se fait par la technique au carmin acétique, ou par d'autres procédés semblables.

2. Mode opératoire

(a) Germination des caryopses de blé

On place les caryopses de blé (Triticum vulgare Vill.) dans l'eau pendant 4 heures et les met ensuite à germer, à $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, dans des boîtes Pétri, ayant le diamètre de 20 à 25 cm et dont le fond est couvert d'une rondelle de papier-filtre imbibée d'eau de robinet bouillie et refroidie. Les plantules de blé résultantes sont prêtes d'être expérimentées quand leur racine principale atteint environ 1 cm de longueur.

(b) Détermination de la concentration minimale active (CM_A)

On pipette les quantités de solution de cytostatique, de caféine M/500 et d'eau bouillie et refroidie mentionnées dans le tableau No. 1 dans chacune des 11 boîtes Pétri (série A), hautes de 4 à 5 cm et d'un diamètre de 10 cm.

Tableau 1

Préparation des dilutions de la série A

No. de la boîte	Solution de cytotatique (ml)	Solution de caféine M/500 (ml)	Eau bouillie et refroidie (ml)	Volume total (ml)
I	1,00	7,50	6,50	15
II	2,00	7,50	5,50	15
III	3,00	7,50	4,50	15
IV	3,50	7,50	4,00	15
V	4,00	7,50	3,50	15
VI	4,50	7,50	3,00	15
VII	5,00	7,50	2,50	15
VIII	5,50	7,50	2,00	15
IX	6,00	7,50	1,50	15
X	6,50	7,50	1,00	15
XI	7,50	7,50	-	15

On introduit dans chaque boîte Pétri 10 caryopses germés (plantules de blé) et on les place pendant 24 heures au thermostat à la température de $25^{\circ} + 1^{\circ}\text{C}$. Les témoins sont constitués par des plantules de blé cultivées dans les mêmes conditions de température, mais sur des milieux sans caféine (série B).

(c) Préparation de la solution du cytostatique à analyser

Dans un ballon jaugé de 100 cc on dissout dans de l'eau bouillie et refroidie le cytostatique à tester, dont la concentration varie d'un composé à l'autre, mais toujours quelques minutes avant de commencer l'expérience, compte tenu de la labilité de leurs groupements actifs, tout particulièrement en milieu aqueux.

(d) Préparation du colorant

On utilise, d'habitude, le procédé de coloration rapide à l'orcéine acétique, préparée comme suit:

Solution de base:

Orcéine pure 2,2 g
Acide acétique glacial ad ... 100 ml

On dissout l'orcéine dans l'acide acétique glacial à la température d'ébullition et on laisse bouillir encore pendant 2-3 minutes; après refroidissement on filtre.

De cette solution de base on prépare extemporanément la solution diluée suivante:

Solution de base 45 p
Eau distillée 55 p
HCl N/1 10 p

(e) Prélèvement pour examen cytologique

On prélève, dans chaque cas, au hasard, 5 plantules de blé, on les place sur du papier-filtre et les méristèmes sont obtenus en sectionnant au scalpel les 2-3 mm terminaux de la racine principale de chaque plantule. On commence avec la boîte Pétri No. 1. Les pointes radiculaires sont plongées rapidement, pour chaque lot, dans un creuset de porcelaine, ayant le diamètre de 2 cm, contenant 3 ml de solution d'orcéine diluée. On chauffe très doucement sur un microbec, jusqu'à l'émission de vapeurs, mais sans atteindre l'ébullition, pour prévenir l'hydro-

lyse de la chromatine. On couvre le creuset d'une plaque de verre, pour éviter l'évaporation et on laisse refroidir au moins 10 minutes à la température du laboratoire. On place les 5 pointes radiculaires sur une lame de verre dans 2-3 gouttes de solution d'orcéine diluée; on recouvre d'une lamelle et on dissocie la pointe radiculaire par une légère pression convenablement exercée avec le pouce, jusqu'à l'obtention d'une couche régulière unicellulaire.

(f) Examen microscopique

On examine les préparations au microscope photonique, à l'immersion dans la glycérine, en étudiant chaque pointe radiculaire. Les résultats sont concluants quand 4 sur 5 pointes présentent toutes les figures mitotiques altérées. La boîte Pétri où l'on constate pour la première fois les résultats correspond à la CM_A .

(g) Evaluation de la CM_A

La valeur de la CM_A est obtenue par la formule:

$$CM_A = c \times 6,66$$

dans laquelle

c = quantité de cytostatique de la boîte Pétri correspondant à la plus grande dilution dans laquelle on a observé pour la première fois l'altération de toutes les figures mitotiques, et

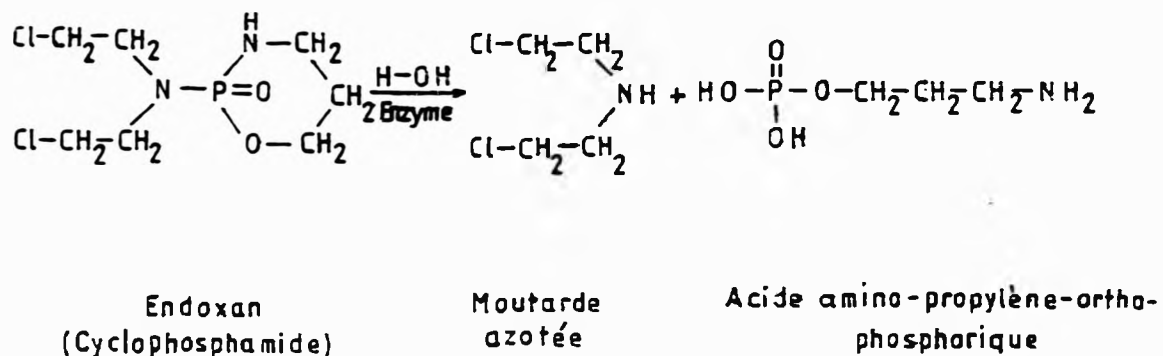
$$6,66 = \frac{100}{15} \quad (\text{volume total de liquide de chaque boîte})$$

Pour vérifier ces résultats on examine par la même méthode les pointes radiculaires de la boîte Pétri-témoin (série B), qui porte le même numéro que la boîte Pétri de la série A et qui a servi à établir la CM_A . Cet examen révèle d'habitude une faible action mitodépressive, c'est-à-dire un nombre réduit de mitoses et sans présenter l'altération des chromosomes.

Notons qu'à l'exception de l'Endoxan, cytostatique alkylant ayant des caractéristiques particulières, cette méthode permet de tester l'activité de tous les composés radiomimétiques utilisés dans le traitement du cancer.

(h) Mise en évidence par voie phytobiologique de l'activité
cytostatique de l'Endoxan

L'Endoxan, ou Cytosan, ou Clafen, ou Cyclophosphamide, est le N,N-bis-(β -chloréthyle)-N'-O-propylène-phosphoramide. Ce produit antitumoral n'agit qu'au niveau des tissus cancéreux riches en phosphamidase et phosphatases; sous l'action de ces enzymes, le cyclophosphamide met en liberté son groupement cyto- statique, c'est-à-dire la moutarde azotée (la partie active) et l'acide amino-propylène-ortho-phosphorique (dépourvu d'activité cytostatique):



Il faut noter également que ce produit exerce une faible action radiomimétique sur les cultures des cellules tumorales cultivées in vitro. Ce manque d'activité justifie la difficulté que soulève la question du contrôle rapide de l'activité cyto- statique de ce produit, qui connaît une assez grande utilisation en cancérologie.

Basés sur l'action sensibilisatrice de la caféine, ainsi que sur les résultats des expériences effectuées sur des tissus animaux, nous avons abouti à élaborer un procédé rapide pour tester ce cytostatique dont la technique est la suivante: d'une part on prépare une solution M/500 de caféine à laquelle on ajoute 8 g de chlorure de sodium (NaCl) et d'autre part - une solution d'Endoxan (Cyclophosphamide) 0,8 g%; les solutions seront préparées avec de l'eau de robinet bouillie et refroidie.

On prépare le même nombre de boîtes Pétri que pour les

autres cytostatiques alkylants (voir Tableau 1) et on pipette dans chaque boîte les volumes de solution de caféine chlorurée et de solution d'Endoxan indiqués au Tableau No.2.

Tableau 2

Préparation des solutions pour tester l'Endoxan

No. boîte Pétri	Solution d'Endoxan 0,8% (ml)	Solution M/500 de caféine + 8 g NaCl (ml)	Eau bouillie et refroidie (ml)	Volume total (ml)
I	0,50	7,50	7,00	15
II	1,00	7,50	6,50	15
III	1,50	7,50	6,00	15
IV	2,00	7,50	5,50	15
.
.
.
X	5,00	7,50	2,50	15
XI	5,50	7,50	2,00	15

On immerge dans chaque boîte Pétri 10 plantules de blé et on les maintient les premières 24 heures à 37°C et ensuite 24 heures à 25° ± 1°C. Enfin, on procède à l'examen microscopique suivant la technique ci-dessus décrite; la boîte Pétri où l'on constate pour la première fois que toutes les figures mitotiques sont altérées correspond à la CM_A (voir Figure 1 de la Planche VII, e-n).

Les témoins sont constitués par des plantules de blé cultivées dans les mêmes conditions de température, mais sur des milieux sans caféine. Notons que l'examen microscopique des pointes radiculaires témoins révèle une décroissance de l'activité cinétique; parmi les images normales on y observe des rares fragmentations de chromosomes et de mitoses en étoile (voir Planche VII, Figure 1, a-d).

Au tableau No. 3 nous avons inscrit les valeurs CM_A des cytostatiques alkylants, plus ou moins utilisés en thérapie antinéoplasique, établies par nous.

Tableau 3

Nom du produit	$CM_A \pm \frac{mg}{100 \text{ ml}}$ $25^{\circ} \pm 1^{\circ}C$	$DL_{50} \text{ mg/Kg}$
Série de l'azote-ypérite		
Mustin	0,0033 \pm 0,106	1,6
Sinalost	0,058 \pm 0,002	2,5
Dopane	2,561 \pm 0,083	2,8
Sarcolysine	5,56 \pm 0,203	18
Leukéran	5,80 \pm 0,036	18,5
Nitromine	8,68 \pm 0,225	50
Endoxan	130 \pm 0,170	180
Série de l'éthylenimine		
TEI	0,261 \pm 0,0145	3
Thiotépa	3,564 \pm 0,226	

De l'examen de ce tableau il résulte qu'il y a une correspondance entre les valeurs CM_A et les DL_{50} mg/Kg dans le sens que les alkylants les plus cytotoxiques sont aussi les plus actifs sur la cellule végétale en division caryocinétique.

B. Méthode phytobiologique pour tester les cyto- statiques antifusoriaux

Les cytostatiques antifusoriaux les plus utilisés dans les traitements de diverses formes de cancer sont la vincaléucoblastine (VLB) et la vincristine (Oncovine), deux alcaloïdes isolés des racines de la pervenche de Madagascar (Vinca rosea), et la colchicine, alcaloïde isolé des semences de colchique (Colchicum autumnale), mais son emploi en thérapeutique anti-néoplasique étant limité par ses propriétés toxiques et l'absence de spécificité de son effet antimitotique; rappelons encore la podophylotoxine et ses dérivés, d'emploi également limité en thérapeutique anticancéreuse.

Nous avons antérieurement précisé que les médicaments antifusoriaux ont comme point d'attaque le fuseau achromatique, ou l'appareil fusorial.

Les recherches effectuées à la Faculté de Pharmacie de Bucarest, par nous et par I. Ciulei, ont précisé que l'intensité des altérations déterminées par ces cytostatiques est fonction de la concentration en cytostatique de la solution expérimentée; ceci nous a permis de mettre au point une méthode phytobiologique pour tester l'activité des VLB, Oncovine et colchicine, non seulement sur des produits pharmaceutiques, mais aussi sur des organes des plantes qui biosynthétisent ces alcaloïdes.

Il faut toutefois souligner que l'action antifusoriale ne dépend plus de la sensibilisation de la cellule végétale par la caféine, comme dans le cas des produits alkylants, mais elle s'exerce directement comme sur la cellule animale.

Notre méthode est basée sur la détermination de la plus petite quantité de cytostatique antifusorial qui produit l'apparition des stathmocinèses dans les cellules des pointes radiculaires de blé immergées pour 6 heures et à la température de $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dans la solution aqueuse de ce composé.

La teneur en cytostatique du produit analysé s'établit par rapport à la substance pure (VLB, Oncovine, colchicine, etc) prise comme étalon, qui produit, dans les conditions et sur le matériau ci-dessus précisé, l'apparition des stathmocinèses (voir Planche III). Il résulte donc qu'on établit au début la valeur antifusoriale de la substance étalon, travaillant sur des solutions soit de 0,050 g% de colchicine, soit de 0,005 g% de VLB, ou d'Oncovine et ensuite sur du produit à analyser.

Le mode opératoire est le même que pour les alkylants, mais le temps de contact est de 6 heures et les solutions étalons et à analyser ne sont plus caféinées (voir Tableau 4). Soulignons que pour préparer les solutions nécessaires on emploie seulement de l'eau de robinet bouillie et refroidie.

Tableau 4

No. boîte Pétri	Solution à analyser ou étalon (ml)	Eau (ml)	Volume (ml)
I	1	14	15
II	2	13	15
III	3	12	15

(à suivre)

(Tableau 4, continuation)

IV	4	11	15
V	5	10	15
VI	6	9	15
VII	7	8	15
VIII	8	7	15
IX	9	6	15
X	10	5	15

La teneur en cytostatique est établie à l'aide de la formule suivante:

$$C = c \times 6,66$$

dans laquelle

C = quantité d'antifusoriaux dissoute dans 100 ml de solution à analyser;

c = quantité de cytostatique de la boîte Pétri où on a observé pour la première fois que toutes les mitoses se présentent comme des stathmocinèses; elle est établie par rapport à la substance étalon.

Pour déterminer la teneur en ces composés des organes végétaux (semences et bulbes de Colchicum autumnale, racines et herbe de Vinca rosea), on procède préalablement à leur extraction selon les méthodes usuelles et ensuite en les transformant, si c'est le cas, en composés hydrosolubles.

Il faut souligner que cette méthode phytobiologique est, à notre connaissance, la seule méthode analytique courante permettant le dosage rapide des alcaloïdes oncolytiques de Vinca rosea; mentionnons que cette plante biosynthétise plus de 70 alcaloïdes, dont seulement VLB et Oncovine sont douées d'activité antitumorale.

De l'ensemble de ces données il résulte que:

. L'expérimentation avec des cellules méristématiques végétales est très simple et peu onéreuse, puisqu'il suffit d'immerger des plantules de blé dans la solution à analyser et il n'est pas nécessaire de travailler en milieu stérile;

. le contrôle des paramètres expérimentaux (c'est-à-dire la concentration, la durée, etc) est plus précis;

- . on réalise un gain de temps et d'argent;
- . le réactif phytobiologique nécessaire, particulièrement les caryopses de blé, est facile à procurer et cela à bon marché;
- . ce réactif permet une observation cytologique d'une précision incomparable et une multiplication des expériences pratiquement impossible sur l'animal et même sur les cultures cellulaires animales et humaines.

B I B L I O G R A P H I E

1. D.Gr. Constantinescu et collab. (1962) - C.R. Ac. Sc. Paris, 255, p. 1357
2. D.Gr. Constantinescu et collab. (1962) - Arzneimit.-Forsch., 12, p. 827
3. D.Gr. Constantinescu et collab. (1962) - Farmacia, Bucarest, 10, p. 586
4. D.Gr. Constantinescu et collab. (1963) - Die Pharmazie, 18, p. 701
5. D.Gr. Constantinescu et collab. (1964) - C.R. Ac. Sc. Paris, 258, p. 5241
6. D.Gr. Constantinescu et collab. (1965) - Arzneimit.-Forsch., 15, p. 1189
7. D.Gr. Constantinescu et El. Hațieganu (1963) - Biologie moléculaire de la cellule végétale, Ed. Medicală, Bucarest
8. I. Ciulei (1967) Thèse de doctorat en Pharmacie, Bucarest
9. G. Deysson et J. Migne (1970) - Biol. méd., 2, p. 21
10. I. Montreuil (1960) Ann. Biol. Clin., 18, p. 239
11. R. Oțeleanu (1969) Thèse de doctorat en Pharmacie, Bucarest

PLANCHE I

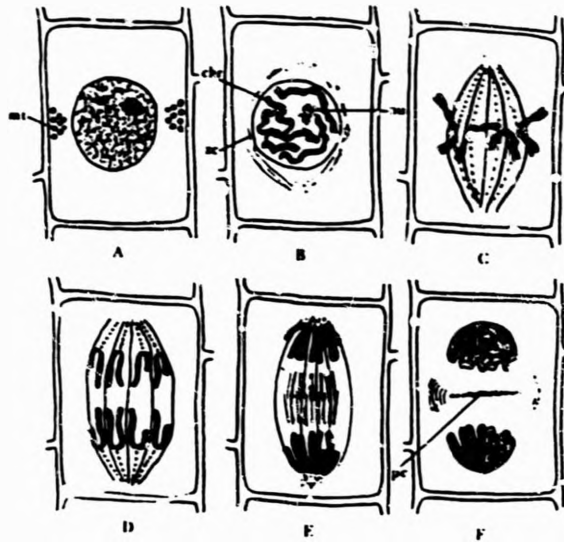


Fig. 1. Représentation très schématique de diverses phases de la mitose de la cellule végétale, observées en microscopie photonique.
A: interphase; B: prophase; C: métaphase; D: anaphase; E: début de télophase; F: télophase - reconstitution de la structure nucléaire et la biogénèse de la plaque cellulaire (pc); mt = microtubes; chr. = chromosomes; zc = zone claire périnucléaire; nu = restes du nucléole; af = appareil fusorial



Fig. 2. Mitose dans les méristèmes radiculaires d'Allium sativum.
A: noyau interphasique (au repos); B: fin de prophase;
C: métaphase; D: anaphase; E: début de télophase; F: fin de télophase (Clichés Deysson)

PLANCHE II



Fig. 1. Microphotographie d'une section longitudinale de la pointe racinaire d'une plantule de blé

Fig. 2 à 5 : Mitose dans les méristèmes radiculaires de blé (*Triticum vulgare* Vill.); a: prophase; b: métaphase; c: anaphase; d: fin de télophase; f = plaque cellulaire; n = restes des nucléoles (Clichés originaux)



PLANCHE III



Fig. 1. Microphotographies des images des mitoses des cellules des méristèmes radiculaires d'Allium sativum placées dans une solution de colchicine
A: stathmométaphase; B: stathmométaphase fortement polyploïde; C: métaphase en étoile; D: anaphase pluripolaire; E: télaphase pluripolaire (Cliché Deysson)

PLANCHE IV

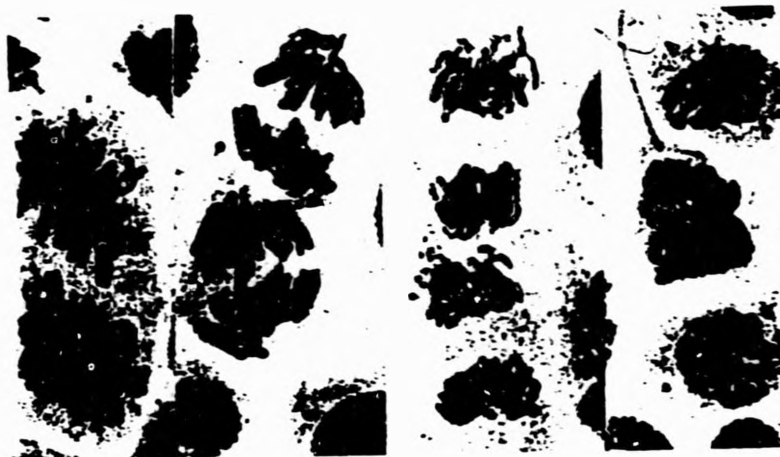


Fig. 1 et 2. Microphotographies des images des mitoses des cellules de méristèmes radiculaires de blé qui ont subi l'action des alcaloïdes (bases) puriques (Clichés originaux)

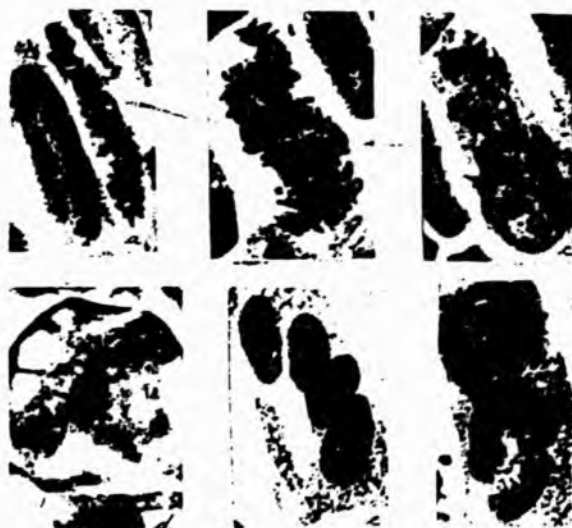


PLANCHE V



Fig. 1. Microphotographie d'une mitose de la cellule du carcinome Walker du rat qui a subi l'action des rayons X



Fig. 2. Microphotographie d'une mitose de la même cellule traitée par des agents alkylants (Cliché Montreuil)

PLANCHE VI

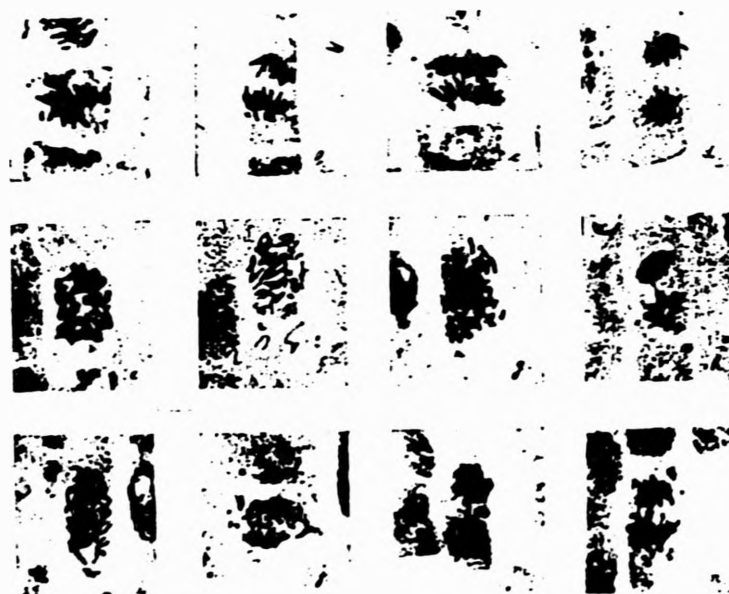
Fig. 1, a-d. Images des mitoses des cellules des méristèmes radiculaires de blé placées pendant 24 heures dans une solution millimolaire de caféine additionnée de cyostatiques alkylants
p = ponts ane- et télophasiques (Cliché original)



PLANCHE VII

Fig. 1. Microphotographies des figures mitotiques des méristèmes radiculaires de blé maintenus pendant 24 heures à 37°C et 24 heures à 25°C dans:

- a - d : solution de cyclophosphamide (Endoxan) à 0,1 - 0,15 g% additionnée de 0,8 g% de ClNa;
e - n : solution millimolaire de caféine additionnée de 0,1 - 0,15 g% de cyclophosphamide et de 0,8 g% de ClNa (Cliché original)



PART XI

LE SCREENING PHARMACOLOGIQUE

Sava Dumitrescu⁺)

⁺) Docteur en médecine, Chef de la Chaire de Pharmacologie
à la Faculté de Médecine de Jassy, Roumanie

I. INTRODUCTION

Le but d'un programme de triage pharmacologique est de réaliser une sélection, de choisir parmi de nombreuses substances, naturelles ou synthétiques, celles qui offrent une plus grande probabilité de devenir des médicaments utiles et qui méritent donc d'être soumises à une investigation clinique.

Mon exposé s'occupera principalement du screening des substances actives contenues dans les plantes.

On peut affirmer qu'un grand nombre de substances, qui seraient utiles comme médicaments ou pour la recherche, attendent encore d'être reconnues dans les végétaux terrestres ou aquatiques. Leur étude serait aussi une riche source d'idées pour la création de molécules nouvelles, dont certaines aboutiront à des médicaments nouveaux. Ces mots ne constituent pas seulement une affirmation optimiste. Les plantes supérieures et les cellules animales ont des mécanismes similaires en matière de codification et de transmission de l'information héréditaire, pour la production d'énergie selon le cycle métabolique de Krebs, pour diverses réactions enzymatiques et ainsi de suite.

Etrangement, bon nombre de médiateurs chimiques du système nerveux animal peuvent être retrouvés dans les organismes végétaux, où leur rôle est encore obscur.

Il y a des bactéries qui produisent de l'adrénaline ou de l'acétylcholine et des plantes supérieures qui produisent de la dopamine. Beaucoup de plantes synthétisent des substances qui, bien que différentes dans leur structure chimique des substances ayant une action pharmacologique équivalente dans le monde animal, ont des puissantes actions spécifiques quand elles agissent sur les récepteurs des cellules animales.

La muscarine agit sur les récepteurs m-cholinergiques d'une manière comparable à l'acétylcholine, l'action de l'éphédrine imite les effets de la noradrénaline, le muscimol ceux de l'acide gamma-amino-butyrrique, les opiacés les effets des enképhalines et des endorphines, etc. Le rôle de ces substances

dans les organismes unicellulaires et sur les organismes dépourvus de système nerveux est encore inconnu. On peut supposer, par exemple, que ces substances remplissent des rôles fondamentaux dans la vie des cellules, leur activité de médiateurs du système nerveux représentant une spécialisation survenue plus tard au cours du processus d'évolution.

Les cellules animales et végétales ayant tant d'éléments communs, l'investigation pharmacologique des extraits végétaux bruts ou purifiés reste une méthode rationnelle dans la découverte de médicaments nouveaux.

Il n'est pas juste de la considérer comme une méthode empirique et son coefficient rationnel, tenant compte des arguments mentionnés plus haut, ne nous paraît point méprisable.

II. CHOIX DES PROBLEMES A ETUDIER

Les options initiales ont une grande influence sur le déroulement d'un programme de recherches. La médecine traditionnelle et l'ethnographie sont souvent utilisées comme sources d'inspiration pour de tels programmes. Des médicaments de grande importance, comme la digitale, ont pour point de départ la médecine folklorique anglaise. Le currare et la strophanthine, dont les extraits bruts servaient à empoisonner la pointe des flèches, ont été utilisés d'abord par les indiens d'Amazonie ou par des peuples africains pour guérir certaines maladies.

Les difficultés d'interprétation des données fournies par la médecine folklorique ne doivent pas être sous-estimées. Le diagnostic, dans les maladies que les guerisseurs prétendent traiter avec succès, est très souvent d'une imprécision décevante. On ne peut pas toujours deviner ce qu'on a traité, s'il s'agit d'une maladie objective ou seulement de symptômes subjectifs, si la guérison est due au traitement administré ou si elle s'est faite malgré lui, il n'existe pas de critères quantitatifs pour l'évaluation des résultats etc. Les informations concernant la toxicité de certaines plantes sont, en général, plus dignes de foi et le screening dans ces cas

peut sélectionner des substances intéressantes.

Pour donner une base plus solide aux options initiales, il est préférable de faire examiner, par un spécialiste possédant une bonne formation clinique, les diagnostics et les résultats des cures effectuées avec les plantes envisagées pour le programme du screening. On peut améliorer ainsi les chances d'introduire dans le programme des plantes contenant des principes actifs.

III. FACTEURS QUI PEUVENT INFLUENCER LES RÉSULTATS DU SCREENING

L'efficacité et l'innocuité des médicaments sont établies seulement pendant l'expérimentation clinique, mais les possibilités de faire de bonnes études de pharmacologie clinique sont, dans le monde entier, limitées.

Les cliniciens ne prennent connaissance que d'un petit échantillon que la capacité de discernement des pharmacologues expérimentateurs a sélectionné pour eux. Sur le reste des substances examinées à l'aide de méthodes de la pharmacologie expérimentale, ils ne savent, le plus souvent, pas grande chose. Il résulte que le rôle de la pharmacologie expérimentale, dans le triage des substances qui seront proposées aux cliniciens pour le verdict final est décisif.

On demande à la pharmacologie expérimentale de prédire l'activité et la toxicité que les extraits ou les substances purifiées manifesteront en clinique. La possibilité de faire correctement de telles prédictions est limitée par les moyens dont on dispose, la qualité du personnel des laboratoires et par l'état des connaissances. Dans toutes les situations, on doit s'efforcer d'éliminer un bon nombre de variables redevables aux extraits, aux animaux d'expérience, aux observateurs ou à l'interaction de ces facteurs.

A. Variables redevables aux extraits

Les extraits végétaux bruts sont relativement faciles à

obtenir, mais leur composition n'est pas constante et les résultats peuvent varier des points de vue quantitatif et/ou qualitatif. Si les premiers essais avec des extraits bruts mettent en évidence une activité pharmacodynamique, on doit procéder à des purifications plus avancées et obtenir finalement le principe actif.

Un exemple pour souligner l'importance de cette manière d'agir: à la fin du siècle passé et dans les premières années du nôtre on a reconnu l'activité antimicrobienne des extraits de Penicillium et de certaines bactéries. L'impossibilité de les purifier à cette époque a retardé de 40 ans l'utilisation des antibiotiques.

Les principes purifiés feront l'objet d'un programme de screening plus élaboré.

B. Variables redevables aux solvants

L'administration des principes actifs peu solubles, surtout par voie injectable, est parfois un problème difficile à résoudre. Certains solvants ou adjuvants de solubilisation ont des actions pharmacologiques puissantes ou augmentent l'action des produits soumis au screening.

Pour l'administration orale, certains échantillons d'agents de suspension non résorbables, comme la carboxyméthylcellulose, peuvent adsorber des principes actifs et être éliminés ensemble par voie rectale.

C. Variables redevables aux animaux d'expérience

Les animaux d'expérience doivent présenter un bon état de santé au commencement du screening. Si cet état est sujet à de doutes, on procédera à une vérification sur un échantillon contenant de préférence les animaux qui semblent être malades ou ceux dont la courbe pondérale est stationnaire ou monte moins vite que celle des autres animaux etc., et on le soumettra à un examen parasitologique et anatomo-pathologique, macro-et microscopique.

Les rations alimentaires doivent être suffisantes des points de vue quantitatif et qualitatif. On doit veiller à ce que les aliments ne soient pas une source d'infestation parasitaire pour les animaux d'expérience.

L'animalerie et les cages seront conçues d'une façon qui interdise la pénétration d'insectes, rongeurs sauvages etc., qui sont fréquemment vecteurs d'infections ou d'infestations.

On tiendra compte de l'influence que les rythmes circadiens ou saisonniers, la température ambiante ou la lumière, peuvent exercer sur l'action des agents pharmacologiques, surtout dans les tests de comportement (5).

Pour la même espèce d'animaux, les différentes races et même lignées peuvent présenter de grandes différences dans l'absorption, le métabolisme ou la sensibilité vis-à-vis des substances administrées.

On doit toujours choisir les animaux et les modèles expérimentaux qui imitent, avec la plus grande fidélité possible, les modalités réactionnelles humaines. On doit aussi vérifier si les effets observés chez une espèce peuvent être reproduites aussi chez d'autres espèces (5).

D. Variables redevables à l'observateur

L'observateur peut influencer les résultats par :

- . le choix des tests;
- . la conception générale du screening;
- . sa capacité de reconnaître des effets imprévus;
- . sa capacité d'interpréter les données expérimentales des points de vue biologique et mathématique;
- . sa manière d'assimiler et de manipuler les connaissances toujours plus nombreuses dans son domaine de recherche.

IV. LE SCREENING

A. Plan de travail

Le succès d'un programme de screening, comme de toute

autre activité de recherche, est conditionné, dans une mesure importante, par l'utilisation rationnelle des crédits disponibles pour le programme respectif.

Faire un bon plan de travail ne signifie pas seulement d'assurer les conditions de travail requises et établir les expériences nécessaires pour aboutir à de résultats importants, mais signifie, en même temps, d'aboutir de la façon la plus économique que possible.

Il convient, par conséquent, d'élaborer une "stratégie" du screening.

En adaptant le plan de travail aux buts du programme de recherches, cette stratégie nous permet d'harmoniser des objectifs, à première vue contradictoires, c'est-à-dire passer en revue toutes les activités importantes, dans un délai bref et avec des dépenses minimales. La mise au point de tests simples et rapides pour la détection des principales activités pharmacodynamiques est la condition première de l'obtention de tels résultats. Après la mise en évidence d'une ou de plusieurs activités intéressantes, on procédera à des essais quantitatifs, en utilisant des tests plus sélectifs et spécifiques.

3. Types de screening

1. Screening "simple" (4). Quand on a pour objectif de sélectionner des substances présentant une action pharmacodynamique précisée, le problème expérimental est en général simple. parfois un seul test est suffisant.

2. Screening "aveugle" (4). Lorsqu'on isole des nouvelles substances, on peut se heurter à la difficulté de ne trouver dans la littérature aucune information permettant de prédire leurs activités pharmacodynamiques.

A l'aide d'une batterie de tests, on établit s'il existe ou non des activités pharmacodynamiques et leur catégorie, s'il en existe. En même temps le screening peut indiquer quelles sont les substances possédant les propriétés les plus intéressantes.

Le screening "aveugle" est conçu pour la détection des

activités pharmacodynamiques des substances dont l'activité pharmacodynamique est totalement inconnue. Pour assurer la rentabilité d'un tel screening, il faut posséder beaucoup d'expérience, beaucoup d'adresse et la capacité d'élaborer des plans d'expériences adéquats.

3. Screening "programmé" (4). Les objectifs proposés sont plus limités dans ce cas que dans celui du screening "aveugle", mais en général il conduit à des résultats plus précis. On emploie cette méthode quand on veut sélectionner des substances possédant une activité d'un type déterminé, par exemple des analgésiques, des bronchodilatateurs etc. L'activité qu'on doit détecter est mise en évidence à l'aide d'une série de tests.

Dans le screening "aveugle" on utilise seulement des tests d'orientation, tandis que dans le screening "programmé" s'ajoutent les essais quantitatifs et les essais comparatifs, en y employant des substances représentatives appartenant à la même classe pharmacodynamique.

C. Quelques considérations générales concernant les phases initiales du screening

Dans le cas des programmes de screening "aveugle", pour une orientation rapide, on commence, le plus souvent, par les tests suivants (1):

1. Observation du comportement général de l'animal;
2. Toxicité aiguë. On utilise, en général, la souris, moins souvent le rat. L'exécution de ces deux tests peut être couplée;
3. Détection des activités cardio-vasculaires et végétatives, en enregistrant la pression artérielle et la respiration, chez le chien ou le chat anesthésiés;
4. Effets sur la musculature lisse, in vitro, en utilisant de préférence l'iléon de cobaye ou de lapin.

1. Malgré les objections formulées par quelques spécialistes à l'adresse de ce premier test, qu'ils considèrent trop subjectif, les résultats ont une fiabilité et une reproductibilité comparables aux résultats de certaines méthodes objectives, si

le comportement est apprécié selon des critères et dans des conditions soigneusement définis .

On ne doit pas ignorer des effets importants, manifestés par les nouvelles substances, pour le seul motif qu'on ne possède pas de méthodes quantitatives objectives.

Dans le screening "aveugle" il est nécessaire d'administrer chaque nouveau produit en plusieurs doses, constituant les termes d'une progression géométrique. Si on ajoute un nombre suffisant de doses, pour enregistrer dans plusieurs lots d'animaux des phénomènes toxiques, on peut exécuter d'un même coup l'observation du comportement général de l'animal et le test de toxicité aiguë.

2. Les animaux injectés avec des doses toxiques doivent être observés avec la même attention que les autres, afin de surprendre des effets liés au mécanisme d'action, ou permettant de prédire un effet secondaire.

Les données relatives à la toxicité aiguë constituent une des premières informations nécessaires dans un screening, pour éviter les doses qui présentent un intérêt plutôt toxique que pharmacologique.

Puisque dans les premières étapes du screening le produit analysé est, le plus souvent, disponible seulement dans des petites quantités, l'animal de choix pour tester la toxicité aiguë est la souris.

3. L'idéal serait d'employer pour la première phase du screening une seule espèce animale, mais il est plus simple d'explorer les actions cardio-vasculaires et végétatives chez le chat ou le chien. L'exploration chez le rat n'est pas seulement plus difficile du point de vue technique, mais s'y ajoutent encore d'importantes différences entre la sensibilité cardiaque du rat et la sensibilité humaine envers les agents pharmacodynamiques (tonicardiaques, par exemple).

Les expérimentateurs individuels diffèrent considérablement dans leur capacité d'évaluer l'intensité des activités des animaux observés. Par conséquent, le même expérimentateur (ou la même paire d'expérimentateurs) doit effectuer toutes les

observations concernant une série de produits.

Au fur et à mesure que l'expérimentateur se perfectionne, ses évaluations peuvent se modifier; c'est une des raisons pour lesquelles les procédures et les critères d'évaluation quantitative doivent être très bien précisés dès le début. A cet égard, une manière objective de décrire les modifications du comportement de l'animal est de noter la fréquence et la durée de ses activités. Lorsqu'on mesure l'intensité on préfère une évaluation du type tout ou rien.

La voie d'administration n'est pas indifférente. Le produit sera administré par la même voie qu'on utilisera en clinique. S'il faut distinguer entre l'inactivité et une absorption intestinale réduite, on fait administrer simultanément le produit, par voie orale à un lot, et par voie parentérale à un autre lot d'animaux. On compare ensuite l'efficacité des deux voies et si celle de la voie orale est réduite, on peut faire appel au laboratoire de chimie pour essayer d'accroître la solubilité lipidique ou la résistance du produit vis-à-vis de l'agressivité du contenu gastro-intestinal ou des enzymes hépatiques.

Au début des études de pharmacocinétique, il est préférable d'effectuer la plupart ou même la totalité des déterminations, en utilisant la même espèce d'animaux pour faciliter la comparaison et l'interprétation des résultats.

En élaborant les programmes de screening, il ne faut jamais oublier que de nombreux nouveaux médicaments sont apparus grâce à des observations fortuites. Le succès dépend parfois de la capacité de l'équipe de chercheurs d'observer et d'interpréter des effets inattendus.

D. Exploration des activités neuropharmacologiques dans le screening "aveugle"

Pour explorer les nombreux effets qu'une substance peut manifester au niveau du système nerveux central (S.N.C.), Irwin a imaginé un programme de screening très économique, capable de rendre rapidement compte si un produit est actif ou inerte et qui fournit, en même temps, des indications pour la classifi-

cation des activités décelées (4,5).

Ces indications sont utiles pour l'étape ultérieure, quand on vérifie les activités décelées par le screening avec des tests spécifiques.

On fait mention dans le protocole expérimental de l'espèce, du sexe, du poids et de l'âge de l'animal. On note ensuite le produit analysé, l'heure de l'administration, la dose, le solvant, la voie d'administration. Si les informations concernant l'activité font défaut, on peut commencer avec une dose d'environ 30 mg/kg. En fonction des effets obtenus, la dose suivante sera plus petite ou plus grande. Pour les doses de 10 à 100 mg/kg, on peut préparer des solutions 0,2%, qui seront administrées par voie intra-péritonéale.

Les souris sont groupées par lots de 3-4 animaux, le poids ne doit pas différer de \pm 1 g. On doit choisir pour les expériences une chambre isolée, sans bruit.

Il faut éviter les solvants organiques, parce qu'ils possèdent leurs propres actions pharmacodynamiques. Les produits testés seront dissous ou suspendus dans de l'eau, des solutions diluées d'acide chlorhydrique ou d'hydrate de sodium, de suspensions de 5% de gomme arabique. Les observations sont poursuivies pendant 5 jours. Les effets des produits analysés sont évalués en utilisant une échelle à neuf degrés (une échelle de 0 à 8). Un lot témoin sera observé simultanément.

La valeur de base pour les manifestations normales est 4, leur diminution est notée avec des valeurs plus petites, l'augmentation avec des valeurs plus grandes. Pour les manifestations anormales, la valeur de base est 0.

Le profil pharmacologique d'un produit est obtenu avec trois types de tests: (1) de comportement, (2) neurologiques, et (3) végétatifs.

1. Tests de comportement

- (a) Vigilance des animaux:
- . Vivacité
 - . Passivité
 - . Stéréotypie

- (b) Disposition des animaux :
 - . Toilette
 - . Vocalisations
 - . Agitation
 - . Agressivité

- 2. Tests neurologiques
 - (a) Activité motrice :
 - . Réflexe d'investigation
 - . Activité spontanée
 - . Réaction au toucher
 - . Réaction à la douleur

 - (b) Excitation du S.M.C. :
 - . Phénomène Straub
 - . Tremblement
 - . Fasciculations
 - . Convulsions

 - (c) Posture :
 - . Position du corps
 - . Position des membres

 - (d) Troubles moteurs de coordination:
 - . Ataxie
 - . Autres formes de démarche anormale
 - . Redressement de l'animal placé sur son dos

 - (e) Tonus musculaire :
 - . Tonus des membres
 - . Force de préhension
 - . Tonus du tronc
 - . Tonus abdominal

 - (f) Réflexes :
 - . Au toucher du pavillon de l'oreille
 - . Au toucher de la cornée

- 3. Tests concernant l'activité végétative:
 - . Diamètre de la pupille
 - . Dimension de la fente palpébrale
 - . Exophtalmie
 - . Emission d'urine
 - . Salivation
 - . Piloérection
 - . Hypothermie
 - . Couleur de la peau
 - . Fréquence cardiaque
 - . Fréquence respiratoire

Simon et Boissier (3) ont proposé (1972) une stratégie pour le screening des activités psychopharmacologiques que nous reproduisons dans le tableau qui suit.

Ils attirent en même temps l'attention, avec beaucoup de justesse, qu'il ne faut pas être rigide dans l'utilisation ou l'interprétation des schémas, car ils sont continuellement sujets à des améliorations.

Ainsi, les recherches ultérieures (2) ont démontré, dans le cas des antidépresseurs, qu'on doit ajouter de nouvelles alternatives au schéma de Simon et Boissier. Le Mianserin est un antidépresseur puissant, tout en étant exempt d'activité anticataleptique et antirésérpinique.

Si une activité est détectée, il faut compléter l'investigation avec tous les tests nécessaires pour préciser le profil pharmacologique du produit étudié.

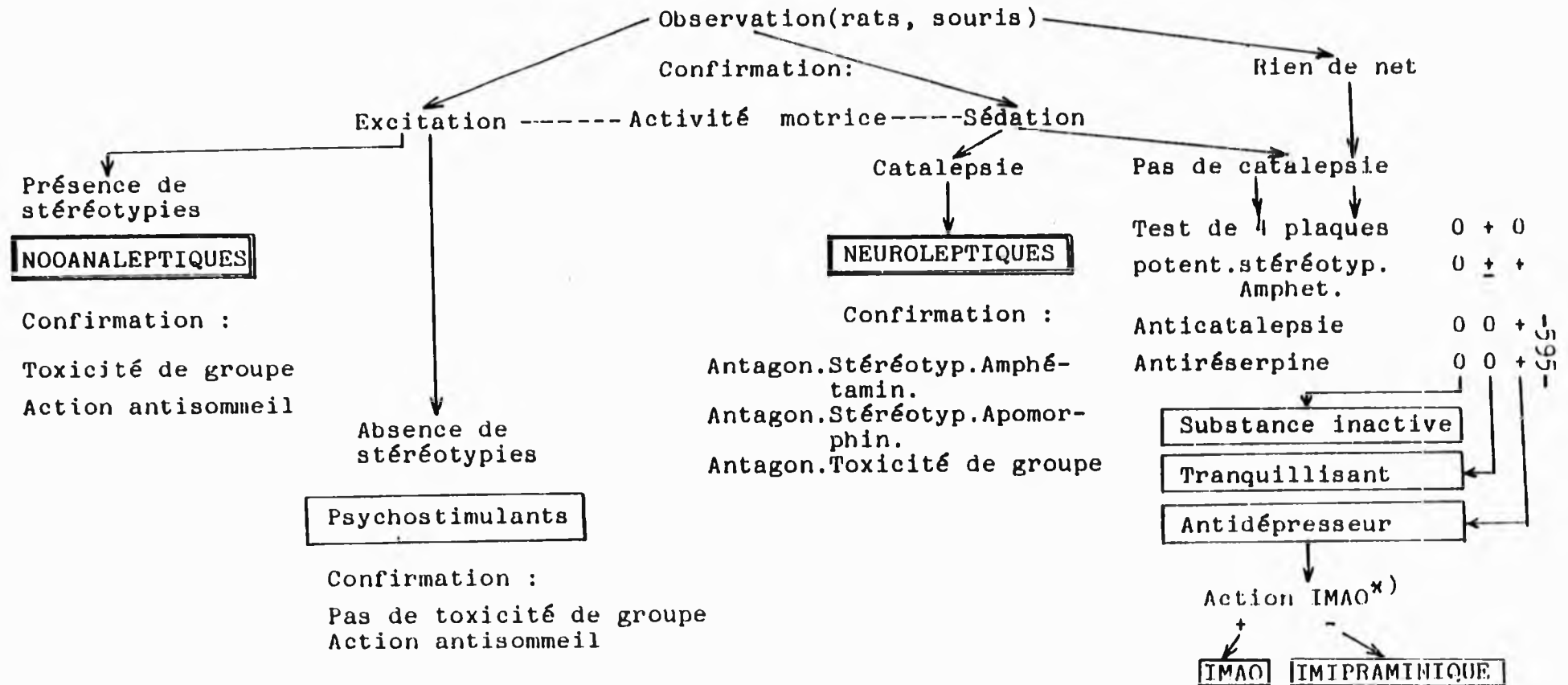
V. CONCLUSIONS

Les stratégies du screening déjà élaborées permettent d'identifier assez vite un grand nombre d'activités pharmacodynamiques.

Mais, surtout en psychopharmacologie, les tests ne sont pas suffisants, et d'autres voies de recherche apparaissent nécessaires. Surtout dans le screening "aveugle" le pharmacologue doit apporter aussi sa solution personnelle, en fonction de son expérience, de sa culture professionnelle, de sa capacité d'aborder des voies encore inconnues.

Le screening n'est pas une activité mécanique, c'est un domaine ouvert à la création scientifique, à la disposition de ceux qui savent "oser".

SCREENING DES ACTIVITES PSYCHOPHARMACOLOGIQUES
(selon Simon et Boissier)



*) IMAO - Inhibiteur des Monoaminoxydases

B I B L I O G R A P H I E

1. Domez, Floyd R. (1971) - Animal Experiments in Pharmacological Analysis. Ch. Thomas Publ., Springfield Illinois, USA
2. Fleischhauer J., Riezen H. von (1974) - Arzneimittel-Forschung, 24, 1129-1131
3. Simon P., Boissier J.R. (1972) - Prévision chez l'animal des effets psychotropes d'une nouvelle substance, Confrontations psychiatriques, 5, No. 9, 107-121
4. Turner R.A. (1965) - Screening Methods in Pharmacology, pp. 22-41, Academic Press, New York and London
5. Vane J.R. (1964) - A Plan for Evaluating Potential Drugs, dans: "Evaluation of Drug Activities: Pharmacometrics" (D.R. Laurence et A.L. Bacharach, ed.), pp. 33-36, Academic Press, London and New York

Autres travaux recommand es

6. The Staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh (1968) - Pharmacological Experiments on Isolated Preparations. E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London
7. The Staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh (1970) - Pharmacological Experiments on Intact Preparations. Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York
8. Michel Colat (1972) - Notions techniques de Pharmacologie générale. Masson et Cie. Editeurs, Paris
9. Leopold Ther (1965) - Grundlagen der experimentellen Arzneimittelforschung. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H., Stuttgart
10. W.M. Castle (1977) - Statistics in Small Doses. Churchill Livingstone Ed., Edinburgh, London and New York

METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE
PHARMACOLOGIQUE DES MEDICAMENTS

Alina Manolescu +)

+) Docteur en sciences médicales, chercheur à l'Institut
pour le Contrôle d'Etat des Médicaments et de Recherches
Pharmaceutiques, Bucarest, Roumanie

I. INTRODUCTION

Le règne végétal offre un grand nombre de substances actives du point de vue thérapeutique, comprenant des médicaments déjà entrés dans l'arsenal thérapeutique aussi bien que des extraits et des substances purifiées dont il faut prouver qu'elles possèdent une activité curative.

Toutes ces drogues d'origine végétale requièrent, en dehors de l'analyse physico-chimique, l'expérimentation pharmacologique dans le but de:

- . trier (screening) l'activité des extraits et des substances purifiées qui n'ont pas encore été étudiées;

- . effectuer une étude pharmacologique complète d'une nouvelle drogue qui s'était avérée intéressante au cours du screening;

- . effectuer le contrôle de routine de certains médicaments d'origine végétale (par exemple, la poudre de feuilles de digitale, d-tubocurarine, etc), dont l'activité ne peut être établie seulement par l'analyse physico-chimique.

Quel que soit le but, on emploie une série de méthodes communes, dont le nombre et la complexité peuvent varier s'il s'agit d'un screening ou d'une étude pharmacologique approfondie.

Tout comme les méthodes d'analyse physico-chimiques, les méthodes pharmacologiques nécessitent des réactifs, représentés dans le cas de ces dernières par les animaux d'expérience.

Les résultats des études effectuées par des méthodes pharmacologiques peuvent être:

- . d'ordre qualitatif (présence ou absence d'une certaine action);

- . d'ordre quantitatif (intensité d'une action, exprimée par la valeur du rapport vis-à-vis d'une substance de référence).

II. ANIMAUX D'EXPERIENCE

Les animaux d'expérience le plus souvent utilisés appartiennent aux espèces suivantes (1,5,6,7):

(a) Poissons, par exemple Beta splendens, le poisson lutteur japonais, qui peut être utilisé pour mettre en évidence l'action tranquillisante des médicaments.

(b) Batraciens, surtout les grenouilles: Rana esculenta, Rana pipiens, etc., animaux faciles à entretenir, nécessitant uniquement un aquarium rempli d'eau courante. Les grenouilles sont utilisées pour des expériences sur le système nerveux périphérique, ainsi que pour mettre en évidence l'action anesthésique locale, l'action curarisante ou pour des expériences sur le coeur isolé, etc.

Les drogues expérimentées sur les grenouilles peuvent être appliquées localement ou injectées dans le sac lymphatique ventral en y introduisant une aiguille destinée aux injections intramusculaires à travers le plancher buccal jusque sous la peau de l'abdomen ou dans le sac lymphatique dorsal, en y introduisant l'aiguille sous la peau de la cuisse dans la direction crânienne jusque dans la région thoracique postérieure. Tenant compte de la taille des grenouilles, on peut injecter par ces voies un volume de 2 ml au maximum.

(c) Mammifères:

- . rongeurs: . souris
 - . rats
 - . cobayes
- . lagomorphes : . lapins
- . non-rongeurs: . chats
 - . chiens
 - . singes
 - . cochons

Quand il s'agit de mammifères, il faut tenir compte des souches, de leur pureté, du contact avec les germes microbiens, variables qui peuvent influencer le résultat des études pharmacologiques.

Il existe un grand nombre de souches de souris (CF 1, CFW, Swiss, etc), la plupart étant albinos. Les souches de rats (Wistar, Sprague-Dawley, etc) sont moins nombreuses.

Dans le cadre d'une souche on peut élever des animaux "outbred", qui proviennent d'un ancêtre commun, sans mélange avec une autre souche, ou des animaux "inbred", qui proviennent depuis 20 générations au moins de parents consanguins (frère et soeur).

Le contact des animaux avec la flore microbienne peut modifier leur sensibilité envers certaines substances médicamenteuses. C'est pourquoi, au cas où certaines recherches l'exigent, on peut élever des animaux dans des conditions de stérilité, soit totalement sans germes (germ free animals) ou seulement sans germes pathogènes (pathogen germ free animals), ce qui implique des efforts spéciaux et l'instruction adéquate du personnel. Le coût de tels animaux est très élevé, car il faut stériliser les cages, la sciure de bois, la nourriture et les récipients à nourriture, etc; les petits sont obtenus par opération césarienne, les animaux sont manipulés dans des conditions aseptiques, l'hygiène corporelle du personnel surveillant doit être très stricte, etc.

1. Souris (*Mus musculus*)

Animal très fréquemment utilisé, la souris peut être maintenue dans des cages en plastique (macrolon), avec le plafond en grillage fin, ou dans des cages inox, sur de la sciure de bois, 5-10-20 animaux ensemble, recevant la nourriture sous forme comprimée ou en poudre et l'eau à partir d'un flacon au bouchon pourvu d'un tube de verre effilé.

La souris devient adulte à l'âge de 5-6 semaines et peut être utilisée pour des expérimentations courantes quand elle atteint le poids de 18-25 g.

La nourriture peut être très simple: du pain mouillé dans du lait, mais on préfère une nourriture standardisée, granulée, fournie par des maisons spécialisées et contenant, en principe, de la farine (de céréales, de luzerne, de poisson ou de viande), des sels minéraux, vitamines, levures, germes de blé, etc. Les animaux nourris de la sorte doivent avoir libre accès à l'eau.

Pour élever les souris, d'autres conditions sont encore nécessaires: température ambiante de 18 à 24°C, humidité de 55 à 65%, absence de courants d'air.

Pour l'immobiliser, la souris sera saisie par la queue avec la main droite, tout en fixant le pouce et l'index de la main gauche sur sa nuque.

Les drogues à expérimenter sur la souris peuvent être

administrées par voies orale ou parentérale.

Pour l'administration orale, les animaux devront jeûner 20 heures, ayant toutefois accès à l'eau. On utilise une canule épointée, légèrement courbée, qui peut être adaptée à une seringue; elle est introduite, sans forcer, par la bouche, le long de la paroi postérieure du pharynx jusqu'à l'oesophage. Le volume maximum toléré est d'environ 1 ml.

Les voies parentérales employées plus fréquemment chez la souris sont: la voie sous-cutanée (partie latérale du tronc), la voie intrapéritonéale (partie inférieure de l'abdomen), la voie intraveineuse (les veines latérales de la queue, avec une canule No. 20 ou 26 G, en injectant à débit constant et en évitant les bulles d'air). Volume maximum toléré: 1-2 ml.

La souris est utilisée pour un grand nombre de tests pharmacologiques et toxicologiques: toxicité aiguë, actions psychotropes, actions endocrines, anticonvulsives, embryotoxiques, tératogènes, etc.

2. Rat (*Rattus norvegicus*)

Les caractères morphophysiologiques et les soins pour son élevage ressemblent beaucoup à ceux de la souris. La taille plus grande (80-350 g, à l'âge adulte) le rend propice, en dehors des tests énumérés pour la souris, à déterminer la toxicité chronique ou l'action anti-inflammatoire, à étudier la motilité digestive sur des fragments de duodénum isolé, l'action ulcérigène et antiulcérigène, l'action sur la tension artérielle, etc.

L'immobilisation, la manipulation et l'administration des drogues dans le cas du rat sont pareilles à celles déjà présentées pour la souris.

3. Cobaye (*Cavia porcellus*)

L'animal est originaire de l'Amérique du Sud. On utilise les animaux à poil court, albinos ou colorés, à taches marron, beiges, noires et blanches.

L'alimentation consiste en granules ou pellets et eau; les cages seront en métal et le plancher recouvert de sciure de bois.

N'ayant pas de queue, l'animal est saisi par la peau de la nuque et les pattes postérieures.

On peut lui administrer les drogues par voie orale, avec une sonde rigide, par voie sous-cutanée, intrapéritonéale et intraveineuse, en abordant la veine dorsale du pénis.

Le cobaye est, en général, utilisé pour mettre en évidence l'action antihistaminique des médicaments, car l'animal a une sensibilité particulière aux effets de l'histamine, amine libérée par les mastocytes pendant les phénomènes allergiques ou anaphylactiques; cette sensibilité se manifeste par l'apparition du bronchospasme ou la contracture de la musculature lisse de l'iléon.

Le cobaye peut également être employé à doser l'activité des cardiotoniques, à mettre en évidence l'antigénicité de certains produits médicamenteux, etc.

4. Lapin (*Oryctolagus cuniculus*)

Le lapin, appartenant aux lagomorphes, est un animal souvent utilisé en recherche pharmacologique. Les souches le plus souvent utilisées sont: Chinchilla, géant belge, Nouvelle Zélande (blanc), etc. Le poids de l'animal adulte varie entre 1500 et 4500 g. L'abord facile des veines marginales de l'oreille rend la voie intraveineuse très aisée chez le lapin.

L'animal est employé pour les tests de toxicité, de tolérance locale, pour mettre en évidence l'action curarisante, déceler les impuretés pyrogènes des solutés injectables aussi bien que pour des expérimentations sur organes isolés: coeur, utérus, intestin.

5. Chat (*Felis catus*)

Il a besoin d'un espace assez large et d'une nourriture équilibrée, étant un animal sensible aux maladies microbiennes, virales et parasitaires. Pour obtenir des résultats concluants il faut sélectionner uniquement des animaux parfaitement sains. Ils sont utilisés surtout en expérimentation aiguë, pour étudier la pression artérielle, les réactions du système nerveux végétatif, du système nerveux central, pour les dosages biologiques des cardiotoniques, etc.

6. Chien (Canis familiaris)

Comme animal de laboratoire, le chien est fréquemment utilisé, car, tout comme le chat, il ressemble davantage à l'homme du point de vue physiologique que les petits rongeurs.

Il sert tant aux expérimentations aiguës que dans les expérimentations chroniques (toxicité chronique) pour mettre en évidence certaines actions sur l'appareil digestif, le système nerveux central, l'appareil excréteur, etc.

On peut utiliser des chiens de race indéterminée, mais, pour l'homogénéité des résultats, on préfère les animaux de race pure, comme, par exemple, des chiens Beagle.

7. Afin d'obtenir des résultats qui puissent être transposés avec plus de certitude à l'espèce humaine, on emploie aussi au laboratoire plusieurs espèces de singes ou de cochons (Large white ou miniporc), dont l'entretien et la manipulation sont différents par rapport aux autres animaux de laboratoire.

III. CONDITIONS GÉNÉRALES DE L'EXPÉRIMENTATION

Pour l'expérimentation on sélectionne des animaux parfaitement sains. Il est préférable que l'animalerie se trouve sous la surveillance d'un médecin vétérinaire spécialisé dans la pathologie des animaux de laboratoire. En son absence, comme une mesure minimale de précaution, l'expérimentateur éliminera les animaux qui ont les poils ébouriffés ou sales, qui présentent du jétage nasal, de la diarrhée, des lésions ou croûtes sur la peau, des abcès, qui toussent ou qui ne présentent pas une vivacité normale.

Le laboratoire de pharmacologie peut avoir une ferme propre, pour élever les animaux, ferme située à une certaine distance du laboratoire, dans un lieu approprié, ou acheter les animaux nécessaires à d'autres fermes.

Pour obtenir des résultats fiables, il faut utiliser un nombre suffisant d'animaux, permettant une interprétation statistique des résultats. On doit calculer les moyennes et leurs erreurs standard et appliquer, en cas de besoin, des tests

de signification, pour être sûr que les différences obtenues sont réelles et non pas dues au hasard.

IV. ETUDE PHARMACOLOGIQUE D'UNE DROGUE INCONNUE

Cette étude implique plusieurs étapes, dont certaines éliminatoires.

A. Triaze (screening) de l'activité

La drogue à étudier est soumise à une série de tests aussi simples que possible, mais spécifiques pour chaque appareil ou système de l'organisme. Si la drogue montre une activité intéressante au cours d'un de ces tests, on passe à l'étape suivante, la toxicité aiguë; en cas contraire, l'étude s'arrête là.

B. Toxicité aiguë

On étudie la toxicité aiguë d'une nouvelle drogue sur deux espèces d'animaux et par deux voies d'administration (orale et parentérale) au moins. Le but est d'établir la dose létale 50% (DL_{50}), la dose maximale tolérée (DL_0) et la dose minimale létale 100% (DL_{100}). Ces doses peuvent être calculées par des méthodes statistiques (par exemple, la méthode de Spearman-Kärber /2/), en utilisant la létalité enregistrée chez plusieurs lots d'animaux lors de l'administration de diverses doses de la drogue étudiée. Une drogue sera considérée pratiquement dépourvue de toxicité si la dose létale 50% par voie orale chez le rat est de 5-15 g/kilo de poids. Dans les mêmes conditions, une drogue sera extrêmement toxique si la DL_{50} par voie orale chez le rat est au-dessous 1 mg/kilo de poids, très toxique si la DL_{50} est 1-50 mg/kilo de poids, modérément toxique entre 50-500 mg/kilo de poids et peu toxique entre 0,5-5 g/kilo de poids.

Pour les drogues extrêmement toxiques ou très toxiques, aussi bien que pour les drogues modérément toxiques, on ne continue l'étude que si les doses qui s'étaient avérées efficaces pendant le screening de l'activité sont beaucoup plus petites que les doses toxiques, chez la même espèce animale.

C. Etude pharmacodynamique

La drogue qui a passé avec succès les deux premières étapes (A et B), sera étudiée sur des animaux sains et sur

des modèles expérimentaux (états pathologiques induits expérimentalement chez les animaux) pour préciser ses effets et, éventuellement, son mécanisme d'action.

Si dans cette étape les résultats sont également satisfaisants, on passe à l'étape suivante.

D. Etude pharmacocinétique

Elle comporte l'étude de l'absorption par diverses voies d'administration, la distribution dans l'organisme, les transformations subies et l'élimination de la drogue, exprimées toutes en termes quantitatifs.

E. Toxicité chronique

Pour finir, on étudie l'effet de l'administration prolongée de la drogue (de 1 à 12 mois, en fonction de la durée d'administration préconisée chez l'homme), sur le développement pondéral des animaux, les constantes hématologiques, biochimiques et sur l'aspect anatomo-pathologique macro- et microscopique.

V. TESTS ET METHODES UTILISES POUR METTRE EN EVIDENCE LES EFFETS D'UNE DROGUE

Nous exposerons succinctement, dans ce qui suit, quelques tests pharmacologiques relativement simples et souvent employés pour mettre en évidence les effets d'une drogue au niveau des appareils et des systèmes de l'organisme et notamment des tests d'activité au niveau du système nerveux central et des tests pour l'action déprimante.

A. Action hypnotique

Cette action se manifeste par l'induction du sommeil chez les animaux de laboratoire (souris ou rat). Le test s'effectue de préférence sur la souris, qui est considérée endormie au moment où elle ne revient pas à la position normale si l'expérimentateur a couché l'animal sur le dos (absence de 'righting-reflex'); on considère que l'animal s'est réveillé quand il revient spontanément à la position normale et fait quelques pas. On chronomètre la durée du sommeil de chaque animal séparément et on calcule les moyennes pour les animaux qui avaient reçu

la même dose. L'effet est plus clair pour l'administration parentérale, mais il apparaît également après administration orale.

La drogue étudiée peut avoir une action hypnotique directe; on peut potentialiser (prolonger) la durée du sommeil induit par un hypnotique connu (par exemple, hexobarbital Na 50 mg/kilo de poids i.v. chez la souris).

B. Action sédatrice

On emploie des tests qui mettent en évidence les modifications de la motilité spontanée des petits animaux (souris, rats). L'interprétation de ces tests est plus difficile; les enregistrements doivent être faits pendant un intervalle suffisamment long et comparés avec les enregistrements normaux chez les mêmes individus, au cours des mêmes périodes de la journée, car les animaux, surtout les rats, ont un programme d'activité quotidienne relativement constant.

Pour ces enregistrements, on utilise des appareils improvisés ou fournis par des firmes spécialisées:

1. Cages à cellule photoélectrique montée dans une paroi de la cage, de sorte que les mouvements de l'animal, en interrompant le spot lumineux, puissent être enregistrés;
2. Cages à plancher enregistreur, par certains contacts électriques ou par d'autres moyens;
3. Cages vibrantes, très petites, individuelles, soutenues par une tige horizontale en métal, élastique: les mouvements de l'animal mis en cage sont inscrits sur un cylindre à l'aide d'un stylet fixé sur la boîte.

C. Action tranquillisante et neuroleptique (3)

1. Tests pour l'activité exploratrice et la curiosité

(a) Test Fedeschi. Le rat est mis dans une boîte cubique ayant le côté de 10 cm et toutes les parois en plastique opaque, à l'exception du plafond constitué par un fin grillage. L'animal ne peut pas se déplacer, mais peut se relever sur ses pattes postérieures (signe de curiosité). On compte pendant 15 minutes ces mouvements chez l'animal traité et on compare avec le lot témoin.

(e) Test de la bataille par choc électrique. Une semaine avant l'expérimentation, on trie les couples de souris mâles qui se battent dans un délai de 60 secondes au maximum, après avoir été placés sur une grille formée de tiges cylindriques en acier inoxydable par lesquelles passe un courant électrique biphasé (intensité: 15 microampères, fréquence des chocs: 5 par seconde). On établit la dose de drogue empêchant la réaction agressive.

4. Tests de catalepsie

(a) Test des trois bouchons. On place un rat avec ses pattes antérieures sur une colonne de 12,5 cm formée par trois bouchons de caoutchouc superposés. Si l'animal garde cette position pendant 15 secondes, le test de catalepsie est positif.

(b) Test de catalepsie chez la souris. On place une souris sur un système de deux fils métalliques de 1 mm de diamètre, parallèles, horizontaux, distants de 6 cm. Le fil postérieur sera situé 2 cm plus bas que le fil antérieur. On place les pattes antérieures sur le fil antérieur et les pattes postérieures sur l'autre. Le test est positif si dans un délai de 20 secondes la souris n'essaie pas de changer de position.

5. Tests utilisant des réflexes conditionnés

On a imaginé plusieurs tests appartenant à cette catégorie. Nous décrirons seulement un test basé sur la réaction de fuite chez le rat. Après plusieurs associations entre un stimulus auditif (une sonnerie) et un choc électrique provenant du plancher de la cage, l'animal grimpe à une corde verticale tendue entre le plancher et une plate-forme reposoir, quand il entend seulement la sonnerie. L'animal est considéré conditionné s'il grimpe en 2 secondes après le déclenchement de la sonnerie et déconditionné si, sous l'influence d'un traitement, le rat n'a pas grimpé à la 30^e seconde (pendant les 30 secondes il a été stimulé 5 fois, à des intervalles de 5 secondes, chaque fois pendant 2 secondes).

6. Tests permettant d'apprécier l'antagonisation de l'effet des excitants du système nerveux central

(a) Activité antagoniste vis-à-vis des effets de la d-amphétamine

(a') Sur la motilité: des doses de 4-8 mg/kilo de poids d'amphétamine par voie sous-cutanée, chez la souris, induisent une hypermotilité qui peut être enregistrée en utilisant des cages vibrantes. On essaie d'antagoniser cette hypermotilité par administration préalable de la drogue à étudier.

(a'') Sur la toxicité de groupe: L'agglomération des animaux augmente la toxicité de l'amphétamine chez la souris. La DL_{50} par voie i.p. est différente si les animaux sont mis en groupes de 10 par cage ou isolés. Un traitement préalable à une drogue tranquillisante réduit la toxicité de groupe de l'amphétamine, jusqu'au niveau de la toxicité des souris isolées.

(b) Activité anti-apomorphine

Les neuroleptiques ont un effet antagoniste électif sur l'action excitante de l'apomorphine sur le centre de vomissement du bulbe.

Chez le chien traité à la drogue étudiée on essaie de diminuer le nombre moyen de vomissements, après avoir injecté s.c. 0,1 mg/kilo corps d'apomorphine.

Chez le rat traité à la drogue étudiée, on essaie de supprimer les mouvements stéréotypes bucco-linguo-pharyngés produits par l'administration de l'apomorphine à la dose de 1,25 mg/kilo poids i.v.

D. Activité anticonvulsivante

Cette activité peut être mise en évidence chez les animaux en expérience vis-à-vis des convulsions provoquées par un stimulus chimique (pentétraazol) ou électrique (électrochoc).

1. Convulsions au pentétraazol

On essaie de réduire ou même de supprimer, par administration préalable de la drogue étudiée, les convulsions produites par l'injection s.c. de 100 mg/kilo de poids de pentétraazol à la souris.

2. Electrochoc supramaximal

Une éventuelle activité anticonvulsivante suppose la suppression, par l'administration du produit étudié, de l'extension

tonique des pattes postérieures, provoquée par l'application d'électrodes oculaires et le passage d'un courant de 50 mA, 0,2 sec., chez la souris.

3. Tests permettant d'apprécier l'activité analgésique

Afin de prouver l'éventuelle activité analgésique d'une nouvelle drogue, il faut établir une méthode standard pour produire la douleur et une réponse adéquate de l'animal, indiquant la présence ou l'absence de la douleur.

1. Test de la constriction abdominale (Writhing test) chez la souris

L'administration i.p. d'acide acétique, 60 mg/kilo de poids, à une concentration de 0,6% produit une irritation péritonéale douloureuse qui déclenche une série de mouvements caractéristiques de contracture des muscles abdominaux et l'extension des membres postérieurs. On observe l'abolition de ces réactions en traitant au préalable l'animal à la drogue étudiée.

2. Test de la plaque chaude (Hot plate)

On sélectionne des souris qui, placées sur une plaque ayant la température de 55°C, réagissent au bout de 45 secondes au plus tard par léchage ou secousse des pattes postérieures. Après administration de la drogue à étudier, on observe, à divers intervalles, la prolongation du temps de réaction jusqu'à 90 secondes au maximum.

3. Test de la chaleur radiante sur la queue

On sélectionne les souris qui réagissent au bout de 10 à 12 secondes par une secousse de la queue (Tail twitch) à l'application sur la queue d'une quantité standardisée de chaleur (ampoule électrique). On observe, à divers intervalles, après administration de la drogue étudiée, le temps de réaction, en considérant sa prolongation jusqu'à 30 secondes comme un effet de 100%.

4. Tests pour l'activité excitante centrale

Pour ce type d'action, on peut utiliser les tests de la motilité spontanée, décrits pour les sédatifs. S'il y a une activité excitante, on observe une augmentation de la motilité par

rapport à l'animal témoin.

Le raccourcissement ou l'abolition de l'activité hypnotique ou narcotique des barbituriques peuvent également être utilisés comme un test pour l'activité excitante centrale.

F. Tests d'activité au niveau du système nerveux
périphérique

1. Tests pour l'activité anesthésique locale

(a) Test d'anesthésie de la cornée du lapin

On touche avec un stylet très fin la cornée à des intervalles de 3 secondes et l'on note si l'animal répond en clignant. Pour éviter des interprétations erronées, les cils doivent être coupés et l'expérimentateur doit se placer derrière l'animal. Le soluté à étudier sera instillé dans le sac conjonctival et on répétera la détermination à certains intervalles. L'effet anesthésique est mis en évidence par la disparition du réflexe de clignement.

(b) Test du plexus lombosacral de la grenouille

Après avoir décérébré et éviscéré la grenouille, on observe le réflexe de rétraction de la patte postérieure lors de l'immersion dans une solution d'acide chlorhydrique dilué (0,05-0,2 N). On introduit le produit à étudier dans la cavité abdominale et on teste, à divers intervalles, le réflexe de rétraction de la patte postérieure à l'acide chlorhydrique; sa disparition montre l'installation de l'anesthésie.

(c) Test du pincement de la queue de la souris

On sélectionne les souris qui, dans 30 secondes à partir du moment où on a placé une pince artérielle fine à la racine de la queue, réagissent en essayant de s'en débarrasser. On injecte s.c. à 1 cm distance de la racine de la queue 0,1 ml du soluté à étudier et on teste à nouveau les animaux à la pince, après 15, 30, 60 et 120 minutes. Les animaux qui ne réagissent pas pendant 30 secondes seront considérés anesthésiés.

2. Tests pour l'activité curarisante

L'activité des curarisants ou bloquants neuro-musculaires peut être mise en évidence par plusieurs tests, dont nous rappel-

lurons seulement la chute de la tête (Head drop), largement utilisée et relativement simple.

Toutes les 15 secondes on injecte 0,1 ml du produit à étudier dans la veine marginale de l'oreille du lapin. On observe une éventuelle hypotonie des muscles de la nuque après un certain nombre d'administrations, hypotonie qui rend l'animal incapable de tenir sa tête en position élevée.

G. Tests pour l'activité antiinflammatoire (4)

Les tests plus fréquemment utilisés essaient de mettre en évidence l'activité d'une substance, soit dans la phase aiguë de l'inflammation, pendant laquelle la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité capillaire sont prédominantes, soit dans la phase chronique, de formation du tissu de granulation.

1. Tests sur la perméabilité capillaire

(a) Oedème des pattes postérieures chez le rat

En injectant s.c. dans la patte postérieure 0,1 ml d'un coluté dont le principe actif augmente la perméabilité capillaire (Dextran 70 - 3%, formol 3%, histamine, kaolin, carragenin, sérotonine), on obtient un oedème qui peut être apprécié quantitativement par pléthysmométrie (en mesurant le volume de la patte par le volume du liquide disloqué, par exemple).

On étudie la diminution de cet oedème (par rapport à un témoin) à la suite du traitement préalable avec le produit étudié pour son activité antiinflammatoire.

(b) Extravasation des protéines marquées par un colorant (par exemple, bleu Trypan)

On administre par injections intradermiques, chez le lapin ou le rat, dans la peau dépilée, 0,1 ml d'un produit qui augmente la perméabilité capillaire (histamine, bradykinine, sérotonine), ou l'on applique sur la peau des rondelles de papier filtre imbibées d'une substance irritante et on injecte ensuite un colorant qui sera fixé par les protéines plasmatiques. Le degré d'extravasation de celles-ci au lieu d'injection des substances qui augmentent la perméabilité capillaire est mis en évidence par l'intensité de la couleur qui apparaît et qui est appréciée par rapport

à une échelle standardisée de nuances.

2. Tests sur la formation du tissu de granulation

Les tests les plus utilisés de ce type conduisent à la formation d'un tissu de granulation chez le rat, soit en injectant s.c., dans la région dorsale, 25 ml d'air (Granuloma pouch), en ajoutant, si l'on désire, une substance irritante comme la térébenthine ou l'huile de croton, ou en implantant s.c. chez le rat des pellets d'ouate (Cotton-wool pellets) de 40 mg. Dans les deux cas on prélève entre le 7^e et le 14^e jour la poche ou le granulome formés, et l'on apprécie son poids et le volume du liquide formé chez les animaux traités et témoins.

H. Tests pour l'appareil cardio-vasculaire

1. Enregistrement de la pression artérielle en expérimentation aiguë

L'enregistrement de l'activité cardiaque peut être effectué avec le thorax fermé, à l'aide d'un électrocardiographe.

Grâce à une installation expérimentale on peut mettre en évidence l'action immédiate d'une drogue sur la pression artérielle (hypo-ou hypertension), aussi bien que l'influence sur le système végétatif, en modifiant l'effet des médiateurs adrénergiques et cholinergiques.

Le test peut être effectué chez des chiens, chats, lapins ou rats. Les animaux sont anesthésiés avec une substance adéquate, par exemple, uréthane 1 g/kilo de poids, i.p., immobilisés sur une table de contention, en mettant en évidence, par des manoeuvres chirurgicales, l'artère carotide, la trachée et la veine saphène chez les chiens et chats, la veine auriculaire chez les lapins, la fémorale ou une veine de la queue chez le rat.

Dans la carotide on introduit et fixe une canule en verre reliée par un tube rempli de citrate de sodium à 10% à un manomètre à mercure; on enregistre les oscillations de la pression artérielle avec un stylet inscripteur placé sur un cylindre enfumé.

Dans la trachée on introduit une canule en verre pour assurer la perméabilité des voies respiratoires et, éventuellement, enregistrer les mouvements respiratoires. Facultativement,

la canule peut être connectée à un appareil de respiration artificielle.

Dans la veine disséquée on introduit une canule métallique munie d'un mandrin, servant à injecter le produit étudié.

Au cas où l'on a pratiqué la respiration artificielle, on peut ouvrir le thorax et enregistrer les contractions cardiaques par des moyens mécaniques (tambour de Marey, stylet inscripteur).

2. Tests permettant d'apprécier l'activité sur le coeur

En dehors de l'appréciation de l'activité cardiaque par électrocardiographie, qui exige des appareils spéciaux, pour une orientation initiale on peut utiliser l'enregistrement de l'activité du coeur isolé de grenouille. On choisit des animaux pesant de 50 à 60 g, auxquels on prélève le coeur après décérébration ou spinalisation. On introduit une canule fine de verre dans l'aorte jusqu'au ventricule: la canule est reliée à un petit réservoir rempli de solution Ringer. Les mouvements du coeur sont enregistrés à l'aide d'un levier ayant à un bout un stylet, l'autre bout étant mis en mouvement par les contractions du ventricule avec lequel il est relié par un fil. Le produit étudié, dilué dans la solution Ringer, est laissé agir 5 minutes au minimum, pour voir s'il modifie la fréquence ou la force de contraction du coeur.

I. Tests pour l'appareil respiratoire

En dehors de l'inscription de la respiration en expérimentation aiguë, on peut encore, avec des moyens relativement simples, effectuer deux types de tests:

1. Tests pour l'activité anti-tussive

On provoque des accès de toux à des cobayes en les maintenant pendant 3 minutes dans un exsiccateur dans lequel on a introduit, à l'aide d'un vaporisateur, des aérosols d'acide sulfurique à 0,1% ou d'acide citrique à 1%. On compte les accès de toux dans cet intervalle chez les cobayes témoins ou traités.

2. Tests pour l'activité broncho-dilatatrice

Dans une installation pareille à la précédente, on introduit

des aérosols d'histamine et l'on note l'intervalle nécessaire à l'apparition de la dyspnée accentuée, suivie de bradypnée qui précède la mort. Les animaux sont sortis de l'installation avant leur mort pour pouvoir être utilisés à nouveau. On administre la drogue étudiée avant l'exposition aux aérosols et l'on compare les valeurs ainsi obtenues avec les valeurs enregistrées sur les animaux témoins.

J. Tests pour l'appareil digestif

1. Tests sur organes isolés

Pour mettre en évidence l'activité de certaines drogues sur les muscles lisses intestinaux, on peut utiliser des fragments d'intestin (duodénum de rat, iléon de cobaye) maintenus en vie dans une solution Tyrode, contenant des électrolytes, du glucose, à un pH adéquat et une température qui permet une activité optimale (38°C pour le cobaye, 32°C pour le rat) et une aération suffisante, avec un mélange de CO₂ à 5% et de O₂ à 95%.

Les contractions du fragment d'intestin sont inscrites par un système de leviers; les substances ajoutées dans un bain où se trouve l'organe peuvent déterminer la contraction ou une diminution du tonus, ou peuvent avoir une action anti-spasmodique sur les contractions produites par les substances cholinergiques, par exemple, l'acétylcholine, ou les substances qui agissent directement sur les fibres musculaires lisses, par exemple, le chlorure de baryum.

2. Tests pour l'activité ulcérigène ou anti-ulcérigène

La présence d'ulcérations sur la muqueuse gastrique chez le rat, après un traitement de durée variable avec une drogue, indique la possibilité d'apparition d'une action ulcérigène chez l'homme.

Pour étudier le revers de cet effet, une action anti-ulcérigène par conséquent, il est nécessaire de produire des ulcérations expérimentales chez le rat. A cette fin il existe un grand nombre de procédés. L'un des plus simples - l'ulcère par immobilisation - est obtenu sur des animaux qui ne reçoivent plus de nourriture et d'eau et sont immobilisés sur un grillage fin

suspendu, par les espaces duquel les pattes pendent et sont solidarisées deux par deux avec du sparadrap.

Après 24 heures d'immobilisation, les ulcérations gastriques apparaissent chez 90% des animaux. Ce modèle sert à étudier l'effet anti-ulcérigène d'un traitement préalable à la drogue qu'on expérimente.

Les méthodes présentées ci-dessus sont loin d'épuiser le sujet. Elles peuvent servir de guide à l'étude des actions importantes que peut avoir une drogue d'origine végétale.

B I B L I O G R A P H I E

1. Dumas J. (1963) - Animaux de laboratoire, Paris
2. Finney D.J. (1964) - Statistical Method in Biological Assay, Ed. Ch. Griffin, London
3. Julou L. (1967) - Pharmacologie des neuroleptiques, Bulletin de la Société de Pharmacie de Lille, No.2, pp.1-40
4. Laurence D.R., A.L. Bacharach (1964) - Evaluation of Drug Activities, Pharmacometrics, Academic Press
5. Poumeau-Delille Guy (1953) - Techniques biologiques en endocrinologie expérimentale chez le rat, Masson et Cie.
6. Ther L. (1965) - Grundlagen der experimentellen Arzneimittelforschung, W.V.G.
7. Worden A., W. Lane-Petter (1957) - The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, UFAW, London.

