J. Soc. Ouest-Afr. Chim. (2001) ; 012

PHYTOSTÉROLS DANS LES RACINES ET FRUITS DE LA COMPOSEE «*Tagetes erecta*» DU SENEGAL

Saliou KANE*, ; Abdoulaye SAMB** et Jean Michel KORNPROBST***

**Département de Sciences Physiques, Ecole normale Supérieure, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal*
***Laboratoire de Produits Naturels, Département de Chimie, Faculté de Sciences, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.*
****Faculté de Pharmacie, groupe SMAB, ISOMER, Laboratoire de chimie marine, 1 rue Gaston Veil, BP 1024 NANTES Cedex 01, France.*

(Reçu le 08/03/2001 – Accepté le 09/08/2001)

Summary : Sterols fraction of senegalese *Tagetes erecta* was separated and represente 2,4% of crude extract of steam barks. Identification of sterol composition was done by CPG analyse and comparaison with authentic samples; campesterol, stigmasterol and β-sitosterol were present with respectively 9; 74 and 17 %. These results were confirmed by masse and NMR spectroscopy.

Key words : *Tagetes erecta*, sterol, campesterol, stigmasterol, β-sitosterol.

I - INTRODUCTION

Le genre *Tagetes* appartient à la famille des Composées de la tribu des Héléniées. Elles sont essentiellement connues et cultivées comme plantes ornementales. Il existe au moins une douzaine d'espèces de *Tagetes*.

Au Sénégal deux espèces sont connues : *Tagetes erecta* et T*agetes patula* ou *pumila*.

Depuis longtemps de nombreuses recherches ont été réalisées sur les espèces de *Tagetes* connues et l'on peut répartir les produits identifiés en deux grandes catégories dont des cétones monoterpéniques à enchaînement normal avec quelques composés apparentés et des dérivés soufrés, en particulier le bi et le terthiényle, ainsi que des composés apparentés.

A notre connaissance, aucune autre catégorie de constituants, originale de par sa nature ou sa composition, n'a été signalée dans les Tagetes.

Nous avons choisi de porter notre contribution sur la recherche et l'étude des constituants de l'espèce sénégalaise *Tagetes erecta*. Nous avons réalisé un screening chimique à l'issue duquel nous avons opté pour extraire, purifier et identifier les stérols de la plante.

Ce mélange de stérols est constitué de campestérol, de béta-sitostérol et de stigmastérol avec des pourcentages en masse respectifs de 9, 17 et 74%.

II - MATERIEL ET METHODE

Une masse de 1 Kg de racines de *Tagetes erecta* séchées et broyées est macérée pendant 48 heures dans deux litres d'éther éthylique. Après évaporation lente du solvant, le résidu est partitionné dans l'eau et l'hexane. La phase organique évaporée donne 9,40 g de produit pâteux. Ce produit est dissout au maximum par 5 x 20mL de méthanol. Le résidu insoluble dissout dans du chloroforme puis concentré, est chromatographié sur colonne de silice montée à l'éther éthylique. A l'issue de cette séparation un seul produit a pu être isolé.

Ce produit recristallisé dans du méthanol donne 1,52 g de cristaux blancs (Point de fusion mesuré F = 153°C).Soit 2,4% par rapport à l'extrait brut.

La chromatographie sur couche mince de ce produit a été faite sur plaques de silice avec successivement trois éluants (benzène–éthanol, 19 : 0,4, v/v ; chloroforme ; chloroforme/hexane, 1 : 1,5, v/v) et un même témoin, le cholestérol.

L'analyse par CPG a été réalisée à l'Université de Perpignan avec un appareil VARIAN série 3700 équipé d'un intégrateur numérique HEWLETT-PACKARD 3380 A et d'une colonne OV-17 de 1 m. Les pics principaux ont été identifiés par comparaison avec des échantillons

authentiques de stérols en isotherme à 260 °C, le bloc injecteur-détecteur étant à 310°C . Pris en solution dans le tétrachlorure de carbone sur un appareil VARIAN-EM-390 à 90MHZ puis sur un VARIAN HA-100, à 100 MHZ, le mélange brut de stérols conduit à des spectres dont l'interprétation a permis de confirmer l'identification des différents constituants.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse du produit par chromatographie sur couche mince a permis de l'identifier à un mélange de stérols (Rf = 0,35 avec silicagel/benzène–éthanol, 19 : 0,4, v/v ; Rf = 0,29 avec silicagel/chloroforme ; Rf = 0,11 avec chloroforme/hexane, 1 : 1,5, v/v).

En CPG le chromatogramme obtenu présentait deux pics importants correspondant à des temps de rétention relatif par rapport au cholestérol de 1,40 et 1,60 ; le premier possédant un épaulement correspondant au temps de rétention relatif de 1,31. Par rajout de stérols de référence on a pu identifier ces pics principaux à ceux des stérols classiques, à savoir: le campestérol, le stigmastérol et le sitostérol. L'attribution des pics a été faite par comparaison avec des échantillons authentiques. Elle est par ailleurs conforme aux données de la littérature [1-4].

Les pourcentages ont été évalués par triangulation : soit 9, 17 et 74% respectivement pour le campestérol, le β-sitostérol et le stigmastérol.

Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 1. Les formules des chaînes latérales des stérols identifiés par CPV sont indiquées en annexe (Figure 1).

En spectroscopie de masse les résultats obtenus sont tout à fait conformes aux données de la littérature [5]. Pour chacun des trois stérols classiques le campestérol, le sitostérol et le stigmastérol on retrouve les pics des fragmentations caractéristiques (tableau 2).

Outre les fragments normalement attendus, le spectre de masse fait apparaître d'autres fragments :

- fragment *m/e* = 314. D'après BERGMAN [6] ce fragment est caractéristique des stérols insaturés en 24-28.

- fragment *m/e* = 299. Ce fragment correspond à la perte d'un méthyle sur le fragment précédent .

Ces deux fragments ne peuvent malheureusement pas encore être attribués avec certitude.

Le spectre RMN du ^{13}C du mélange de stérols se confond pratiquement avec celui du stigmastérol publié par ARTAUD [5] comme le montre le Tableau (3). Nous avons analysé le spectre de résonance magnétique du carbone 13 de la fraction stérolique par comparaison avec ceux du stigmastérol et du sitostérol.

La concordance est excellente à deux exceptions près. Le spectre ne fait pas apparaître le signal à 45,1 ppm caractéristique du carbone en 24 aussi bien pour le sitostérol que pour le stigmastérol mais révèle un signal à 51,3 ppm qui n' apparaît pas dans les spectres publiés par ARTAUD [5]. D'après les indications de la littérature ce signal est attribuable à un carbone tertiaire qui ne peut être ni le carbone 20, ni le carbone 25 dont les signaux ont été identifiés sans ambiguïté en comparaison avec les spectres publiés. Ce signal correspond donc au carbone 24.

Les données ainsi obtenues confirment l'existence des trois stérols majoritaires des végétaux supérieurs : le Campestérol, le Stigmastérol et le Sitostérol.

De très nombreuses études ont été consacrées à la nature et à la distribution des stérols dans les végétaux, nous n'en rappellerons que l'essentiel.

Les phytostérols sont des stérols ayant en général 27, 28 ou 29 atomes de carbone avec le système tétracyclique du cholestérol. Les substitutions se trouvent en 24 sur la chaîne latérale et la configuration absolue de ce carbone est le plus souvent S pour les végétaux inférieurs

(chlorophycées et chrysophycées en particulier) et R pour les végétaux supérieurs.

Si l'on observe souvent une grande variété de stérols chez les végétaux inférieurs, on en rencontre essentiellement trois dans les végétaux supérieurs : le sitostérol, le campestérol et le stigmastérol.

La nature des phytostérols est schématiquement résumée dans le Tableau (4).

Il apparaît ainsi que le stigmastérol est un stérol relativement rare dans le monde végétal. Parmi les plantes inférieures on ne le rencontre guère que chez les Bryophytes en quantité équivalente dans les différentes espèces mais généralement inférieure à celle du sitostérol. Ce n'est que pour les ordres des Surgermanniales (lichens) et des Grimmiales (mousses) que le stigmastérol est majoritaire [7].

Pour les végétaux supérieurs, le β-sitostérol est en général toujours majoritaire mais accompagné du campestérol et du stigmastérol. Seules quelques familles font exception : les Verbénacées et les Cucurbitacées ont des stérols en C-29 avec un méthylène en 25 [8] ; les Sapotacées et les Théacées ont surtout des delta-7 stérols, l'α-Spinostérol (Chondrillastérol), 10, étant prépondérant[9,10, 11]. La seule exception notable est celle du genre Pinus dans lequel le stigmastérol n'a pas été mis en évidence[12].

Il ressort des données de la littérature que le β-sitostérol est, en général, le stérol majoritaire [13-18]. Sa teneur peut avoisiner 100% dans certains cas 97% du mélange de stérols de l'huile d'olive, 94 % pour l'huile de noisette, 91 % pour l'huile de coton. Le pourcentage du β-sitostérol est normalement compris entre 50 et 70 %, quelle que soit la famille botanique considérée. Quant au campestérol et au stigmastérol, leurs pourcentages atteignent rarement 20%.

Le tableau 5 résume quelques distributions de phytostérols dans les plantes supérieures.

Il ressort de ce tableau que la composition en stérols de *Tagete erecta* apparaît comme exceptionnelle par sa teneur en stigmastérol ; seule la papilionacée *Erythrina suberosa* en possède une quantité équivalente [19]. Par ailleurs, l'examen de la composition en stérols des huiles extraites de plusieurs oléagineux montre également un pourcentage en stigmastérol nul (huiles de noisette, d'olive, de colza, de coton) ou faible (6% dans l'huile de lin) ; les valeurs les plus élevées ont été obtenues avec l'huile de pépin de raison (17%) et l'huile de soja (24%) [17]. Enfin, les données de la littérature concernant la composition en stérols d'un grand nombre de graines montre également un pourcentage en stigmastérol faible, toujours inférieur à 20% [17].

En résumé, sur une cinquantaine d'exemples deux espèces seulement ont une teneur en stigmastérol supérieure à 50 % : *Erythrina suberosa* (63 %) et *Tagetes erecta* (74 %).

IV - CONCLUSION

Dans les racines de la Composée *Tagetes erecta*, la fraction stérolique qui a été isolée représente 2,4 % de l'extrait brut. Ce pourcentage est considérable quand on sait que, quantitativement, toute la partie insaponifiable d'une huile végétale (hydrocarbures, alcools triterpéniques, méthylstérols, stérols) ne représente en général qu'une faible partie de celle-ci, tout au plus 2%[9, 20].

Par ailleurs ce mélange de stérols contient un pourcentage tout à fait inhabituel de stigmastérol, 74 %, c'est-à-dire 3 à 5 fois la quantité que l'on rencontre généralement dans les plantes supérieures. Ce résultat est important, au moins à deux points de vue :

- la composition particulière de ce mélange stérolique et surtout sa localisation dans les racines en même temps que les dérivés soufrés du thiophène méritent une attention particulière. ROWE justifie l'absence de stigmastérol dans le genre Pinus par le manque de la déshydrogé-

nase qui transforme le β-sitostérol en stigmastérol [12]. Ainsi, la présence, dans les racines de *Tagetes erecta*, d'un pourcentage élevé en stigmastérol associé à une faible teneur en β-sitostérol laisse supposer une activité déshydrogénante qui transforme le β-sitostérol en stigmastérol.

Selon SOERENSEN la biosynthèse des dérivés soufrés du thiophène fait intervenir des composés polyacétyléniques et met en jeu des déshydrogénases [21].

Cette partie de la plante, les racines, serait donc particulièrement riche en déshydrogénases intervenant à la fois dans la biosynthèse des deux catégories de constituants chimiques.

- le taux élevé de stigmastérol soulève un problème de taxonomie. En effet de nombreux travaux ont signalé l'existence de phytostérols dans les extraits des végétaux supérieurs. Barbier et al [22] ayant analysé les stérols de plusieurs plantes ont montré la présence de substances en C_{27}, C_{28} et C_{29}, le méthylène-24 cholestérol étant souvent un des principaux constituants. Les stérols identifiés diffèrent entre eux par les substitutions de leur chaîne latérale. Bien des hypothèses ont été formulées sur la biosynthèse de la chaîne latérale des phytostérols. Selon Schreiber et al [23], le cycloarténol pourrait être le précurseur des phytostérols, sur lequel s'effectueraient les méthylations par la S-adénosylméthionine. La présence du cycloarténol et l'absence du lanostérol dans des cultures de tabac *in vitro* ont été prouvées ; par contre chez les levures et les champignons pour lesquels le stérol principal est l'ergostérol et chez lesquels on n'a jamais à notre connaissance trouvé de stérol en C_{29}, le cyclarténol est absent et le précurseur de l'ergostérol est le lanostérol. En fin si le cholestérol est particulièrement abondant dans *Hypochoeris radicata*, 90% de l'insaponifiable des pollens de cette plante de la famille des Composées [22], l'analyse des stérols d'autres plantes de cette même famille montre que le sitostérol est de loin le stérol le plus abondant, le cholestérol étant un constituant mineur.

Les résultats de notre étude montrent plutôt la prépondérance du stigmastérol.

Ces données permettent de constater l'absence de relation taxonomique entre la composition des stérols et la famille botanique.

TABLEAU 1 : ***Analyse par CPV de la fraction stérolique extraite des racines Tagetes.***

Pic	TRR (CHOLESTéROL)	POURCENTAGE RELATIF	Attribution (40)
1	1,31	9	Campestérol
2	1,42	74	Stigmastérol
3	1,63	17	β-sitostérol

TABLEAU 2 : ***Attribution des pics du spectre de masse de la fraction stérolique***

Campestérol :

m/e = 400 (M^+), 385 (M^+-CH_3), 382 (M^+-H_20), 273(M^+-chaîne latérale), 271 (M^+- chaîne latérale + $2H^+$), 255 (M^+-H_20 -chaîne latérale)

Stigmastérol :

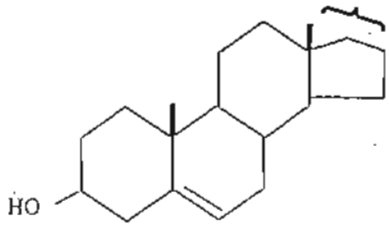
m/e = 412(M^+), 397 (M^+- CH_3), 394 (M^+-H_20), 379 (M^+-CH_3-H_20), 351 (M^+-C_3H_7-H_20), 273 (M^+-chaîne latérale), 271 (M^+-chaîne latérale + 2H)

Sitostérol :

m/e = 414 (M^+), 399 (M^+-CH_3), 396 (M^+-H_20), 381 (M^+-H_2O -CH_3), 273 (M^+ - chaîne latérale), 271 (M^+ - chaîne latérale + $2H^+$) .

FIGURE 1 : ***Formule de base et formules développées des stérols extraits de la Composée Tagetes erecta.***

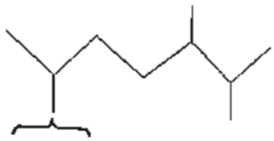
Novau de base



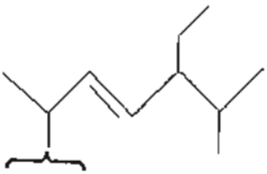
Stérols

Chaîne latérale

Campestérol



Stigmastérol



B-sitostérol

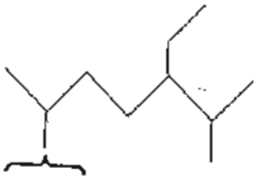


TABLEAU 3 : ***Déplacements chimiques en RMN du Carbone 13.***

Carbone	SITOSTéROL	STIGMASTéROL	Stérols bruts de Tagetes erecta
1	37,4	37,4	37,3
2	31,7	32,0	31,9
3	71,8	71,8	71,9
4	42,3	42,4	42,4
5	140,8	140,8	140,9
6	121,7	121,7	121,8
7	31,9	32,0	32,0
9	50,2	50,3	50,3
10	36,5	36,6	36,5
11	21,1	21,2	21,1
12	39,8	39,9	39,8
13	42,4	42,4	42,4
14	56,9	57,0	56,9
15	24,4	24,4	24,4
16	28,3	28,4	28,9
17	56,1	56,1	56,0
18	11,9	12,0	12,0
19	19,4	19,4	19,4
20	36,0	40,5	40,5
21	18,8	21,5	21,1
22	34,0	138,3	138,4
23	26,1	129,4	129,5
24	45,9	45,1	?
25	29,2	32,0	32,0
26	19,9	20,9	21,1
27	19,1	20,9	21,1
28	23,2	25,4	25,4
29	12,3	12,2	12,2

Végétaux	Classe	Stérols majoritaires	Références
Végétaux inférieurs	Rhodophycées	Cholestérol, 34	3
	Phaeophycées	Fucostérol, 38	3 et 4
	Chlorophycées	Isofucostérol, 39	3 et 4
	Champignons	Ergostérol, 40	3 et 21
	Bryophytes	B-sitostérol, 37 Capestérol, 35 Stigmastérol, 36	3
Végétaux supérieurs	Gymnospermes	B-sitostérol, 37	3
	Angiospermes	B-sitostérol, 37 Capestérol,35 Stigmastérol, 36	3

TABLEAU 4 : ***Comparaison de la distribution des stérols entre les végétaux supérieurs et végétaux inférieurs***

LE TABLEAU 5: ***Distribution de phytostérols dans les plantes supérieures***

Espèce	Famille	Pourcentages			Référence
		B-SITOSTÉROL	Campestérol	Stigmastérol	
Pinus contorta	Abietinée	73	5	0	16
Helianthus annus	Composée	21	8,5	11,5	16
Erythrina suberosa	Papilionacée	31	5	63	7
Posidonia australis	Potomogetonacée	83,7	5,4	9,6	14
Avicennia marina	Verbénacée	70 ;,2	0,7	22,7	20
Albizzalebbek	Mimosacée	78	2	10	13
Thevetianerifolia	Apocynacée	50	29	10	12
Oncoba spinosa	Flacourtiacée	87	2	1	13
Callophylum	Guttiferacée	26	20	50	13
Hyptis suaveolens	Labiée	61	15	13	13
Hannoa undulata	Simaroubacée	62	9,2	14	18
Tagetes erecta	Composée	17	9	74	PRÉSENT TRAVAIL

BIBLIOGRAPHIE

[1] - G.W.PATTERSON, *Relation between structure and retention time of sterols in gaz chromatography*. Anal. Chem, (1971), 43, 1165-1170.

[2] - G.ZWEIG, J.SHERMA. *Handbook of Chramatography*. CRC PRESS,Cleveland, (1972), 4418,1, S46.

[3] - T.TCHESCHE, *Les stéroides en C_{21} d'origine végétale*. Bull.Soc.Chim, (1969), 1219.

[4] - HEFTMAN dans L.P.MILLER, *Steroides, Phytochemistry*, (1973), 2, chap5, 171.

[5] - J.ARTAUD, M.C. IATRIDES, C.TISSE, J.P.ZAHRA, J.ESTIENNE, *Etudes chromatographiques et spectroscopiques de stérols, applications aux stérols d'algues*. Analusis, (1980), 8, (7), 277-286.

[6] - J.BERGMAN, B. LINDGREN, CM. SVAHN, Acta Chim.Scand., (1965),19, 1661.

[7] - K.R, MARKHAM, L.J.PORTER, *Chemical constituents of bryophytes*, in REINHOLD, L., HARBONE, J.B., SWAIN, T., .Progress in Phytochemistry, (1978),5, 81-182

[8] - LJ.GOAD, TW.GOODWIN, *The biosynthesis of plant sterols in* L.REINHOLD, L., LIPSHITZ, Y., Prog ress in Phytochemistry. Intersciences Publishers, (1972),3, 113-199.

[9] T.ITOH , I.TAMURA, T.MATSUMOTO, *Steroids , Methyl sterols and Triterpenes alcohols in threacea and some vegetable oils*. Lipids, (1974), 9,1973.

[10] - S.P.GUNASEKERA, V.KUMAR, M.UVAIS, S.SULTANBAWA, N.P.BALASUBRAMANIAM, *Triterpenoids and steroids of some Sapotacea and their chemotaxonomic significance*. Phytochemistry, (1977), 16, 923.

[11] - T.ITOH , I.TAMURA, T.MATSUMOTO, *Composition of 19 vegetables oils*. Journal of the American Oil of Chemistry Society, (1983), 123.

[12] - J.W.ROWE, *The steroids of Pine bark* .Phytochemistry, (1965), 4,1.

[13] - P.D. NICHOLS, D.W.KLUMPP, R.B.JOHNS, *Lipid components of the Seagrasses Posidonia Australis and Heterozostera tasmanica as indicators of carbon source*. Phytochemistry, (1982), 21, 1613.

[14] - G.P.WANNIGAMA, J.K.VOLKMAN, F.T.GILLAN, P.D.NICHOLS, R.B JOHNS, *A comparison of lipid component of the fresh and dead leaves and pneumatophores of the Mangrove Avicennia marina*. Phytochemistry , (1981), 20, 659.

[15] - J.MIRALLES, *Etude de l'insaponifiable de l'huile de graines de Thevetia nereifolia Juss*. Revue française des corps gras, (1982), 29e année, (2).

[16] - A.HARLESKIND, F.AUDIAU, J.P.WOLFF, *Analyse des stérols et son application à l'étude des corps gras*. Revue française des corps gras, (1966),3, 165-173.

[17] - T.M.YOUNG, I.TOSHIHIRO, T.TOSHITAKE, T.MATSUMOTO, *Analysis of sterol fractions from twenty vegetable oils. Lipids*, (1974), 9, 11.

[18] - T.W.GOODWIN, Sterols, in W.D.P.STEWART, *Algal Physiology and Biochemistry*, University of California Press,(1974), chap 9, 266-281.

[19] - S.HARKISHAN, S.C.AMRIK, *Waxes and stetols of Erythryna suberosa bark*. Phytochemistry, (1970), 9, 1673-1675.

[20] - J.MIRALLES, *Contribution à l'étude de quelques huiles d'origine sénégalaise* ; Thèse de Doctorat d'Ingénieur, Académie de Montpellier, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, (1982), 57-63.

[21] - N.A.SOERENSEN, The taxanomic significance of acetylenic compounds. Recent.Advan. Phytochemistry, (1968), 1, 187.

[22] - M.BARBIER, M.DEVIS, *Sur les stérols des pollens*, C.R.Acad.SC. Paris (1967), 264, 504-506.

[23] - V.ARDENNE, G.OSSKE, K.SCHREIBER, K.STERNFELDER, R.TUMMLER, *Die Kultupflanze*, (1965), 13, 101-105.