

DÉTERMINATION DU PROFIL EN ACIDES GRAS DE L'HUILE DES GRAINES DE *MOMORDICA CHARANTIA* PAR CHROMATOGRAPHIE UPC²

Présenté par Manuela Mekoudjou

Promoteur(s) : Prof. Yvan Larondelle (UCL/AGRO/LIBST)

Lecteurs: Prof. Cathy Debier (UCL/AGRO/LIBST)
Prof. Joelle Leclercq (UCL/FASB)

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention
du diplôme de **Bioingénieur : chimie et bioindustries**

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation.

Je tiens à remercier mon promoteur, M. Yvan Larondelle, pour m'avoir permis d'effectuer mon mémoire dans son laboratoire, pour m'avoir toujours encouragée, pour sa disponibilité et ses conseils.

Je tiens également à remercier M. Eric Mignolet pour toute son aide dans la réalisation de mes analyses au laboratoire, pour sa disponibilité pour répondre à mes questions, et pour le temps qu'il a accordé dans la réalisation de ce document.

Je remercie tout particulièrement Mlle Monique Tatiana Ngo Njembe que j'ai prise de court, mais qui n'a ménagé aucun effort pour que ce travail soit réalisé. Merci pour ta disponibilité, ton temps, tes conseils, tes encouragements et pour tout le reste.

Je remercie les Professeures Joelle Leclercq et Cathy Debier pour avoir accepté de faire partie de mon Jury.

Je remercie le Professeur Lai Thi Ngoc Ha, son étudiante Pham Thi Luyen de l'Université nationale d'agriculture du Vietnam, pour m'avoir fourni mon matériel d'étude qui venait du Vietnam. Merci Luyen pour ton amitié et tes encouragements durant la réalisation de ce travail.

Je remercie également le Professeur Nicolas Ayessou et le Doctorant Samba Balde de l'Université Cheikh Anta Diop sans qui je n'aurais pas pu avoir les échantillons provenant du Sénégal.

Merci à tous les membres du laboratoire BNTE qui m'ont acceptée dans leur équipe, et qui m'ont toujours apporté leur aide quand j'en avais besoin. Merci également à tous mes camarades avec qui j'ai été au laboratoire durant la réalisation de ce travail.

Merci également à ma famille et mes amis qui n'ont jamais cessé de me soutenir durant mes études, qui ont toujours été là dans les bons comme les mauvais moments, et qui ont toujours cru en moi.

RÉSUMÉ

Les acides α -linoléniques conjugués (CLnA) sont un mélange d'isomères géométriques et de position de l'acide octadécatriénoïque. Ils sont trouvés en grande quantité dans les graines de certaines plantes, et de nombreuses études suggèrent qu'ils ont des effets bénéfiques pour la santé. L'acide α -éléostéarique est le CLnA majoritaire dans l'huile des graines de *Momordica charantia*, et de nombreuses variétés sont cultivées au Vietnam. L'objectif de ce travail est d'établir le profil en acides gras de plusieurs variétés traditionnelles de *Momordica charantia* du Vietnam, ainsi que de plantes sauvages collectées au Sénégal, dans l'espoir d'en identifier qui soient particulièrement riches en CLnA.

Nous avons analysé 98 échantillons de 14 variétés de *Momordica charantia*, ainsi que deux échantillons d'une variété de *Momordica balsamina* afin de faire une étude comparative. Parmi les 14 variétés de *Momordica charantia*, 11 provenaient de Vietnam, deux provenaient du Sénégal, récoltées dans les localités de « Fatick deouvsel » et « Niaye dakan », et la dernière provenait d'une localité indéterminée du Vietnam, mais a été cultivée dans les serres de l'UCL à Louvain-la-Neuve. Les échantillons de *Momordica balsamina* provenaient du Sénégal, dans la localité de « Pal de jamba ». La détermination du profil en acides gras s'est faite par chromatographie en phase gazeuse et par chromatographie UPC².

Les résultats de cette étude ont montré qu'en moyenne, dans les graines de *Momordica charantia*, il y a 5 acides gras principaux que sont l'acide palmitique (2,15%), l'acide oléique (2,23%), l'acide linoléique (4,76%), l'acide stéarique (32,88%) et les CLnA (56%). Parmi les CLnA, l'acide α -éléostéarique représente 87,64%, l'acide β -éléostéarique 8,11%, et l'acide punicique 4%. Ces teneurs ne sont pas significativement différentes d'une variété à l'autre, d'après le test de Tukey-Kramer au seuil de 5%. L'huile des graines de *Momordica balsamina* contient de l'acide stéarique (9,55%), de l'acide linoléique (10,13%), de l'acide palmitique (11,01%), de l'acide oléique (15,63%) et des CLnA (50,98%), dont 82,72% d'acide punicique, 12,98% d'acide α -éléostéarique et 3,28% d'acide β -éléostéarique. Cette espèce présente dès lors un profil en CLnA très différent de celui de *Momordica charantia*.

La chromatographie en phase gazeuse nous a permis d'établir le profil en acides gras des graines de *Momordica charantia*, mais ne nous a pas permis de séparer les différents isomères de CLnA présents dans l'huile. La séparation de ces isomères a été effectuée grâce à l'UPC².

Mots clés : Acides linoléniques conjugués, Acide α -éléostéarique, *Momordica charantia*, UPC²

ABSTRACT

Conjugated linolenic acids (CLnA) stands for a mixture of positional and geometric isomers of octadecatrienoic acid. CLnA are the major fatty acids in the seeds of few plants. Many studies have suggested their beneficial effects on health. α -Eleostearic acid is the major CLnA in *Momordica charantia* seed oil. Many varieties are cultivated in Vietnam. The objective of this work is to establish the fatty acid profile of several varieties of *Momordica charantia* from Vietnam, as well as of some wild specimen harvested in Senegal, in the hope of identifying some that would be particularly rich in CLnA.

We analyzed 98 samples of 14 varieties of *Momordica charantia*, as well as two samples of the *Momordica balsamina* species to make a comparative study. Among the 14 varieties of *Momordica charantia*, 11 were grown from Vietnam, two came from Senegal and were harvested in the localities of "Fatick deouysel" and "Niaye dakan", and the last one came from an undetermined locality of Vietnam but was grown in the greenhouses of UCL in Louvain-la-Neuve. The *Momordica balsamina* samples came from the locality of "Pal de jamba" in Senegal. The determination of the fatty acid profile was done by gas chromatography, and by UPC² chromatography.

The results of this study showed that on average, in the seeds of *Momordica charantia*, there are 5 main fatty acids that are palmitic acid (2.15%), oleic acid (2.23%), linoleic acid (4.76%), stearic acid (32.88%) and CLnA (56%). Among the CLnAs, α -eleostearic acid represents 87.64%, β -eleostearic acid 8.11%, and punicic acid 4%. These levels are not significantly different from one variety to another, based on the Tukey-Kramer 5% test. The *Momordica balsamina* seed oil contains stearic acid (9.55%), linoleic acid (10.13%), palmitic acid (11.01%), oleic acid (15.63%) and CLnA (50.98%), of which 82.72% punicic acid, 12.98% α -eleostearic acid and 3.28% β -eleostearic acid. This species thus presents a very different CLnA profile, as compared to *Momordica charantia*.

Gas chromatography allowed us to establish the fatty acid profile of *Momordica charantia* seeds, but did not allow us to separate the different isomers of CLnA present in the oil. The separation of these isomers was done with UPC².

Key words: Conjugated linolenic acids, α -eleostearic acid, *Momordica charantia*, UPC².

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	i
RÉSUMÉ.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TABLE DES MATIERES.....	iv
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
I- Les acides gras	3
1- Définition, nomenclature et classification.....	3
2- Les acides linoléiques conjugués.....	5
3- Les sources naturelles de CLnA.....	6
4- Les rôles physiologiques des CLnA.....	6
II- Momordica charantia	10
1- Description générale.....	10
2- Systématique de <i>Momordica charantia</i>	10
3- Descriptions botaniques.....	11
4- Origine et usages.....	12
5- Valeurs nutritionnelles.....	14
III- La chromatographie	18
1- Principe et description de la méthode.....	18
2- L'efficacité d'une colonne.....	20
3- La résolution d'une colonne.....	22
4- Quelques caractéristiques des chromatographies en phase liquide et en phase gazeuse 22	
5- La chromatographie UPC ²	24
CHAPITRE II : OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	29
CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES.....	30
I- Appareillage	30
II- Echantillonnage	32
III- Préparation des échantillons	33
IV- Analyses chromatographiques	35

CHAPITRE IV : RÉSULTATS ET DISCUSSION	38
I- Analyse des échantillons par GC	38
1- Analyse des variétés de <i>Momordica charantia</i>	38
1-1- Chromatogrammes	38
1-2- Profil en acides gras	38
2- Analyse des échantillons de <i>Momordica balsamina</i> provenant de la localité de Pal de jamba 43	
2-1- Chromatogrammes	43
Figure 14: Chromatogramme d'un échantillon de <i>Momordica balsamina</i> obtenu en GC 44	
2-2- Profil en acides gras	45
3- Comparaison de <i>Momordica charantia</i> et de <i>Momordica balsamina</i>	45
II- Analyse des échantillons par UPC²	48
1- Analyse des variétés de <i>Momordica charantia</i>	48
1-1- Chromatogrammes	48
1-2- Profil en acides gras	48
2- Analyse des échantillons de <i>Momordica balsamina</i> provenant de la localité de Pal de jamba 51	
2-1- Chromatogrammes	51
2-2- Profils en acides gras	51
III- Discussion générale	54
1- Le profil en acides gras	54
2- Comparaison des concentrations en CLnA obtenues en GC et en UPC ²	55
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	57
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58

LISTE DES ABBREVIATIONS

CLA	Conjugated linoleic acid
CLnA	Conjugated linolenic acid
GC	Gaz chromatography
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IL	Interleucines
MCP	Macrophage chemotactic protein
MIP	Macrophage inflammatory protein
PAF	Platelet activating factor
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	Peroxisome proliferator response element
TNF-α	Tumor necrosis factor- α
UPC²	Ultra Performance Convergence Chromatography
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Acides gras avec des doubles liaisons en configuration trans (A) et cis (B).....	4
Figure 2: Exemples d'acides gras oméga 3 et 6 (Palmer et al., 2012).....	4
Figure 3: Structures chimiques de quelques CLnA retrouvés à l'état naturel (Plourde, 2006) ..	5
Figure 4: Feuilles (a), fleurs (b), fruit à maturité (c) et graines de <i>Momordica charantia</i>	12
Figure 5: Principe général de fonctionnement de la chromatographie.....	20
Figure 6: Le système ACQUITY® Ultra Performance Convergence Chromatography (UPC ²) et son mode de fonctionnement (adapté de Fountain et al., 2014).....	25
Figure 7: Solvants pouvant être utilisés avec le CO ₂ en UPC ² (d'après Fountain et al., 2014)	27
Figure 8: Chromatographe GC Trace 1310.....	30
Figure 9: Chromatographe GC Trace 2000.....	31
Figure 10: Vue partielle du chromatographe UPC ²	31
Figure 11: Graines entières et décortiquées de <i>Momordica balsamina</i> , (PJ)	33
Figure 12: Graines des différentes variétés de <i>Momordica charantia</i> provenant du Vietnam .	33
Figure 13: Chromatogrammes de 3 variétés de <i>Momordica charantia</i> obtenus par GC	39
Figure 14: Chromatogramme d'un échantillon de <i>Momordica balsamina</i> obtenu en GC.....	44
Figure 15: Superposition des chromatogrammes de <i>Momordica charantia</i> et de <i>Momordica balsamina</i>	46
Figure 16: Zoom des pics des CLnA de <i>Momordica charantia</i> et <i>Momordica balsamina</i>	47
Figure 17: Chromatogramme d'un échantillon V5 de <i>Momordica charantia</i> obtenu en UPC ²	49
Figure 18: Chromatogramme de <i>Momordica balsamina</i> obtenu en UPC ²	52
Figure 19: Comparaisons des moyennes des concentrations en CLnA obtenues en GC à celles obtenues en UPC ² par le test de tukey-Kramer	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Valeur nutritionnelle des fruits de <i>Momordica charantia</i> (USDA, 2017)	14
Tableau 2: Valeur nutritionnelle des feuilles de <i>Momordica charantia</i> (d'après Tchiégang and Aissatou, 2004).....	15
Tableau 3: Valeur nutritionnelle des graines de <i>Momordica charantia</i> (d'après Ali et al., 2008)	15
<i>Tableau 4: Composition en acides gras de quelques espèces de Momordica cultivées dans différentes régions (valeurs exprimées en pourcentage molaire).....</i>	<i>17</i>
Tableau 5: Classification des méthodes chromatographiques sur colonne (adapté de Skoog et al., 2015).....	19
Tableau 6: Quelques avantages et inconvénients de la chromatographie en phase liquide (adapté de Hudalla et McDonald, 2013)	23
Tableau 7: Quelques avantages et inconvénients de la chromatographie en phase gazeuse (adapté de Serpinet, 1968).....	23
Tableau 8: Caractéristiques des échantillons des graines de <i>Momordica charantia</i> analysés pour leur profil en acides gras	32
Tableau 9: Caractéristiques des appareils chromatographiques utilisés	36
Tableau 10: Gradient de solvants en UPC ²	36
Tableau 11: Programme de température des fours en GC	37
Tableau 12: Concentrations des principaux acides gras dans les différents échantillons de <i>Momordica charantia</i> analysés (mg/g)	40
Tableau 13: Concentrations des principaux acides gras dans les différents échantillons de <i>Momordica charantia</i> analysés (% d'acides gras identifiés)	41
Tableau 14: Concentrations moyennes des acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et des CLnA dans les échantillons de <i>Momordica balsamina</i>	45
Tableau 15: Concentrations en CLnA dans les échantillons de <i>Momordica charantia</i> (% de CLnA identifiés).....	50
Tableau 16: Concentrations en CLnA dans les échantillons de <i>Momordica balsamina</i> (% de CLnA identifiés).....	53
Tableau 17: Tableau comparatif des teneurs en acides gras dans les différents échantillons analysés	54
Tableau 18: Concentrations en CLnA de quelques échantillons, déterminées en GC et en UPC ²	55

INTRODUCTION

Margose, momordique, ou melon amer, sont des différentes appellations désignant une même plante, scientifiquement connue sous le nom de *Momordica charantia*. Cette plante grimpante de la famille des *Cucurbitaceae* serait originaire des régions tropicales du globe, et aurait un potentiel nutritionnel et pharmacologique énorme. Les feuilles auraient une concentration variée et élevée en protéines. Ces mêmes feuilles, ainsi que les graines, les fruits et les racines seraient utilisés dans le traitement de certaines pathologies (Gupta et al., 2011).

De nombreux scientifiques, pour donner suite à des observations empiriques et à la pharmacopée traditionnelle des populations vivant dans les régions où se développe *Momordica charantia*, ont entamé des études sur la plante (Taylor, 2002). Ces études avaient pour rôle de déceler les différents composés actifs que pouvait renfermer la plante, ainsi que ses propriétés nutritionnelles et/ou curatives qui pourraient être exploitées. Il a effectivement été démontré que toutes les parties de la plante avaient un potentiel nutritionnel et/ou curatif, et à ce jour des études continuent d'être menées dans ce sens.

Au Vietnam, des botanistes ont constaté que la plante très répandue dans le pays, voit bon nombre de ses variétés disparaître. La cause principale est le développement des variétés hybrides (dépourvues de graines) à rendement élevé, et la sous-exploitation des variétés locales à graines (Lai, 2017). Conscients du potentiel énorme de la plante qui pourrait être perdu, une équipe de chercheurs Belges et Vietnamiens a décidé de mener des recherches sur les huiles des graines de Momordiques, plus précisément sur leur contenu en acides gras linoléiques conjugués (CLnA). Ces CLnA qui représentent près de 50% des acides gras de l'huile des graines (Ali et al., 2008), auraient des propriétés anti-obésité, anti-inflammatoires, anti-diabétiques, anti-tumorales et immunostimulantes (Gupta et al., 2011).

C'est dans le cadre de ces recherches que s'inscrit le présent travail. Notre objectif principal est de déterminer le profil en acides gras des graines de différentes variétés de *Momordica charantia* par chromatographie en fluide supercritique (Ultra performance Convergence Chromatography UPC²) et par chromatographie en phase gazeuse (Gaz Chromatography GC). Il sera question dans un premier temps de déterminer le profil en acides gras de 11 variétés de *Momordica Charantia* cultivées au Vietnam, ainsi que d'autres variétés de l'espèce, provenant du Sénégal. Ensuite, nous établirons un profil en CLnA de quelques échantillons par UPC². Pour finir, nous déterminerons les différences de profil en acides gras

suivant les variétés, et nous évaluerons ainsi les performances des deux méthodes analytiques sur base des résultats obtenus.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

I- Les acides gras

1- Définition, nomenclature et classification

Les acides gras sont des molécules hydrophobes, comportant une chaîne linéaire ou chaîne aliphatique de 4 à 32 atomes de carbone, avec une extrémité carboxylique et une extrémité méthyle. Ils appartiennent à la grande famille des lipides (Akoh and Min, 2002; Hennebelle, 2012). Les acides gras peuvent être classés selon plusieurs critères, comme la longueur de la chaîne aliphatique, le nombre, la position et la configuration des doubles liaisons.

- **La longueur de la chaîne aliphatique.** Les acides gras contenant au plus 4 atomes de carbone sont dits volatils. Ils sont appelés acides gras à chaîne courte lorsqu'ils ont entre 6 et 10 atomes de carbone. Ils sont appelés acides gras à chaîne moyenne entre 12 et 16 atomes de carbone et acides gras à chaîne longue lorsqu'ils ont plus de 16 atomes de carbone (Cuvelier et al., 2004)
- **Le nombre de doubles liaisons.** La chaîne aliphatique peut contenir ou pas des doubles liaisons. Lorsqu'elle n'en contient pas, on parle d'acide gras saturé dont la formule chimique générale est la suivante : $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$. Lorsqu'elle en contient, on peut distinguer des acides gras mono-insaturés avec une seule double liaison de formule chimique générale $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_x\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_y\text{-COOH}$, et des acides gras poly-insaturés avec au moins deux doubles liaisons (Cuvelier et al., 2004).
- **La configuration des doubles liaisons.** S'agissant des acides gras insaturés, on distinguera en fonction de la configuration des doubles liaisons dans l'espace les acides gras *cis* et les acides gras *trans*. Ces appellations sont fonction de l'organisation des atomes d'hydrogène autour des doubles liaisons carbone-carbone. Lorsque les hydrogènes sont du même côté de la double liaison, on parle d'acide gras *cis*, et lorsqu'ils sont de part et d'autre de la double liaison, on parle d'acide gras *trans*. Ces configurations sont représentées à la Figure 1.

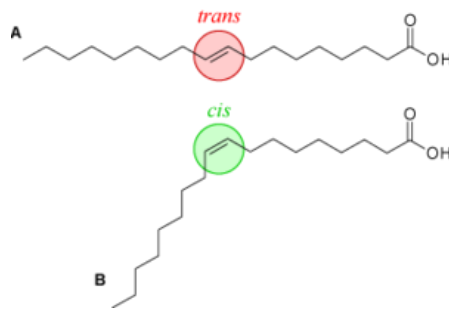


Figure 1: Acides gras avec des doubles liaisons en configuration *trans* (A) et *cis* (B)

Dans la classification de l’UICPA (Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée), le carbone numéro 1 est celui porté par la fonction carboxylique, et le dernier est celui à l’autre bout de la chaîne. Le deuxième carbone est appelé α , le troisième β , et le dernier ω . Les nutritionnistes quant à eux considèrent le carbone ω comme étant le premier, et c’est de là qu’est née la nomenclature dite ω (Cuvelier et al., 2004). Selon la nomenclature oméga, on peut distinguer les acides gras oméga 3 (ω -3) et les acides gras oméga 6 (ω -6). Les ω -3 ont leur première double liaison située entre le troisième et le quatrième carbone en partant du méthyle terminal ; les ω -6 ont leur première double liaison située entre le sixième et le septième carbone en partant du méthyle terminal. On peut observer des exemples de quelques acides gras à la Figure 2.

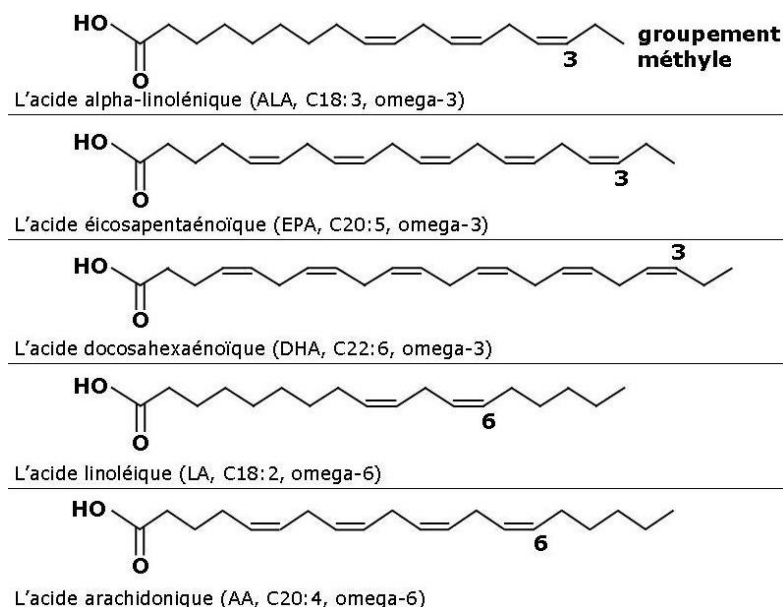


Figure 2: Exemples d'acides gras oméga 3 et 6 (Palmer et al., 2012)

Au sein des acides gras polyinsaturés, le nombre de doubles liaisons entraîne une augmentation du nombre d'isomères possibles. Parmi ces isomères, il est alors possible de trouver des isomères dits conjugués. Il s'agit des isomères dont les doubles liaisons ne sont séparées l'une de l'autre que par une simple liaison sans groupement méthylène (Cuvelier et al., 2004).

2- Les acides linoléiques conjugués

Les acides linoléiques conjugués (CLnA) sont un mélange d'isomères géométriques et de position de l'acide octadécatriénoïque [C18:3(cis9,cis12,cis15) ou cis,cis,cis-9,12,15-octadécatriénoïque, ou C18:3 ω-3] (Cuvelier et al., 2004). Ces acides gras sont généralement trouvés dans les graines des plantes (Yuan et al., 2014). On peut par exemple les trouver dans les huiles de pépins de *Punica granatum*, des graines de *Riciodendron heudelotii*, de *Momordica charantia* ou encore de *Catalpa bignonioides* (Yuan et al., 2014). Les isomères naturels en position 9,11,13 et 8,10,12 qui ont été recensés et dont les formules sont représentées à la Figure 3, sont l'acide α-éléostéarique (α-ESA), l'acide punique (PA), l'acide catalpique (CA), l'acide jacarique (JA) et l'acide calendique (CDA) (Plourde, 2006).

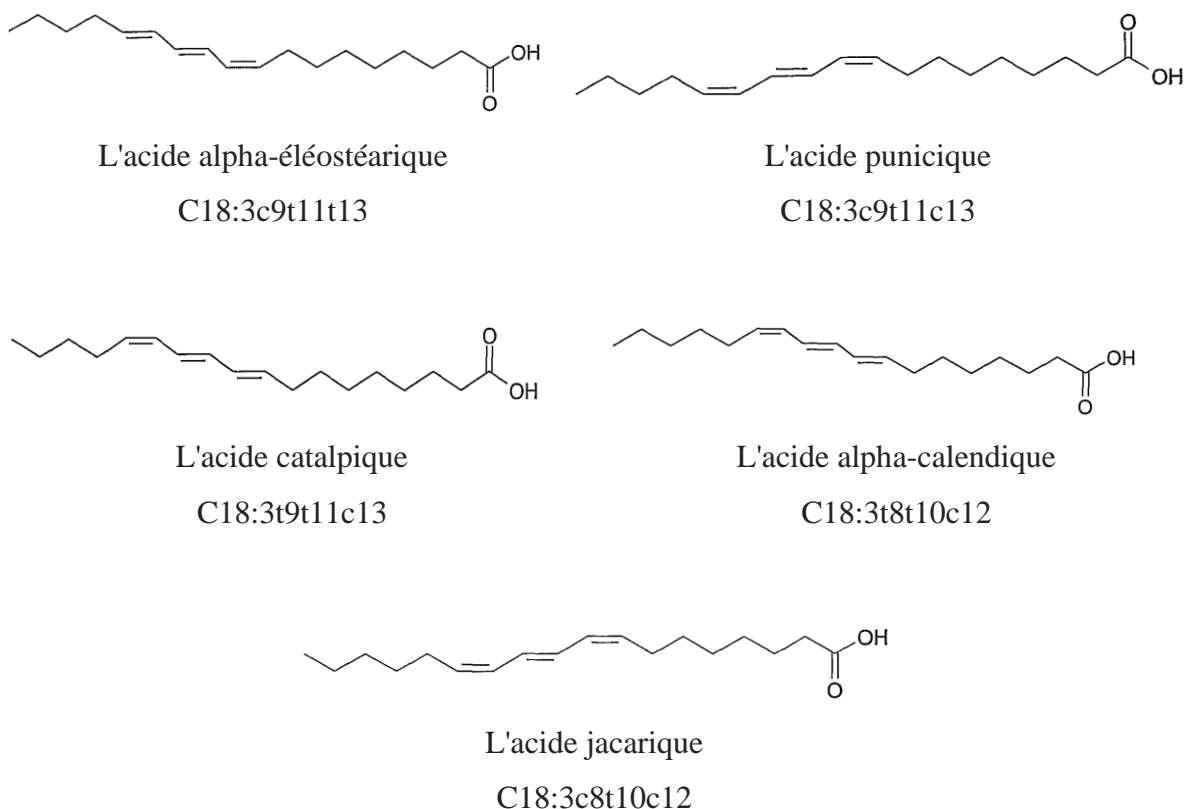


Figure 3: Structures chimiques de quelques CLnA retrouvés à l'état naturel (Plourde, 2006)

3- Les sources naturelles de CLnA

Comme énoncé plus haut, les CLnA sont retrouvés en grande quantité dans les graines des plantes. L'acide alpha-éléostéarique est retrouvé en grande quantité dans l'huile des graines de *Momordica charantia*, de *Ricinodendron heudelotii* (Nzali Ghomdim et al., 2012), de même que dans l'huile des graines de *Vernicia fordii*, communément appelée Tung. L'acide punique est retrouvé dans les graines de *Punica granatum*, communément appelé grenade (Pereira de Melo et al., 2014) d'où son nom. L'acide catalpique est retrouvé dans l'huile des graines de *Catalpa bignonioides* (Yuan et al., 2014), l'acide calendique dans l'huile des graines de *Calendula officinalis*, communément appelé marigold (Yang et al., 2016), et l'acide jacarique est retrouvé dans l'huile des graines de *Jacaranda mimosifolia* (Yuan et al., 2014).

4- Les rôles physiologiques des CLnA

De nombreuses études ont démontré que les CLnA ont des effets bénéfiques pour la santé (Yuan et al., 2014). Des activités biologiques ont notamment été décelées, et certaines d'entre elles seraient dues à la conversion des CLnA en CLA (Conjugated Linoleic Acid) (Tsuzuki et al., 2003).

Les CLA sont un mélange d'isomères géométriques et de position de l'acide octadécadiénoïque (C18:2cis9,cis12), principalement trouvés dans la matière grasse issue des ruminants (Bhattacharya et al., 2006). Ils auraient de nombreux effets bénéfiques sur la santé humaine, dont l'inhibition de la carcinogénèse (Akraim et al., 2007).

Il a été démontré chez le rat que les acides α -éléostéarique, jacarique et punique pouvaient être métabolisés en CLA, C18:2cis9, trans11 (Yuan et al., 2014). Ce type de conversion a également été observé *in vitro* avec des cellules Caco-2 (Schneider et al., 2012).

Parmi les rôles physiologiques que pourraient avoir les CLnA, nous pouvons citer :

- **Des effets cytotoxiques sur des cellules tumorales.** Plusieurs études ont démontré que les CLnA auraient une activité cytotoxique plus forte que les CLA (Nagao and Yanagita, 2005). Une étude a été menée sur des cellules responsables du cancer colorectal (DLD-1), du cancer du poumon (A549), du cancer du sein (MCF-7) et du cancer de l'estomac (MKN-7). Durant cette étude, des préparations ont été effectuées à partir de CLA, d'acide linoléique, d'acide α -linoléique, et à partir d'huile de tung, riche en acide α -éléostéarique. Tous ces acides gras ont été traités par 6,6% de KOH à 180°C pendant 25minutes. Les cellules cancéreuses ont été incubées pendant 24h avec 5-100 μ M des acides gras. Selon les résultats de cette étude, les CLA et l'acide linoléique n'avaient

pas un effet significatif sur la viabilité des cellules cancéreuses. Toutefois, il a été observé une forte diminution de la viabilité des cellules cancéreuses incubées dans l'huile de tung. Les conclusions de cette étude ont attribué un effet cytotoxique important de l'acide α -éléostéarique sur les cellules cancéreuses, contrairement aux CLA (Igarashi and Miyazawa, 2000).

- **Une réduction significative des acides gras du foie, du tissu adipeux et du plasma.** Arao et al. ont étudié des effets des CLnA, principalement l'acide punique, sur des rats obèses (Arao et al., 2004). Durant cette étude, un groupe de rats obèses a été nourri pendant deux semaines avec des aliments supplémentés avec 9% d'huile de carthame (huile riche en acide linoléique et réputée pour agir sur la diminution du taux de cholestérol) et 1% d'huile de pépins de grenade. Un autre groupe a été nourri avec un aliment supplémenté avec 10% d'huile de carthame (contrôle). Les aliments donnés aux rats induiraient chez ceux-ci une hyperlipidémie, mais l'objectif de l'étude était d'évaluer si le supplément d'huile de pépins de grenade avait un effet sur le métabolisme des lipides. Les observations ont montré que le régime avec l'huile de pépins de grenade n'affectait pas le tissu adipeux abdominal et les lipides plasmatiques. Toutefois, une diminution nette des triacylglycérols du foie a été observée. Les rats du groupe contrôle présentaient une hyperlipidémie (Arao et al., 2004). Ces observations ne permettent néanmoins pas de confirmer l'effet des CLnA sur le profil lipidique du tissu adipeux. D'autres observations faites des études menées sur les animaux et sur les humains sont contradictoires en ce qui concerne l'effet hypolipidémiant des CLnA (Yuan et al., 2014). Dans les cas où des effets hypolipidémians ont été observés, les CLnA impliqués étaient l'acide α -éléostéarique et l'acide punique (Yuan et al., 2014).
- **Une baisse significative de la glycémie.** Une étude a été menée chez des souris présentant un diabète induit. Une administration d'acide punique à 1g/100g d'aliment pendant 30 jours a entraîné une diminution significative de la glycémie. De plus, une diminution de la concentration plasmatique d'insuline a été observée (Banihani et al., 2013). De cette même étude et des résultats des travaux de Bassaganya, il est ressorti que les acides punique et catalpique avaient la capacité de réguler l'activité des gènes contrôlant l'homéostasie du glucose via les récepteurs PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor)- α et γ (Bassaganya-Riera et al., 2011).

- **Des effets anti-inflammatoires.** Les troubles inflammatoires tels que les maladies inflammatoires de l'intestin, la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, le syndrome métabolique, sont reconnus comme problèmes de santé majeur. Ils ont pour principale caractéristique une production excessive de médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α , les GM-CSF, les IL-1, IL-6, IL-8, les leucotriènes B4 et PAF), des neutrophiles, des macrophages et des espèces réactives de l'oxygène (Boussetta et al., 2009). Il a été démontré que la prévention et le traitement des désordres inflammatoires pourrait passer par l'activation de PPAR- γ par certains CLnA comme l'acide punique (Bassaganya-Riera et al., 2011). Les mêmes auteurs montrent de façon expérimentale que l'acide punique améliore les maladies inflammatoires de l'intestin en régulant la fonction des macrophages et des lymphocytes T par des mécanismes PPAR- γ et δ dépendants. Il a également été montré que l'acide punique inhiberait la surproduction des espèces réactives de l'oxygène induite par le TNF- α . L'acide α -éléostéarique serait aussi un agoniste des PPAR- γ (Yuan et al., 2014). Une autre étude a montré que les CLnA induisaient une diminution considérable de la viabilité de neuf cytokines pro-inflammatoires, à savoir : IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 and TNF- α (Costantini et al., 2014).
- **Des activités anti-oxydantes.** Une étude ayant pour but d'évaluer l'activité antioxydante de l'acide α -éléostéarique et de l'acide α -linoléinique a été menée sur des rats. 6 groupes de rats ont été constitués. Le premier groupe (contrôle normal) a été nourri avec de l'huile de tournesol et de l'eau. Le second groupe a été nourri avec du chlorure de méthyl mercure (5mg/kg de poids corporel/jour) dissous dans l'huile de tournesol. Les rats du troisième et du quatrième groupe ont été nourris avec de l'acide α -linoléinique (0,5% et 1% des lipides totaux) ainsi que du chlorure de méthyl mercure (5mg/kg de poids corporel/jour) dissous dans les lipides. Les rats du cinquième et du sixième groupe ont été nourris avec de l'acide α -éléostéarique (0,5% et 1% des lipides totaux) ainsi que du chlorure de méthyl mercure (5mg/kg de poids corporel/jour) dissous dans les lipides. Hormis le groupe contrôle, tous les autres groupes ont reçu du chlorure de méthyl mercure durant 3 jours avant le début de l'expérience décrite précédemment, et qui a duré 15 jours. Les résultats ont montré une diminution significative des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion transférase) dans le foie et les reins, à cause du stress oxydatif généré par le méthyl mercure. Toutefois, les paramètres altérés ont pratiquement été rétablis suite à l'administration des CLnA, et les dommages engendrés par le méthyl mercure ont significativement diminué (Pal and

Ghosh, 2012). Ceci atteste l'activité antioxydante qu'auraient les CLnA. Yuang et al ont montré que cette activité serait due à la présence d'une grande quantité de doubles liaisons trans (Yuan et al., 2014).

II- *Momordica charantia*

Au sein de la famille des *Cucurbitaceae*, le genre *Momordica* retrouvé dans les régions tropicales comprend plus de 600 espèces, très utiles pour leurs propriétés nutritionnelles et médicinales. *Momordica balsamina* et *Momordica cochinchinensis* en sont des espèces, mais la plus répandue et la plus cultivée de ce genre est *Momordica charantia* (Singh et al., 2018).

1- Description générale

Momordica charantia est une plante de la famille des *Cucurbitaceae*, originaire des régions tropicales du monde. Elle est connue sous de nombreux noms vernaculaires parmi lesquels : Margose (à la Réunion), Pomme de coolie (aux Antilles), Concombre amer (en France), Habirou (au Cameroun) ou Karela (en Inde). L'espèce *Momordica charantia* aurait d'abord été domestiquée en Inde et dans le sud de la Chine. Autrefois retrouvée à l'état sauvage, elle est aujourd'hui largement cultivée dans plusieurs parties du monde, notamment en Afrique, en Asie, aux Caraïbes et en Amérique du Sud (Armougom, 1998).

2- Systématique de *Momordica charantia*

La classification systématique présente *Momordica charantia* de la manière suivante :

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Embranchement : *Spermaphyta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Dilleniidae*

Ordre : *Violales*

Famille : *Cucurbitaceae*

Sous-famille : *Cucurbitoideae*

Tribu : *Joliffieae*

Sous-tribu : *Thladianthinae*

Genre : *Momordica*

Espèce : *charantia* (L.,1753)

(Laleye et al., 2016)

3- Descriptions botaniques

La margose est une plante annuelle grimpante monoïque, dont la hauteur peut atteindre 5 m. Les tiges sont délicates et munies de vrilles simples, tandis que les feuilles (Figure 4a) alternes sont de forme comparable à celle des feuilles de vignes. Les limbes ont quant à eux 3, 5 ou 7 lobes. Les fleurs (Figure 4b) petites et jaunâtres, sont portées par des pédoncules frêles. Les fleurs mâles ont trois étamines et les fleurs femelles ont un stigmate à trois lobes et un ovaire infère (Anilakumar et al., 2015).

Les fruits (Figure 4c) sont des baies pendantes, largement ovoïdes et munies d'un bec, ou en ellipse atténuée, d'environ 11 cm × 4 cm, mais pouvant aller jusqu'à 45 cm × 9 cm. Leur couleur est orange rougeâtre à maturité, avec un apex plus pâle. Les fruits sont ornés d'environ 8 rangées longitudinales de tubercules subconiques et de nombreux tubercules plus petits dans les intervalles. Ils s'ouvriront en 3 valves dévoilant les graines entourées d'une pulpe rouge visqueuse. Les fruits cultivés ont une surface lisse ou épineuse, souvent munie de protubérances arrondies, en rangées formant 8 à 10 côtes longitudinales, mais quelques cultivars sont complètement épineux sans côtes (www.prota4u.org).

Les graines sont quant à elles oblongues, d'environ 10 mm × 5 mm, aplaties, blanches ou brunes, à tégument sculpté, à bords cannelés (Figure 4d).



a



b



c



d

Figure 4: Feuilles (a), fleurs (b), fruit à maturité (c) et graines de *Momordica charantia*

Certaines variétés de la plante peuvent être différenciées en fonction de la morphologie ou des caractéristiques des fruits. Toutefois, les données génétiques sont rares, ce qui rend difficile l'estimation correcte de la diversité génétique (Singh et al., 2018). Des regroupements en fonction des distances génétiques et des caractéristiques des fruits ont tout de même été effectués, permettant de classer certaines plantes au sein d'une même variété (Singh et al., 2018). C'est ainsi qu'on retrouve des variétés aux fruits de forme elliptique, oblongue ou ovoïde. On peut également retrouver des variétés aux fruits lisses ou rugueux. La productivité et la longueur des fruits sont également des facteurs d'identification des variétés (Singh et al., 2018).

4- Origine et usages

L'Asie, l'Afrique, les Caraïbes et l'Amérique du Sud sont des régions du globe où on retrouve fréquemment la margose. Elle y est utilisée pour l'alimentation ou la pharmacopée traditionnelle (www.prota4u.org). La plante qui est originaire des tropiques a été domestiquée en Inde et dans le sud de la Chine. Aujourd'hui, elle est retrouvée dans toutes les régions tropicales et subtropicales du globe. Des variétés originaires d'Asie sont cultivées en Amérique

tropicale et dans le sud des Etats-Unis. La plante est parfois cultivée en Afrique de l'Est par des asiatiques, qui utilisent des variétés qui viennent d'Asie (www.prota4u.org).

Les fruits immatures sont considérés comme un légume commercialement important, très prisé pour sa saveur amère. Cette saveur amère peut être atténuée par plusieurs procédés culinaires dont le blanchiment ou le trempage. Le fruit est alors consommé en salade.

En Asie, les feuilles sont très appréciées en tant que légume (www.prota4u.org). Dans les pays où pousse cette plante, les traditions médicinales lui attribuent de nombreuses vertus. Les feuilles écrasées sont utilisées contre les dermatoses et les brûlures. Leurs décoctions sont utilisées comme antibactérien, anti-diarrhéique, pour lutter contre les troubles gastro-intestinaux, ainsi que pour traiter les problèmes menstruels et cardiaques (Armougom, 1998).

Les fruits peuvent servir de purgatif et de vermifuge. Toutefois, ce qui a le plus retenu l'attention des chercheurs est leur utilisation traditionnelle pour contribuer à réguler les taux de glucose sanguin chez les personnes diabétiques. Les racines aident à lutter contre la syphilis, les rhumatismes, mais provoquent également des avortements (Gupta et al., 2011). En ce qui concerne les graines, elles sont utilisées comme anti-inflammatoire, anti-helminthique et anti-diabétique. Dans le passé, toutes les parties de la plante ont été utilisées à des fins médicinales, mais il semblerait que ce soient le fruit et les graines qui renferment les plus importantes quantités de substances actives (www.prota4u.org).

Gupta et al. (2011) ont sommairement résumé les activités pharmacologiques de *Momordica charantia* comme suit :

- Activité antioxydante assurée par des extraits de graines
- Activité antidiabétique
- Activité anticancéreuse et antitumorale, par exemple dans des cas de leucémie, du cancer de la prostate, du sein, du foie...etc
- Activité antimicrobienne (large spectre d'action *in vitro* d'un extrait de feuilles dans de l'eau et de l'éthanol contre plusieurs bactéries)
- Activité anti fertilité démontrée *in vivo* sur des animaux femelles, en utilisant des fruits et des feuilles
- Activité antivirale démontrée *in vivo* et *in vitro*
- Activité anti-helminthique, notamment contre *Ascaridia galii*, en consommant un extrait du jus de fruit dans de l'éthanol ou alors contre *Haemonchus contorcus* en consommant un extrait de graines concentré
- Activité anti-malariale assurée en consommant une infusion de feuilles

- Activité antinéoplasique grâce aux extraits aqueux du fruit
- Activité anti-ulcère et immunomodulatrice grâce à la poudre de fruits séchés.

De nombreux composés biochimiques de la plante sont responsables des activités pharmacologiques citées ci-dessus. Nous pouvons par exemple citer la charantine, la momordicine, la momordine, les momordicosides G, F1, F2, I, K, L, les momorcharines, le momordenol, la momordicine, le momordolol, les acides éléostériques, la cucurbitine, la cucurbitacine, la cucurbitane... etc (Anilakumar et al., 2015; Desai and Tatke, 2015)

5- Valeurs nutritionnelles

Une étude publiée en 2017 par l'USDA (United States Department of Agriculture) a déterminé les valeurs nutritionnelles pour 100 g de fruit du melon amer (Tableau 1).

Tableau 1: Valeur nutritionnelle des fruits de *Momordica charantia* (USDA, 2017)

Constituants	Valeur nutritionnelle (/100g de fruit)
Énergie	17 Kcal
Eau	94,03 g
Macroéléments	
Protéines	1,00 g
Lipides totaux	0,17 g
Sucres totaux	0,90 g
Fibres totales	2,80 g
Minéraux	
Calcium	19 mg
Fer	0.43 mg
Magnésium	17 mg
Phosphore	31 mg
Potassium	296 mg
Sodium	5 mg
Zinc	0.800 mg
Vitamines	
Vitamine A	471 IU
Vitamine B1 (Thiamine)	0.040 mg
Vitamine B2 (Riboflavine)	0.040 mg
Vitamine B3 (Niacine)	0.400 mg
Vitamine B6 (Pyridoxine B6)	0.043 mg
Vitamine B9 (Folates)	72 µg
Vitamine C (acide ascorbique)	84 mg

Une analyse des feuilles récoltées au Cameroun (Tchiégang and Aissatou, 2004) a donné la composition résumée dans le Tableau 2:

Tableau 2: Valeur nutritionnelle des feuilles de *Momordica charantia* (d'après Tchiégang and Aissatou, 2004)

Constituants	Valeur nutritionnelle (/100g de matière sèche)
Protéines	23 g
Lipides	7 g
Sucres totaux	46 g
Dont sucres réducteurs	42g
Fibres totales	11 g
Composés phénoliques	0,49 g
Calcium	1,17 g
Magnésium	2,20 g
Fer	10,13 mg
Phosphore	2,48 g
Vitamine C	2 g

Teneur en eau dans la matière fraîche : 84g/100g

Les graines, sont surtout prisées pour leur huile riche en acides gras polyinsaturés. Leurs valeurs nutritionnelles en fonction de la matière sèche sont données dans le Tableau 3. La variété analysée était Goj karela, cultivée au Bangladesh, caractérisée par un fruit long, vert, recouvert de sortes d'épines triangulaires et au goût amer. Les graines ont été prélevées de fruits matures.

Tableau 3: Valeur nutritionnelle des graines de *Momordica charantia* (d'après Ali et al., 2008)

Constituants	Valeur nutritionnelle (% de matière sèche)
Lipides	36,21 %
Protéines totales	18,23%
Glucides totaux	33,68%
Dont amidon	3,12%
Fibres totales	1,16%
Cendres	2,73 %

Armougom (1998) a établi une comparaison des teneurs en acides gras dans les graines de quelques espèces de *M. charantia* cultivées dans différentes régions du monde. Cette comparaison est présentée dans le Tableau 4.

Tout d'abord, au sein de l'espèce *charantia*, les teneurs en acide α -éléostéarique sont les plus élevées et sont comprises entre 47% et 70%. Les teneurs les plus élevées en cet acide gras sont retrouvées dans l'échantillon du Mississippi, tandis que l'échantillon de l'Inde en contient à peine 47%. Cependant, l'échantillon du Mexique n'en contient pas du tout. Le second acide gras le plus important est l'acide stéarique, dont la valeur la plus élevée de 83% est trouvée dans l'échantillon du Mexique. La valeur la plus faible est trouvée dans l'échantillon du Japon. Les acides oléique et linoléique sont retrouvés en quantités similaires et faibles dans les échantillons du Mexique, de la Réunion et du Mississippi (3%), mais en quantités un peu plus élevées dans les échantillons de l'Inde et du Japon. Les acides α -linoléique et palmitoléique sont pratiquement inexistantes dans tous les échantillons. L'acide palmitique est retrouvé en quantités plus élevées dans l'échantillon du Mexique.

Globalement, on constate qu'au sein de l'espèce *charantia*, même s'il y a des échantillons dont les teneurs en acides gras se rapprochent, elles semblent varier en fonction des régions d'où provient l'échantillon. Le Tableau 4 montre également deux échantillons différents de *Momordica cochinchinensis* provenant tous les deux du Vietnam. Les valeurs obtenues sont largement différentes, alors qu'il s'agit de la même espèce et de la même région, ce qui suggère des problèmes d'échantillonnage ou des problèmes analytiques.

Pris dans leur ensemble, les résultats du Tableau 4 suggèrent des différences interspécifiques, car les teneurs en acides gras des espèces *balsamina*, *charantia* et *cochinchinensis* sont largement différentes. Au niveau des CLnA, *Balsamina* et *cochinchinensis* semblent plus riches en acide punicique, tandis que *charantia* est plus riche en acide α -éléostéarique.

Tableau 4: Composition en acides gras de quelques espèces de Momordica cultivées dans différentes régions (valeurs exprimées en pourcentage molaire)

% Molaire	<i>M. charantia</i>				<i>M. balsamina</i>		<i>M. cochinchinensis</i>	
	Mississippi	Japon	Inde	Mexique	La Réunion	Sénégal	Vietnam	Vietnam
Acide laurique C12:0	/	/	/	/	/	/	/	/
Acide myristique C14:0	/	/	/	/	/	/	/	/
Acide palmitique C16:0	1,6 – 1,9	1,5	/	14,8	2,7	13,6	33,8	2,9
Acide palmitoléique C16:1	0,12 – 0,16	/	/	/	/	/	/	0,3
Acide stéarique C18:0	21,7 – 26,5	17,4	29,8	82,9	32,4	7,5	7,1	21,0
Acide oléique C18:1(n-9)	3,1 – 4,6	14,6	15,8	0,9	2,0	5,1	44,4	14,2
Acide linoléique C18:2(n-6)	3,1 – 4,6	8,6	7,7	0,5	3,2	6,5	14,7	7,9
Acide α -linoléique C18:2(n-3)	0,5 – 0,6	/	/	0,9	/	/	/	/
Acides conjugués C18:3 conj				/			/	
• Acide α éléostéarique	63,4 – 67,9	56,2	46,7		57,9	13,1		
• Acide catalpique						2,0		
• Acide β éléostéarique		0,3			0,9	1,1		
• Acide punicique					0,9	50,6		53,6
Acide arachidique C20:0	/	0,3	/	0,9	/	/	/	/
Acide gondoïque C20:1(n-9)	/	0,3	/	/	/	/	/	/
Autres	/	0,8	/	/	/	0,5	/	/

III- La chromatographie

1- Principe et description de la méthode

La chromatographie est, à ce jour, la meilleure technique de séparation, d'identification et de dosage des différents constituants de mélanges complexes. Son application nécessite l'utilisation d'une phase stationnaire et d'une phase mobile (Skoog et al., 1997). Les constituants à analyser sont entraînés (par gravité, par différence de pression ou par capillarité) à travers la phase stationnaire par une phase mobile qui peut être liquide ou gazeuse. La séparation des constituants est assurée par leurs différences de vitesses de progression (Skoog et al., 1997).

On distingue en fonction du support deux méthodes de chromatographie, à savoir la chromatographie sur colonne et la chromatographie planaire. En chromatographie sur colonne, la phase stationnaire est maintenue dans un tube étroit tandis que la phase mobile y progresse par gravité ou sous l'action d'une différence de pression. En chromatographie planaire, la phase stationnaire se trouve sur un support plat (chromatographie sur couche mince) ou immobilisée à l'intérieur des pores d'une feuille de cellulose (chromatographie sur papier), et la phase mobile progresse à travers la phase stationnaire par capillarité ou sous l'effet de la gravité. L'entraînement des molécules de solutés à travers la phase stationnaire est appelé élution, et le solvant qui entraîne ces molécules est l'éluant (Skoog et al., 1997).

Il est également possible de différencier les chromatographies sur colonne en fonction du type de phase mobile, comme présenté dans le Tableau 5. On y distingue les chromatographies en phase liquide, en phase mobile et en fluide supercritique.

La chromatographie en phase liquide aura la particularité de pouvoir être effectuée en phase normale et en phase inverse, lorsque le type d'équilibre est le partage entre une phase stationnaire et une phase mobile. En phase normale, la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est apolaire, les solutés sont élués du moins polaire au plus polaire. En phase inverse, la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile est polaire et les solutés sont élués du plus polaire au moins polaire (Skoog et al., 2015).

Tableau 5: Classification des méthodes chromatographiques sur colonne (adapté de Skoog et al., 2015)

Classification générale	Méthodes spécifiques	Phase stationnaire	Type d'équilibre
Chromatographie en phase liquide ou liquid chromatography (LC) Phase mobile : liquide	Chromatographie liquide-liquide (CLL) ou chromatographie de partage	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre liquides non miscibles
	Chromatographie liquide-phase greffée	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre liquide et surface greffée
	Chromatographie liquide-solide (CLS) ou adsorption	Solide	Adsorption
	Chromatographie par échange d'ions	Résine échangeuse d'ions	Echange d'ions
	Chromatographie liquide-Gel (CLG) ou chromatographie par perméation	Liquide dans les interstices d'un solide polymérique	Partage/tamisage
Chromatographie en phase gazeuse ou gas chromatography (GC) Phase mobile : gaz	Chromatographie gaz-liquide (CGL)	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre gaz et liquide
	Chromatographie gaz-phase greffée	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre gaz et surface greffée
	Chromatographie gaz-solide (CGS)	Solide	Adsorption
Chromatographie en fluide supercritique ou supercritical fluid chromatography (SFC) Phase mobile : fluide supercritique	-UPC ² -SFC/UHPLC (Ultra-High-Performance Liquid Chromatography)	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre fluide supercritique et surface greffée

En sortie du chromatographe, on utilise un détecteur afin d'analyser les différents composés élués, et on obtient un graphe composé de pics, appelé chromatogramme. La position des pics (ou temps de rétention) permet d'identifier les différents composés, tandis que la surface des bandes permet de déterminer leurs concentrations. Le principe général de la chromatographie est présenté à la Figure 5

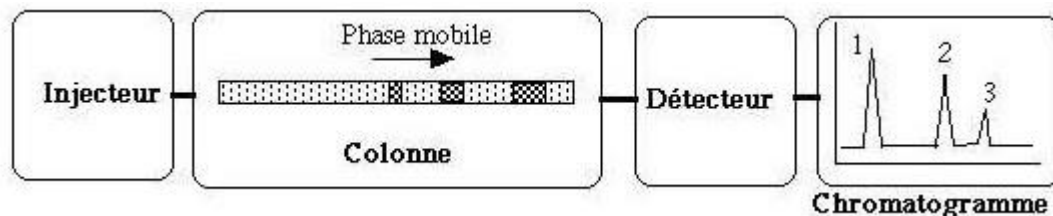


Figure 5: Principe général de fonctionnement de la chromatographie

(Source : <http://www.masterchimie1.u-psud.fr/Chromatoweb/Generalites%20chromato.html>)

Lors du fonctionnement d'un chromatographe, le mélange à analyser est introduit dans la colonne à l'aide d'une micro seringue appelée injecteur. À l'intérieur de la colonne, les différents constituants du mélange transportés par la phase mobile sont séparés en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire. Le détecteur en sortie de colonne permet de détecter les composés qui en sortent. Le résultat de l'analyse est obtenu sous la forme d'un chromatogramme dont les temps de rétention et la surface des pics permet d'identifier et de quantifier les composés analysés.

2- L'efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne chromatographique est la capacité de celle-ci à fournir des pics bien distincts et le moins large possible lorsque l'analyte parcourt la colonne (plus les pics seront distincts, plus la colonne sera efficace). Elle peut s'exprimer par le nombre de plateaux théoriques N que la colonne possède. Les plateaux théoriques représentent ici un ensemble de disques cylindriques successifs où s'établit un équilibre au fur et à mesure que s'effectue l'éluion (Burgot et Burgot, 2011). Ainsi, plus le nombre de plateaux théoriques est élevé, plus la colonne est efficace. L'efficacité dépend de la durée de contact entre les phases stationnaire et mobile. Elle est donc maximale lorsque la vitesse d'écoulement est faible. C'est en chromatographie en phase liquide qu'on peut atteindre les vitesses les plus faibles possibles (0,2 cm/s contre 2 cm/s en chromatographie en phase gazeuse), mais ces vitesses sont si faibles qu'il est impossible de les obtenir en conditions opérationnelles normales (Skoog et al., 1997).

Plusieurs paramètres affectent l'efficacité des colonnes, on peut citer :

- La vitesse linéaire de la phase mobile
- Le coefficient de diffusion de la phase mobile
- Le coefficient de diffusion de la phase stationnaire
- Le facteur de capacité
- Le diamètre des particules de support
- L'épaisseur de la couche liquide sur la phase stationnaire.

Pour une meilleure efficacité en chromatographie en phase liquide, il serait intéressant d'utiliser des colonnes plus longues (25-50cm), mais dans celles-ci les pertes de charge sont énormes. C'est l'une des raisons pour lesquelles on préfère les colonnes de chromatographie en phase gazeuse, car elles peuvent mesurer plus de 50 m.

De nombreuses théories ont été élaborées pour essayer d'expliquer et de résoudre le problème d'élargissement des pics, sans résultat satisfaisant. Toutefois, certaines s'avèrent être d'une grande utilité pour améliorer les performances des colonnes. C'est le cas de la théorie de Martin et Synge, émise en 1950 (Skoog et al., 1997). Selon cette théorie, il faut considérer une colonne chromatographique comme étant constituée de N plateaux théoriques, comme en distillation (ensemble de disques cylindriques successifs où s'établit un équilibre). La phase mobile traverse ces plateaux lors de sa progression. Au niveau de chaque plateau, un certain équilibre se crée entre phase stationnaire et phase mobile, entraînant une rétention de soluté. Plus le temps de rétention serait long, plus le nombre de plateaux théoriques serait élevé. L'observation de pics très larges serait dans ce cas expliquée par un nombre faible de plateaux théoriques (Skoog et al., 1997).

On peut exprimer l'efficacité d'une colonne par la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT), donnée par la formule suivante :

$$H=L/N \text{ (cm)}$$

avec L la longueur de la colonne (en cm), H la hauteur équivalente à un plateau théorique, N le nombre de plateaux théoriques. Plus H est faible, plus la colonne est efficace.

Il est possible de déterminer le nombre de plateaux théoriques N d'une colonne à partir d'un chromatogramme. Pour cela, on mesure le temps de rétention d'un pic (t_r), la largeur du pic à sa base (w), et on calcule N par la formule suivante (Skoog et al., 1997) :

$$N = 16 * (t_r/w)^2$$

Sur base des considérations émises ci-dessus, le choix d'une colonne en fonction de son efficacité devrait se porter sur les colonnes de chromatographie en phase gazeuse, car la vitesse d'écoulement des solutés, plus élevée qu'en chromatographie en phase liquide, serait compensée par la longueur de la colonne.

3- La résolution d'une colonne

La résolution (R) d'une colonne est une mesure quantitative de sa capacité à séparer deux analytes. Pour deux analytes à séparer, elle se calcule par la formule suivante :

$$R = 2 \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(\omega_1 + \omega_2)}$$

Avec :

t_{r1} : le temps de rétention du premier pic (en min)

t_{r2} : le temps de rétention du deuxième pic (en min)

ω_1 : la largeur de base du premier pic (en cm)

ω_2 : la largeur de base du deuxième pic (en cm)

R est généralement exprimé sans unité. Lorsque ses valeurs sont supérieures à 1,5, alors les pics sont bien séparés. Il est possible d'augmenter la résolution en agissant sur trois paramètres : augmenter le nombre de plateaux théoriques, améliorer la sélectivité ou facteur de séparation (α), ou augmenter le facteur de rétention (k).

La sélectivité a pour formule $\alpha = t_{r2} / t_{r1}$ ou $\alpha = k_2 / k_1$. Elle rend compte de la proximité des pics, et k_1 et k_2 sont les coefficients de partition ou constantes d'équilibre des deux solutés (Skoog et al., 1997).

4- Quelques caractéristiques des chromatographies en phase liquide et en phase gazeuse

En général, les différentes méthodes chromatographiques ne sont pas concurrentes, mais plutôt complémentaires (Serpinet, 1968). Pour corroborer ce propos, nous donnerons dans les Tableaux 6 et 7 quelques avantages et inconvénients des deux types de chromatographies.

Tableau 6: Quelques avantages et inconvénients de la chromatographie en phase liquide (adapté de Hudalla et McDonald, 2013)

Chromatographie en phase liquide	
Avantages	Désavantages
Possibilité de séparer des solutés ioniques, non ioniques et ionisables	Mécanismes de rétention des solutés complexes
Possibilité de séparer des grosses molécules	Utilisable à des pH entre 2 et 7,5
Séparations rapides	Solvants toxiques
Haute sélectivité et bonne résolution	Coût élevé des éluants
Appareillages simples	/

Tableau 7: Quelques avantages et inconvénients de la chromatographie en phase gazeuse (adapté de Serpinet, 1968)

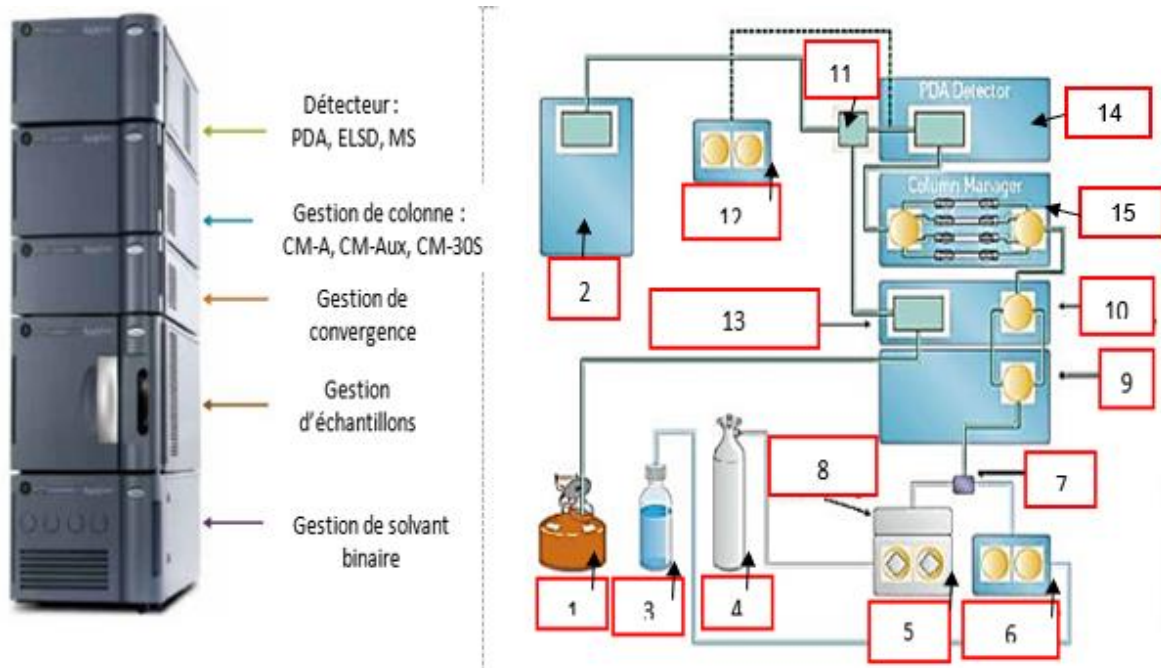
Chromatographie en phase gazeuse	
Avantages	Désavantages
Applicables aux composés gazeux ou susceptibles d'être volatilisés	Limitée aux composés thermostables et suffisamment volatils
Bonne séparation des complexes organiques, organométalliques et biochimiques	Nécessité d'avoir un soluté volatil
Précision dans le dosage de petits échantillons	Ne convient pas aux grosses molécules
Meilleure efficacité et meilleure sensibilité que la chromatographie en phase liquide	/
Meilleure diffusion de la phase mobile	/
Séparation plus rapide que la chromatographie en phase liquide	/

5- La chromatographie UPC²

L'acronyme UPC² est utilisé pour « Ultra-Performance Convergence Chromatography ». Comme son nom l'indique, il s'agit d'une chromatographie ultra performante, qui allie les avantages de la chromatographie en phase gazeuse et de la chromatographie en phase liquide (en phase normale et en phase inverse) (Fountain et al., 2014). Les avantages évoqués ici sont respectivement une meilleure efficacité (puissance de séparation) et une meilleure diffusion de la phase mobile, ainsi qu'une large sélectivité de composés pouvant être analysés. La technique a été développée en 2012 par J. Calvin Giddings de la société Waters (Hudalla and McDonald, 2013).

L'UPC² est une chromatographie en fluide supercritique, utilisant les techniques de l'UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography). Un fluide supercritique est un fluide porté à une température et une pression au-dessus de son point critique, où il n'existe pas de phases liquide et gazeuse distinctes. Le fluide supercritique utilisé est le CO₂ (couplé à un co-solvant). Sa température et sa pression supercritiques sont respectivement de 31°C et 74 bar. Grâce à sa faible viscosité, il est possible de travailler à basse pression, et donc d'avoir une meilleure efficacité (Hudalla and McDonald, 2013). La séparation se fait en manipulant la densité et la composition du fluide supercritique de base de la phase mobile.

La Figure 6 présente le système ACQUITY® UPC² et son mode de fonctionnement



- 1 : Déchets
- 2 : Spectromètre de masse
- 3 : Modificateur
- 4 : Alimentation en CO₂
- 5 : Pompe de CO₂
- 6 : Pompe modificatrice
- 7 : Mixeur
- 8 : Echangeur de chaleur thermo électrique

- 9 : Valve d'injection
- 10 : Valve d'injection auxiliaire
- 11 : Séparateur
- 12 : Pompe
- 13 : Régulateur de pression retour (dynamique et statique)
- 14 : Détecteur PDA
- 15 : Gestion de colonne

Figure 6: Le système ACQUITY® Ultra Performance Convergence Chromatography (UPC²) et son mode de fonctionnement (adapté de Fountain et al., 2014)

Le système est constitué des différents éléments suivants.

- **Une unité de gestion des solvants.** Elle est conçue pour gérer spécialement les fluides supercritiques. Elle contrôle précisément la composition et la densité de la phase mobile, permettant d'obtenir des temps de rétention reproductibles, des faibles bruits de fond et un contrôle exceptionnel des forces de solvation (Fountain et al., 2014).
- **Une unité de gestion des échantillons.** C'est à ce niveau que les échantillons sont déposés et prélevés pour être injectés. Cette unité est dotée d'un système de double injection, et le prélèvement se fait à pression atmosphérique. Les injections se font par boucles partielles, répétables et reproductibles. Des injections de 0,1 à 50 µL peuvent être effectuées par incréments de 0,1 µL (Fountain et al., 2014).
- **Une unité de gestion de convergence.** Elle permet de délivrer une pression constante inférieure de 5 PSI (0,345 bar) par rapport à la pression de consigne. Ceci permet une

reproductibilité des temps de rétention et une stabilité des lignes de base (Fountain et al., 2014).

- **Une unité de gestion des colonnes.** Ce système utilise principalement les colonnes de la chromatographie liquide haute performance (HPLC), assurant des séparations sélectives et rapides. Ces colonnes sont placées à l'intérieur d'un four, et peuvent être montées en série (Fountain et al., 2014).
- **Un détecteur :** Ce système utilise un détecteur PDA (Photodiode Array) ou détecteur à barrette de diodes, spécialement conçu pour des fluides supercritiques. Les lentilles de ce détecteur sont faites de silice à haute résistance qui résiste à la contre-pression générée lors d'une séparation. Ceci permet de maximiser la sensibilité, de réduire le bruit de fond et de compenser les différences d'effets d'indice de réfraction entre le CO₂ et le co-solvant organique. À la sortie du détecteur, se trouve une vanne de contrôle de pression, appelée ABPR (Automated back pressure regulation). Si la pression du système augmente, la densité du CO₂ augmente aussi et il en résulte une force de solvation très élevée et une diminution des temps de rétention. Cette vanne a donc pour rôle de toujours maintenir le système à une pression constante (Fountain et al., 2014).

Le CO₂ supercritique utilisé est miscible avec toute la série éluotropique, ouvrant une large gamme de choix de sélectivité du co-solvant pour permettre la séparation (Fountain et al., 2014). Les co-solvants jouent un rôle d'éluant fort, en évacuant les molécules qui tarderaient à sortir de la colonne. De cette manière, ils réduisent les temps de rétention des molécules. Lorsque l'adsorbant utilisé est polaire comme la silice, le solvant de fixation doit être le moins polaire possible. L'éluotion est commencée avec des solvants peu polaires, puis poursuivie avec des solvants de plus en plus polaires qui sont dans ce cas de pouvoir éluotropique (indice chiffrant la polarité d'un solvant) de plus en plus élevé. Le pouvoir éluotropique d'un solvant est mesuré par la valeur de son paramètre E_0 (Burgot et Burgot, 2011). La Figure 7 présente les solvants pouvant être utilisés.

Force du solvant		
Solvant	Force éluotropique [E°]	Polarité [P']
Pentane, Hexane, Heptane	0	0,1
Xylène	0,22	2,5
Toluène	0,22	2,4
Diéthyl éther	0,29	2,8
Dichlorométhane	0,30	3,1
Chloroforme	0,31	4,1
Acétone	0,43	5,1
Dioxane	0,43	4,8
THF	0,48	4,0
MTBE	0,48	2,5
Acétate d'éthyle	0,48	4,4
DMSO	0,50	7,2
Acétonitrile	0,52	5,8
Isopropanol	0,60	3,9
Ethanol	0,68	4,3
Méthanol	0,73	5,1
Eau		10,2

CO₂ supercritique
 Faible
 Phase normale
 Fort

Zone de chromatographie en phase normale
 Zone de chromatographie de convergence
 Zone de phase inverse

THF : Tétrahydrofurane

MTBE : Méthyl tert-butyl éther

DMSO : Diméthylsulfoxyde

→ : Degré de miscibilité du CO₂ avec les solvants du plus faible au plus fort

Figure 7: Solvants pouvant être utilisés avec le CO₂ en UPC² (d'après Fountain et al., 2014)

Les avantages de l'UPC² sont les suivants (Eaton and McDonald, 2012):

- Elle a une sélectivité élevée grâce à l'utilisation des colonnes de chromatographie en phase liquide qui ont un faible diamètre et une faible granulométrie.
- Elle permet de séparer un grand nombre de molécules qui ne peuvent pas facilement l'être en chromatographie en phase gazeuse ou en chromatographie en phase liquide : des composés acides, basiques, neutres, lipophiles, hydrophiles, des stéréoisomères, des diastéréoisomères, des énantiomères, des composés chiraux.

- Elle utilise le CO₂ supercritique comme phase mobile : ce fluide est écologique, non toxique, peu coûteux et hautement compressible.
- Elle permet de mesurer de façon précise le CO₂ utilisé en phase mobile.
- La consommation des solvants est faible.
- Elle est hautement efficace.
- Les temps et les coûts d'analyses sont réduits.

CHAPITRE II : OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

L'objectif principal de ce travail est de comparer différentes variétés de *Momordica charantia* au niveau du profil en acides gras de l'huile de leurs graines, dans l'espoir d'identifier des variétés particulièrement riches en CLnA. Nous allons dès lors déterminer le profil en acides gras des échantillons de graines de *Momordica charantia* dont nous disposons. En particulier, nous établirons le profil en CLnA de l'huile de ces graines en utilisant l'UPC².

L'huile des graines de *Momordica charantia* est réputée pour être riche en CLnA, principalement en acide α -éléostéarique. Plusieurs variétés de cette espèce ne sont plus cultivées au Vietnam, car délaissées au profit des variétés hybrides qui auraient un rendement plus élevé. Les variétés délaissées dont nous possédons quelques échantillons de graines pourraient être très riches en acide α -éléostéarique, mais il est nécessaire d'établir un profil en acides gras pour le déterminer. La détermination du profil en acides gras se fait par chromatographie en phase gazeuse. Nous appliquerons donc cette méthode à nos échantillons. Cependant, la limite de cette méthode pour cette étude est qu'elle ne permet pas de séparer les différents isomères de CLnA. Pour séparer ces isomères, et donc obtenir un profil plus complet en acides gras, nous utiliserons également l'UPC². Cette double approche analytique nous permettra d'évaluer les performances des deux méthodes choisies. Nous serons par ailleurs en mesure de déterminer si parmi les variétés étudiées, il en existe qui soient plus intéressantes du point de vue de la teneur en acide α -éléostéarique.

Pour atteindre nos objectifs, nous ferons une extraction des acides gras des graines par la méthode de Folch. Ensuite, nous méthylerons ces acides gras pour facilement les analyser en chromatographie en phase gazeuse et en UPC². Une fois les profils en acides gras obtenus, nous effectuerons une comparaison des teneurs en différents acides gras de tous les échantillons grâce au test de Tukey Kramer, avec un focus particulier sur les teneurs en CLnA. Enfin, une étude comparée des profils obtenus en chromatographie en phase gazeuse et en UPC² nous permettra de montrer quelles sont les limites de la chromatographie en phase gazeuse, et comment ces dernières sont compensées par l'UPC².

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

I- Appareillage

En chromatographie en phase gazeuse (GC), nous avons utilisé un chromatographe GC Trace 1310 (ThermoFisher scientific, Milan, Italie) (Figure 8) et un chromatographe GC Trace 2000 (Figure 9), avec comme gaz vecteur, l'hydrogène. La colonne utilisée dans les deux appareils est une colonne capillaire de marque RESTEK (Rt-2560, Bellefonte, USA). Elle a une longueur de 100 m, un diamètre intérieur de 0,25 mm, avec un film d'une épaisseur de 0,20 μm . Il s'agit d'une colonne de phase très polaire au biscyanopropyl polysiloxane non lié, dont la sélectivité en phase stationnaire est optimisée pour la séparation des isomères, afin d'assurer une quantification précise des esters méthyliques d'acides gras *cis/trans* critiques (www.restek.com). Les chromatographes sont équipés d'un injecteur on column et d'un détecteur à ionisation de flamme. Les données chromatographiques sont traitées avec le logiciel Chromquest 5.0.

En UPC², nous avons utilisé un chromatographe Waters ACQUITY UPC² (Waters, Milford, MA, USA) (Figure 10), équipé de 3 colonnes Chromspher 5 lipids pour HPLC à la silice, montées en série. Leur longueur est de 250 mm, leur diamètre intérieur de 4,6 mm, et elles sont conçues spécialement pour la séparation des triglycérides (www.agilent.com). Ce chromatographe permet une séparation hautement efficace des isomères de position et des isomères géométriques *trans/cis* d'acides gras (Yang et al., 2016). Les données chromatographiques sont traitées avec le logiciel Empower 3.

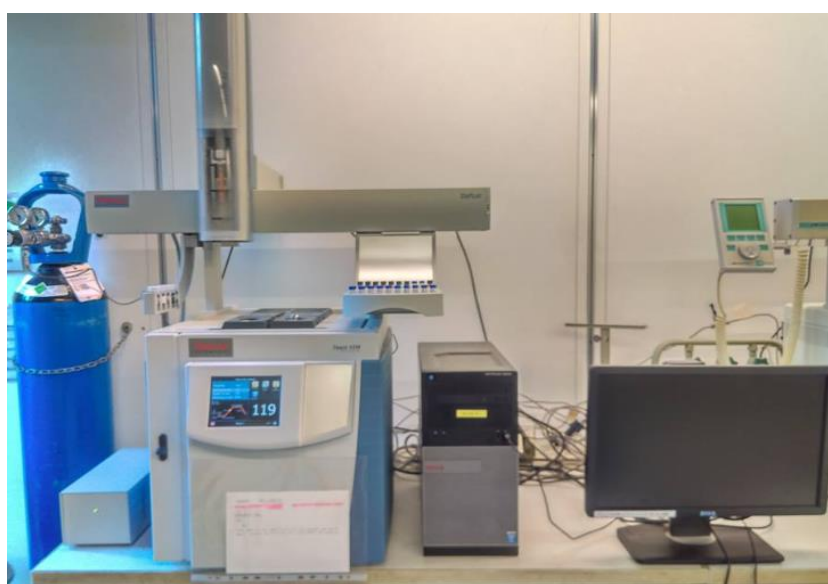


Figure 8: Chromatographe GC Trace 1310



Figure 9: Chromatographe GC Trace 2000



Figure 10: Vue partielle du chromatographe UPC²

II- Echantillonnage

Les analyses ont été effectués sur 100 échantillons constitués de différentes variétés de *Momordica charantia*, cultivées au Vietnam (Figure 12) par le PRC (Plant Resources Center), le FAVRI (Fruits and the Vegetables Research Institute) et le WVC (World Vegetable Center), d'une plante cultivée dans les serres de l'UCL à Louvain-la-neuve (5 fruits différents ayant été récoltés), de même que de plantes récoltées au Sénégal dans deux localités différentes, Fatick deouysel (FD) et Niaye dakan (ND). Par ailleurs, deux échantillons de graines de *Momordica balsamina* récoltées au Sénégal dans la localité Pal de jamba (PJ) ont été analysées (Figure 11). Tous ces échantillons ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse, et certains d'entre eux ont en plus été analysés en UPC². Ils sont tous présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8: Caractéristiques des échantillons des graines de *Momordica charantia* analysés pour leur profil en acides gras

Espèces	Variétés	Origine de l'échantillon	de	Nombre d'échantillons analysés en GC	Nombre d'échantillons analysés en UPC ²
<i>Momordica charantia</i>	A1	Vietnam (WVC)		7	1
	A4	Vietnam (WVC)		8	1
	A5	Vietnam (WVC)		8	1
	D41	Vietnam (PRC)		8	1
	D9	Vietnam (PRC)		8	3
	V1	Vietnam (FAVRI)		9	2
	V2	Vietnam (FAVRI)		8	1
	V3	Vietnam (FAVRI)		8	1
	V4	Vietnam (FAVRI)		8	2
	V5	Vietnam (FAVRI)		9	1
	V7	Vietnam (FAVRI)		9	1
	UCL	UCL		5	5
	« Fatick Deouysel » (FD)	Sénégal		2	2
	« Niaye Dakan » (ND)	Sénégal		1	1
<i>Momordica balsamina</i>	« Pal de jamba » (PJ)	Sénégal		2	2
Total	/	/		100	25



Figure 11: Graines entières et décortiquées de *Momordica balsamina*, (PJ)

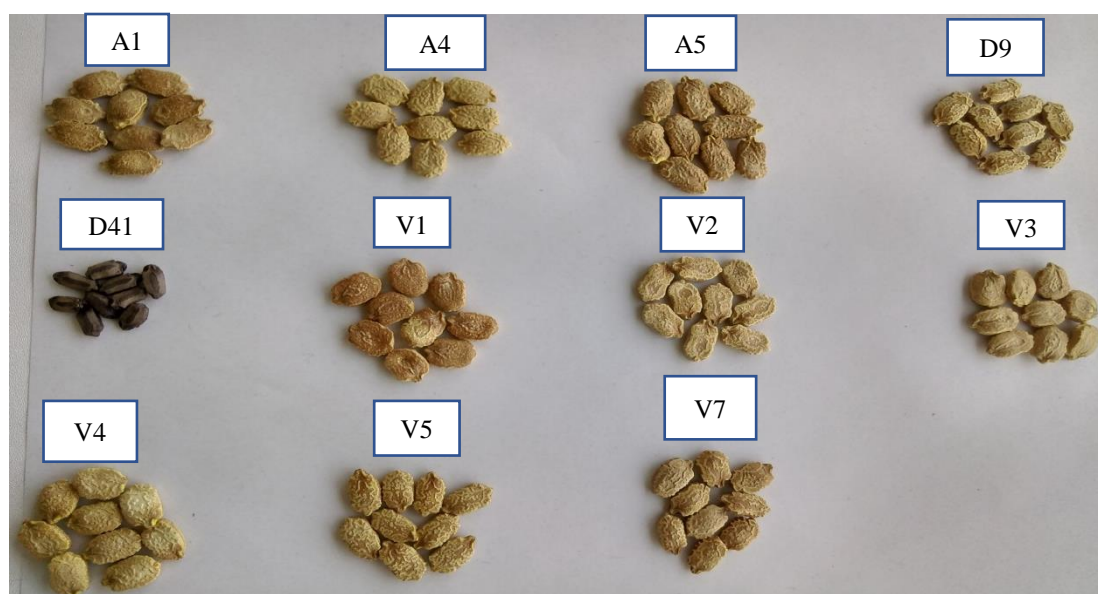


Figure 12: Graines des différentes variétés de *Momordica charantia* provenant du Vietnam

III- Préparation des échantillons

Les fruits récoltés sont ouverts afin de récupérer les graines. Ensuite les graines débarrassées du mucus qui les entoure sont, décortiquées, puis broyées dans un mortier et conservées dans des tubes hermétiquement fermés avant l'extraction des lipides. Pour les plants cultivés dans les serres de l'UCL, une fois les fruits récoltés, ils sont ouverts, les graines sont extraites puis lavées, afin d'être débarrassées du mucilage qui les entoure. Ces graines sont ensuite décortiquées et broyées comme les autres.

Extraction des acides gras

L'extraction des acides gras se fait selon la méthode de Folch (Folch et al., 1957). Un gramme de poudre de graines décortiquées est mélangé à 7 g d'une solution de standard interne C13:0-chloroforme, (C13:0 Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne). Le standard interne permet d'estimer les pertes durant l'extraction. L'ensemble est d'abord traité avec 10 ml de méthanol, afin de précipiter les protéines, puis homogénéisé. À ce mélange est ajoutée 20 ml de chloroforme, l'ensemble est homogénéisé puis filtré. Le résidu est récupéré et dissous dans 30 ml d'une solution de chloroforme-méthanol dans les proportions 2:1 (réactif de Folch), le mélange est homogénéisé, puis filtré, et le résidu présent sur le papier filtre est rincé avec 20 ml de chloroforme et 10 ml de méthanol. Les deux filtrats sont rassemblés, et à ce mélange est ajoutée 22 ml d'une solution aqueuse de KCl 0,88% (Merck, Darmstadt, Allemagne) et une solution de méthanol-eau (1:1) ayant pour rôle d'éliminer les substances non lipidiques. Le mélange non miscible obtenu est placé dans une ampoule à décantier, et la phase inférieure (phase organique contenant les lipides purifiés) est récupérée dans un ballon, puis évaporée dans un rotavapor (Rotavapor R-3000 Buchi, Suisse) à 30°C. Les lipides restants sont récupérés dans du diéthyl éther (VWR, Leuven, Belgique) puis transférés dans des tubes de méthylation.

Méthylation des acides gras

L'analyse en chromatographie en phase gazeuse et en UPC² des acides gras nécessite une dérivation des acides gras, afin d'augmenter leur volatilité (Akoh and Min, 2002) (Belitz et al., 2009). Pour cela, il faut préparer des esters méthyliques d'acides gras. Ainsi, le diéthyl éther ayant servi à recueillir les lipides dans les tubes de méthylation est évaporé grâce à de l'azote, et un mélange de KOH dans le MeOH 0,1M (KOH, Sigma Aldrich, Seelze, Allemagne) est ajouté aux échantillons, qui sont ensuite placés dans un bain-marie à 70°C pendant 1 heure. Après refroidissement, une solution de HCl 1,2M dans le MeOH est ajoutée, et les tubes sont de nouveau placés dans un bain-marie pendant 20 minutes, afin de permettre la formation des esters méthyliques d'acides gras. Après addition d'eau et d'hexane, les tubes sont placés en chambre froide pour séparation des phases, durant une nuit. La phase organique (hexane) est alors récupérée. Elle contient les esters méthyliques d'acides gras.

IV- Analyses chromatographiques

Avant de faire une analyse chromatographique, les échantillons doivent d'abord être dilués. Pour les deux types de chromatographie, les dilutions sont réalisées comme suit.

- Pour la GC : Dans des fioles, nous avons introduit successivement 81 μ l de C11:0 (Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne) comme standard d'injection, 9 μ l de l'extrait d'acides gras récupérés dans de l'hexane, et 710 μ l d'hexane. Les fioles ainsi préparées ont été mises dans l'appareil pour analyse.
- Pour l'UPC² : Les dilutions sont faites par étapes successives.
 - Premièrement, dans un tube de 15 mL, nous avons introduit 1 mL de l'extrait d'acides gras récupérés dans la phase hexane, et 9 mL d'hexane.
 - Nous avons ensuite prélevé 1 mL de cet échantillon dilué que nous avons mis dans un tube de 15 mL, et nous y avons ajouté 9 mL d'hexane.
 - Enfin, nous avons mis 1 mL de l'échantillon dilué pour la deuxième fois dans un tube, auquel nous avons ajouté 0,2 mL d'acide sorbique comme standard d'injection. Pour la solution standard, nous avons ajouté 1 ml de standard d'acides gras à 0,2 mL d'acide sorbique.

Le standard est constitué des acides β -éléostéarique, β -catalpique, α -catalpique, α -calendique, punique et jacarique. Ce standard ne contient pas d'acide α -éléostéarique, mais cet acide gras est quantifié dans les échantillons sur base de la surface obtenue pour l'acide α -catalpique.

Les caractéristiques des appareils chromatographiques utilisés, le gradient de solvant en UPC² et les programmes de température en chromatographie en phase gazeuse sont donnés dans les Tableaux 9, 10 et 11.

Tableau 9: Caractéristiques des appareils chromatographiques utilisés

	GC Trace 1310			GC Trace 2000			UPC ²	
Colonne	Rt-2560	100m	x	Rt-2560	100m	x	ChromSpher	5
	0,25mm	I.D	x	0,25mm I.D	x 0,20µm		Lipids 250 x 4,6mm	
	0,20µm						(3 colonnes en série)	
Pression du gaz vecteur	200 KPa			200 KPa			110 Bar (ABPR)	
Température du détecteur	255°C			255°C			/	
Débit du gaz vecteur	Air : 350 mL/min			Air : 350 mL/min			1,5 mL/min	
	H ₂ : 35 mL/min			H ₂ : 35 mL/min				
Détecteur	Détecteur à ionisation de flamme (FID)			Détecteur à ionisation de flamme (FID)			PDA	

Le gradient de solvant pour l'UPC² est donné dans le tableau 10. Le gradient de solvant pourrait être considéré comme le programme de température du four en GC.

Tableau 10: Gradient de solvants en UPC²

Temps (min)	Débit (mL/min)	% CO ₂	% Acétonitrile
0	1,5	100	0
20	1,5	92	8
25	1,5	92	8
30	1,5	60	40
40	1,5	60	40
45	1,5	100	0
60	1,5	100	0

Tableau 11: Programme de température des fours en GC

Vitesse (°C/min)	Température 1310 (°C)	GC	Trace	Durée (min)
	80,0			0,00
25	175,0			25,00
10	200,0			20,00
10	220,0			5,00
10	235,0			15,00
20	80,0			0,00

Pour les deux types de chromatographies, les acides gras sont identifiés et quantifiés par comparaison des positions et surfaces des pics obtenus avec ceux des standards dont les temps de rétention et les concentrations sont déjà connus.

Les calculs sont effectués avec le logiciel Microsoft EXCEL, et les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel JMP Pro version 13.1.0.

CHAPITRE IV : RÉSULTATS ET DISCUSSION

I- Analyse des échantillons par GC

1- Analyse des variétés de *Momordica charantia*

1-1- Chromatogrammes

La Figure 13 présente les chromatogrammes de 3 échantillons de *Momordica charantia* obtenus en GC.

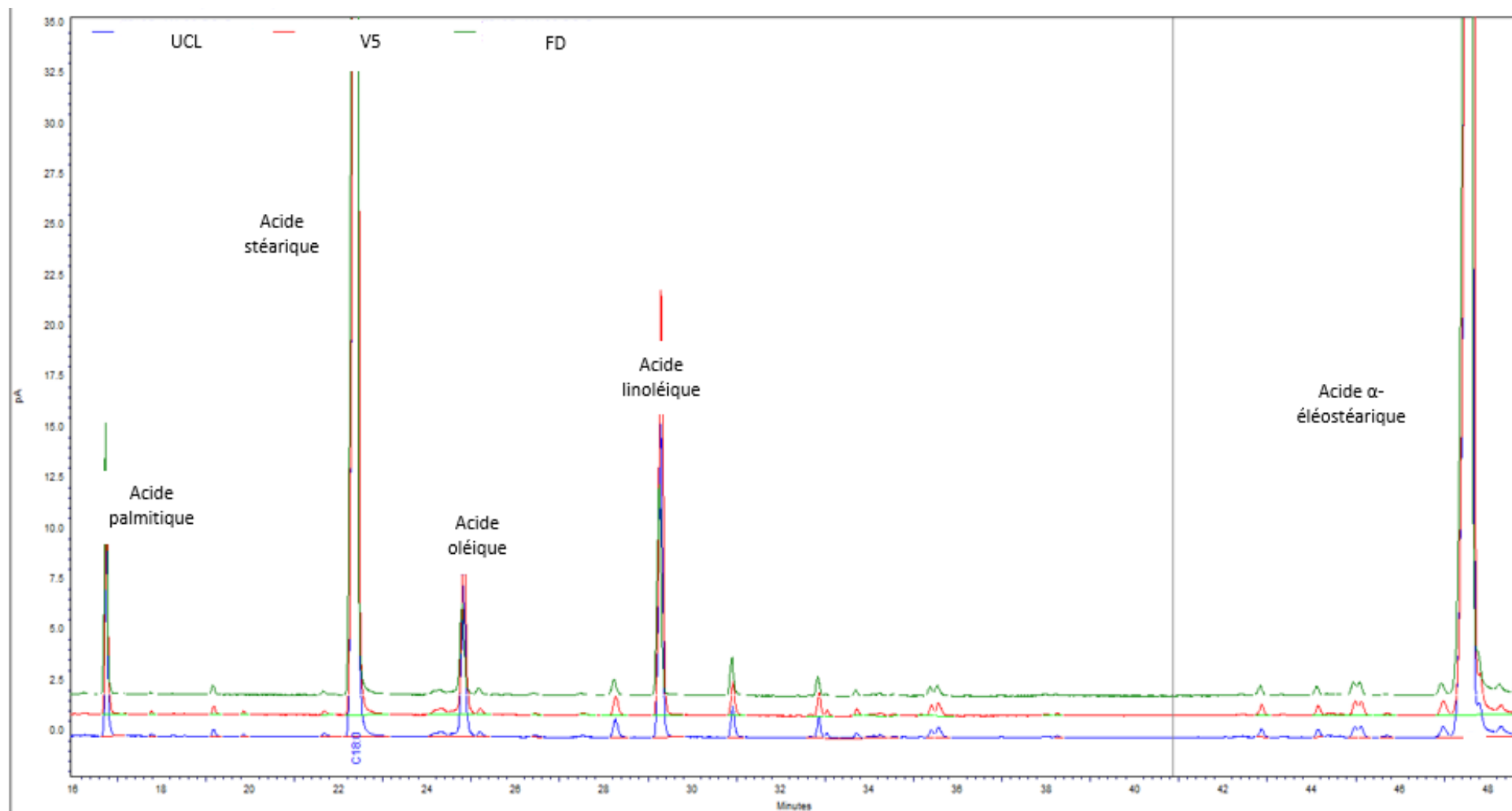
Nous constatons d'abord que ces chromatogrammes se superposent tous, ce qui signifie que ce sont les mêmes acides gras qui sont identifiés dans chacun des échantillons. Ils diffèrent tout de même par leurs concentrations, car les surfaces des pics sont différentes. Nous constatons également que parmi les acides gras identifiés, il y en a 5 dont les pics sont les plus grands et les plus distincts, ce sont les acides gras majoritaires dans les échantillons.

Parmi les pics d'acides gras majoritaires, le plus grand se situe au temps de rétention de 47,5min. Malgré le fait que la GC soit une méthode très pratique d'identification et de dosage des molécules (Skoog et al., 2015), elle est limitée pour le dosage des CLnA. Des essais antérieurs du laboratoire durant lesquels des CLnA purs ont été injectés en GC nous indiquent que ces acides gras ont un temps de rétention dans la zone 45-48 minutes. L'acide lignocérique (C24:0) est également élué à ce temps de rétention, et c'est en équivalent de ce C24:0 (absent de nos échantillons) que nous exprimerons les CLnA en GC. Par ailleurs, la littérature rapporte que les CLnA sont les acides gras majoritaires dans l'huile de *Momordica charantia*, et que le plus important de ces CLnA est l'acide α -éléostéarique. Nous considérerons dès lors que le pic obtenu à 47,5 min correspond aux CLnA dans nos échantillons, et plus particulièrement à l'acide α -éléostéarique.

En fonction des temps de rétention croissants, les acides gras majoritaires présents dans les échantillons de *Momordica charantia* sont : l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide α -éléostéarique.

1-2- Profil en acides gras

Les Tableaux 12 et 13 présentent les concentrations moyennes, respectivement en mg/g et en % des différents acides gras identifiés, dans les échantillons de *Momordica charantia*.



UCL : *Momordica charantia* cultivé dans les serres de l'UCL à Louvain-la Neuve

V5 : *Momordica charantia* variété V5

FD : *Momordica charantia* cultivé dans la localité de Fatick deouvsel

Figure 13: Chromatogrammes de 3 variétés de *Momordica charantia* obtenus par GC

Tableau 12: Concentrations des principaux acides gras dans les différents échantillons de *Momordica charantia* analysés (mg/g)

	A1 (n=7)	A4 (n=8)	A5 (n=8)	D41 (n=8)	D9 (n=8)	FD (n=2)	ND (n=1)	UCL (n=5)	V1 (n=9)	V2 (n=8)	V3 (n=8)	V4 (n=8)	V5 (n=9)	V7 (n=9)
C16:0	8,21 ±0,71c	7,58 ±0,85c	7,97 ±0,31c	8,22 ±1,03c	7,33 ±1,26c	9,32 ±0,11bc	8,43 a	7,24 ±0,48c	7,28 ±0,37c	7,13 ±0,64c	8,16 ±0,72c	7,45 ±0,59c	7,50 ±1,03c	7,03 ±0,94c
C18:0	111,78 ±20,27ab	128,99 ±16,22a	130,45 ±15,86a	120,06 ±22,19a	101,94 ±14,15ab	136,29 ±9,87a	111,59 ab	106,54 ±12,65ab	121,75 ±11,27a	115,88 ±15,98ab	129,98 ±17,58a	127,48 ±12,62a	113,64 ±17,41ab	111,81 ±17,11ab
C18:1cis9	13,89 ±4,81c	5,71 ±1,66ef	6,41 ±2,14ef	12,90 ±4,98cd	11,63 ±6,11cde	5,38 ±0,09cdef	4,11 cdef	9,05 ±0,59cde	6,51 ±3,67ef	8,51 ±4,26cde	5,22 ±1,13f	5,92 ±2,04ef	7,86 ±1,96cde	7,12 ±2,09def
C18:2c9c12	25,86 ±5,89a	16,15 ±2,37cde	15,51 ±3,00cde	22,90 ±6,05ab	18,07 ±4,33bcd	10,63 ±0,49de	9,4261 de	17,38 ±1,24bcde	17,61 ±3,85bcd	19,15 ±4,34bcd	15,06 ±1,54de	16,39 ±2,00cde	15,78 ±2,44cde	16,73 ±1,84cde
C18:3c9t11t13	203,06 ±46,70a	209,41 ±30,63a	215,96 ±25,43a	215,97 ±56,76a	185,96 ±41,09a	226,17 ±11,04a	221,380 a	205,38 ±6,55a	199,32 ±27,45a	189,16 ±33,90a	208,07 ±32,49a	187,65 ±23,27a	201,67 ±27,62a	198,08 ±32,69a

Les valeurs pour un même acide gras non connectées par une même lettre sont significativement différentes d'après le test de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

A1, A4, A5, D41, D9, V1, V2, V3, V4, V5, et V7: variétés de *Momordica charantia* cultivées au Vietnam

UCL : Plante de *Momordica charantia* cultivée à l'UCL à Louvain-la-neuve

FD et ND : Plantes de *Momordica charantia* provenant respectivement des localités de Fatick deoussel et Niaye dakan au Sénégal

Tableau 13: Concentrations des principaux acides gras dans les différents échantillons de *Momordica charantia* analysés (% d'acides gras identifiés)

	A1 (n=7)	A4 (n=8)	A5 (n=8)	D41 (n=8)	D9 (n=8)	FD (n=2)	ND (n=1)	UCL (n=5)	V1 (n=9)	V2 (n=8)	V3 (n=8)	V4 (n=8)	V5 (n=9)	V7 (n=9)
C16:0	2,27 ±0,35c	2,03 ±0,19c	2,09 ±0,19c	2,16 ±0,42c	2,18 ±0,48c	2,36 ±0,04c	2,33 c	2,06 ±0,13c	2,03 ±0,13c	2,07 ±0,16c	2,20 ±0,21c	2,13 ±0,18c	2,14 ±0,19c	2,09 ±0,162c
C18:0	30,41 ±2,57ab	34,59 ±3,72ab	34,24 ±4,15ab	30,89 ±3,02ab	29,95 ±2,59ab	34,41 ±2,45ab	30,84 bc	30,20 ±2,40ab	34,01 ±2,98ab	33,65 ±3,74ab	35,07 ±4,98ab	36,42 ±2,71a	32,28 ±2,84ab	33,29 ±3,11ab
C18:1cis9	3,94 ±1,59b	1,55 ±0,49b	1,69 ±0,64b	3,54 ±1,79b	3,52 ±2,05b	1,36 ±0,03b	1,14 b	2,57 ±0,06b	1,87 ±1,19b	2,55 ±1,45b	1,42 ±0,34b	1,71 ±0,65b	2,22 ±0,39b	2,17 ±0,76b
C18:2c9c12	7,33 ±52,47bc	4,38 ±0,87d	4,11 ±1,03d	6,19 ±2,51cd	5,36 ±1,43cd	2,68 ±0,13d	2,60 cd	4,94 ±0,38cd	4,98 ±1,39cd	5,65 ±1,62cd	4,09 ±0,64d	4,71 ±0,68d	4,53 ±0,80d	5,08 ±10,15cd
C18:3c9t11t13	54,56 ±4,55a	55,94 ±4,75a	56,49 ±4,45a	54,80 ±6,75a	54,26 ±8,19a	57,10 ±2,86a	61,19 a	58,40 ±2,00a	55,41 ±4,09a	54,50 ±4,64a	55,74 ±5,60a	53,48 ±3,59a	57,29 ±3,24a	56,01 ±4,09a

Les valeurs pour un même acide gras non connectées par une même lettre sont significativement différentes d'après le test de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

A1, A4, A5, D41, D9, V1, V2, V3, V4, V5, et V7: variétés de *Momordica charantia* cultivées au Vietnam

UCL : Plante de *Momordica charantia* cultivée à l'UCL à Louvain-la-neuve

FD et ND : Plantes de *Momordica charantia* provenant respectivement des localités de Fatick deoussel et Niaye dakan au Sénégal

Pour toutes les variétés de *Momordica charantia*, la concentration en acides gras la plus élevée est celle de l'acide α -éléostéarique, suivie par l'acide stéarique, l'acide linoléique, l'acide oléique et l'acide palmitique.

- **L'acide α -éléostéarique (C18:3c9t11t13)** est retrouvé en quantités équivalentes ($p < 0,05$) dans tous les échantillons. Les proportions sont comprises entre 53,48% et 61,19% d'acides gras identifiés. La proportion la plus faible est obtenue pour l'échantillon V4, et la proportion la plus élevée est obtenue pour l'échantillon ND. La valeur moyenne de 56,09% est inférieure à celle obtenue par Armougom (58,89%) (Armougom, 1998), mais supérieure aux 53,22% obtenus par Ali (Ali et al., 2008). Ces résultats confirment en accord avec l'auteur Yoshime, que *Momordica charantia* est une espèce très riche en acide α -éléostéarique (Yoshime et al., 2016).
- **L'acide stéarique (C18:0)** est retrouvé en quantités équivalentes ($p < 0,05$) dans tous les échantillons. Les proportions sont comprises entre 29,95% et 36,42% d'acides gras. La proportion la plus faible est obtenue pour l'échantillon D9, et la proportion la plus élevée est obtenue pour l'échantillon V4. La valeur moyenne de 32,19% est proche de celle obtenue par Armougom (32,88%) (Armougom, 1998), mais supérieure aux 20,19% obtenus par Ali (Ali et al., 2008).
- **L'acide linoléique (C18:2c9c12)** n'est pas retrouvé en quantités équivalentes ($p < 0,05$) dans tous les échantillons, mais les variations d'une variété à l'autre sont faibles. Les proportions sont comprises entre 2,6% et 7,33% d'acides gras. La proportion la plus faible est obtenue pour l'échantillon ND (mais un seul échantillon a été analysé), et la proportion la plus élevée est obtenue pour l'échantillon A1. La valeur moyenne de 4,76% est supérieure à celle obtenue par Armougom (3,2%) (Armougom, 1998), mais inférieure aux 6,4% obtenus par Ali (Ali et al., 2008).
- **L'acide oléique (C18:1cis9)** est retrouvé en quantités équivalentes ($p < 0,05$) dans tous les échantillons. Les proportions sont comprises entre 1,14% et 3,94% d'acides gras. La proportion la plus faible est obtenue pour l'échantillon ND (mais un seul échantillon a été analysé), et la proportion la plus élevée est obtenue pour l'échantillon A1. La valeur moyenne de 2,23% est proche de celle

obtenue par Armougom (2,2%) (Armougom, 1998), mais inférieure aux 15% obtenus par Ali (Ali et al., 2008).

- **L'acide palmitique (C16:0)** est retrouvé en quantités équivalentes ($p < 0,05$) dans tous les échantillons. Les proportions sont comprises entre 2,03% et 2,36% d'acides gras. La proportion la plus faible est obtenue pour l'échantillon A4, et la proportion la plus élevée est obtenue pour l'échantillon FD. La valeur moyenne de 2,15% est similaire à celle obtenue par Armougom (2,7%) (Armougom, 1998) et Yoshime (Yoshime et al., 2016), mais inférieure à celle obtenue par Ali et al, à savoir 4,84% (Ali et al., 2008).

Les valeurs données par Armougom (1998) auxquelles nous avons comparé nos échantillons ont été obtenues avec des échantillons de *Momordica charantia* cultivés à la Réunion. Celles de Ali (2008) auxquelles nous avons également comparé nos échantillons ont été obtenues avec des échantillon provenant du Bangladesh. Pour rappel, nos échantillons proviennent d'une part des différentes variétés cultivées au Vietnam (A1, A4, A5, D41, D9, V1, V2, V3, V4, V5 et V7), de même que de plantes sauvages dont les graines ont été récoltées au Sénégal (ND et FD) et enfin d'une variété vietnamienne plantée dans les serres de l'UCL.

2- Analyse des échantillons de *Momordica balsamina* provenant de la localité de Pal de jamba

2-1- Chromatogrammes

La Figure 14 présente le chromatogramme de *Momordica balsamina*

Comme pour les échantillons de *Momordica charantia*, nous constatons pour *Momordica balsamina* que le chromatogramme présente 5 acides gras majoritaires (plus grands et plus distincts). Il s'agit également ici des acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et des CLnA où on observe des particularités en fonction des espèces. Au temps de rétention de 47,5 minutes, on constate que le pic présente deux sommets. Le premier sommet et aussi le plus important se trouve avant 47,5 minutes, et le deuxième se situe à ce temps. La littérature fait état de ce que *Momordica balsamina* contient des teneurs élevées en CLnA, mais avec une majorité d'acide punicique, ainsi que l' α -ESA en moindre quantité (Armougom, 1998). L'analyse des pics de l'espèce *charantia* nous a emmené à conclure qu'à 47,5 minutes se trouvait l'acide α -éléostéarique. Sur cette base, nous émettons l'hypothèse que le sommet qui apparaît juste avant correspondrait à l'acide punicique.

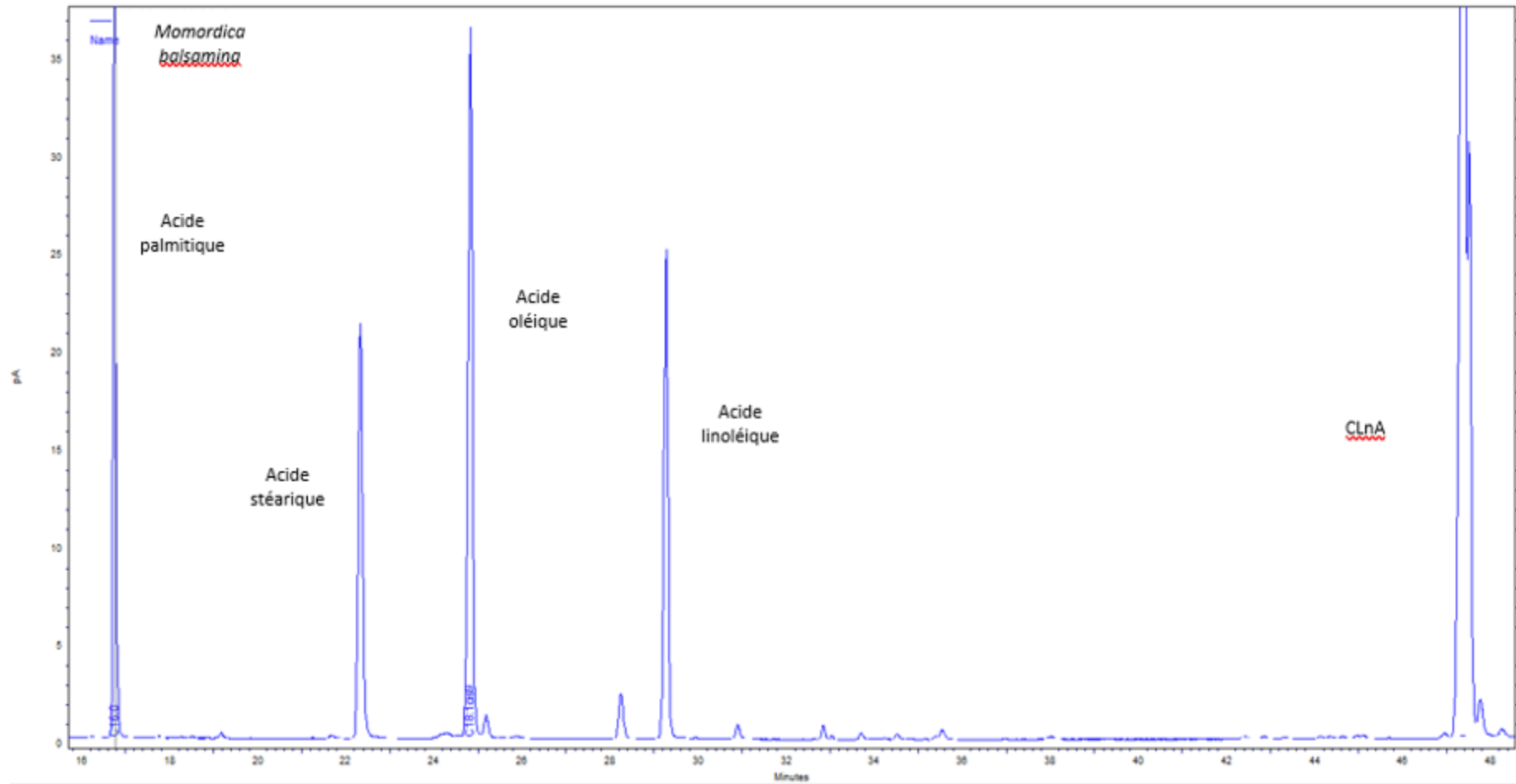


Figure 14: Chromatogramme d'un échantillon de *Momordica balsamina* obtenu en GC

2-2- Profil en acides gras

Le Tableau 14 présente les concentrations moyennes en mg/g et en % des différents acides gras identifiés dans les échantillons de *Momordica balsamina*.

Tableau 14: Concentrations moyennes des acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et des CLnA dans les échantillons de *Momordica balsamina*

	C16 :0 (Acide palmitique)		C18 :0 (Acide stéarique)		C18 :1cis9 (Acide oléique)		C18 :2c9c12 (Acide linoléique)		CLnA	
	mg/g	% AGI	mg/g	% AGI	mg/g	% AGI	mg/g	% AGI	mg/g	% AGI
PJ	27,54	11,01	23,82	9,55	39,07	15,63	25,31	10,13	127,42	50,98

PJ : *Momordica balsamina* provenant de la localité Pal de jamba

AGI : Acides gras identifiés

Les CLnA représentent plus de la moitié des acides gras identifiés (50,99%). L'acide gras minoritaire est l'acide stéarique (9,55%). L'acide palmitique a une teneur de 11,02%. Hormis les acides oléique (15,63%) et linoléique (10,13%) dont les concentrations sont plus élevées ici, les teneurs en acides gras de cet échantillon se rapprochent de celles publiées par Armougom. Cet auteur a identifié les acides gras présents dans ses échantillons grâce aux techniques de chromatographie en phase gazeuse, chromatographie liquide haute performance et résonance magnétique nucléaire. En analysant une variété de *Momordica balsamina* provenant du Sénégal, cet auteur a obtenu les valeurs suivantes : acide palmitique : 13,6% ; acide stéarique : 7,5% ; acide oléique : 5,1% ; acide linoléique : 6,5% ; acide α -éléostéarique: 13,1% ; β -éléostéarique : 1,1% ; acide catalpique : 2% et acide punicique : 50,6% (Armougom, 1998).

3- Comparaison de *Momordica charantia* et de *Momordica balsamina*

Les Figures 15 et 16 présentent des chromatogrammes où sont superposés des échantillons de *Momordica charantia* et de *Momordica balsamina*. La Figure 16 correspond à un zoom effectué sur les pics obtenus au temps de rétention des CLnA.

Outre les surfaces des pics, et donc les concentrations qui diffèrent pour beaucoup d'acides gras, la principale différence qui s'observe sur le chromatogramme de *Momordica balsamina* est la présence au temps de rétention des CLnA, de deux pics qui ne se séparent pas suffisamment. Ceci nous montre qu'en GC, il est possible de quantifier les CLnA présents dans un échantillon, mais il n'est pas possible d'en séparer les différents isomères.

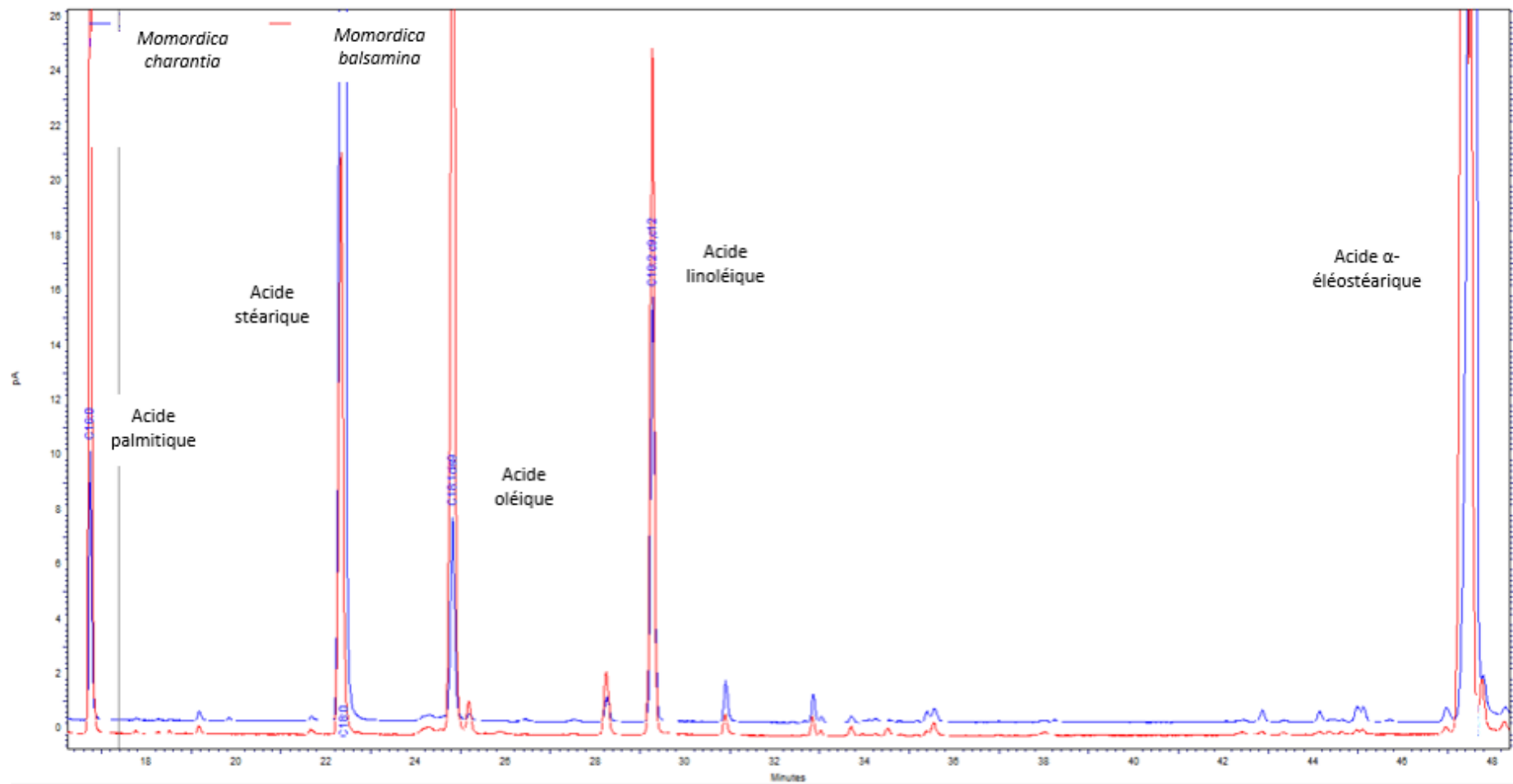


Figure 15: Superposition des chromatogrammes de *Momordica charantia* et de *Momordica balsamina*

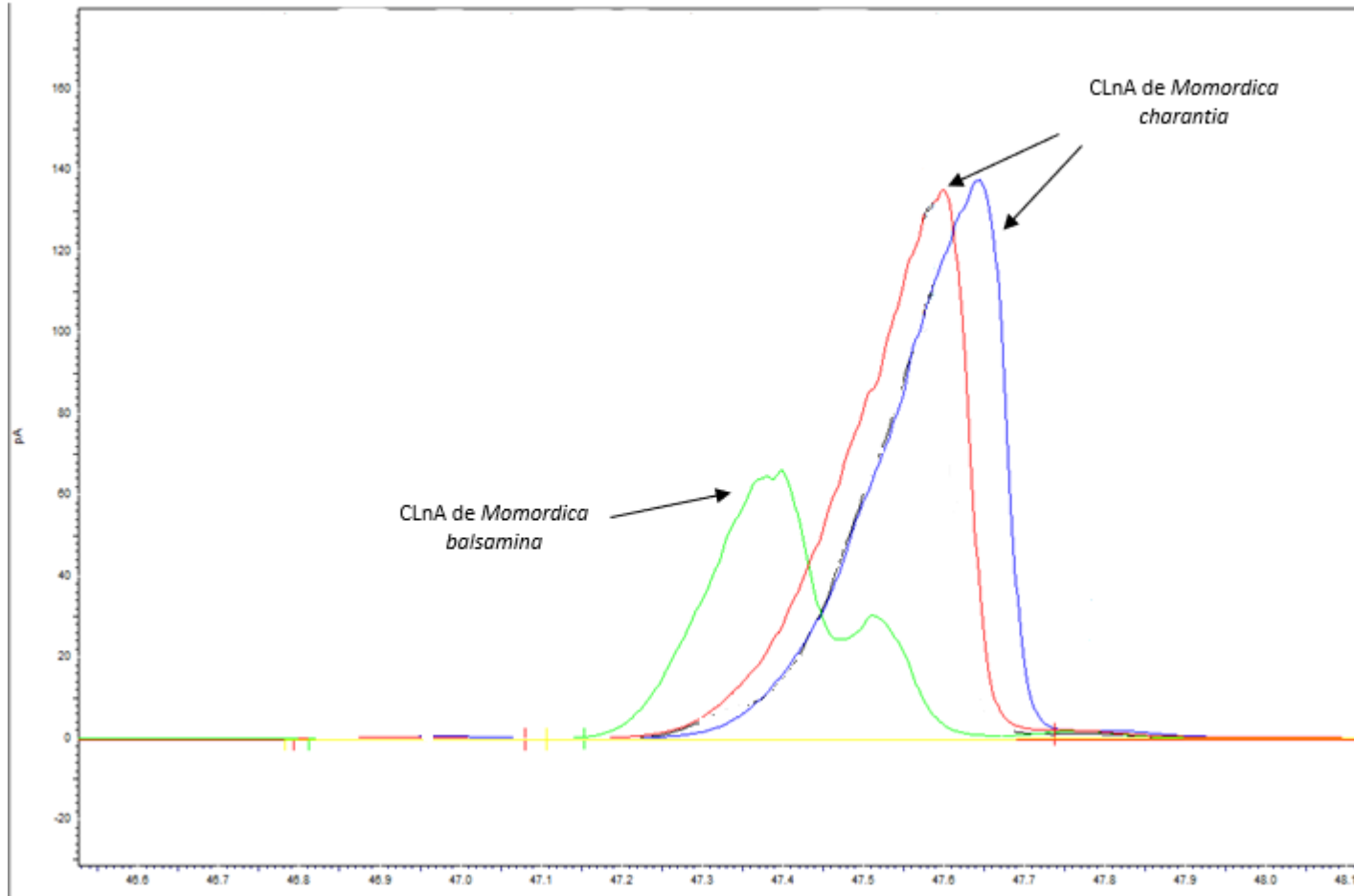


Figure 16: Zoom des pics des CLnA de Momordica charantia et Momordica balsamina

II- Analyse des échantillons par UPC²

1- Analyse des variétés de *Momordica charantia*

1-1- Chromatogrammes

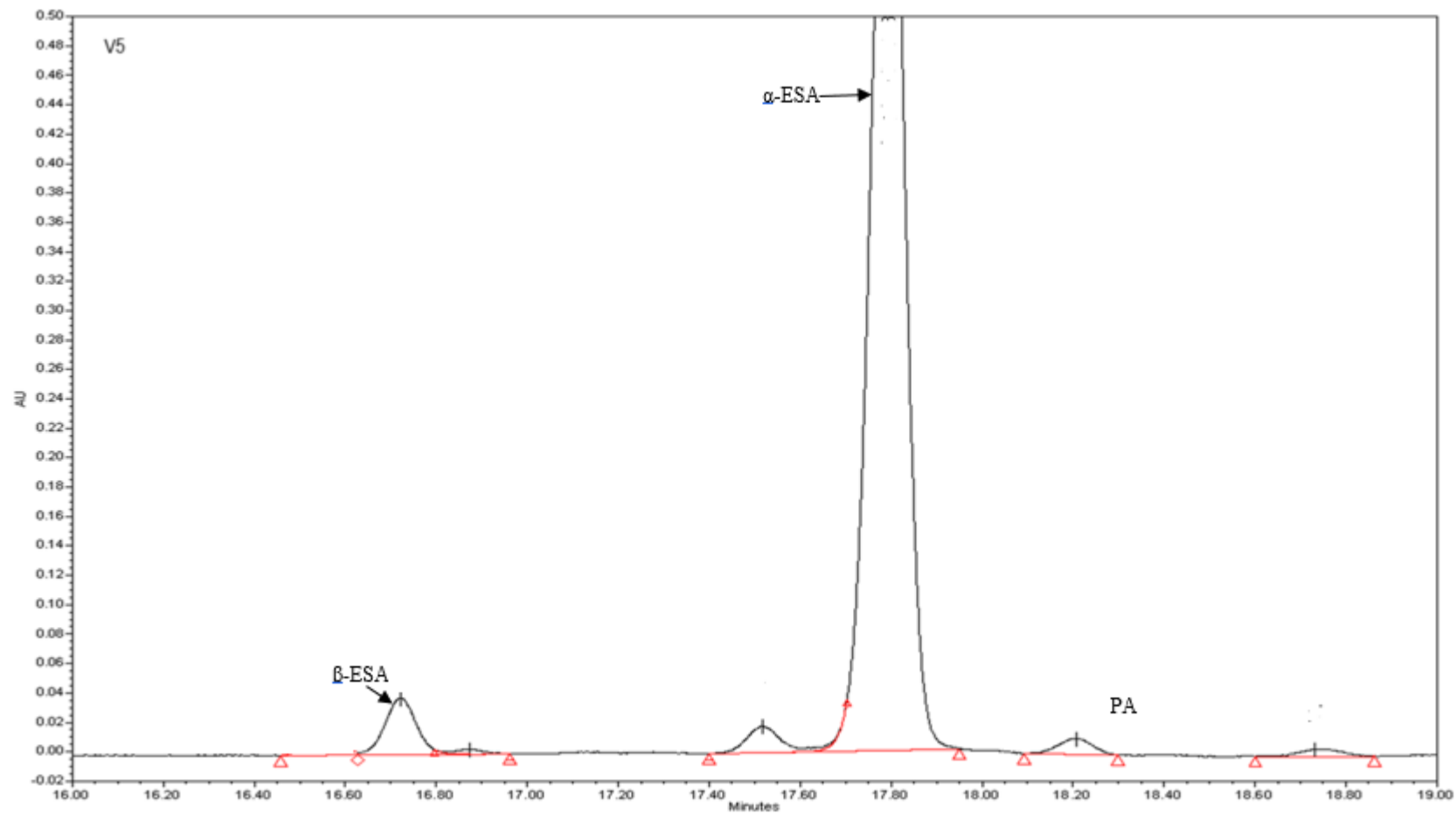
La Figure 21 présente le chromatogramme d'un échantillon de *Momordica charantia* obtenu par UPC². Son observation montre qu'en UPC², tous les acides gras ne sont pas identifiés et quantifiés, il s'agit uniquement des CLnA, et ils sont tous élués entre 16 et 18 min. Le profil obtenu est assez clair, les pics sont bien séparés, et donc facilement identifiables grâce à leurs temps de rétention.

Le pic à 17,79 min est identifié comme étant l'acide α -éléostéarique. Les autres pics identifiés sont l'acide β -éléostéarique (16,72 min) et l'acide punicique (18,20 min). À 16,87 min, l'acide β calendique est identifié à l'état de traces. Ce chromatogramme montre qu'avec l'UPC², nous identifions bien plusieurs isomères de CLnA. Les pics sont bien distincts les uns des autres, et l'identification est assez rapide puisque tous les CLnA sont élués avant la 19^{ème} minute.

Des temps de rétention inférieurs à 20 min sont optimaux, car à partir de 20 min on commence à associer l'acétonitrile au CO₂ comme co-solvant, afin d'éliminer de la colonne toute éventuelle impureté. Ceci indique que l'analyse est effectivement terminée.

1-2- Profil en acides gras

Le Tableau 15 présente les teneurs en CLnA identifiés dans les échantillons de *Momordica charantia*.



α -ESA : acide α -élostéarique

β -ESA : acide β -élostéarique

PA : Acide punicoque

Figure 17: Chromatogramme d'un échantillon V5 de *Momordica charantia* obtenu en UPC²

Tableau 15: Concentrations en CLnA dans les échantillons de *Momordica charantia* (% de CLnA identifiés)

Variétés	Nombre d'échantillons analysés	α -ESA (%)	β -ESA (%)	PA (%)
A4	1	89,23	7	3,77
D41	1	79,4	14,96	5,64
D9	3	87,47	8,23	4,31
FD	2	87,28	8,38	4,34
ND	1	88,36	7,67	3,98
UCL	5	88,58	7,38	4,05
V1	2	89,29	6,53	4,19
V2	1	87,58	8,14	4,27
V3	1	92,07	4,07	3,86
V4	2	88,52	6,58	4,9
V5	1	91,59	4,77	3,65
V7	1	81,57	13,76	4,67
Moyennes	/	87,58 \pm 3,66	8,12 \pm 3,21	4,30 \pm 0,55

α -ESA : acide α -éléostéarique

β -ESA : acide β -éléostéarique

PA : Acide punicique

Pour toutes les variétés de *Momordica charantia*, la concentration en acides gras la plus élevée est celle de l'acide α -éléostéarique, suivie par l'acide β -éléostéarique et l'acide punicique.

- **L'acide α -éléostéarique** : Ce tableau montre que l'acide gras majoritaire retrouvé dans les CLnA de *Momordica charantia* est l'acide α -éléostéarique, avec une moyenne de 87,58 \pm 3,66. C'est la variété V3 qui présente la proportion la plus élevée avec une teneur de 92,07% d'acides gras identifiés, suivie par les variétés V5 et V1 avec les valeurs respectives de 91,59% et 89,23%. D41 est la variété qui présente la teneur la plus basse en cet acide gras (79,4%). La valeur moyenne de 87,58% pour l'acide α -éléostéarique

dans nos échantillons est inférieure à celle trouvée par Armougom (96,9%) (Armougom, 1998).

- **L'acide β -éléostéarique** : Les proportions en ce CLnA sont comprises entre 4,07% et 14,96%. La proportion la plus faible est obtenue pour l'échantillon V3, et la proportion la plus élevée est obtenue pour l'échantillon D41. La valeur moyenne de 8,12% est supérieure à celle de 0,9% trouvée par Armougom (Armougom, 1998).
- **L'acide punicique** : Les proportions en cet acide gras sont comprises entre 3,65% et 5,64%. La proportion la plus faible est obtenue pour l'échantillon V5, et la proportion la plus élevée est obtenue pour l'échantillon D41. La valeur moyenne de 4,30 est supérieure à celle de 0,9% trouvée par Armougom (Armougom, 1998).

Les différents CLnA trouvés dans les échantillons analysés ici sont les mêmes que ceux trouvés par Armougom dans des échantillons de *Momordica charantia* provenant de la Réunion (Armougom, 1998). Toutefois, les proportions obtenues par cet auteur sont différentes de celles des échantillons analysés en ce qui concerne l'acide β -éléostéarique et l'acide punicique.

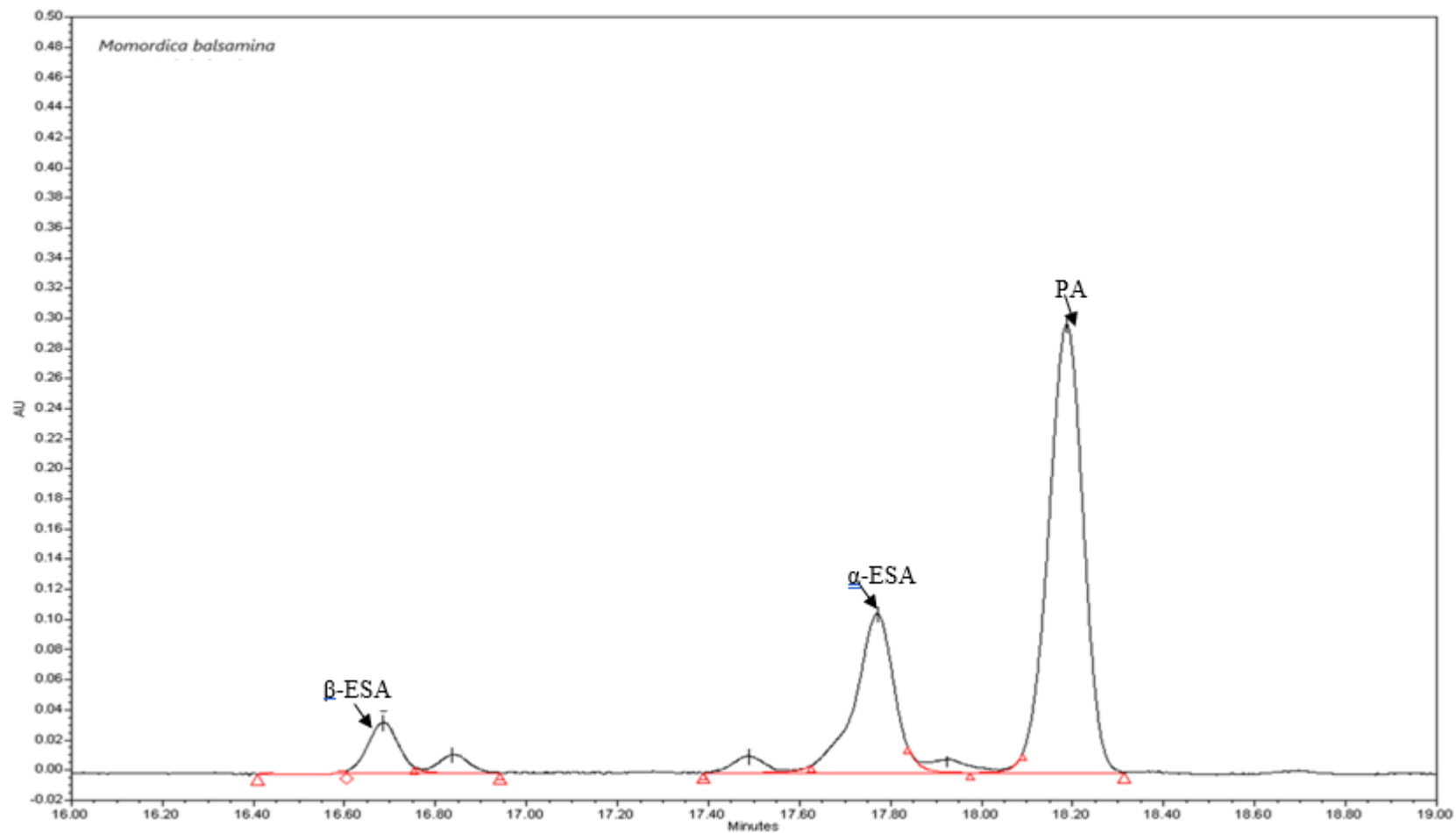
2- Analyse des échantillons de *Momordica balsamina* provenant de la localité de Pal de jamba

2-1- Chromatogrammes

La Figure 18 présente le chromatogramme de *Momordica balsamina* obtenu en UPC². Le CLnA retrouvé en quantité plus élevée est l'acide punicique, qui est élué à 18,17 minutes. Ensuite, il y a l'acide α -éléostéarique qui est élué à 17,71 minutes et l'acide β -éléostéarique qui est élué à 16,68 minutes.

2-2- Profils en acides gras

Le Tableau 16 nous présente le profil en CLnA des échantillons de *Momordica Balsamina*.



α -ESA : acide α -élostéarique
 β -ESA : acide β -élostéarique
PA : Acide punicoque

Figure 18: Chromatogramme de *Momordica balsamina* obtenu en UPC²

Tableau 16: Concentrations en CLnA dans les échantillons de *Momordica balsamina* (% de CLnA identifiés)

	α-ESA (%)	β-ESA (%)	PA (%)
PJ	12,98	3,28	82,72

α -ESA : acide α -éléostéarique

β -ESA : acide β -éléostéarique

PA : Acide punicique

PJ : *Momordica balsamina* provenant de *Pal de jamba*

L'acide gras majoritaire pour cette variété est l'acide punicique, avec une teneur de 82,72% des CLnA identifiés. Il est suivi par l'acide α -éléostéarique de teneur 12,98% et par l'acide β -éléostéarique de teneur 3,28%. La teneur élevée en acide punicique dans cet échantillon pourrait faire de lui une importante source de ce CLnA. En ce qui concerne l'acide α -éléostéarique, les valeurs sont très faibles par rapport à celles retrouvées dans *Momordica charantia*. L'acide β -éléostéarique a des concentrations très faibles dans toutes les variétés analysées, donc aucune d'entre elles ne peut être considérée comme source de ce CLnA.

III- Discussion générale

1- Le profil en acides gras

Afin de faire une étude comparée des teneurs en acides gras des échantillons analysés, nous résumerons d'abord celles-ci dans le Tableau 17. Ce tableau présente les profils en acides gras (en pourcentage d'acides gras identifiés) de *Momordica charantia* et *Momordica balsamina* obtenus par GC et par UPC². L'identification des acides gras présent dans les échantillons se fait par rapport à un standard, et pour les deux méthodes d'analyse le standard n'était pas le même. En GC les acides gras ont été identifiés par rapport à un standard qui ne contenait pas de CLnA. Ces derniers ont été identifiés et quantifiés en équivalent d'acide lignocérique (C24:0), dont les temps de rétention sont pareils. En UPC², le standard ne contenait pas d'acide α -éléostéarique, et cet acide gras a été identifié et quantifié en équivalent d'acide α -catalpique. Grâce aux deux techniques, nous avons pu obtenir un profil constitué des acides gras majoritaires, y compris les CLnA.

Tableau 17: Tableau comparatif des teneurs en acides gras dans les différents échantillons analysés

Acides gras	<i>Momordica charantia</i>	<i>Momordica balsamina</i>
C16:0	2,15%	11,02%
C18 :0	32,88%	9,55%
C18:1c9	2,23%	15,63%
C18:2c9c12	4,76%	10,13%
CLnA	56,09%	50,99%
• α-ESA	87,64%	12,98%
• β-ESA	8,11%	3,28%
• PA	4,24%	82,72%

α -ESA : acide α -éléostéarique

β -ESA : acide β -éléostéarique

PA : Acide punicique

Une étude comparée des chromatogrammes nous montre que la GC a permis de déceler la présence de CLnA, mais n'a pas permis d'identifier les isomères séparément. De plus, la détection de leur présence se fait 47 minutes après le début du passage dans la colonne, alors qu'en UPC² le temps d'analyse est plus court (maximum 20 minutes). Malgré le fait que la GC soit une méthode très pratique d'identification et de dosage des molécules (Skoog et al., 2015), elle est limitée pour le dosage des CLnA. Elle a déjà été utilisée par certains auteurs (Ali et al.,

2008; Armougom, 1998) pour cette analyse, mais était complétée par d'autres techniques telles que la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Armougom, 1998). L'UPC² présente ici les avantages d'être rapide, performante et pratique pour la séparation d'isomères de CLnA. Cependant, le type de colonne chromatographique avec lequel l'appareil a fonctionné lors de ces analyses n'était pas approprié pour l'obtention d'un profil en acides gras complet.

2- Comparaison des concentrations en CLnA obtenues en GC et en UPC²

Le Tableau 18 présente les concentrations en CLnA en mg/g de quelques échantillons analysés en GC et en UPC². Une comparaison statistique des moyennes des concentrations obtenues en GC à celles obtenues en UPC² nous a permis d'obtenir la Figure 24.

Tableau 18: Concentrations en CLnA de quelques échantillons, déterminées en GC et en UPC²

Echantillons	GC	UPC ²			Total CLnA UPC ²
	(mg/g de graine fraîche)	(mg/g de graine fraîche)			
	CLnA	α -ESA	β -ESA	PA	
A4	224,92	266,7	20,93	11,27	298,9
D41	111,3	31,8	5,99	2,26	40,05
D9	237,23	301,1	12,34	11,09	324,53
FD	218,36	280,1	27,26	13,59	320,95
ND	221,38	303,2	26,31	13,65	343,16
UCL	207,38	265,1	17,59	11,49	294,18
V1	216,98	244,3	23,68	12,91	280,89
V2	175,31	227,9	21,19	11,12	260,21
V5	228,93	223,7	11,64	8,91	244,25
V3	263,80	287,06	12,69	12,04	311,79
V4	185,38	243,30	31,60	12,55	287,46
V7	159,83	200,50	33,82	11,48	245,81
PJ	134,62	49,7	13,44	333,52	396,66

α -ESA : acide α -éléostéarique

β -ESA : acide β -éléostéarique

PA : Acide punique

PJ : *Momordica balsamina* provenant de la localité Pal de jamba

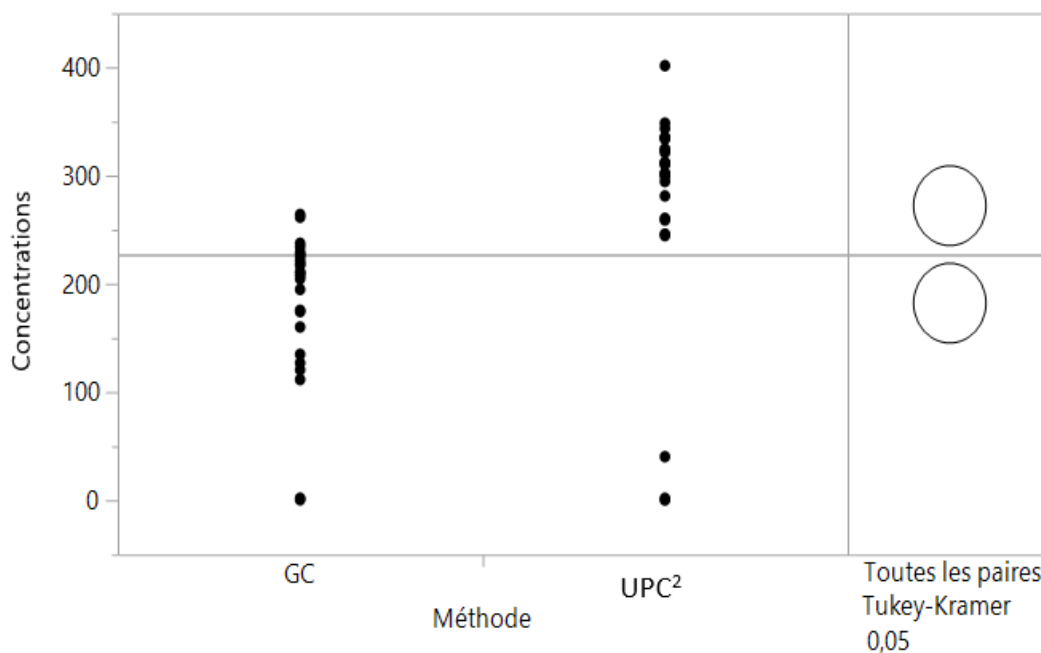


Figure 19: Comparaisons des moyennes des concentrations en CLnA obtenues en GC à celles obtenues en UPC² par le test de Tukey-Kramer

La Figure 19 compare les concentrations moyennes en CLnA obtenues en GC à celles obtenues en UPC². Les points noirs sont les concentrations moyennes, et les deux cercles représentés dans la partie droite de la figure présentent visuellement l'égalité des moyennes par le test de Tukey-Kramer. Si les deux cercles se croisent, alors les moyennes peuvent être considérées comme étant égales, sinon elles ne le sont pas.

Lorsqu'on compare les teneurs totales en CLnA de la GC à celles de l'UPC², on constate qu'elles sont significativement différentes ($P < 0,05$). Les concentrations moyennes en CLnA obtenues par GC sont plus faibles que celles obtenues par UPC². Les différences de concentrations en fonction des méthodes analytiques pourraient s'expliquer par le fait que pour chacune des deux méthodes, le standard d'identification est différent. En GC, ce standard est constitué d'acides gras ne contenant pas de CLnA, et en UPC² il est uniquement constitué de CLnA.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le travail réalisé avait pour objectifs d'établir le profil en acides gras des échantillons de *Momordica charantia* dont nous disposions, et d'évaluer les performances analytiques de la GC et de l'UPC². Nous avons analysé au total 98 échantillons de 14 variétés de *Momordica charantia*, et deux échantillons d'une variété de *Momordica balsamina*.

Les résultats de notre étude démontrent le potentiel de l'UPC² pour identifier et quantifier les CLnA. En plus d'obtenir le profil en acides gras des échantillons, il a été possible de déterminer les différences et les similitudes entre la composition en acides gras des différentes variétés de *Momordica charantia*, de même qu'entre les espèces *charantia* et *balsamina*. L'UPC² est une technique très performante, car elle nous a permis de séparer et de quantifier les isomères de CLnA présents dans les échantillons, ce qui n'a pas pu être réalisé en GC. Cette technique a en plus l'avantage d'être très rapide, donc elle permettrait de gagner en temps

On retient également de cette étude que la GC et l'UPC² sont deux techniques qui ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients, mais qui peuvent être utilisées conjointement pour l'établissement d'un profil complet en acides gras.

Au terme du travail, nous sommes en mesure de dire que les acides gras majoritaires dans l'huile des graines analysées sont les CLnA. *Momordica charantia* présente les teneurs les plus élevées en CLnA (56%), et ces teneurs ne varient pas fortement en fonction des espèces. L'analyse en UPC² a permis de déterminer que *Momordica charantia* contient en majorité de l'acide α -éléostéarique (88% des CLnA) et *Momordica balsamina* est quant à elle plus riche en acide punicoïque (83%).

En perspectives à ce travail, dans le but d'explorer tout le potentiel de l'UPC², il serait intéressant :

- d'effectuer les analyses sur une gamme plus large d'échantillons d'autres espèces du genre *Momordica*
- d'effectuer des analyses de CLA dans l'huile des graines de *Momordica charantia*
- d'établir un profil complet en acides gras par UPC².

Concernant les graines, il serait intéressant d'effectuer une quantification des lipides totaux, ainsi que des analyses sur une gamme plus large d'échantillons afin d'obtenir des valeurs plus fiables notamment pour *Momordica balsamina*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akoh, C.C., and Min, D.B. (2002). *Food lipids: chemistry, nutrition, and biochemistry* (New York: M. Dekker).
- Akram, F., Nicot, M.C., Juaneda, P., and Enjalbert, F. (2007). Conjugated linolenic acid (CLnA), conjugated linoleic acid (CLA) and other biohydrogenation intermediates in plasma and milk fat of cows fed raw or extruded linseed. 835–843.
- Ali, M.A., Sayeed, M.A., Reza, M.S., Yeasmin, M.S., and Khan, A.M. (2008). Characteristics of seed oils and nutritional compositions of seeds from different varieties of *Momordica charantia* Linn. cultivated in Bangladesh. *Czech J. Food Sci.* 26, 275–283.
- Anilakumar, K.A., Kumar, G.P., and Ilaiyaraja, N. (2015). Nutritional, Pharmacological and Medicinal Properties of *Momordica Charantia*. *Int. J. Nutr. Food Sci.* 4, 75.
- Arao, K., Wang, Y.-M., Inoue, N., Hirata, J., Cha, J.-Y., Nagao, K., and Yanagita, T. (2004). Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF Rats. *Lipids Health Dis.* 3, 24.
- Armougom, P.R. (1998). Étude de la fraction lipidique des graines de Cucurbitacées tropicales des genres *Lagenaria*, *Luffa*, *Momordica*. Université de la réunion.
- Banihani, S., Swedan, S., and Alguraan, Z. (2013). Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutr. Res.* 33, 341–348.
- Bassaganya-Riera, J., DiGuardo, M., Climent, M., Vives, C., Carbo, A., Jouni, Z.E., Einerhand, A.W.C., O’Shea, M., and Hontecillas, R. (2011). Activation of PPAR γ and δ by dietary puniic acid ameliorates intestinal inflammation in mice. *Br. J. Nutr.* 106, 878–886.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., and Schieberle, P. (2009). *Food chemistry* (Berlin: Springer).
- Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., and Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *Journal of nutritional biochemistry* 789–810.
- Boussetta, T., Raad, H., Lettéron, P., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Marie, J.-C., Driss, F., and El-Benna, J. (2009). Puniic Acid a Conjugated Linolenic Acid Inhibits TNF α -Induced Neutrophil Hyperactivation and Protects from Experimental Colon Inflammation in Rats. *PLOS ONE* 4, e6458.
- Burgot, G., and Burgot, J. (2011a). *Méthodes instrumentales d’analyse chimique et applications* (3e ed.) (Lavoisier).

- Burgot, G., and Burgot, J.-L. (2011b). Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques (Lavoisier).
- Costantini, S., Rusolo, F., De Vito, V., Moccia, S., Picariello, G., Capone, F., Guerriero, E., Castello, G., and Volpe, M.G. (2014). Potential Anti-Inflammatory Effects of the Hydrophilic Fraction of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil on Breast Cancer Cell Lines. *Molecules* 19, 8644–8660.
- Cuvelier, C., Cabaraux, J.-F., Dufrasne, I., Hornick, J.-L., and Istasse, L. (2004). Acides gras: nomenclature et sources alimentaires.
- Desai, S., and Tatke, P. (2015). Charantin: An important lead compound from *Momordica charantia* for the treatment of diabetes. *Journal of Pharmacognosy and phytochemistry* 3, 163–166.
- Eaton, S.F., and McDonald, P.D. (2012). Waters ACQUITY UPC2 system for convergence chromatography. *chimica oggi/Chemistry today* 30.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissue. *Journal of biological chemistry* 226, 497–509.
- Fountain, K.J., Grumbach, E.S., McCabe, D.R., Anwer, P., and Yong, B. (2014). Beginner's guide to convergence chromatography (USA).
- Gupta, M., Sharma, S., Gautam, A.K., and Bhadauria, R. (2011). MOMORDICA CHARANTIA LINN. (KARELA): NATURE'S SILENT HEALER. 11, 6.
- Hennebelle, M. (2012). Acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3) e prévention des dommages cérébraux induits par un stress chronique. Université Paris sud Paris XI.
- Hudalla, C.J., and McDonald, P.D. (2013). Un nouvel outil de séparation pour relever un large éventail de défis analytiques : la chromatographie de convergence ultra performante (UPC²). 16–17.
- Igarashi, M., and Miyazawa, T. (2000). Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. *Cancer Lett.* 148, 173–179.
- Lai, N.H. (2017). le melon amer (Vietnam).
- Laleye, O.A.F., Ahissou, H., Olounlade, A.P., Azando, E.V.B., and Laleye, A. (2016). Etude bibliographique de trois plantes antidiabétiques de la flore béninoise: *Khaya senegalensis* (Desr) A. Juss (Meliaceae), *Momordica charantia* Linn (Cucurbitaceae) et *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 9, 2682.

- Nagao, K., and Yanagita, T. (2005). Conjugated fatty acids in food and their health benefits. *J. Biosci. Bioeng.* *100*, 152–157.
- Nzali Ghomdim, henri, Tchiegang, C., Mignolet, E., Turu, C., Larondelle, Y., and Meurens, M. (2012). Study of Bioconversion of Conjugated Linolenic Acid (CLNA) of *Ricinodendron heudelotii* (Bail.) Seed in Male Rats into Conjugated Linoleic Acid (CLA) Using UV-Vis Spectrometry and Gas Chromatography - SciAlert Responsive Version.
- Pal, M., and Ghosh, M. (2012). Studies on comparative efficacy of α -linolenic acid and α -eleostearic acid on prevention of organic mercury-induced oxidative stress in kidney and liver of rat. *Food Chem. Toxicol.* *50*, 1066–1072.
- Palmer, D.J., Sullivan, T., Gold, M.S., Prescott, S.L., Heddle, R., Gibson, R.A., and Makrides, M. (2012). Effect of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in pregnancy on infants' allergies in first year of life: randomised controlled trial. *BMJ* *344*, e184–e184.
- Pereira de Melo, I.L., Teixeira de Carvalho, E.B., and Mancini-Filho, J. (2014). Pomegranate Seed Oil (*Punica Granatum* L.): A Source of Punicic Acid (Conjugated α -Linolenic Acid). *Journal of human nutrition and food science* *2*, 1024.
- Plourde, M. (2006). Etude des effets physiologiques des acides alpha-linoléniques conjugués. Université Laval - Québec ; Université de Bourgogne - Dijon.
- Schneider, A.-C., Beguin, P., Bourez, S., Li, J.W.P., Mignolet, E., Debier, C., Schneider, Y.-J., and Larondelle, Y. (2012). Conversion of t11t13 CLA into c9t11 CLA in Caco-2 Cells and Inhibition by Sterculic Oil. *PLOS ONE* *7*, e32824.
- Serpinet, J. (1968). Les applications de la chromatographie en phase gazeuse et leurs limites. *Fresenius Z. Fr Anal. Chem.* *236*, 3–15.
- Singh, A.K., Pan, R.S., and Bhavana, P. (2013). HETEROSIS AND COMBINING ABILITY ANALYSIS IN BITTERGOURD (*MOMORDICA CHARANTIA* L.). *The bioscan* *8*, 1533–1536.
- Singh, V., Rana, D.K., and Shah, K.N. (2018). Evaluation of Genetic Diversity in Bitter Gourd (*Momordica charantia* L.) under Subtropical Conditions of Garhwal Himalaya. *International journal of advanced scientific research and management* *4*.
- Skoog, D.A., West, D.M., and Holler, J.F. (1997). *Chimie analytique* (Paris: De Boeck & Larcier s.a).
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., Buess-Herman, C., Dauchot-Weymeers, J., and Doneux, T. (2015). *Chimie analytique* (Bruxelles: De Boeck).

- Taylor, L. (2002). Technical data report for bitter melon (*Momordica charantia*).
- Tchiégang, C., and Aissatou, K. (2004). Données ethnonutritionnelles et caractéristiques physico-chimiques des légumes-feuilles consommés dans la savane de l'Adamaoua (Cameroun). *tropicultura* 22, 11–18.
- Tsuzuki, T., Igarashi, M., Komai, M., and Miyazawa, T. (2003). The Metabolic Conversion of 9,11,13-Elleostearic Acid (18:3) to 9,11-Conjugated Linoleic Acid (18:2) in the Rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 49, 195–200.
- USDA (2017). Basic Report 11024, Balsam-pear (bitter gourd), pods, raw (USDA).
- Yang, J., DeMuro, R., Snyder, C., Bench, B.J., and Shringarpure, J. (2016). Fatty Acid Profiling by UPC2-MS. 2.
- Yoshime, L.T., de Melo, I.L.P., Sattler, J.A.G., de Carvalho, E.B.T., and Mancini-Filho, J. (2016). Bitter gourd (*Momordica charantia* L.) seed oil as a naturally rich source of bioactive compounds for nutraceutical purposes. *Nutrire* 41.
- Yuan, G.-F., Chen, X.-E., and Li, D. (2014). Conjugated linolenic acids and their bioactivities: a review. *Food Funct.* 5, 1360.

Résumé

Les acides α -linoléiques conjugués (CLnA) sont un mélange d'isomères géométriques et de position de l'acide octadécatriénoïque. Ils sont trouvés en grande quantité dans les graines de certaines plantes, et de nombreuses études suggèrent qu'ils ont des effets bénéfiques pour la santé. L'acide α -éléostéarique est le CLnA majoritaire dans l'huile des graines de *Momordica charantia*, et de nombreuses variétés sont cultivées au Vietnam. L'objectif de ce travail est d'établir le profil en acides gras de plusieurs variétés traditionnelles de *Momordica charantia* du Vietnam, ainsi que de plantes sauvages collectées au Sénégal, dans l'espoir d'en identifier qui soient particulièrement riches en CLnA.

Nous avons analysé 98 échantillons de 14 variétés de *Momordica charantia*, ainsi que deux échantillons d'une variété de *Momordica balsamina* afin de faire une étude comparative. Parmi les 14 variétés de *Momordica charantia*, 11 provenaient de Vietnam, deux provenaient du Sénégal, récoltées dans les localités de « Fatick deoussel » et « Niaye dakan », et la dernière provenait d'une localité indéterminée du Vietnam, mais a été cultivée dans les serres de l'UCL à Louvain-la-Neuve. Les échantillons de *Momordica balsamina* provenaient du Sénégal, dans la localité de « Pal de jamba ». La détermination du profil en acides gras s'est faite par chromatographie en phase gazeuse et par chromatographie UPC².

Les résultats de cette étude ont montré qu'en moyenne, dans les graines de *Momordica charantia*, il y a 5 acides gras principaux que sont l'acide palmitique (2,15%), l'acide oléique (2,23%), l'acide linoléique (4,76%), l'acide stéarique (32,88%) et les CLnA (56%). Parmi les CLnA, l'acide α -éléostéarique représente 87,64%, l'acide β -éléostéarique 8,11%, et l'acide punique 4%. Ces teneurs ne sont pas significativement différentes d'une variété à l'autre, d'après le test de Tukey-Kramer au seuil de 5%. L'huile des graines de *Momordica balsamina* contient de l'acide stéarique (9,55%), de l'acide linoléique (10,13%), de l'acide palmitique (11,01%), de l'acide oléique (15,63%) et des CLnA (50,98%), dont 82,72% d'acide punique, 12,98% d'acide α -éléostéarique et 3,28% d'acide β -éléostéarique. Cette espèce présente dès lors un profil en CLnA très différent de celui de *Momordica charantia*.

La chromatographie en phase gazeuse nous a permis d'établir le profil en acides gras des graines de *Momordica charantia*, mais ne nous a pas permis de séparer les différents isomères de CLnA présents dans l'huile. La séparation de ces isomères a été effectuée grâce à l'UPC².

Mots clés : Acides linoléiques conjugués, Acide α -éléostéarique, *Momordica charantia*, UPC²