

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE MENTOURI - CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre:

Série:

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de Magister

En Chimie Organique

Option: Phytochimie

Intitulé

Recherche et Détermination Structurale des Composés
Flavoniques de L'espèce : *Myrtus communis* L.

(Myrtaceae)

Par: CHAUCHE MASSIKA

Devant la commission d'examen:

Mr. RHOUATI Salah	Pr. Université Mentouri Constantine	Président
Mr. ZAIDI Farouk	MC. Université Ferhat Abbas Sétif	Rapporteur
Mr. AKKAL Salah	Pr. Université Mentouri Constantine	Examineur
Mr. BENKINIOUAR Rachid	MC. Université Mentouri Constantine	Examineur
Mr. ZELLAGUI Amar	MC. Université Oum El Bouaghi	Examineur

Soutenu le : 20/05/2010

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Produits Naturels d'Origine végétale et de Synthèse Organique (Département de chimie, Université Mentouri- Constantine).

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de ce mémoire, Monsieur Zaidi Farouk, Maître de conférences au Département de chimie de l'université Ferhat Abbas-Sétif, de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie, pour ses nombreux conseils et discussions scientifiques qui ont permis de mener à bon terme ce travail.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur Salah Rhouati, Professeur au département de chimie de l'université Mentouri-Constantine, pour le grand honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Mes remerciements vont également à Monsieur Akkal Salah, Professeur au département de chimie de l'université Mentouri-Constantine d'avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Benkiniouar Rachid, Maître de conférences au Département de chimie de l'université Mentouri-Constantine pour son aide, ses conseils précieux et pour le grand honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

Je tiens à remercier également Monsieur Zellagui Amar d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont enfin à tous ceux qui m'ont aidé et encouragé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

Chapitre I : La famille des Myrtacées

I-1- Aspect botanique.....	3
I-1-1- Position systématique.....	3
I-1-2- Généralités.....	3
I-1-3- Intérêt biologique de la famille Myrtacées	3
I-2- Aspect chimique.....	5
I-2-1- Les métabolites secondaires les plus courants chez les Myrtacées.....	5
I-2-1-1- les flavonoïdes isolés de la famille Myrtacées.....	5

Chapitre II : les flavonoïdes

Introduction	12
II-1- Structure chimique et classification.....	12
II-2- Biosynthèse des flavonoïdes.....	19
II-3- Substitutions du squelette flavonique.....	21
II-3-a- L'hydroxylation.....	21
II-3-b- La méthylation.....	21
II-3-c- O-glycosylation.....	22
II-3-d- C-Méthylation.....	23
II-3-e- C- glycosylation.....	23

II-4- Distribution et localisation.....	24
II-5- Propriétés des flavonoïdes	24
II-5-a- Activité anti-oxydante des flavonoïdes.....	25
II-6- Etude chimique des flavonoïdes.....	27
II-6-1- Les extractions.....	27
II-6-2- Séparations chromatographiques	27
II-6-2 –a- Chromatographie sur colonne.....	28
II-6-2-b- Chromatographie sur papier.....	28
II-6-2-c- Chromatographie sur couches minces.....	28
II-7-Analyse structurale des flavonoïdes.....	29
II-7-1- Généralités.....	29
II-7-2- Fluorescence sous lumière de Wood.....	31
II-7-3- Effet du rapport frontal	32
II-7-4- Spectrophotométrie UV-visible.....	32
II-7-5- Hydrolyse acide des hétérosides.....	37
II-7-6- Spectrométrie de masse.....	38
II-7-6-1- Ionisation par impact électronique.....	38
II-7-6-2- Spectrométrie de masse à bombardement atomique rapide FAB.....	41
II-7-6-3- Ionisation à pression atmosphérique.....	41
II-7-7- Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire	42
II-7-7-a- RMN monodimensionnelle	43
II-7-7-b- RMN bidimensionnelles.....	48

Chapitre III : Partie expérimentale

III-1- Etude chimique de l'espèce <i>Myrtus communis</i> L.....	50
III-1-1- Choix du matériel végétal.....	50
III-1-2- Place dans la systématique.....	51
III-1-3- Description botanique du l'espèce <i>Myrtus communis</i> L.....	51
III-1-4- Protocole expérimentale.....	52
III-1-4-1- Extraction.....	52
III-1-4-2-Contrôle chromatographique.....	54
III-1-4-3- Séparation chromatographique.....	56
III-1-4-3-a- Séparation et purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle.....	56
III-1-4-3-b- Séparation et purification des composants de l'extrait butanolique.....	59

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV-1- Elucidation structurale du composé A ₂	64
IV-2- Elucidation structurale du composé R ₁₁₁	72
IV-3- Elucidation structurale du composé G ₁₁₁	83
CONCLUSION GENERALE.....	96
BIBLIOGRAPHIE.....	97

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE :

Les plantes ont été et sont toujours connus comme étant une source importante de médicaments.

En effet, l'industrie pharmaceutique moderne s'appuie largement sur la diversité des métabolites secondaires des végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites.

Les plantes sont extrêmement complexes du point de vue de leur composition chimique. On estime qu'elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents, dont quelques-uns seulement (ou parfois un seul) sont (ou est) responsable(s) de l'effet thérapeutique ou de l'effet toxique [40]. Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes médicinales afin d'étudier leur efficacité, leur mode d'action et bien entendu leurs effets secondaires sur la santé humaine.

Afin de donner un sens sinon valoriser ce genre de travail de recherche, autant essayer de choisir une espèce de plante utilisée dans un domaine tel que la médecine traditionnelle, la cosmétologie ou autre. Ainsi, l'occasion se présente afin de considérer l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales (Sahara, montagne, milieu aquatique) ou encore l'endémisme [77].

Le chemin qui mène de la plante à ses constituants purs est très long et nécessite un travail d'équipes pluridisciplinaires (botanistes, chimistes, etc....), le travail de phytochimiste concerne essentiellement l'isolement, la purification et enfin la détermination structurale du produit isolé quoique ce dernier a tellement évolué ces dernières années.

L'Algérie compte dans sa flore un grand nombre de plantes médicinales appartenant à des familles variées, notre choix s'est porté particulièrement sur une espèce de la famille des Myrtacées.

Notre présent travail est orienté vers l'étude phytochimique de l'espèce *Myrtus communis*L. et consiste en l'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires en l'occurrence les flavonoïdes et qui est présenté comme suit :

- Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique concernant la famille des Myrtacées, sa classification botanique, l'intérêt biologique de leurs espèces et leurs métabolites secondaires les plus courants (spécialement les flavonoïdes).
- Le second chapitre renferme une étude bibliographique des flavonoïdes, les différents squelettes flavoniques, leur biosynthèse ainsi que les différentes méthodes de séparation et d'identification.
- Le troisième chapitre sera consacré à la présentation des techniques d'isolement, et de purification des flavonoïdes de l'espèce *Myrtus communis*L. .
- Le dernier chapitre englobera les résultats obtenus ainsi que les interprétations structurales des différents composés isolés, suivi d'une conclusion générale.

CHAPITRE I

LA FAMILLE DES MYRTACEES

I-1- ASPECT BOTANIQUE :

I-1-1- Position systématique :

On peut définir la famille des Myrtacées du point de vue botanique selon les divisions suivantes [25].

Règne	—————→	Plantae
Sous-règne	—————→	Eucaryotae
Embranchement	—————→	Spermaphytæ
Sous-embranchement	—————→	Angiospermae
Classe	—————→	Dicotylédonae
Ordre	—————→	Myrtales
Famille	—————→	Myrtaceae

I-1-2- Généralités :

La Famille des myrtacées est une famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 3800 espèces réparties en 133 genres [74].

Ce sont des arbustes à feuilles entières et opposées; fleurs axillaires hermaphrodites; 5-mère. Calice cupuliforme. Etamines très nombreuses, insérées avec les pétales au sommet du tube calycinal. Gynécée infère ou semi-infère à 5 carpelles uniloculaires, à ovules nombreux, à placentation axile. Fruit bacciforme bleuâtre, globuleux, de 5-8mm de diamètre [79].

I-1-3- Intérêt biologique de la famille Myrtacées :

Beaucoup d'espèces de cette famille possèdent des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans le tableau I-1 suivant sont cités quelques exemples d'espèces dont les propriétés susdites ont été vérifiées et confirmées suite à différents travaux.

Tableau I-1 : Activités biologiques de certaines espèces de la famille des Myrtacées.

Espèce	Activités biologiques	Références
<i>Cleistocalyx operculatus</i>	anti-inflammatoire antiseptique anti-oxydante antimicrobienne cytotoxique anti-tumorale	[71] [70] [13]
<i>Melaleuca squarrosa</i>	anti-oxydante	[66]
<i>Leptospermum polygalifolium</i>	antimicrobienne	[45]
<i>Psidium guajava</i>	anti-oxydante anti-hypertensive anti-diarrhique antinociceptive antidiabétique anti-allergique anti-tumorale anti-inflammatoire cytotoxique antispasmodique antigenotoxique	[87]
<i>Syzygium samarangense</i>	cytotoxique anti-oxydante	[62]
<i>Eucalyptus saligna</i>	antibactérienne	[15]
<i>Eucalyptus rostrata</i>	anti-oxydante	[38]
<i>Eugenia jambos</i>	antipyrétique anti-inflammatoire anti-tumorale	[48]
<i>Eugenia jambolana</i>	antidiabétique anti-lipidémique	[6]
<i>Leptospermum scoparium</i>	antimicrobienne	[54]
<i>Myrtus communis</i>	antidiabétique anti-oxydante antimicrobienne anti-mutagénique	[3] [95] [36]
<i>Syzygium aromaticum</i>	anti-hypertensive anti-oxydante antifongique antidiabétique	[47] [96] [86] [81]

I-2- ASPECT CHIMIQUE:

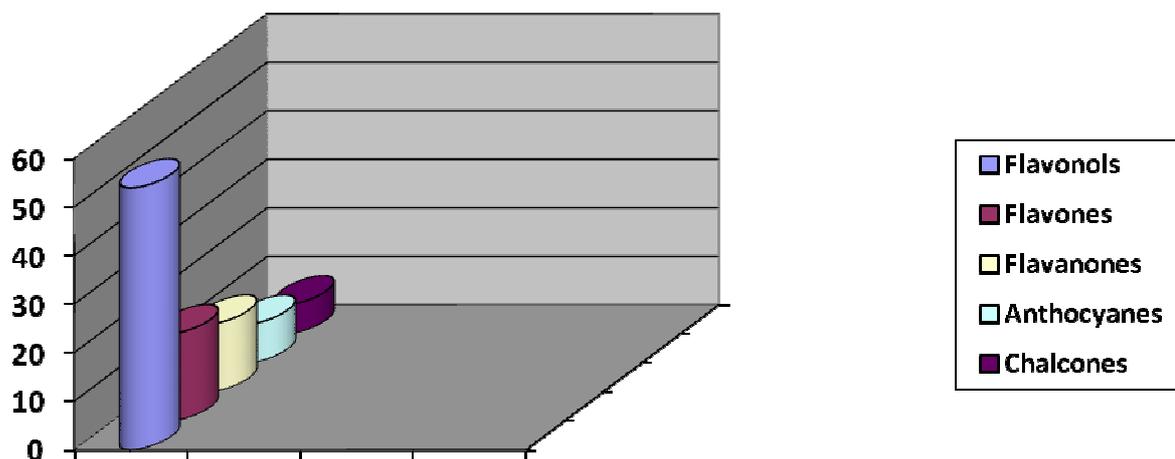
I-2-1- Les métabolites secondaires les plus courants chez les myrtacées :

La recherche bibliographique réalisée sur cet axe montre que la majorité, sinon la totalité des études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces de la famille des myrtacées certifie la richesse en métabolites secondaires tels que : les flavonoïdes [22], les huiles essentielles [72] et les terpénoïdes [63,92].

Pour ce qui nous concerne, nous allons mentionner les métabolites secondaires les plus distribués dans les différentes espèces de la famille des myrtacées et qui sont les flavonoïdes.

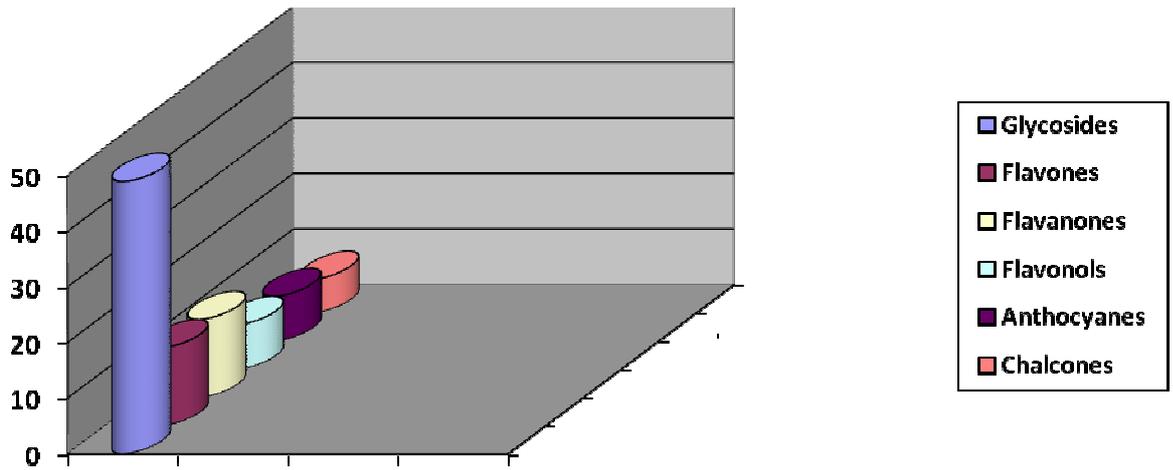
I-2-1-1- les flavonoïdes isolés de la famille myrtacées:

Une étude bibliographique présentant les différentes classes de flavonoïdes isolés d'espèces de la famille des myrtacées a montré une nette domination des composés de type flavonols (Histogramme I-1) :



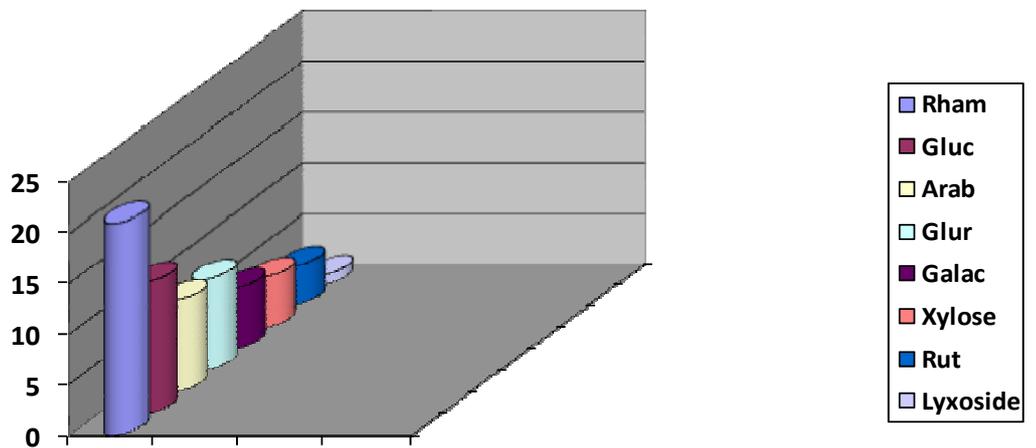
Histogramme I-1 : les différentes classes de flavonoïdes issues des myrtacées.

Cette étude montre également que parmi ces structures flavoniques identifiées, les composés glycosylés de type flavone et flavonol sont majoritaires (Histogramme I-2).



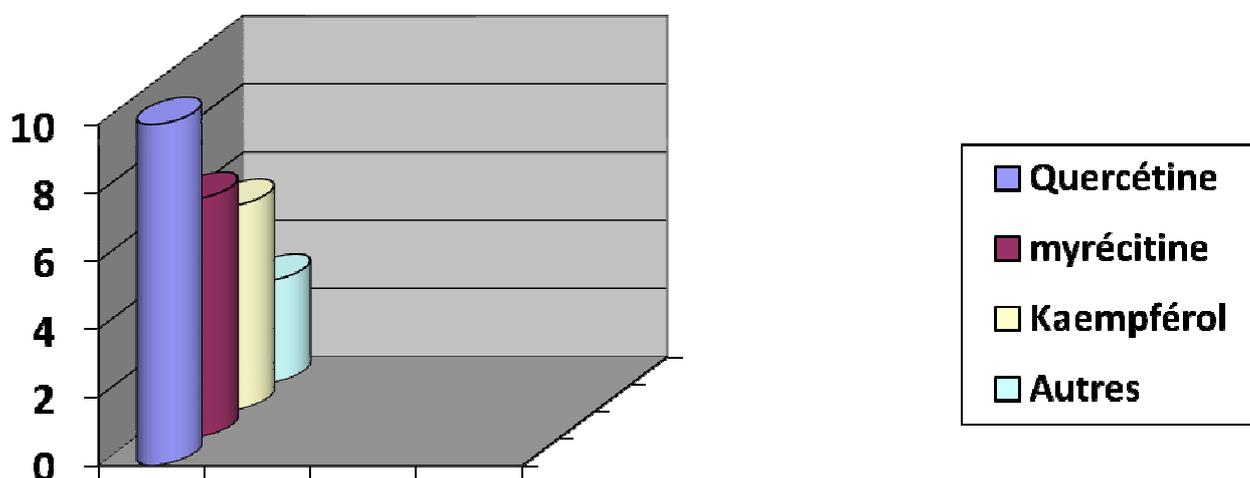
Histogramme I-2 : les différentes classes de flavonoïdes détectés chez les espèces étudiées de la famille de myrtacées.

Une étude plus détaillée sur l'abondance des différents sucres chez ces espèces a montré que les flavonoïdes rhamnosides sont majoritaires par rapport aux autres (Histogramme I-3).



Histogramme I-3 : l'abondance des différents flavonoïdes glycosylés détectés chez les espèces étudiées de la famille de myrtacées.

Concernant les flavonols, c'est la quercétine qui est la plus accumulée par cette famille (10 espèces) suivie du myricétine (7 espèces) et du kaempférol (6 espèces) (Histogramme I-4).



Histogramme I-4 : Répartition des flavonols détectés chez les espèces étudiées des Myrtacées.

Le tableau I-2 suivant énumère la liste des flavonoïdes isolés des myrtacées.

Tableau I-2 : liste des flavonoïdes isolés de certaines espèces des myrtacées.

Flavonoïde	Espèce (Origine)	Réf.
3'-Formyl-4', 6'-dihydroxy-2'-methoxy-5'-methyl chalcone	<i>Cleistocalyx operculatus</i>	14
2', 4'-dihydroxy-6'-methoxy- 3', 5'-dimethyl chalcone	<i>Cleistocalyx operculatus</i>	14
	<i>Syzygium samarangense</i>	89
	<i>Metrosideros excelsa</i>	46
2', 4'-dihydroxy-3'-methyl-6'-methoxy chalcone	<i>Syzygium samarangense</i>	89
	<i>Metrosideros excelsa</i>	46
2', 4'-dihydroxy-6'-methoxy chalcone	<i>Syzygium samarangense</i>	89
2',6'-dihydroxy-3'-methyl -4'-methoxy chalcone	<i>Metrosideros excelsa</i>	46
2'-hydroxy-3'-methyl-4',6'- dimethoxy chalcone		
(2S)-8-Formyl-5-hydroxy-7-methoxy-6-methyl flavanone.	<i>Cleistocalyx operculatus</i>	14
8-formyl-5,7-dihydroxy-6- methyl flavanone.		
7- hydroxy-5- methoxy-6,8-dimethyl flavanone.		

Tableau I-2 : liste des flavonoïdes isolés de certaines espèces des myrtacées (suite).

Flavonoïde	Espèce (Origine)	Réf.
5- hydroxy-7- methoxy flavanone	<i>Leptospermum scoparium</i>	28
5,7-dimethoxy-6- methyl flavanone		
5- hydroxy-7- methoxy-6-dimethyl flavanone	<i>Leptospermum scoparium</i>	28
	<i>Leptospermum polygalifolium</i>	45
5,7-dimethoxy flavanone		
2,5-dihydroxy-6-methyl-7-methoxy flavanone		
2,5-dihydroxy-8-methyl-7-methoxy flavanone	<i>Leptospermum polygalifolium</i>	45
2,3,5-trihydroxy-6-methyl-7-methoxy flavanone		
2,3,5-trihydroxy-8-methyl-7-methoxy flavanone		
5,7-dihydroxy flavanone	<i>Syzygium samarangense</i>	89
5,7-dihydroxy-6,8-dimethyl flavanone	<i>Metrosideros excelsa</i>	46
Gossypetin-3,8-dimethyl ether-5-O-β-glucoside		
Gossypetin-3,5-dimethyl ether		
Myricetin-3,5,3'-trimethyl ether		
Quercetin-3-O-β-galactoside	<i>Eugenia edulis</i>	41
Quercetin-3-O-β-(6''-galloyl)glucoside)		
Kaempferol-3-O-α-arabinofuranoside		
Quercetin-3-O-α-arabinofuranoside		
Myricetin-3-O-α-rhamnoside	<i>Eugenia edulis</i>	41
	<i>Syzygium samarangense</i>	89
	<i>Myrtus communis</i>	65
Kaempferol	<i>Eugenia edulis</i>	41
	<i>Eugenia jambolona</i>	52
	<i>Eucalyptus rostrata</i>	73
Quercetin	<i>Eugenia edulis</i>	41
	<i>Eucalyptus rostrata</i>	73
	<i>Syzygium samarangense</i>	89
	<i>Psidium guajava</i>	82
Quercetin-3-O-β-D-xylopyranosyl (1 → 2) α-L-rhamnopyranoside		
	<i>Eugenia jambos</i>	90
Myricetin-3-O-β-D-xylopyranosyl (1 → 2) α-L-rhamnopyranoside		
Mearnsetin 3-O-(4''-O-acetyl)-α-L-rhamnopyranoside		
Myricetin-3-O-(4''-O-acetyl-2''-O-galloyl-α-L-rhamnopyranoside		
Myricetin-3-O-(4''-O-acetyl)-α-L-rhamnopyranoside		
Myricetin-4'-methyl ether-3-O-α-L-rhamnopyranoside	<i>Eugenia jambolona</i>	52
Myricetrin		
Quercetrin-4''-O-acetate		
Quercetrin-3-O-α-L-rhamnopyranoside		
Kaempferol-3-O-β-D-glucuronopyranoside		
Myricetin -3-O-β-D-glucuronopyranoside		
Kaempferol-3-glucuronide	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	67

Tableau I-2 : liste des flavonoïdes isolés de certaines espèces des myrtacées (suite).

Flavonoïde	Espèce (Origine)	Réf.
Quercetin-3-glucoside	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	67
	<i>Eucalyptus sideroxylon</i>	39
	<i>Myrtus communis</i>	65
Quercetin-3-glucuronide	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	67
	<i>Eucalyptus occidentalis</i>	67
Quercetin-3-rutinoside	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	67
	<i>Eucalyptus occidentalis</i>	67
	<i>Eucalyptus sideroxylon</i>	39
Quercetin-7-glucoside	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	67
	<i>Eucalyptus occidentalis</i>	67
Myricetin-3- glucuronide	<i>Eucalyptus occidentalis</i>	67
Quercetin-3-rhamnoside	<i>Eucalyptus sideroxylon</i>	39
	<i>Syzygium samarangense</i>	89
	<i>Myrtus communis</i>	65
Dihydrokaempferol-3-rhamnoside	<i>Eucalyptus sideroxylon</i>	39
Kaempferol-3-rhamnoside		
Kaempferol-3-rutinoside		
Quercetin-3-rhamnosylglucoside		
Kaempferol-3-rhamnosylglucoside		
Myricetin	<i>Eucalyptus rostrata</i>	73
	<i>Eugenia jambolona</i>	52
	<i>Myrtus communis</i>	65
Quercetin-4'-O-β-D- glucopyranoside	<i>Eucalyptus rostrata</i>	73
Quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside	<i>Eucalyptus rostrata</i>	73
	<i>Syzygium samarangense</i>	89
Quercetin-3-O-β- glucopyranoside	<i>Eucalyptus rostrata</i>	73
Myricetin-3-O-α-L-arabinopyranoside		
Quercetin-3-O -α-arabinopyranoside – 2"-gallate		
Kaempferol -3-O -α-arabinopyranoside – 2"-gallate		
Quercetin-4'-O-β-D- glucopyranoside -6"- gallate		
Quercetin-3-O-β-D-xylopyranoside	<i>Syzygium samarangense</i>	89
Guaijaverin	<i>Syzygium samarangense</i>	69
Mearnsitrin		
2'-C-methyl-5'-O-galloyl myricetin-3-O-a-L-rhamnopyranoside		
Kaempferol-3-O-(2"-O-galloyl)-glucuronide	<i>Melaleuca squarrosa</i>	98
Herbacetin-3-O-glucuronide	<i>Psidium guajava</i>	82
Morin		
Morin-3-O-lyxoside		
Morin-3-O-arabinoside		
Quercetin-3-O-arabinoside		
5,7,2',5'-tetrahydroxydihydroflavonol	<i>Plinia pinnata</i>	43
Myricetin-3-galactose	<i>Myrtus communis</i>	65
Myricetin-3-arabinose	<i>Eugenia kurzii</i>	78
3-C-methyl Apigenin 5-O-rhamnoside		
3-C-methyl luteolin 5-O-rhamnoside		

Tableau I-2 : liste des flavonoïdes isolés de certaines espèces des myrtacées (suite).

Flavonoïde	Espèce (Origine)	Réf.
7,4'-diméthyl-3-C-méthyl Apigénin	<i>Eugenia kurzii</i>	72
7,3',4'-triméthyl-3-C-méthyl luteolin		
5,7,4'-trihydroxy-3-méthyl flavone		
4'-méthoxy-5,7-dihydroxy-3-C-méthyl flavone		
3',4'-diméthoxy-5,7-dihydroxy-3-C-méthylflavone		
3-C-méthyl luteolin		
Sideroxylin	<i>Eucalyptus saligna</i>	88
	<i>Eucalyptus sideroxylon</i>	39
5,7-Diméthoxy-6-méthyl flavone	<i>Leptospermum scoparium</i>	28
5,7-Diméthoxy flavone		
5-hydroxy-7-méthoxy-6-méthyl flavone		
5-hydroxy-7-méthoxy-8-méthyl flavone	<i>Leptospermum polygalifolium</i>	45
Apigénin 6-C-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β - D-galactopyranoside]- 7- O- β -D-glucopyranoside	<i>Syzygium aromaticum</i>	53
Apigénin 6-C-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β - D-galactopyranoside]- 7- O- β -D-(6-O-coumaryl glucopyranoside)		
5,7-dihydroxy-8,4'-diméthoxy-6-méthyl flavone	<i>Metrosideros excelsa</i>	46
5-hydroxy-7-méthoxy-6,8-diméthyl flavone	<i>Leptospermum scoparium</i>	28
Delphinidin -3-glucose	<i>Myrtus communis</i>	65
Petunidin-3-glucose		
Malvidin-3-glucose		
Petunidin-3-arabinose		
Cyanidin-3-glucose		
Peonidin-3-glucose		
Delphinidin-3-arabinose		
Malvidin-3- arabinose		

CHAPITRE II

LES FLAVONOÏDES

INTRODUCTION:

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus" signifiant "jaune" [20], désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols [24].

Ce genre de composés étant considéré comme des pigments quasi-universels des végétaux constitue un groupe de produits jaunes (flavus) mais aussi d'autres couleurs et même incolores.

Jusqu'à ce jour, plus de 9000 structures flavoniques ont été isolées et identifiées [91]. Ces diverses structures se rencontrent aussi bien sous la forme de génines (aglycones libres) que sous forme de glycosides. Connus pour leurs rôles de protection des plantes, les flavonoïdes sont présents, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits [7].

La structure chimique des flavonoïdes est basée principalement sur un squelette de 15 atomes de carbone constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par une chaîne en C₃ [31] (Figure II-1).

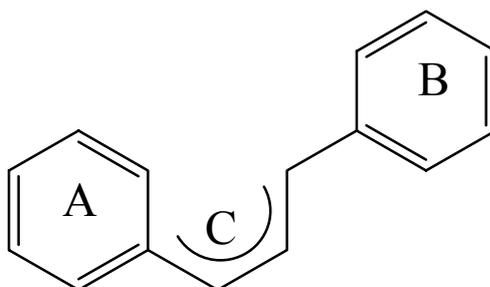


Figure II-1 : Squelette de base des flavonoïdes

II -1-STRUCTURE CHIMIQUE ET CLASSIFICATION:

Tous les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du noyau pyramique central, dont les plus importants sont [91] :

- Phényl-2-chromones : flavones, flavonols et flavanones.
- Phényl-2-chromanes (flavanes) : flavan-3-ols et flavan-3,4-diols.
- Flavyliums : anthocyanes.
- Chalcones : formes isomères ouvertes des flavanones.
- Aurones : homologues des flavones à hétérocycles pentagonales.
- Phényl-3 chromone : isoflavone.

La Figure II-2 suivante représente les structures des squelettes de base des flavonoïdes.

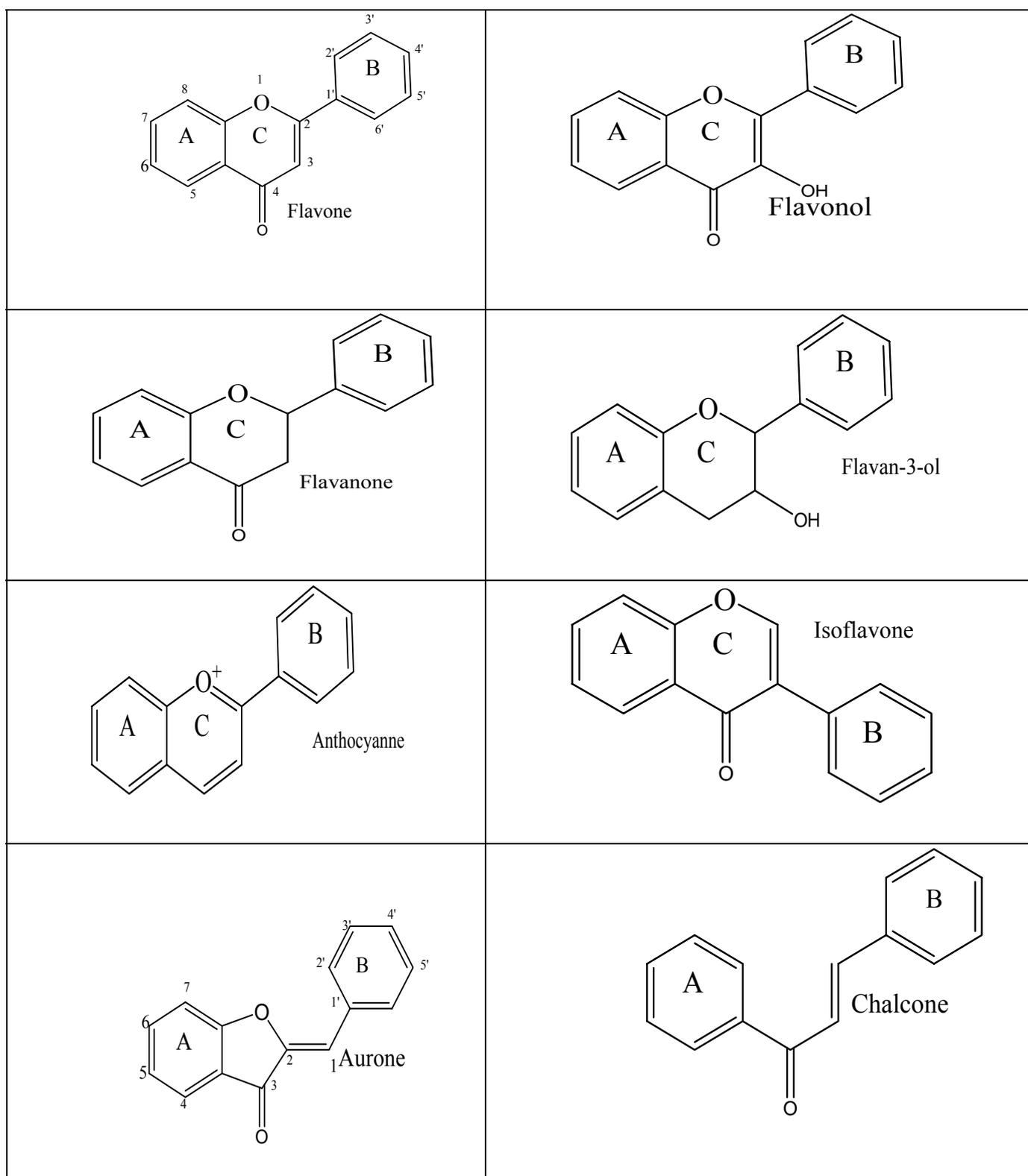


Figure II-2 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes.

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupement hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C-3 intermédiaire.

Les flavones et les flavonols représentent à eux seuls plus de 80% des flavonoïdes connus d'où la place de choix qu'ils occupent au sein de cette classe de produits du métabolisme secondaire.

Concernant toujours les flavones et les flavonols (côté structure), dans 90% des cas, le cycle A est substitué par des hydroxyles libres en position 5 et 7 (hydroxyles originels).

Quelques fois, les carbones C-5 et C-7 peuvent porter des substitutions de types O-Alkyl.

D'autre part, dans plus de 80% des cas, le cycle B est substitué en C-4' ou disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3',4',5'-trisubstitué.

Ces substituants du cycle B peuvent être des hydroxyles libres (flavonoïdes polyhydroxylés) ou des méthoxyles (flavonoïdes polyméthoxylés).

Les positions C-2' et C-6' ne sont qu'exceptionnellement substituées [9].

Les figures II- 3, II-4, II-5, II-6, II-7 représentent quelques structures de flavonoïdes.

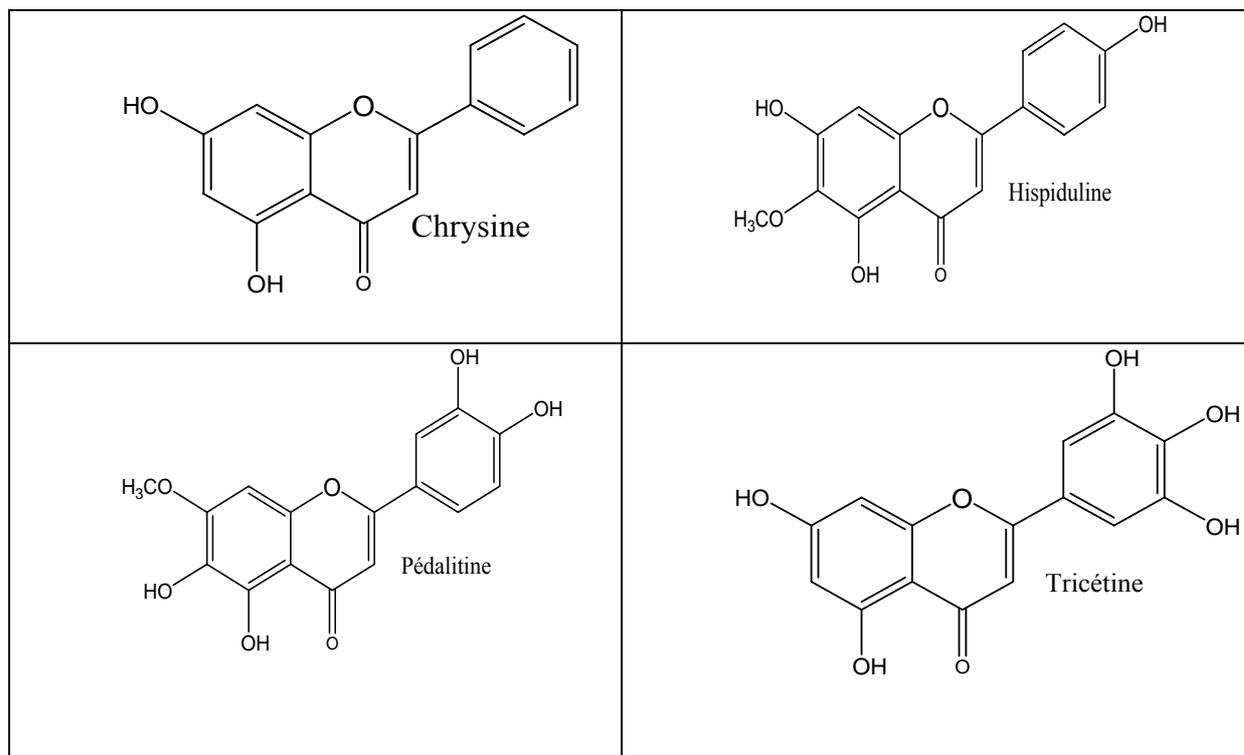


Figure II-3 : Structures de quelques flavones.

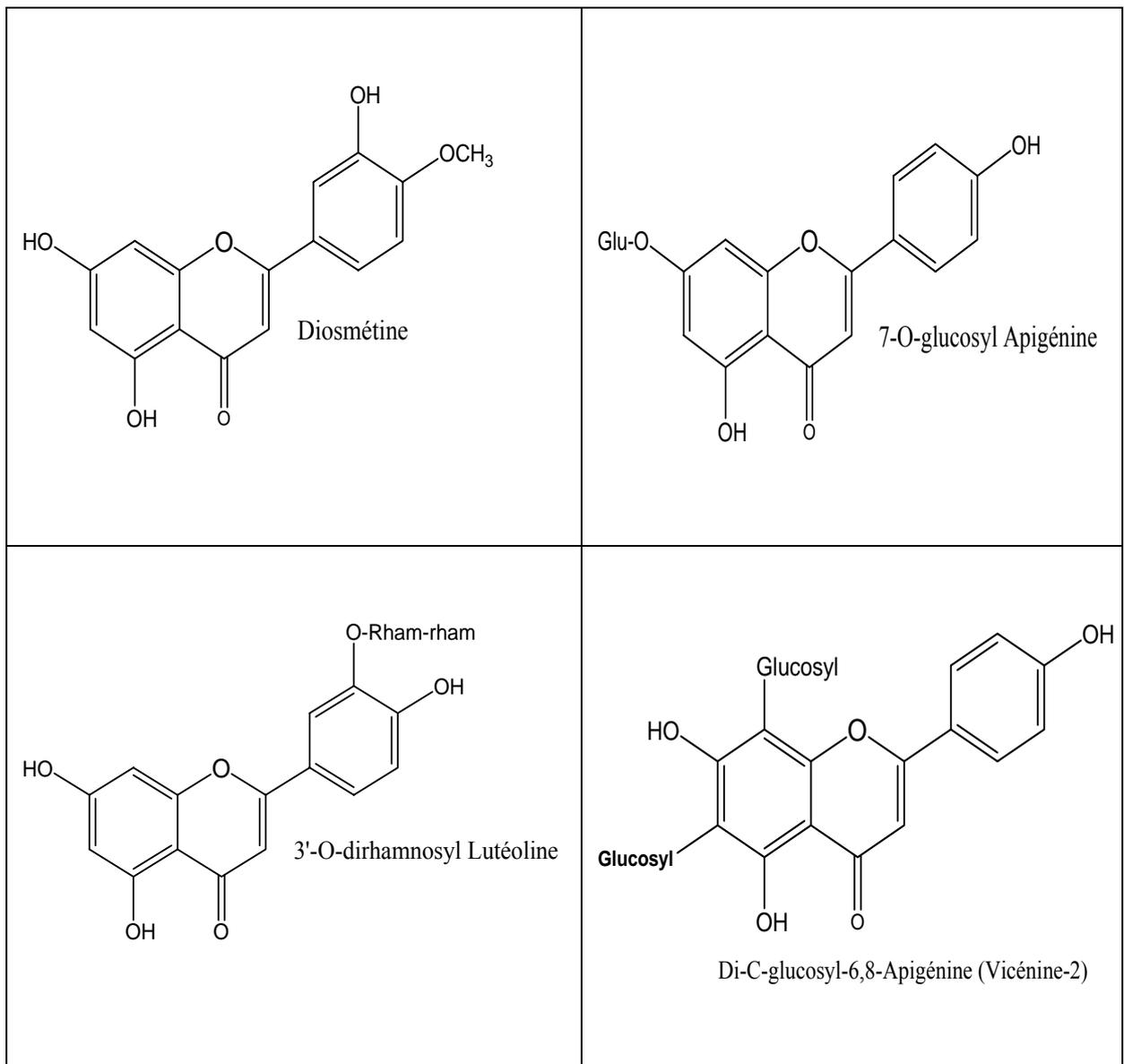


Figure II-4 : Structures de quelques flavones (aglycones et glycosides).

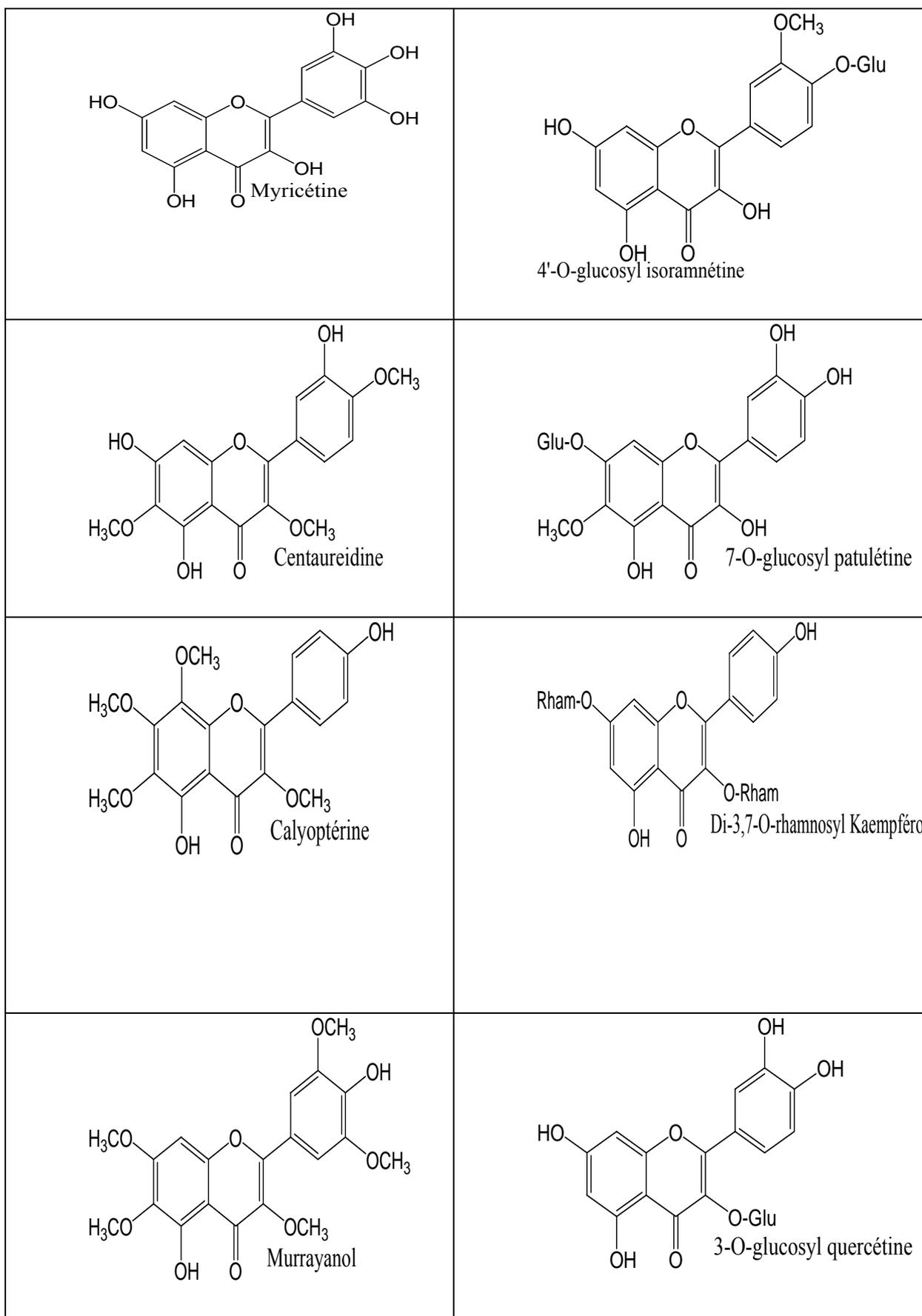


Figure II-5 : Structures de quelques flavonols (aglycones et glycosides).

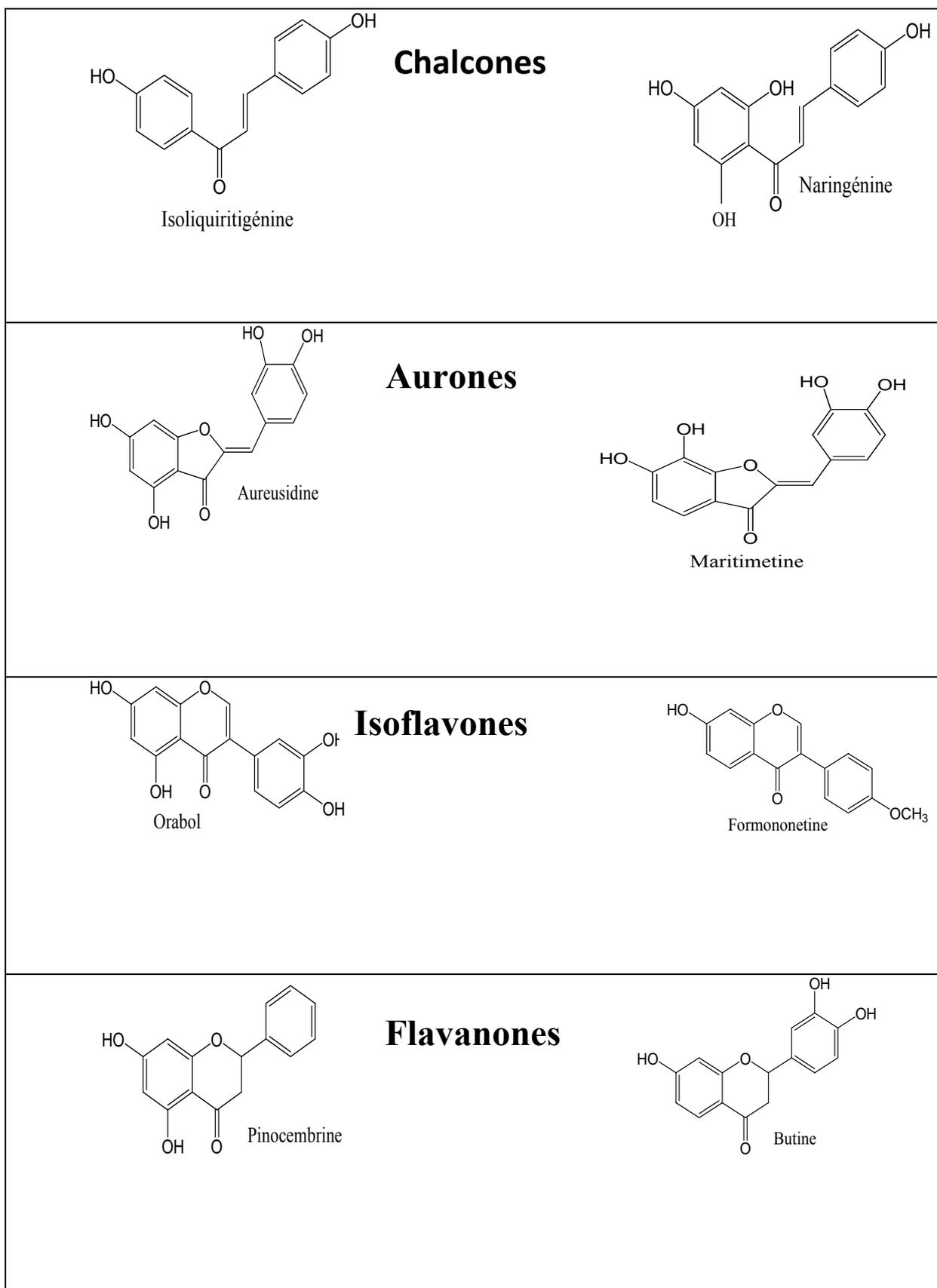


Figure II-6 : Exemples de structures d'autres classes de flavonoïdes.

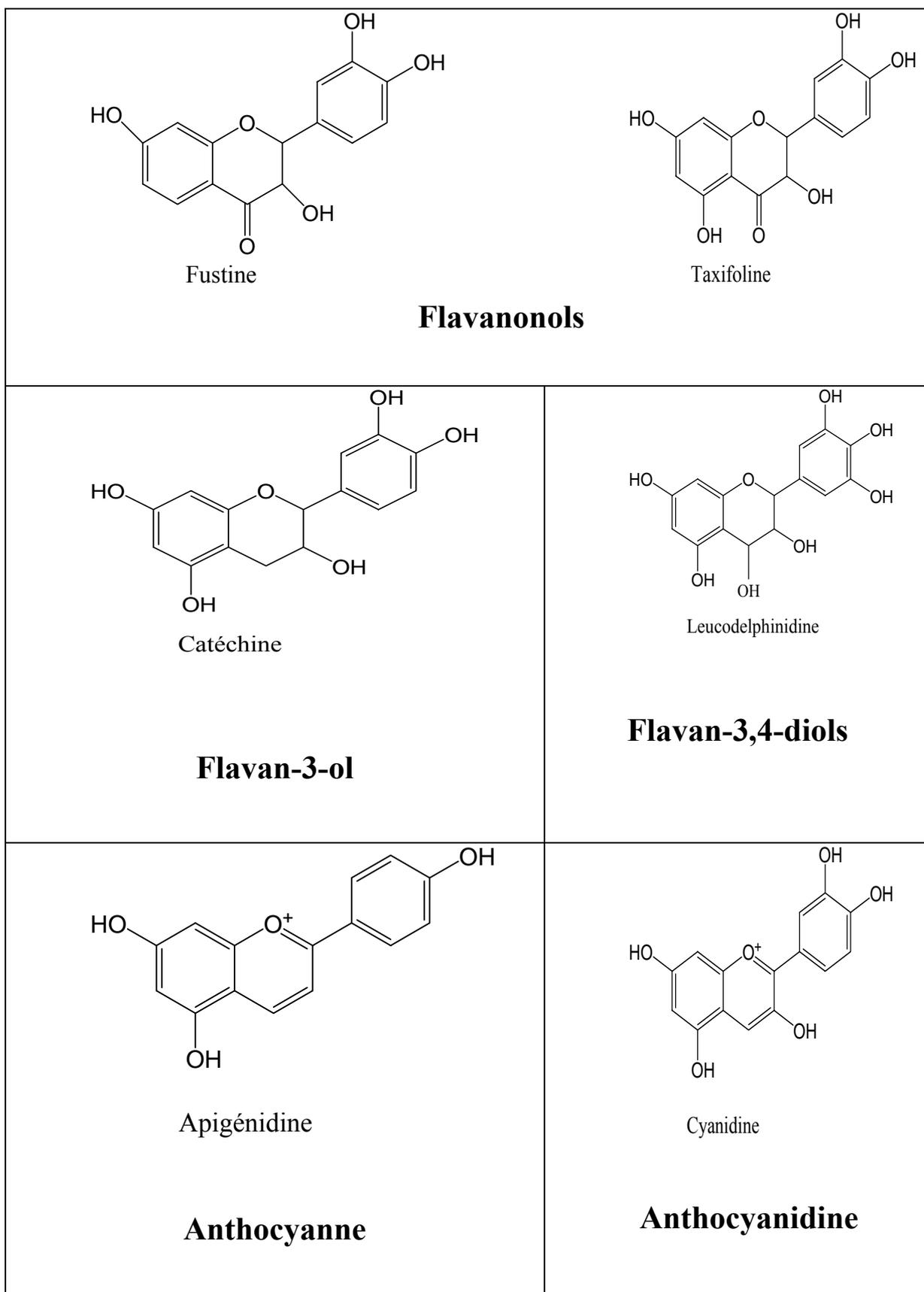


Figure II-7 : Exemples de structures d'autres classes de flavonoïdes.

II-2- BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES :

L'enzyme clé pour la formation du squelette flavonique est la chalcone synthase (CHS) qui catalyse l'étape de condensation de trois unités acétate à partir de malolnyl-CoA avec la 4-coumaroyl-CoA pour donner l'intermédiaire en C15, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone [85]. Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des différentes classes de flavonoïdes.

Dans les conditions physiologiques normales, cette chalcone tend à s'isomériser en flavanone sous l'action de la chalcone isomérase (CHI) qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle (addition syn. sur la double liaison E) conduisant à la seule (2S)-flavanone. Cette chalcone peut également se cycliser en aurone. Elle est le précurseur de toutes les classes de flavonoïdes comme le montre la Figure II-8.

Le tableau II-1 rassemble la liste des enzymes impliquées dans les différentes étapes de biosynthèse des flavonoïdes présentées dans la Figure II-8.

Tableau II-1: Liste des enzymes

Numéro	Abréviations	L'enzymes
1	CHS	Chalcone synthase
2	CHI	Chalcone isomerase
3	FNSI	Flavone synthase I
4	FNSII	Flavone synthase II
5	IFS	Isoflavone synthase
6	FNR	Flavanone 4-reductase
7	F3H	Flavanone 3-hydroxylase
8	ANS	Anthocyanine synthase
9	FLS	Flavonol synthase
10	DFR	Dihydroflavonol 4-reductase
11	F3GT	Flavonoid 3-O-glucosyl-transferase

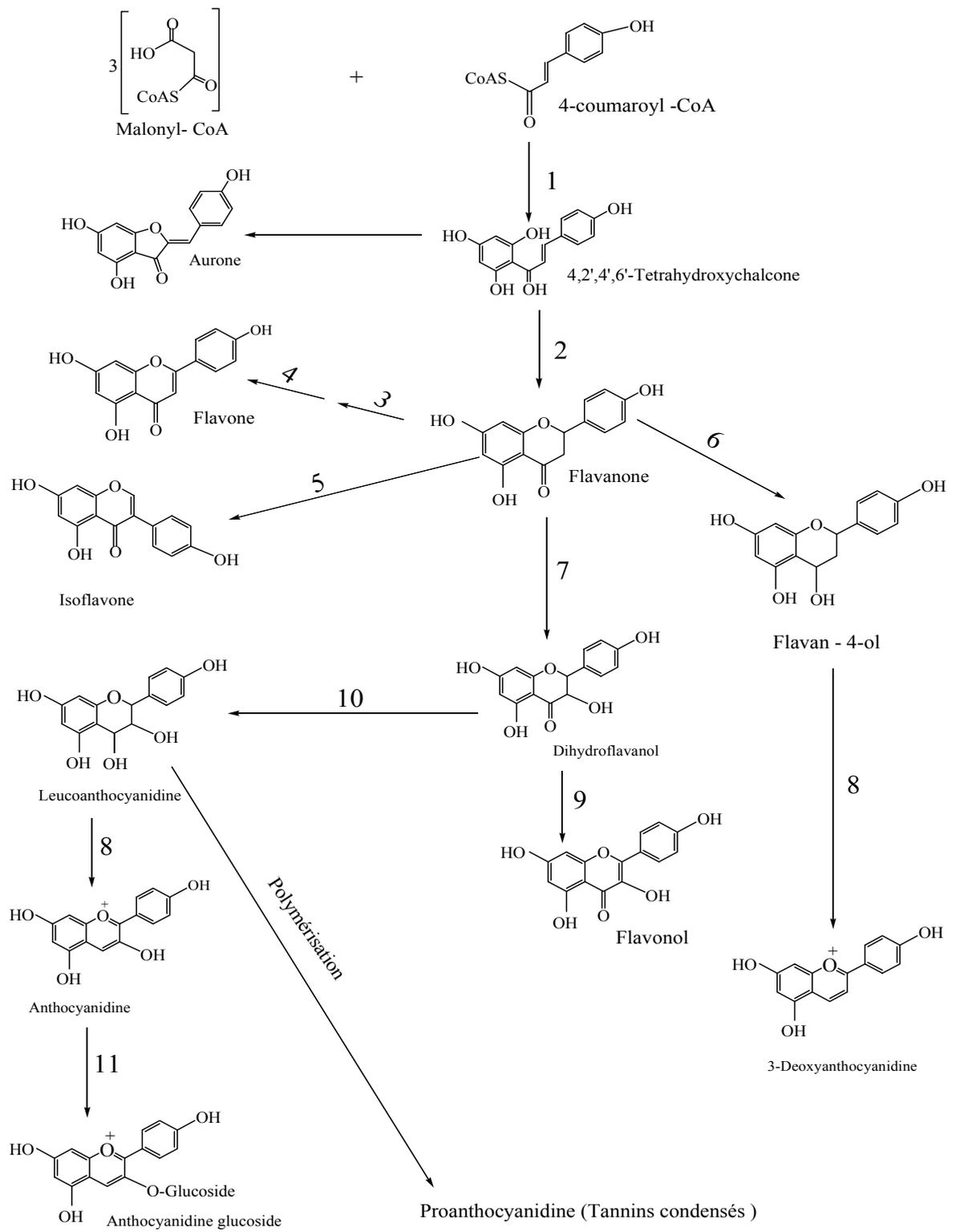


Figure II-8 : La biosynthèse des flavonoïdes

II-3- SUBSTITUTIONS DU SQUELETTE FLAVONIQUE :

Les substitutions du squelette flavonique sont très diversifiées, on y trouve notamment des hydroxylations, des méthoxylations et des glycosylations.

II-3-a-L'hydroxylation :

Dans toutes les classes des flavonoïdes, la biosynthèse justifie la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques : en position C-5, C-7 et C-4'. Ces hydroxyles sont appelés des hydroxyles originels (OH-7 et OH-5), ils sont introduits avant la formation du noyau chalcone [33].

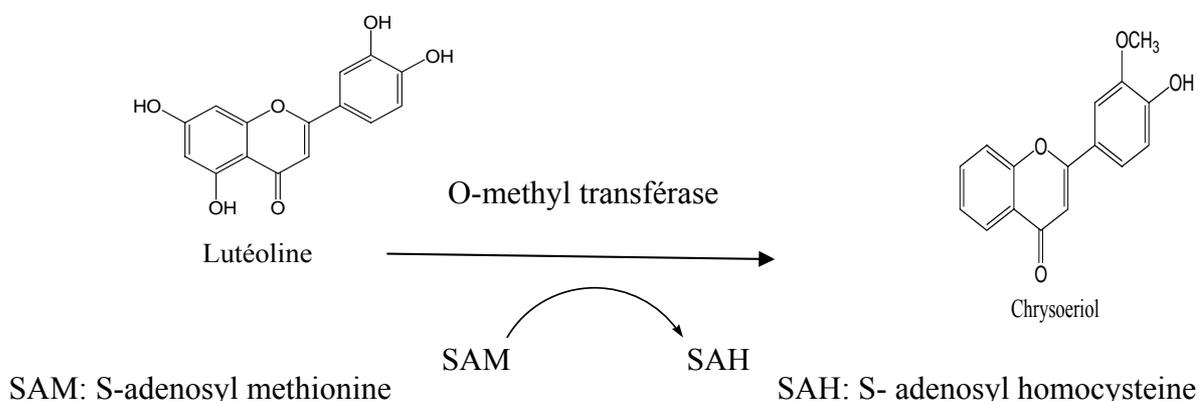
L'hydroxylation du noyau B dans la position 3'se fait après la fermeture de l'hétérocycle C c'est-à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3',4',5') se fait par le biais des enzymes (hydroxylases) [19,37].

Enfin, les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylés [42].

II-3-b- La méthoxylation :

La méthylation des groupes hydroxyles portés par le squelette flavonique se fait sous l'action de l'enzyme O-méthyl transférase en présence de S-Adenosyl-méthionine (SAM) comme donneur du groupement méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone [21,37].

Dans le cas de flavones et flavonols, cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7,8), noyau B (carbones 2',3',4',5') et l'hétérocycle C (carbone3) après la formation du noyau chalcone [37].



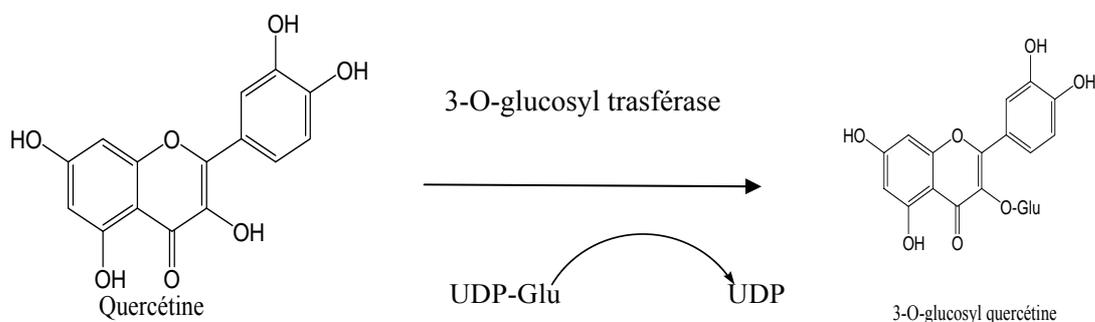
II-3-c- O-glycosylation :

La liaison aglycone-sucre s'effectue par le biais d'un hydroxyle phénolique et l'hydroxyle du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose) après perte d'une molécule d'eau créant ainsi un pont oxygéné entre les deux parties.

La O-glycosylation se fait en présence de l'enzyme O-glycosyl transférase et un donneur de sucre comme UDP-GLU (Uridine diphosphate glucose) [30].

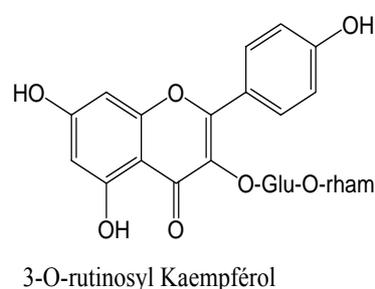
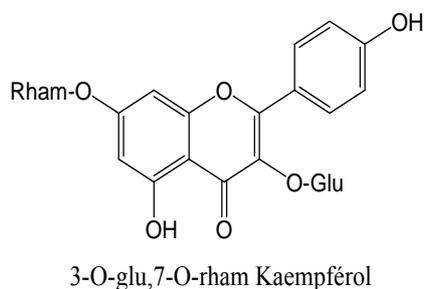
La partie osidique peut être mono, di ou tri-saccharidique.

La liaison entre la génine et l'ose peut se faire avec n'importe quel des hydroxyles phénoliques de la génine, mais en règle générale, ce sont surtout l'hydroxyle en 7 des flavones et l'hydroxyle en 3 des flavonols qui ont une plus grande labilité [9].



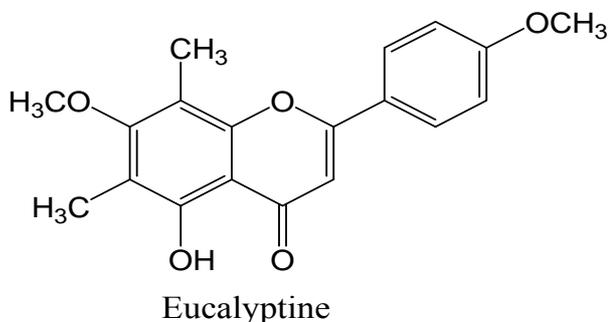
Dans le cas des composés polyglycosylés d'autres ponts oxygénés peuvent se faire soit par le biais d'autres OH phénoliques soit par le biais d'hydroxyles osidiques.

Comme dans le cas du 3-O-glu, 7-O-rham Kaempférol [1] et du 3-O-rutinosyl Kaempférol [10].



II-3-d- C-Méthylation :

La présence d'un groupement méthyle sur le squelette flavonique se fait par l'établissement d'une liaison carbone-carbone. Cette liaison est rencontrée en position C-6 et /ou C-8, parfois en d'autres positions C-3 et C-7 [7].



II-3-e- C-glycosylation :

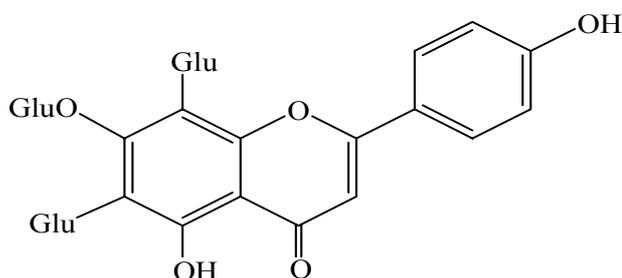
Le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide [17].

D'une manière générale, la liaison carbone-carbone est rencontrée souvent en position C-6 et / ou en C-8.

Il existe aussi des C-glycosyles flavonoïdes en position 7 ou en 4' [30].

Dans certains composés, les modes de glycosylation peuvent coexister, ce sont les O-glycosyles de C-glycosyl flavones [17].

La 7-O-glucoside de vicénine -2 illustre ce cas.



7-O-glycosyl Vicénine-2

II-4- Distribution et localisation :

II-4-a- Distribution :

Les flavonoïdes sont largement distribués dans le règne végétal. Quasiment absents chez les algues, ils apparaissent chez les bryophytes (majoritairement des O- et C-hétérosides de flavones et des dérivés O-Uroniques).

Les O-hétérosides de flavonols sont dominant chez les fougères.

Enfin, c'est chez les angiospermes que la diversité structurale des flavonoïdes est maximale [8].

II-4-b- Localisation :

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, hydrosolubles, s'accumulent dans les vacuoles et, selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle.

Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques.

Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyle [8].

II-5-PROPRIETES DES FLAVONOIDES :

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction.

On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes.

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance [55].

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités : antivirales, antiallergiques, anti-inflammatoires, anticancéreuses, anti-radicalaires, antibactériennes, anti-oxydantes [64], et on leur reconnaît également une activité anti-malaria [68].

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase [12].

La myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques [75,76].

II-5-a-Activité anti-oxydante des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des molécules capables de piéger de nombreuses espèces oxydatives comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ; le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) ou le radical peroxyde (ROO^{\cdot}).

Les données de la littérature montrent une mise en évidence de certaines relations entre la structure chimique du flavonoïde et l'activité anti-oxydante :

- La présence du groupe hydroxyle 3-OH lié à la double liaison C-2=C-3, et son emplacement adjacent au groupement carbonyle de l'hétérocycle (C) en position C-4 est exigé pour la grande efficacité de l'activité anti-oxydante [29]. Cette activité atteint son maximum quand le noyau B est substitué par un système orthodihydroxyle [84] (Figure II-9).
- La O-méthylation des substituants hydroxyles du squelette flavonique réduit l'activité antioxydante des flavonoïdes [11,97].
- Les groupements hydroxyles en position 3, 5, 7, 3', 4' participent dans l'inhibition de la peroxydation lipidique [16].
- La capacité antioxydante des flavonoïdes revient à leur aptitude à former des chélates métal-ion, par l'ensemble (3-hydroxy, 4-oxo), (5-hydroxy, 4-oxo) ou orthodihydroxy sur le cycle B (3',4'-OH) (Figure II-10) [94].

- Les groupes hydroxyles 5-OH, 7-OH, et la double liaison C-2=C-3 qui sont des sites potentiels de réactivité, sont essentiels pour l'activité inhibitrice des flavonoïdes de l'enzyme Xanthine oxydase et du radical peroxyde produit par ce dernier [18].

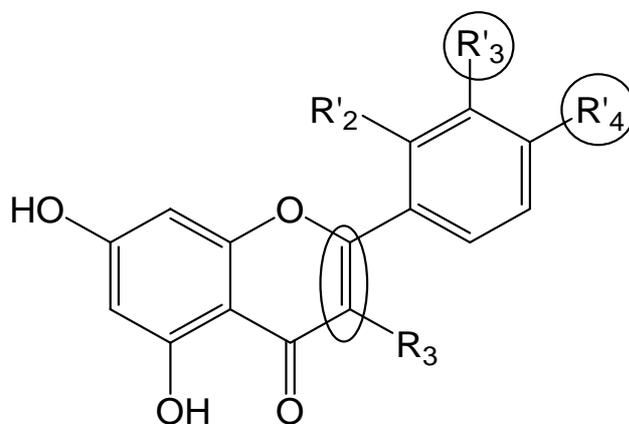


Figure II-9 : Éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes

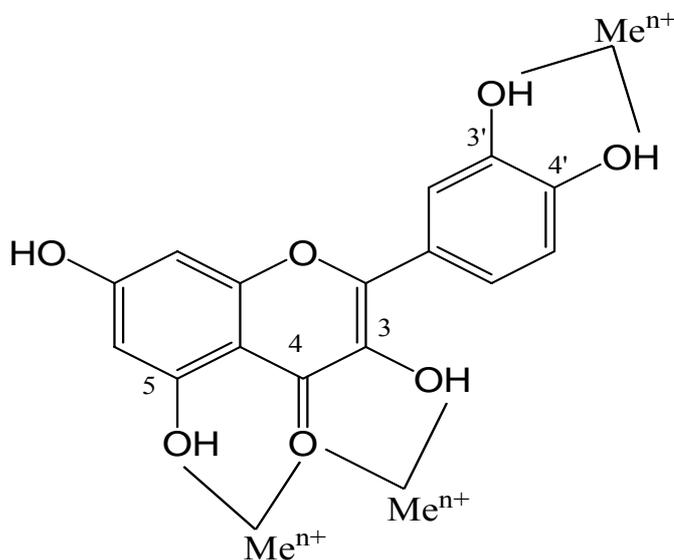


Figure II-10: Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Meⁿ⁺).

II-6- ETUDE CHIMIQUE DES FLAVONOÏDES :

Une étude phytochimique d'une plante (du moins dans le sens qui nous intéresse) passe impérativement par les étapes suivantes :

- Extractions : obtention de différents extraits.
- Séparations chromatographiques et purifications : obtention de produits purs et propres.
- Méthodes d'analyses structurales : identifications structurales des produits isolés.

II-6-1-Les extractions :

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes [9, 83]. L'une de ces méthodes est adoptée par notre laboratoire où les étapes essentielles sont :

- La macération : une opération qui consiste à laisser le matériel végétal en contact prolongé avec un solvant approprié (mélange MeOH/H₂O : 8/2) pour extraire les produits recherchés, c'est une extraction qui se fait à température ambiante.
- Extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité différente avec en premier lieu de l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones hydroxylés, méthoxyles et monoglycosylés suivie par le n-butanol qui extrait les hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type C-glycosyle.
- Les épiphases (solutions organiques) ainsi obtenues seront évaporées au rotavapeur, ce qui permet l'obtention de différents extraits lesquels seront pesés avant d'éventuelles opérations de séparations chromatographiques.

II-6-2-Séparations Chromatographiques:

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation, au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée, des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. Ainsi, la séparation des composés flavonique est fondée essentiellement sur les différentes techniques chromatographiques à savoir :

II-6-2-a) Chromatographie sur colonne (C.C):

Alors que les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse et la séparation de très faibles quantités de produits, la chromatographie sur colonne peut être une méthode préparative ; elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes.

La chromatographie d'adsorption sur colonne est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le silicagel, le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants (éluant).

Pour les flavonoïdes et selon l'objectif fixé, on utilise une colonne de polyamide (toluène/méthanol ou méthanol/eau), une colonne de séphadex LH20 (MeOH/H₂O ou MeOH).....

II-6-2-b- Chromatographie sur papier (C.P):

La chromatographie sur papier est une méthode de séparation dont le principe repose surtout sur des phénomènes de partage. La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau ; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même, adsorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle.

Les systèmes de solvants les plus utilisés dans cette technique pour les flavonoïdes :

- solutions aqueuses de AcOH : de 15 à 70% : selon la nature des flavonoïdes.
- Mélange nBuOH – AcOH-H₂O : 4-1-5 (phase organique).

Cette méthode présente certains avantages dans le cas de la séparation des composés hétérosidiques de même qu'elle permet de débarrasser l'échantillon des acides phénols qui accompagnent souvent les flavonoïdes et sont difficilement détachables par d'autres méthodes.

II-6-2-c- Chromatographie sur couches minces (C.C.M):

La chromatographie sur couches minces (C.C.M) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui

progresses le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant ; elle est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification en utilisant diverses phases stationnaires et des systèmes de solvants appropriés. Ainsi, pour les flavonoïdes : plaques de polyamide DC6 on utilise les systèmes [(Tol/MEC/MeOH : 4/3/3) ; (H₂O/MEC/MeOH/AcAc : 13/3/3/1)] ou plaques de cellulose microcristalline (souvent des solutions en acide acétique).

La purification ultime des produits isolés se fait généralement sur des petites colonnes :

- de séphadex LH20 en utilisant le méthanol comme éluant (aglycones).
- de polyamide en utilisant le mélange : toluène/ méthanol avec comme solvant de base le toluène (hétérosides ou flavonoïdes plutôt polaires).

II-7- ANALYSE STRUCTURALE DES FLAVONOÏDES :

II-7-1-Généralités :

L'identification structurale des flavonoïdes est basée tout comme celle des composés organiques en général sur ce que peut donner la spectroscopie ; à savoir :

- Spectrophotométrie UV-Visible avec les réactifs spécifiques qui reste la méthode de choix pour cette catégorie de produits [32,51].
- Spectrométrie de masse (SM) avec différents modes d'ionisation : impact électronique (IE), ionisation chimique (IC) et bombardement atomique rapide (FAB).
- Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) avec ses différents modes (RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT, COSY, etc....).

Notons que l'utilisation de toutes ces méthodes en même temps n'est en aucun cas systématique.

La figure II-11 énumère les différentes étapes utilisées pour la détermination structurale des composés isolés.

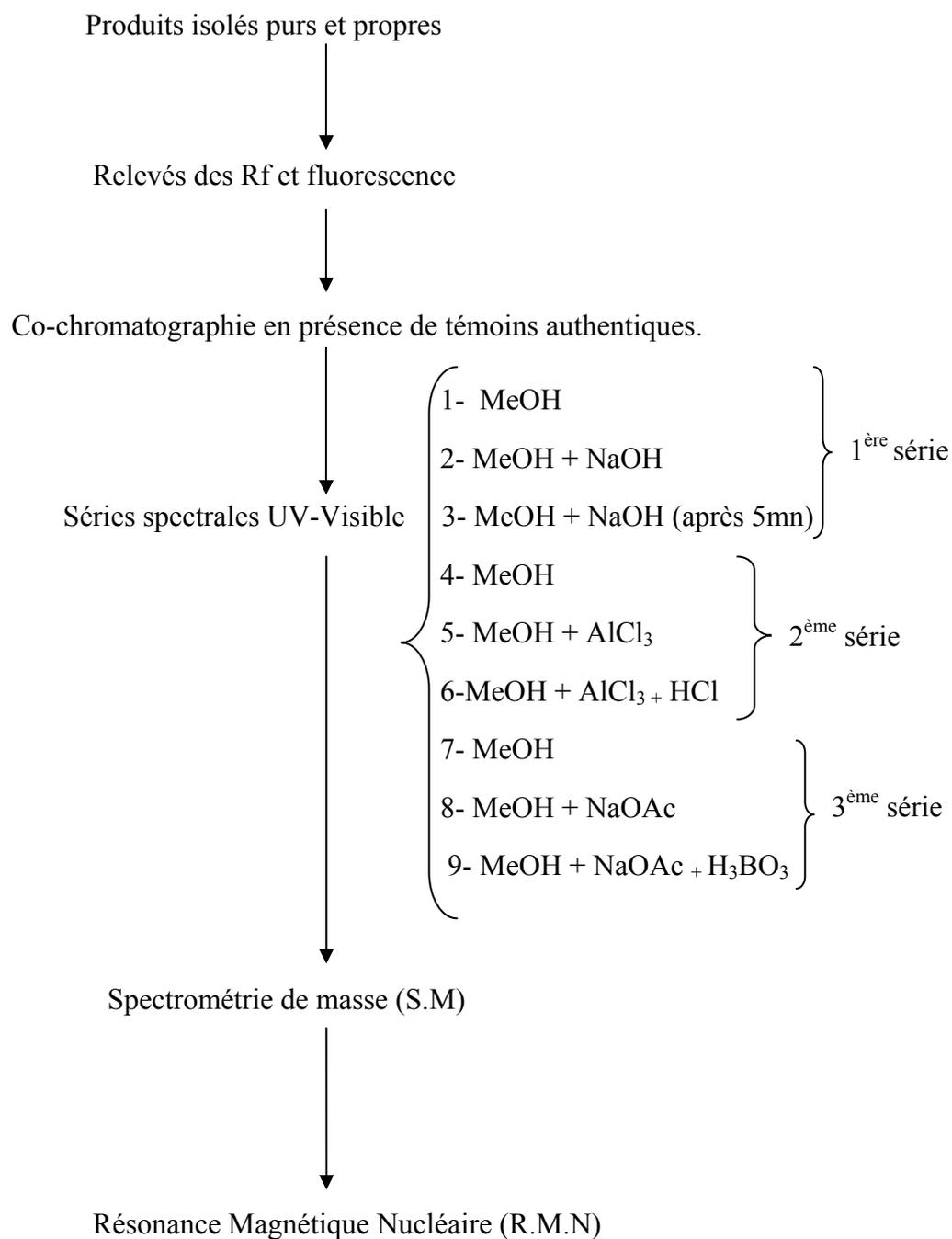
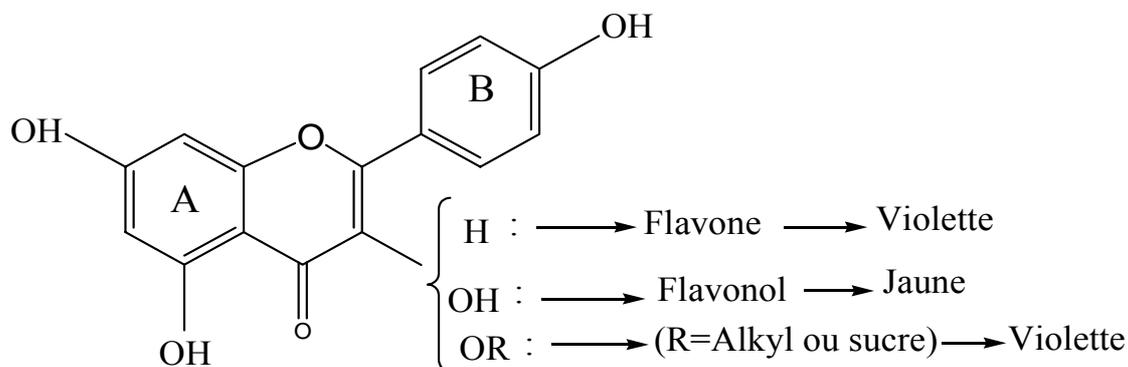


Figure II-11 : Les étapes suivies pour l'analyse des produits isolés.

II-7-2- Fluorescence sous lumière de Wood :

La fluorescence sous lumière de Wood (la longueur d'onde de 365nm) des flavonoïdes donne des renseignements très utiles sur leurs structures chimiques préliminaires. A titre d'exemple, la fluorescence permet de distinguer au moins une flavone d'un flavonol à condition que ça soit sous leur forme aglyconique.



Le tableau II-2 montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [51].

Tableau II-2 : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.

Fluorescence	Structures possibles
Violette noire	- Flavones avec 5, 6,7 ou 5,7, 8 tri-OH - Flavonol avec 3-OR. - Chalcones.
Bleue	-Flavone ou flavonol sans OH en 5. -Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. -Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

II-7-3- Effet du rapport frontal (Rf):

Le rapport frontal (Rf) est défini comme étant le rapport de la distance entre la tâche du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front du solvant d'autre part.

La valeur du Rf varie avec la nature de l'éluant utilisé (organique ou aqueux), le type du support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la nature du produit lui-même (aglycone ou glycosyl), ainsi que de la disposition des différents substituants sur le squelette flavonique [5, 51,59].

Un simple regard sur le comportement chromatographique des flavonoïdes en fonction de leur structure, dans un solvant organique ou aqueux, a permis de dégager les premières indications (qui sont illustrées dans le tableau II-3); ce qui facilitera certainement la suite de l'opération identification structurale.

Tableau II-3 : Relation Rf -Structure flavonique

Structure flavonique	Rf
Augmentation des groupes hydroxyles	Rf diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux.
Méthylation des hydroxyles	Rf augmente dans les systèmes de solvants organiques.
Glycosylation	Rf diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux.

II-7-4 - spectrophotométrie UV-Visible :

C'est une technique très importante pour l'identification des structures flavonoïdiques et son utilisation en premier lieu reste déterminante. Elle permet la localisation des hydroxyles libres et leur position sur le squelette flavonique, par la formation de complexes avec les différents réactifs. Ceci se traduit sur le spectre UV-Visible via les effets électroniques par des déplacements bathochromiques, hypsochromiques et à moindre degré hyper et hypochromique des bandes d'absorption par rapport au spectre de référence pris dans le méthanol.

Ce dernier est caractérisé par deux bandes d'absorption principales : la bande I et la bande II [44] (Figure II-12).

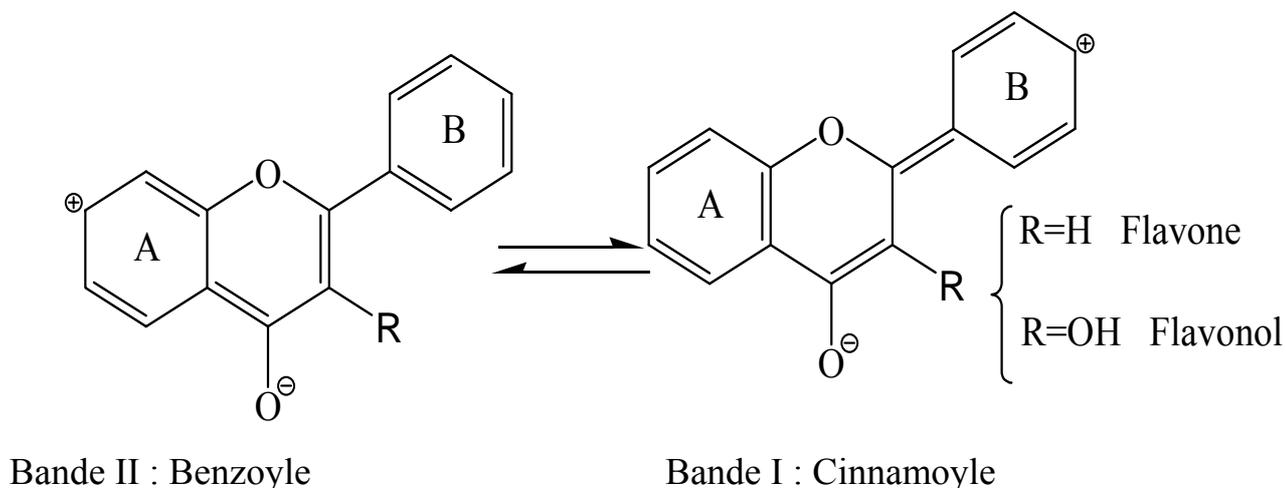


Figure II-12 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.

Bande I : présentant un maximum d'absorption entre 300 et 385 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2-C3) et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.

Bande II : présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm et même plus haut ($\approx 295\text{nm}$); elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [59].

L'interprétation des spectres dans le méthanol et / ou en présence de réactifs spécifiques s'appuie sur des règles très connues des flavonistes ; règles décrites par Jurd et al (1962) reprises par Mabry et al (1970) et complétées par Voirin (1983).

Le tableau II-4 donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes [59].

Tableau II-4: Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes [59]

Type de flavonoïdes	Bande I (nm)	Bande II (nm)
Flavones	310-350	250-280
Flavonols (3-OH substitué)	330-360	250-280
Flavonols (3-OH libre)	350-385	250-280
Isoflavones	310-330 Ep	245-275
Isoflavones (5-deoxy-6,7-dioxygénés)	Pic à 320	
Flavones et dihydroflavonols	300-330 Ep	275-295
Chalcones	340-390	230-270 Intensité faible
Aurones	380-430	230-270 Intensité faible
Anthocyanes et Anthocyanidines	465-560	270-280

Le maximum d'absorption de telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles, méthoxyles ou glycosyles sur le squelette flavonique.

L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacé le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosyles fait déplacer ce maximum vers des longueurs d'onde plus faibles [56].

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition de réactifs spécifiques (**NaOH**, **NaOAc**, **H₃BO₃**, **AlCl₃** et **HCl**). Ces derniers réagissant avec les groupements hydroxyles par formation de complexes ceci se traduit sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique aussi bien sur le cycle B que sur le cycle A.

La figure II-13 montre les actions des réactifs sur la molécule flavonique alors que la figure II-14 établit les différentes incidences sur les allures des spectres UV-Visible [99].

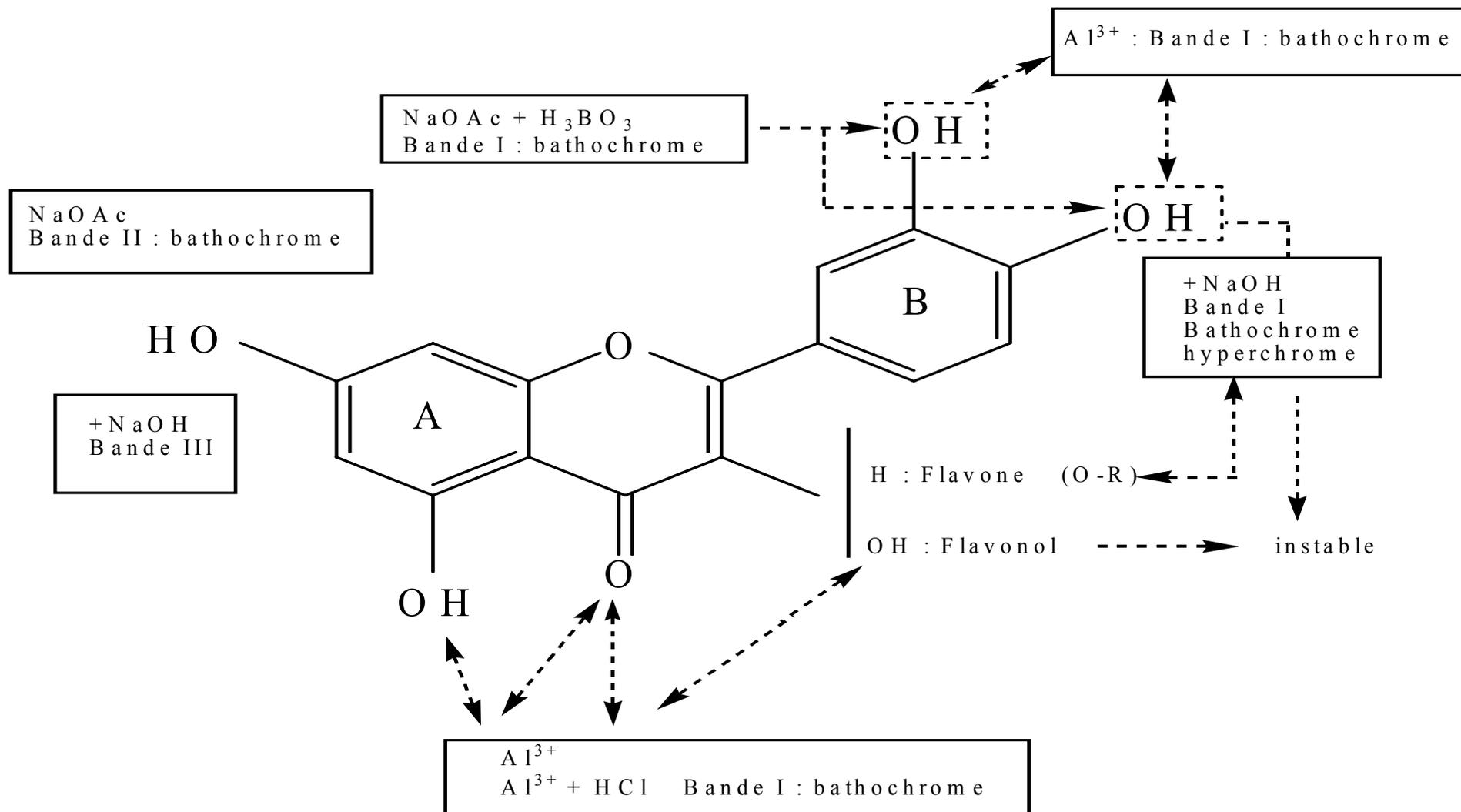


Fig. II-13 : Effets électroniques résultants

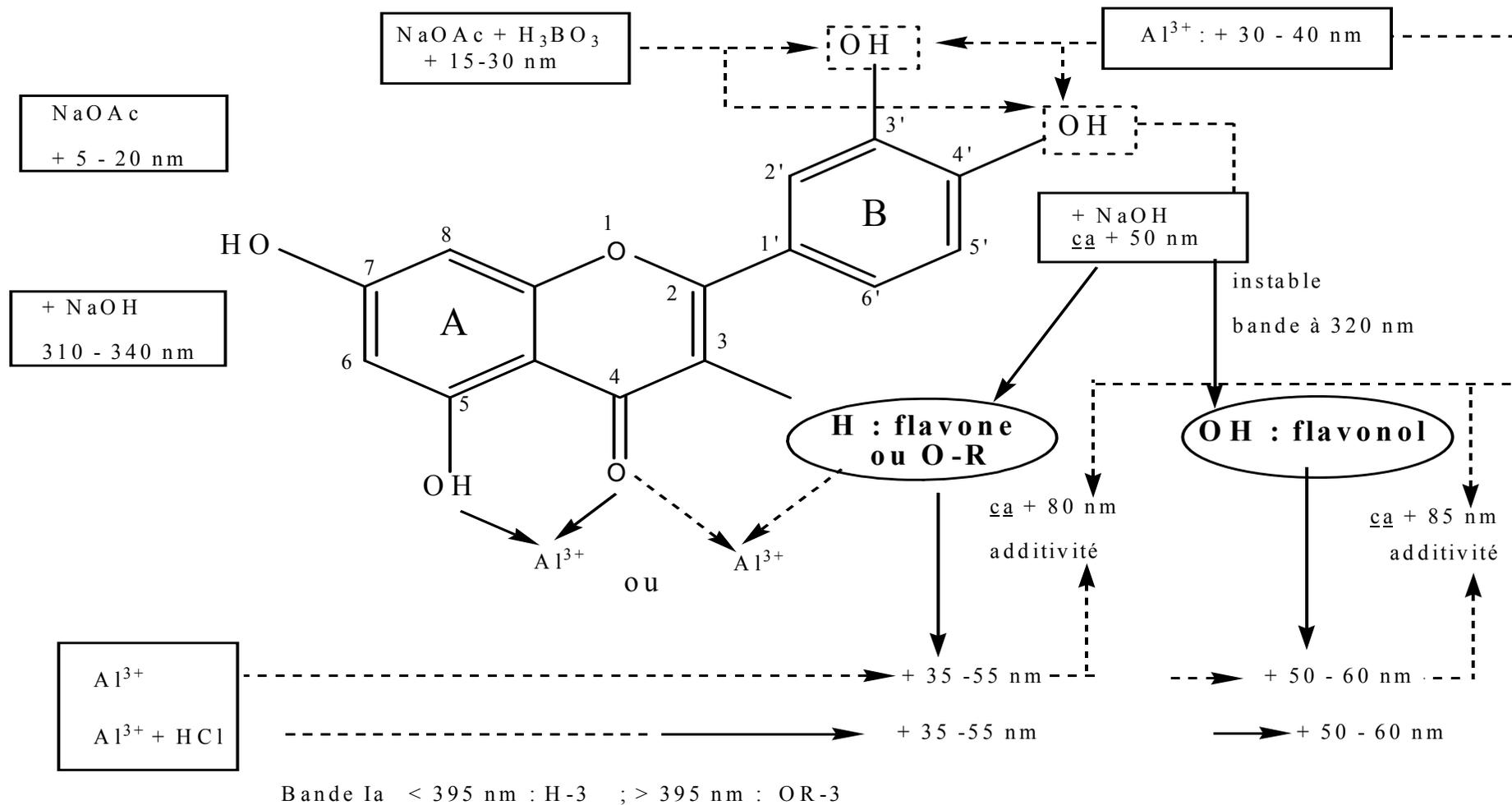


Fig. II-14 : Actions des réactifs spécifiques sur la molécule flavonique [99].

II-7-5 -Hydrolyse acide des hétérosides :

L'hydrolyse acide étant une opération très simple et elle est utilisée dans le cas des O-hétérosides.

Une fois la liaison osidique coupée, l'aglycone ainsi que le sucre détaché peuvent être analysés séparément.

L'identification du sucre se fait par Co-chromatographie avec des solutions authentiques ou par CPG.

Les hétérosides C-glycosylés résistent à l'hydrolyse acide, cette propriété permet de différencier ce type de liaison dans les flavonoïdes glycosylés.

Cas des substituants O-glycosides :

- L'extrait pur est chauffé en présence d'acide chlorhydrique (2N) dans un bain marie pendant 30 à 120 minutes selon le degré de substitution de l'aglycone.

- Après refroidissement, l'aglycone est récupéré par affrontement à l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle ou le n-butanol selon la nature de cette dernière.

- L'identification de l'aglycone se fait par analyse spectrophotométrique UV -Visible et par Co-chromatographie en présence des substances témoins.

- La phase aqueuse résiduelle est évaporée à sec et reprise par une goutte d'eau pour l'identification des sucres pour cela :

- Une CCM en présence des sucres témoins s'effectue sur une plaque de gel de silice imprégnée d'une solution de NaH_2PO_4 (0,2M), l'élution se fait dans le mélange acétone/eau (9 :1).

- La révélation des sucres se fait par pulvérisation d'une solution de malonate d'aniline dont la composition est la suivante :

-1g d'acide malonique.

-1cm³ d'aniline.

-3cm³ d'acide phosphorique.

-100cm³ d'éthanol.

- Après séchage (5 à 10 minutes) à 100⁰C les taches apparaissent brunes dans le visible et jaunes sous UV-Visible qu'on comparera (valeurs des Rf) avec celles des sucres témoins.

Le tableau II-5 suivant représente les valeurs de Rf de sucres témoins dans le système précédemment.

Tableau II-5 : Valeurs de Rf de sucres témoins.

Sucres	Rf
α -(L) Rhamnose	88
D (+) Xylose	79
L (+) Arabinose	66
β -D (+) Glucose	53
D (+) Galactose	33

II-7-6 -Spectrométrie de masse :

Cette technique est utilisée pour confirmer mais aussi pour finaliser (pas toujours) l'ébauche structurale obtenue grâce aux données des Rf et des données de l'UV-Visible.

Parmi les informations d'ordre structural qu'on peut y tirer, on citera :

- La détermination du pic moléculaire qui permet d'apprécier globalement le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles; cette détermination dans le cas complexes peut être effectuée à haute résolution permettant ainsi d'accéder avec une extrême précision à la formule brute de la molécule étudiée.

- La détermination des pics de fragmentation qui vont fournir des indications sur la répartition des substitutions entre les noyaux A et B [35].

- La détermination de la nature et le site d'attachement des sucres dans les "O" ou "C" glycosides [60].

Il existe différents modes d'ionisation en spectrométrie de masse et les plus utilisées en ce qui nous concerne sont :

II-7-6 -1- Ionisation par impact électronique (S.M.E.I):

C'est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée ; l'échantillon est volatilisé dans la chambre d'ionisation à une température $T= 100-300^{\circ}\text{C}$ où les molécules sont transformées en ions positifs par bombardement électronique ; seul les aglycones pourront être analysés en mode E.I [27].

Le cas des flavones et des flavonols a été étudié par Audier [2].

Les modes ou les schémas de fragmentation de la partie aglycone de ces composés sont illustrés respectivement par les deux figures 15 et 16.

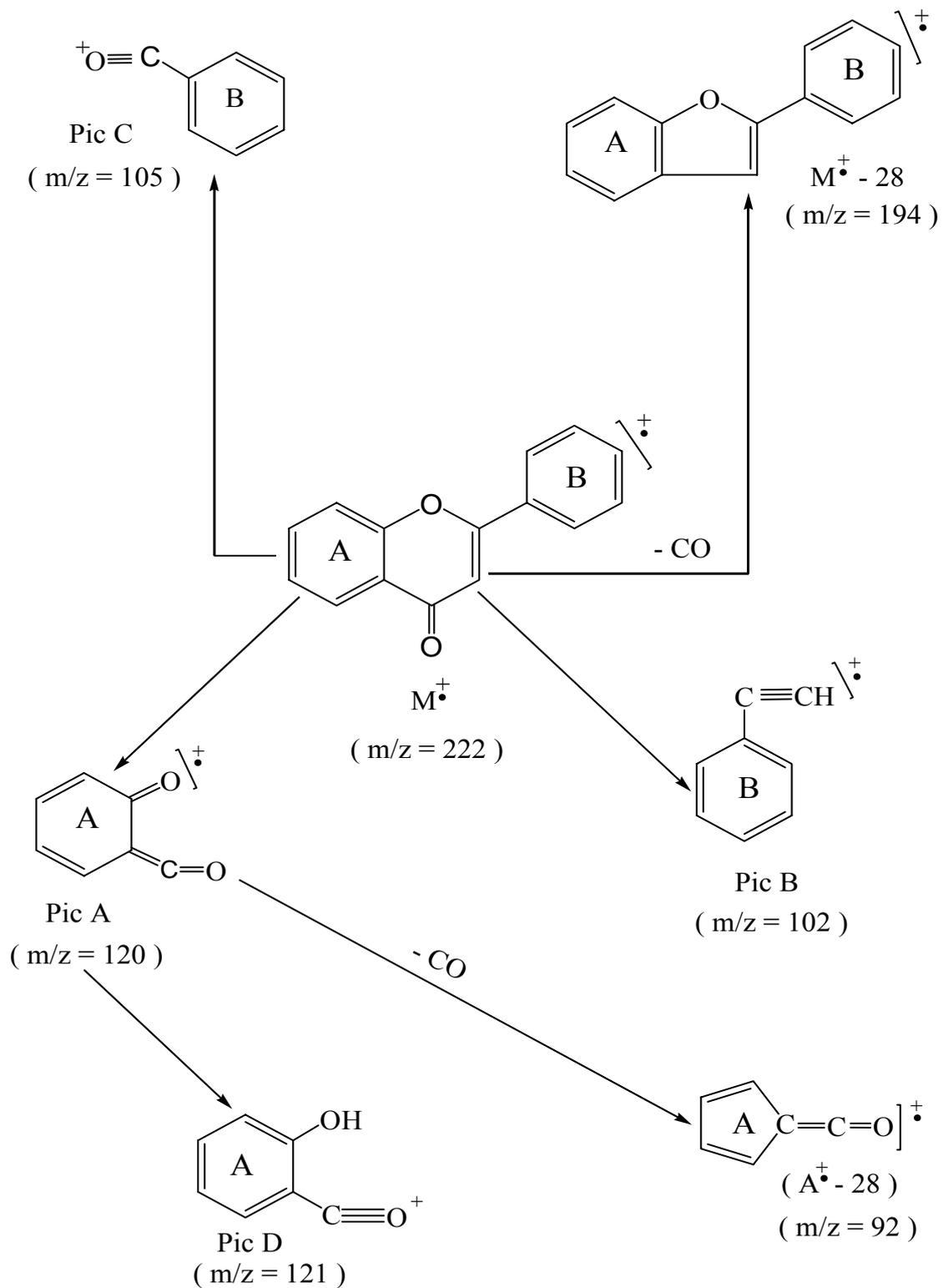


Fig. II-15 : Mode de fragmentation des flavones

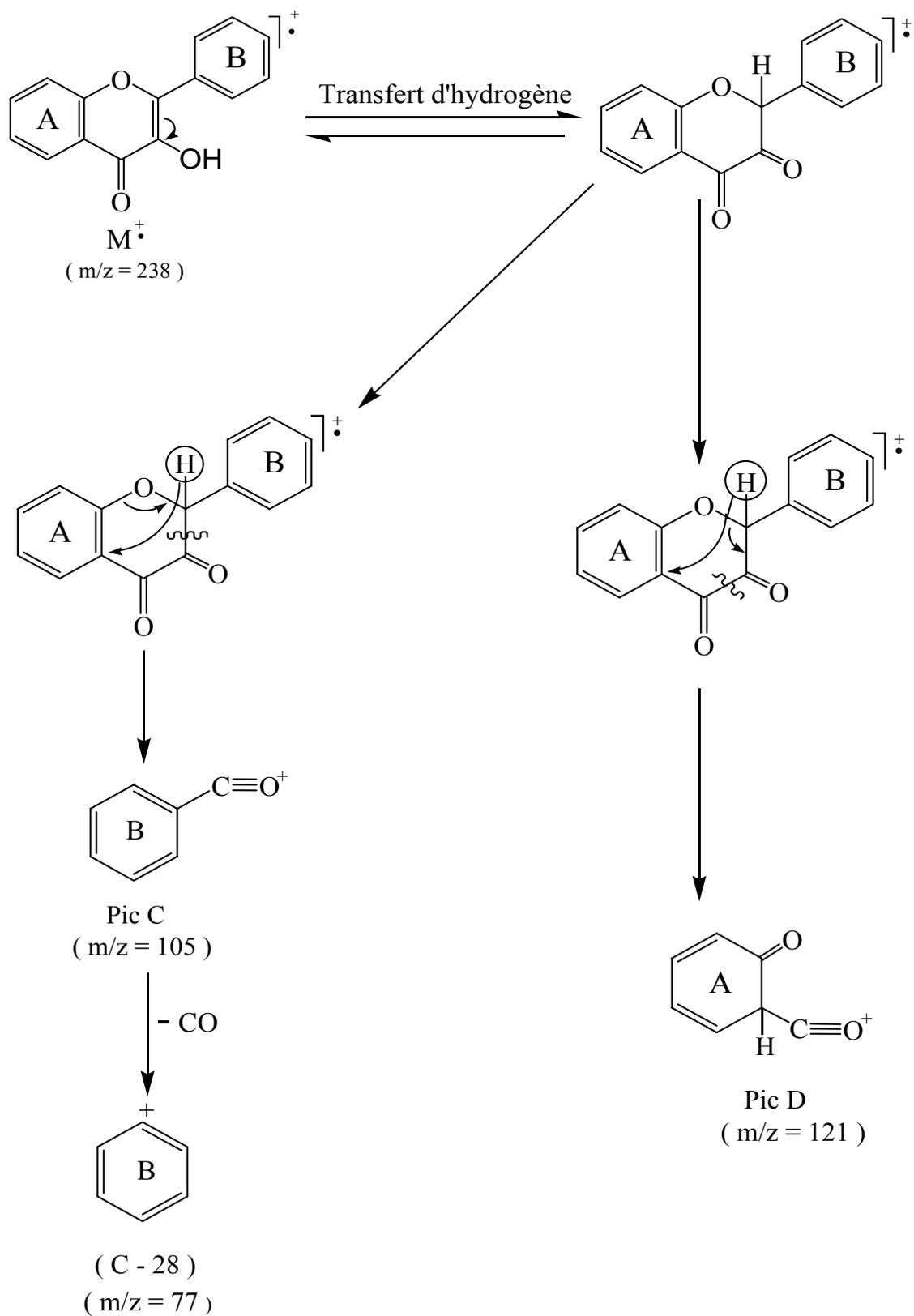


Fig. II-16 : Mode de fragmentation des flavonols.

II-7-6 -2- Spectrométrie de masse à bombardement atomique rapide FAB :

Plus récente, elle s'apprête à l'analyse des composés à poids moléculaire élevé et peu volatils [4] et dont le spectre de masse obtenu par source E.I ne contient pas le pic moléculaire.

Les caractéristiques de cette méthode sont les suivantes :

- La formation des ions a lieu à partir d'un échantillon à basse température (échantillon non chauffé).
- La présence des ions quasi moléculaires et quelques fois des fragments caractéristiques.
- La formation d'ions positifs et négatifs (F.A.B positive et F.A.B négative).
- La durée de vie importante de l'échantillon soumis à l'analyse, permettant ainsi de travailler un temps relativement long avec le même échantillon.
- L'application de cette méthode sur les flavonoïdes glycosylés, elle donne des informations utiles concernant la nature, la position et l'arrangement des sucres dans la molécule [4].

Dans cette technique, l'ion moléculaire n'est pas toujours observable. On observe généralement, l'ion correspondant au poids moléculaire plus un proton $[M+H]^+$ (en mode positif), d'autres ions peuvent se former lorsqu'il existe des impuretés de sels tel que chlorure de sodium (on obtient l'ion $[M+Na]^+$) ou de chlorure de potassium (on obtient l'ion $[M+K]^+$). Ces informations permettent de déduire le poids moléculaire du composé étudié.

II-7-6 -3- Ionisation à pression atmosphérique :

C'est une technique d'ionisation douce plus récente que le F.A.B; elle consiste à injecter la solution contenant le produit à analyser dans la source et la formation des ions a lieu lors de la volatilisation.

Deux techniques sont à distinguer :

a- L'ionisation par électrospray (E.S.I):

A pression atmosphérique, les gouttelettes de solutés sont formées à l'extrémité d'un fin capillaire de silice, métallisé en surface et porté à un potentiel élevé.

Le champ électrique intense leur confère une densité de charge importante. Sous l'effet de ce haut champ électrique, il y a formation d'un électrospray, c'est-à-dire d'une multitude de micro gouttelettes très chargées, par effet d'un gaz sec, elles s'évaporent progressivement en perdant des molécules de solvant par des mécanismes complexes de désolvatation et d'évaporation. Leur densité de charge devenant trop importante, elles explosent en libérant des microgouttelettes constituées de molécules protonées ou déprotonées de l'analyte, porteuses d'un nombre de charges variable.

b- Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI):

C'est une technique d'ionisation dans la phase gazeuse, basée sur le transfert d'espèces chargées d'un ion réactif à une molécule d'analyte [50,93]. Elle est utilisée comme méthode d'ionisation pour la spectrométrie de masse, préférentiellement couplée à une chromatographie en phase liquide (HPLC). Les échantillons liquides sont directement introduits dans un nébuliseur pneumatique.

Sous l'effet d'un jet d'air ou d'azote, le liquide est transformé en fin brouillard. Un chauffage assure la désolvatation des composés. Ces derniers sont ensuite ionisés chimiquement à pression atmosphérique: en général, la phase mobile vaporisée joue le rôle de gaz d'ionisation et les électrons sont obtenus à partir de décharges d'électrode couronne. L'ionisation des composés est très favorisée lors de ces techniques car la fréquence des collisions est élevée à pression atmosphérique.

L'avantage de ces techniques de masse est l'obtention d'ions multichargés et multiprotonés qui permettent la détermination de molécules très lourdes.

II-7-7-Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN):

La spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire trouve un grand emploi pour la détermination des structures flavoniques plutôt compliquées [35].

C'est une méthode précise et efficace, mais exige une grande quantité de produit; simplement, à l'inverse des autres techniques, elle est non destructive.

Il existe la RMN monodimensionnelle et la RMN bidimensionnelle :

II-7-7-a- RMN monodimensionnelle :

- **RMN du proton (RMN ¹H) :**

Elle informe sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm; elle permet de connaître [80,61] :

- La position et le nombre de divers protons porté par le flavonoïde.
- Le nombre de substituants méthoxyles porté par le squelette flavonique.
- Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

1- Protons du noyau A :

Selon les substitutions possibles, les résonances et les multiplicités des protons H-5, H-6 et H-8 sont résumées dans le tableau II-6.

Nature de flavonoïdes	H-5	H-6	H-8
5,7-OH	—	6,0-6,2ppm d (J=2,5Hz)	6,3-6,5ppm d (J=2,5Hz)
5-OH, 7-OR (R= Sucre)	—	6,2-6,4ppm d (J=2,5Hz)	6,5-6,9ppm d (J=2,5Hz)
5, 6,7-OR (R=H, Sucre)	—	—	6,3ppm (S)
5, 7,8-OR (R=H, Sucre)	—	6,3ppm (S)	—
7-OR (R=H, Sucre)	8,0ppm d (J=9,0Hz)	6,7-7,1ppm dd (J=9Hz et 2,5Hz)	6,7-7,0ppm d (J=2,5Hz)

Tableau II-6: déplacements chimiques et multiplicités des protons du noyau A.

Le déplacement chimique est basé sur les substituants dans le noyau B et le degré d'oxydation du noyau C.

Le tableau II-7 représente quelques déplacements chimiques des protons du noyau B.

Tableau II-7 : Déplacements chimiques des protons du noyau B

Flavonoïdes	H-2', H-6'		H-3', H-5'	
Flavones (4'-OH)	7,7-7,9 ppm d (J=8,5Hz)		6,5-7,1 ppm d (J=8,5Hz)	
Flavonols (4'-OH)	7,9 -8,1 ppm d (J=8,5Hz)		6,5 – 7,1 ppm d (J=8,5Hz)	
3',4'-di-OH	7,2 –7,3 ppm d (J=2,5Hz)	7,3-7,9ppm dd (2,5-8,5Hz)	—	6,7-7,1ppm d (J=8,5Hz)
3',4',5'-tri-OH	6,5-7,5ppm (S)		—	

2- Protons de l'hétérocycle :

Dans le cas des flavones, le proton H-3 apparaît sous forme d'un singulet à 6,3 ppm qui très souvent chevauche avec le signal du proton H-6.

3- Protons des méthoxyles :

L'introduction d'un ou plusieurs méthoxyles sur la molécule donne lieu à l'apparition d'un ou plusieurs singulets de 3,8 à 4,5 ppm [57].

La mesure du spectre RMN des produits méthoxylés dans deux solvants différents est très utilisée pour la détermination de la position du ou des groupements méthoxyles sur le noyau des flavonoïdes et ceci par l'observation du déplacement du signal correspondant au(x) méthoxyle(s) dans les deux solvants [57].

4- Protons osidiques :

Les protons correspondants à la partie osidique résonnent à des champs forts par rapport à ceux de la génine (3,5 – 4 ppm). Le proton anomérique (H-1'') résonne à champ faible par rapport aux autres protons à la partie osidique (4,2 à 6 ppm).

L'intégration du signal qui est proportionnelle au nombre de protons qu'elle représente permet de déterminer le nombre de sucres, alors que la constante de couplage du proton anomérique permet de déterminer l'anomère α ou β connaissant la nature du sucre.

Le déplacement chimique du proton anomérique (H-1'') est basé sur :

- La nature du flavonoïde et du sucre.
- La position et le type de liaison entre le sucre et l'aglycone.

Les deux tableaux suivants illustrent les déplacements chimiques de quelques protons anomériques dans DMSO-d₆, le premier pour les monoglycosyles alors que le second concerne les diosides [58].

Sucre	H-1" (ppm)
3-O-β-D-glucoside	2,25-5,56
3-O-β-D-galactoside	5,6
3-O-β-D-glucuronide	5,48
3-O-β-D-xyloside	5,37
3-O-β-D-Alloside	5,67-5,68
3-O-α-L-Glucoside	5,63
3-O-α-L-Rhamnoside	5,31
5-O-β-D- Glucoside	4 ,56-4,79
7-O-β-D- Glucoside	4,95
7-O-β-D- glucuronide	5,10-5,30
7-O-α-L- Rhamnoside	5,22-5,75
7-O-β-D- xycoside	4,98
8-O-β-D- Glucoside	4,65
8-O-β-D- glucuronide	4,82
2'-O-β-D- glucuronide	5,00-5,11
3'-O-β-D- Glucoside	4,92-5,00
3'-O-α-L- Rhamnoside	5,37-5,43
4'-O-β-D- Glucoside	4,80-5,04
4'-O-β-D-galactoside	5,00
3',5'-O-di-O-β-D- Glucoside	5,24
6-C-β-D- Glucoside	4,58-4,90
6-C-β-D- Rhamnoside	4,85-5,26
6-C-α-D-Arabinoside	4,67
8-C-β-D- Glucoside	4,64-4,88
6,8-di-C-β-D- Glucoside	4,84
8-C-β-D- Rhamnoside	4,64-4,88
8-C-α-L-Arabinoside	4,75-4,89

Tableau II-8 : Déplacements chimiques des protons anomériques dans DMSO-d₆ des monoglycosyles.

1 ^{er} sucre	H-1''(ppm)	Second sucre	H-1''(ppm)
3-O-β-D-glucoside	5,72-5,75	2-O-β-D-Glucosyl	4,63-4,65
	5,28-5,45	6-O-β-D-Glucosyl	3,96-4,02
	5,40-5,66	2-O-α-L-Rhamnosyl	4,90-5,10
	5,28	2-O-α-L-Rhamnosyl	4,37-4,39
3-O-α-L-rhamnoside	5,56	2-O-β-D-Glucosyl	4,10-4,23
	5,21-5,50	3-O-β-D-Glucosyl	4,32-4,48
	5,33-5,44	3-O-β-D-Galactosyl	4,25
	5,31	3-O-α-L-Rhamnosyl	4,81
7-O-β-D- glucoside	4,90-5,25	2-O-β-D-Glucosyl	4,23-4,68
	5,05-5,05	2-O-α-L-Rhamnosyl	5,56

Tableau II-9 : Déplacements chimiques des protons anomériques dans DMSO-d₆ des diosides.

- Quand les protons (H-1'') et (H-2'') du sucre sont diaxiaux, la liaison devient β avec une constante de couplage de 7 – 8 Hz.

- Quand les protons (H-1'') et (H-2'') sont axial- équatorial, le sucre forme une liaison α avec l'aglycone avec une constante de couplage de 3 à 4 Hz [58]

- **RMN carbone -13:**

Donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telles que [61-34] :

- Le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement.

- La connaissance de type des liaisons –C et / ou –O- sucres.

Le tableau II-10 : énumère les valeurs des déplacements chimiques (en ppm) de spectres RMN carbone¹³ de quelques flavonoïdes [59].

flavonols						Flavones					
Myricétine[3-O-galactose]	Patuletine	Quercétine	Kamphérol	Tricétine	Lutéoline	Apigénine	Flavonoïde				
156.2	147.1	146.9	146.8	164.2	164.5	136.8	C-2				
133.9	135.5	135.5	135.6	103.2	103.3	102.8	C-3				
177.4	174.1	175.8	175.9	181.6	182.2	181.8	C-4				
161.2	151.8	160.7	160.7	161.6	162.1	161.9	C-5				
98.6	130.9	98.2	98.2	99.0	99.2	98.8	C-6				
164.0	157.2	163.9	163.9	164.2	164.7	164.1	C-7				
93.3	93.7	93.5	93.5	93.9	94.2	94.0	C-8				
156.2	151.4	156.2	156.2	157.5	157.9	157.3	C-9				
104.0	103.5	103.1	103.1	104.0	104.2	103.7	C-10				
120.2	122.1	122.1	121.7	120.9	122.1	121.3	C-1'				
108.8	115.2	115.3	129.5	106.0	113.8	128.4	C-2'				
145.3	145.1	145.0	115.4	146.5	146.2	116.0	C-3'				
136.6	147.8	147.6	159.2	137.9	150.1	161.5	C-4'				
145.3	115.7	115.6	115.4	146.5	116.4	116.0	C-5'				
108.8	120.1	120.0	129.5	106.0	119.3	128.4	C-6'				
	60.3						O-CH ₃				

Tableau II-10 : les déplacements chimiques (en ppm) des carbones de quelques flavonoïdes.

- **DEPT 135 et J mod** : cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule.

Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH₃), secondaires (CH₂), tertiaires (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires.

La différence majeure entre le DEPT 135 et le J mod, réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le J mode alors qu'ils ne le sont avec le DEPT.

II-7-7-b- RMN bidimensionnelles (RMN – 2D) :

Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage [26].

1- Corrélations homonucléaires :

- **COSY** ($^1\text{H} - ^1\text{H}$): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires ^2J et ^3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.

- **NOESY** ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

2- Corrélations hétéronucléaires :

- **HSQC** ($^1\text{J}_{\text{H-C}}$) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons auxquels ils sont liés. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

- **HMBC** ($^2\text{J}_{\text{H-C}}$, $^3\text{J}_{\text{H-C}}$) : cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance $^2\text{J}_{\text{H-C}}$, $^3\text{J}_{\text{H-C}}$, et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.

CHAPITRE III
PARTIE EXPERIMENTALE

III-1- Etude chimique de l'espèce *Myrtus communis* L.:

III-1-1- Choix du matériel végétal:

L'analyse qualitative des composés phénoliques effectuée (couplage HPLC / UV-Visible) sur des extraits hydroalcooliques de différentes espèces de certaines familles a montré la richesse de l'espèce *Myrtus communis* L. en métabolites secondaires qui nous intéressent, notamment les flavonoïdes.

Le tableau suivant énumère les résultats des analyses effectuées sur les extraits hydroalcooliques des différentes espèces.

Tableau III-1 : Liste des espèces testées par HPLC /UV

Matériel végétal		Richesse en flavonoïdes	Lieux des récoltes
Espèce	Famille		
<i>Cynoglossum cheirifolium</i>	Boraginaceae	++	Sétif
<i>Centranthus ruber</i>	Valerianaceae	+++	Sétif
<i>Sambucus ebulus</i>	Caprifoliaceae	+	Sétif
<i>Sedum nevadence</i>	Crassulaceae	+++	Sétif
<i>Berberis hispanica</i>	Berberidaceae	++	Sétif
<i>Ranunculus arvensis</i>	Ranunculaceae	++	Sétif
<i>Cistus villosus</i>	Cistaceae	+	Sétif
<i>Lamium longiflorum</i>	Lamiaceae	+	Sétif
<i>Satureja granatensis</i>	Lamiaceae	++	Sétif
<i>Stachys ocymastrum</i>	Lamiaceae	+++	Sétif
<i>Phlomis orinita</i>	Lamiaceae	+++	Khenchela
<i>Stachys officinalis</i>	Lamiaceae	++	Khenchela
<i>Smyrniolum olusatrum</i>	Apiaceae	+	Khenchela
<i>Myrtus communis</i>	Myrtaceae	+++++	Sétif
<i>Cerinthe major</i>	Boraginaceae	+	Khenchela
<i>Helianthemum helianthoides</i>	Cistaceae	+	Khenchela
<i>Knautia arvensis</i>	Dipsacaceae	++	Khenchela
<i>Artemisia judaica</i>	Compositae	++++	Batna
<i>Pergularia tomentosa</i>	Asclepiadaceae	+	Batna

III-1-2- Place dans la systématique:

Embranchement	—————▶	Spermaphytæ
Sous-embranchement	—————▶	Angiospermae
Classe	—————▶	Dicotylédonae
Ordre	—————▶	Myrtales
Famille	—————▶	Myrtaceae
Genre	—————▶	<i>Myrtus</i>
Espèce	—————▶	<i>M. communis</i> L.

III-1-3- Description botanique de l'espèce Myrtus communis L. :

C'est un arbuste sempervirent de 1 à 3 mètres de haut, à tiges très ramifiées, dès la base; ses buissons touffus et aromatiques portent des feuilles ovales lancéolées, luisantes, coriaces, opposées, par deux ou quelquefois par trois ; fleurs blanches solitaires à l'aisselle des feuilles, axillaires, périanthe à cinq sépales et cinq pétales; nombreuses étamines et un style saillant ; baies bleu-noir, couronnées par le calice persistant [79].

Espèce méditerranéenne, commune dans le Tell et sur le littoral du centre. Connue sous le nom de "Rihan" [23] (Figure III-1).



Figure III-1 : Photos de *Myrtus communis* L.

III-1-4- Protocole expérimentale :

III-1-4-1- Extraction:

1500g des feuilles de la plante sèche sont coupées en petits morceaux et mises à macérer dans un mélange hydroalcoolique (MeOH/H₂O ; 70/30 ; V/V) pendant 24 heures.

La solution résultante est filtrée puis concentrée. Cette opération est répétée 4fois (3fois à froid et une fois à chaud).

Les solutions hydroalcooliques ou filtrats sont réunies et concentrées sous pression réduite à température ambiante.

Après reprise par de l'eau bouillante, la solution est mise au repos pendant une nuit puis filtrée (élimination des résines et quelques pigments chlorophylliens «dépôt en bas de l'éprouvette»).

La phase aqueuse limpide est épuisée successivement par l'acétate d'éthyle puis par le n-butanol. Chaque extraction est répétée trois fois. Les deux phases organiques ainsi obtenues (acétate d'éthyle et n-butanol) sont concentrées à sec sous pression réduite et pesées.

Le processus de l'extraction est résumé dans la figure III-2.

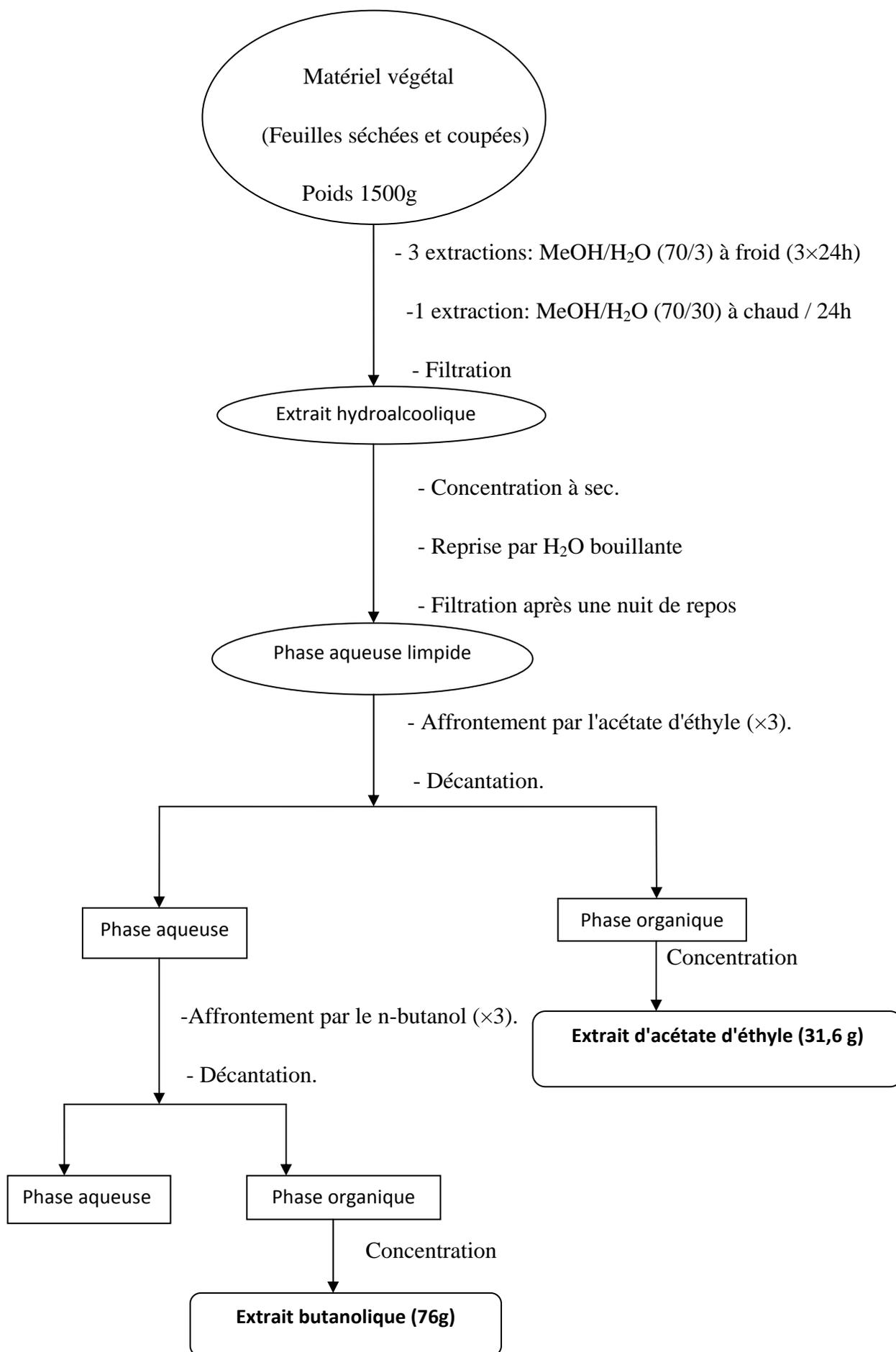


Figure III-2: Protocole d'extraction de *Myrtus communis* L.

III-1-4-2- Contrôle chromatographique :

Pour avoir les empreintes flavoniques de la plante et avoir une idée sur les meilleurs systèmes de séparation, les deux extraits subissent une chromatographie bidimensionnelle sur papier wattman n°3 et plaque de polyamide DC6 avec les systèmes d'éluateurs suivants :

Système I: chromatographie sur papier wattman n°3 avec les éluateurs suivants :

- La première dimension : B.A.W (4/1/5) : épiphase.
- La seconde dimension : ACOH 15%.

Système II: chromatographie sur plaque de polyamide DC6 avec les éluateurs suivants:

- La première dimension: Toluène/Méthyl éthyl cétone / Méthanol (4/3/3) : dimension organique.
- La seconde dimension : Eau/ Méthyl éthyl cétone / Méthanol/Acétyle acétone (13/3/3/1) : dimension aqueuse.

La première dimension (dimension organique) assure une dispersion en fonction de la nature des aglycones qui seront classés par ordre de lipophilie croissante (nombre d'hydroxyles et de méthoxyles), la seconde dimension (dimension aqueuse) sépare les hétérosides en fonction du nombre, position et la nature des sucres.

Les résultats des chromatographies analytiques des deux extraits Acétate d'éthyle et n-butanol ont montré que les composés présents dans la phase acétate étaient différents de ceux présents dans la phase butanolique. Ceci nous a donc amené à étudier chaque extrait séparément.

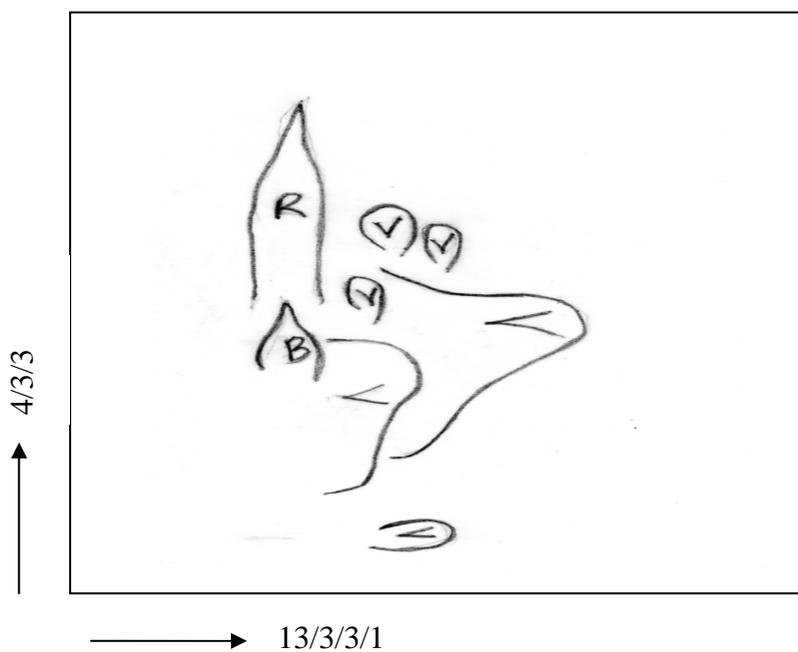


Figure III-3: Chromatographie 2D sur couche mince de polyamide DC6 de la phase acétate d'éthyle de *Myrtus communis* L.

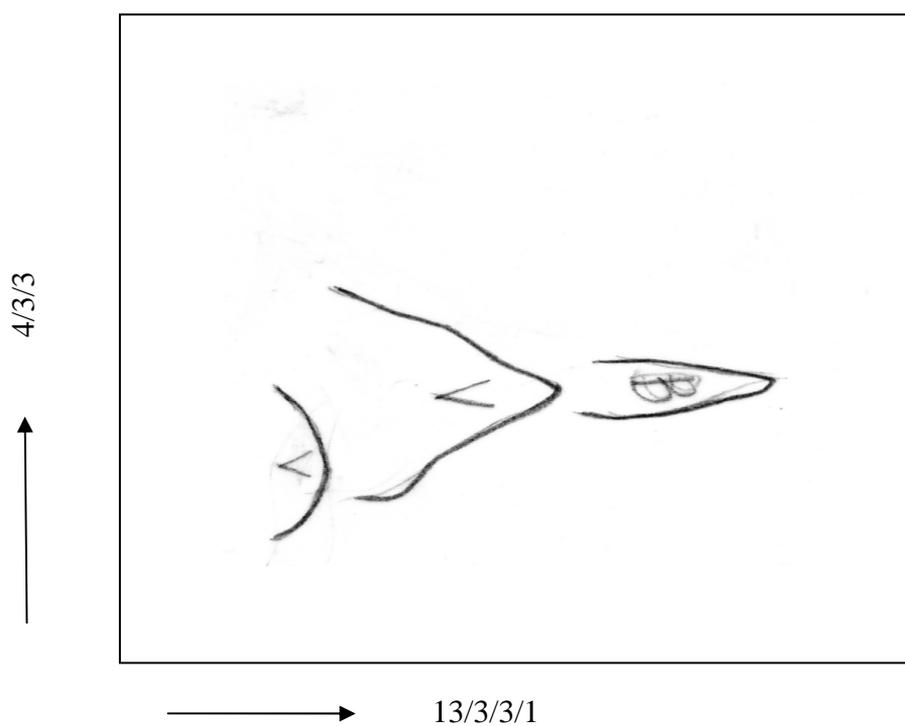


Figure III-4: Chromatographie 2D sur couche mince de polyamide DC6 de la phase butanolique de *Myrtus communis* L.

III-1-4-3- Séparations chromatographiques :

Les résultats du couplage HPLC/UV d'une part et des plaques analytiques bidimensionnelles sur polyamide DC6 effectués sur les extraits Acétate d'éthyle et n-butanol ont fait qu'on étudie séparément ces deux derniers.

III-1-4-3-a- Séparation et purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle:

Une étude chromatographique analytique par HPLC/UV a été effectuée sur cet extrait (fig. III-5).

A travers un simple regard sur les données (UV-Visible) du chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle (Figure III-5), on a tout de suite conclu que ce dernier est plutôt riche en composés flavonoïdiques aussi bien en qualité qu'en quantité. Aussitôt, une suite d'opération de séparation et de purification a été réalisée à savoir :

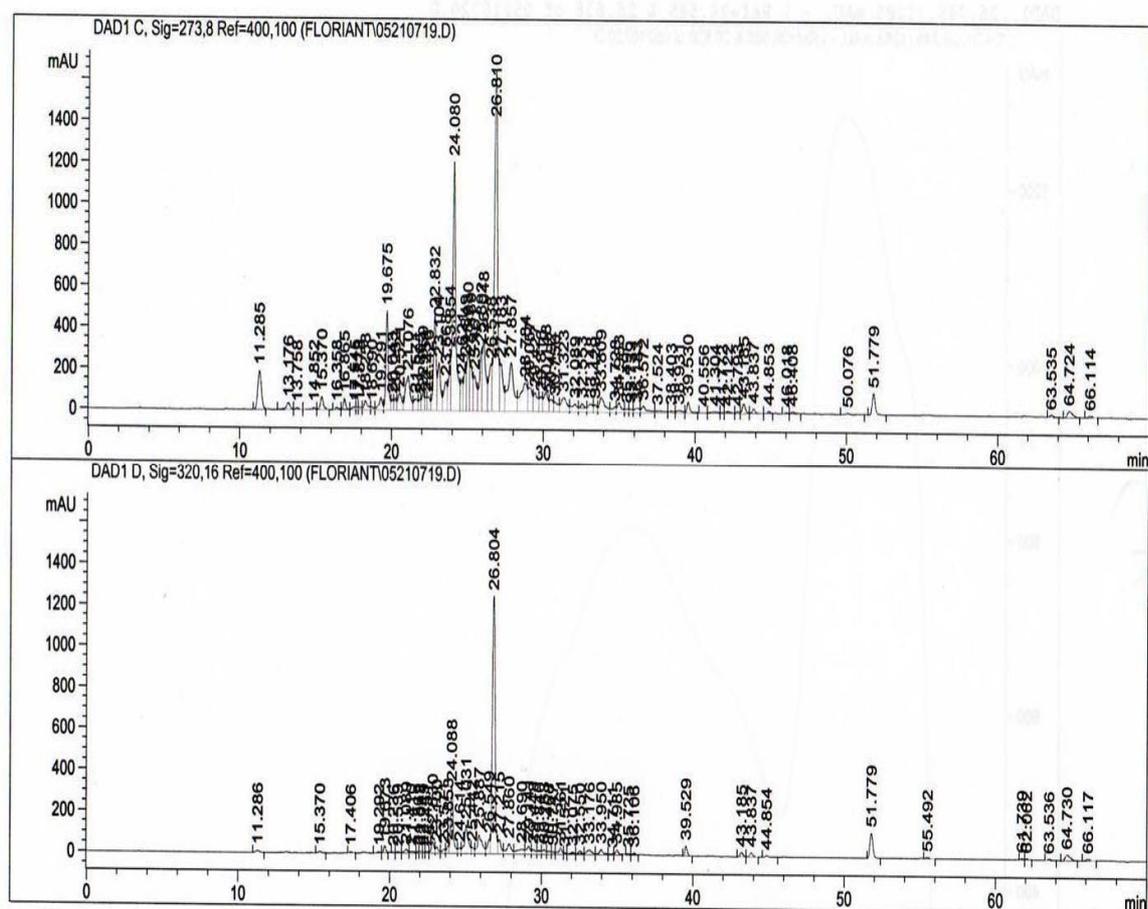


Figure III-5 : Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de *Myrtus communis* L.

- **Séparation sur colonne:**

Environ 25g de l'extrait acétate d'éthyle sont déposés sur une colonne de polyamide SC6 et l'éluant utilisé étant le mélange Toluène/Méthanol avec comme solvant de base le toluène.

Les fractions de colonne obtenues ont subi des tests sur différents supports chromatographiques dans différents systèmes d'éluant ; ce qui nous a permis de réunir les fractions ayant des comportements chromatographiques semblables donnant ainsi huit fractions en tout. Seules les fractions E et F ont été étudiées, les autres sont des mélanges plutôt complexes.

- **Etude de la fraction E :**

Cette Fraction a subi une chromatographie sur papier wattman n°3 avec comme éluant une solution aqueuse d'acide acétique à 50%, ce qui nous a permis d'isoler un produit qui sous lumière de Wood présente une fluorescence jaune et qui a subi une purification sur sephadex LH20. Le produit obtenu est appelé (A₁).

- **Etude de la fraction F :**

La séparation des produits de cette fraction a été effectuée sur papier wattman n°3 avec comme système d'éluant l'acide acétique 50%, ce qui a montré l'apparition de deux bandes, l'une de fluorescence jaune et l'autre violette sous lumière de Wood.

La bande jaune a été éluée par du méthanol, après filtration la solution est évaporée à sec. L'extrait obtenu a été testé par CCM dans différents systèmes ; les résultats de ces tests ont montré la présence d'un seul produit majoritaire de type aglycone. Ce qui nous a amené à purifier cet extrait sur gel de sephadex LH20 pour obtenir le produit (A₂).

Après élution de la bande violette dans le méthanol (R1), la phase alcoolique a été évaporée à sec puis reprise avec minimum de méthanol. Les tests chromatographiques ont montré que cette phase est un mélange séparable. Cette phase a subi une rechromatographie sur plaques préparatives de polyamide DC6, éluée par le système Toluène/Méthyl éthyl cétone / Méthanol (4/3/3), qui a donné lieu à deux fractions, dans l'une est majoritaire présentant un mélange facilement séparable sur plaques préparatives de cellulose dans le système d'éluant l'acide acétique 50%, ce qui nous a permis d'obtenir un produit de fluorescence violette (R₁₁₁) dont le comportement chromatographique dans les différents systèmes présente une monotache, ce qui nous a permis de faire la purification sur colonne de polyamide dans le système toluène / polyamide.

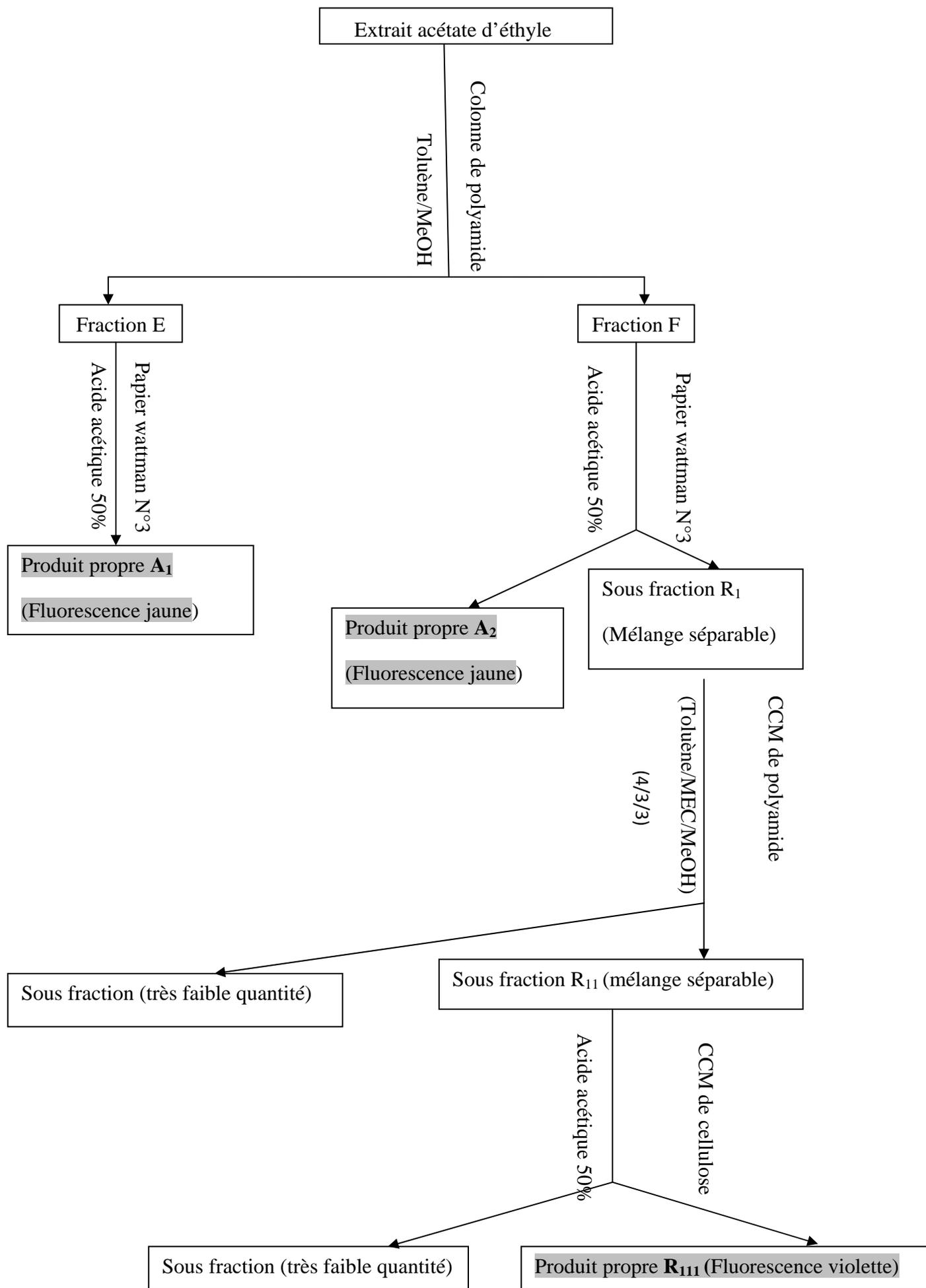


Figure III-6 : Isolement des composés de l'extrait acétate d'éthyle

III-1-4-3-6- Séparation et purification des composants de l'extrait butanolique :

De même que l'extrait acétate d'éthyle, une chromatographie analytique par HPLC/UV a été effectuée sur l'extrait butanolique (fig. III-7).

Le chromatogramme obtenu a montré une composition très riche de cet extrait et notamment en composés recherchés plutôt polaires par rapport aux antécédents (probablement des hétérosides). Aussi, il s'avère que pour cet extrait, la diversité en composé flavonoïdique est plus prononcée et il en est de même sur le plan quantitatif.

Les spectres UV correspondants aux différents produits séparés par HPLC montrent que plusieurs des produits séparés appartiennent à la classe des flavonoïdes, type flavone ou flavonol sauf que seulement quelques un entre eux sont en quantité suffisante.

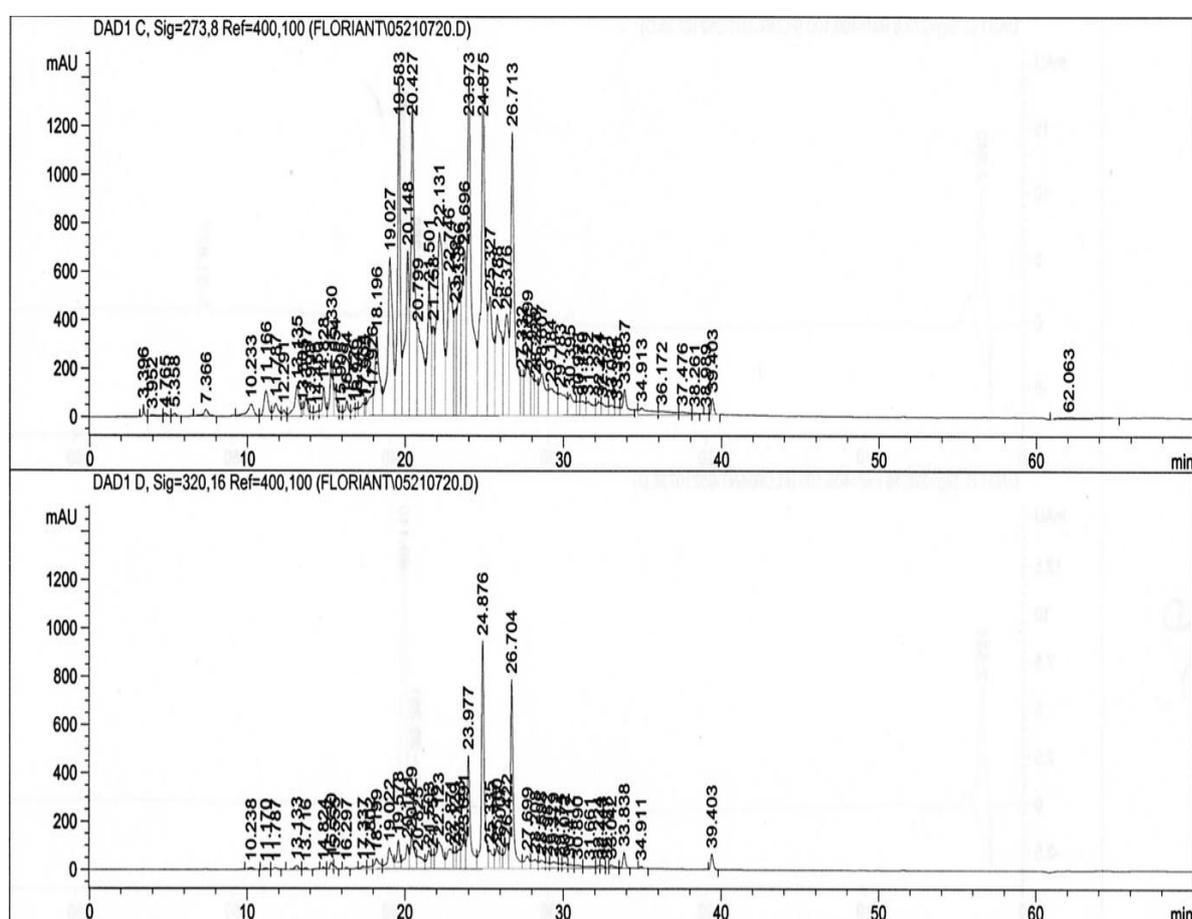


Figure III-7: Chromatogramme de l'extrait butanolique de *Myrtus communis* L.

Suite à ceci, une batterie de méthodes séparatrices a été réalisée à savoir :

- **Séparation sur colonne:**

L'extrait butanolique (25g) dissout dans le méthanol, est mélangé à une petite quantité de polyamide, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène.

Cette poudre est déposée sur colonne de polyamide SC6, préparée dans le Toluène.

L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système Toluène/Méthanol avec comme solvant de base le toluène.

Notons que le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM analytique, cela a permis de réunir sept fractions.

Parmi les sept fractions obtenues, nous avons procédé à la séparation de la fraction F. Les critères de choix de cette dernière reposent sur la base des données de la chromatographie couche mince ainsi que sur leur poids relativement intéressant.

- **Etude de la fraction F :**

La fraction F est traitée par une chromatographie sur des plaques préparatives de gel de silice, éluées par le système acétate d'éthyle/eau/acide acétique (8/1/1), a permis l'isolement des composés suivants :

R₂ : un produit propre de fluorescence violette.

G₁ : un mélange séparable ; rechromatographié sur des plaques préparatives de polyamide DC6 éluées par le système Eau/ Méthyl éthyl cétone / Méthanol/Acétyle acétone (13/3/3/1) a donné lieu à un autre mélange, rechromatographié sur des plaques préparatives de cellulose ; l'éluant est l'acide acétique 15%, a donné le produit propre (G111) de fluorescence violette et la sous fraction G₁₂ de très faible quantité.

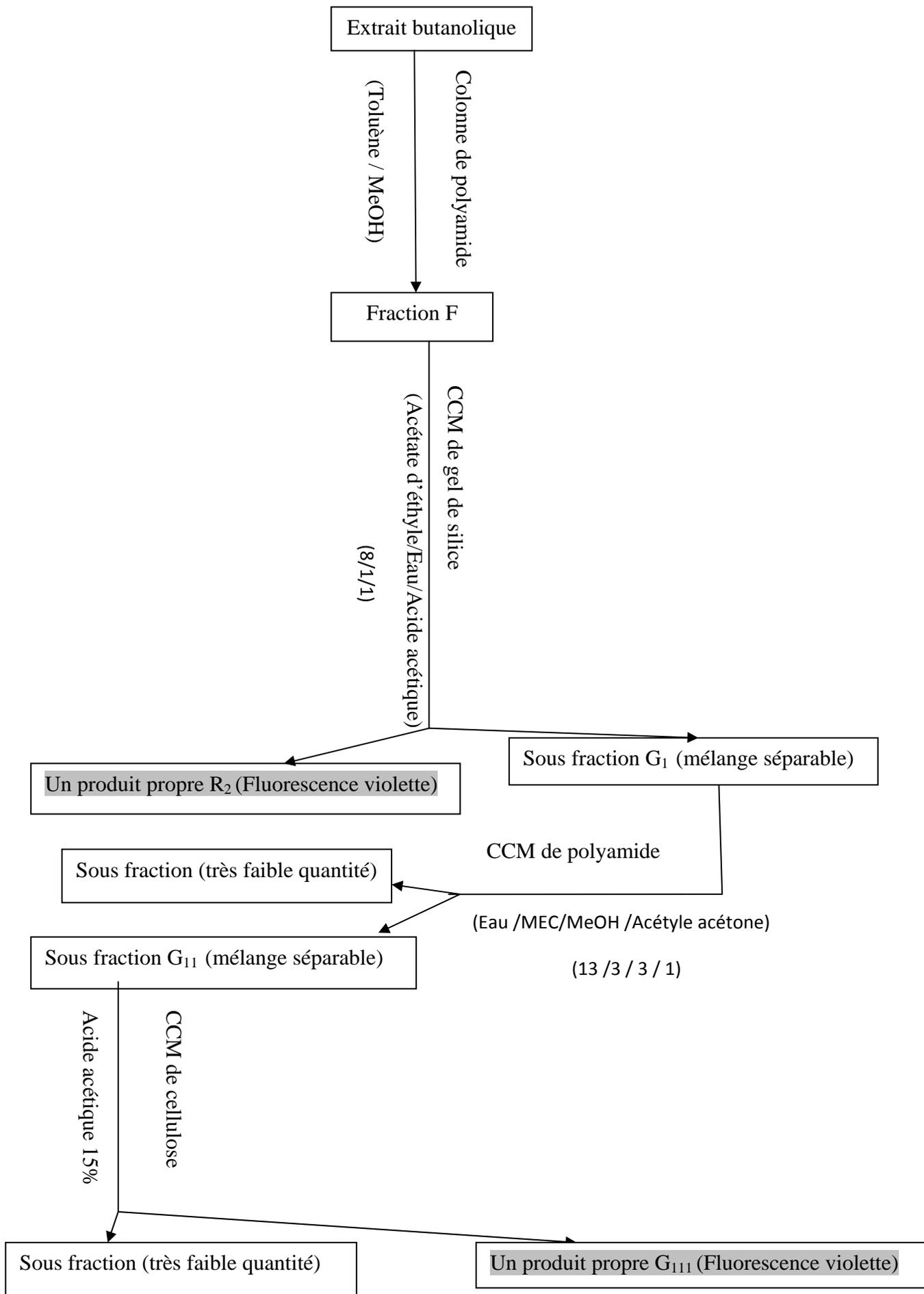


Figure III-8 : Isolement des composés de l'extrait butanolique

CHAPITRE IV
RESULTATS ET DISCUSSIONS

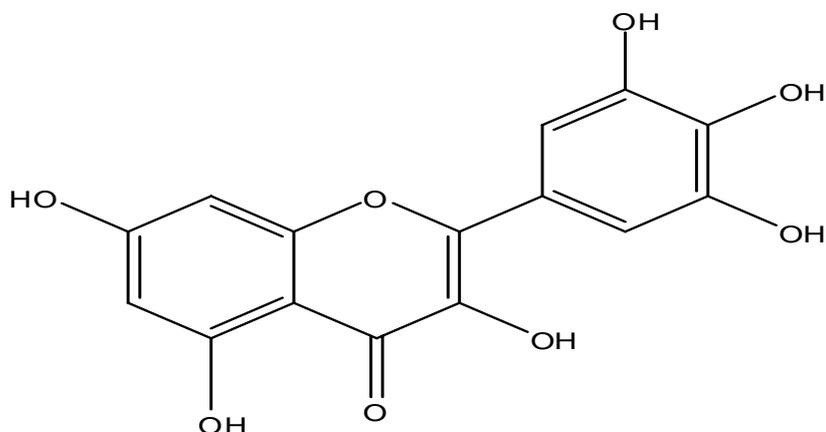
Résultats et discussions :

L'identification des composés flavoniques de *Myrtus communis* L. a été réalisée sur la base des données de :

- La fluorescence.
- Le calcul de R_f à partir d'une CCM dans les trois systèmes de solvants :
 - Toluène / Méthanol/ Méthyléthylcétone : 4/3/3 : SI.
 - Eau /Méthanol/ Méthyléthylcétone /Acétylacétone : 13/3/3/1 : SII.
 - Acide acétique 15% : SIII.
- La valeur de temps de rétention (t_R) du chromatogramme HPLC.
- L'interprétation des séries spectrales UV-Visible.
- Les données spectrales : SM en APCI, RMN-¹H et RMN-¹³C.
- L'hydrolyse acide qui permet de déterminer la nature du sucre et parfois sa position.

IV-1- Elucidation structurale du composé A₂:

3, 5, 7,3',4',5'- hexahydroxyflavone (Myricétine)



IV-1- 1-Comportement chromatographique :

Système	SI	SII
Rf	0.09	0.03
Fluorescence	jaune	
Temps de rétention t _R (mn)	31.98	

IV-1- 2-Les données spectrales :

a- Données des spectres UV-Visible :

	Réactifs	Maximum d'absorption : λ _{max} (nm)		
		Bande I	Bandes intermédiaires	Bande II
1 ^{ère} série	MeOH	376	301	254
	+NaOH	430	321	278
	+NaOH+5mn	446	318	285
2 ^{ème} série	MeOH	376	300	254
	+AlCl ₃	448	/	270
	+AlCl ₃ +HCl	431	320	267
3 ^{ème} série	MeOH	375	301	254
	+NaOAc	394	327	268
	+NaOAc+H ₃ BO ₃	395	/	258

b- Spectres de masse :

m/z	Ions	Pourcentage%
319	$[M+H]^+$	100
341	$[M+Na]^+$	15
357	$[M+K]^+$	20
382	$[M+2H+Na+K]^+$	25
317	$[M-H]^-$	100
635	$[2M-H]^-$	25

c- Spectre RMN-¹H :

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité J(Hz)	Attribution
6.08	1H	d (2.09)	H-6
6.25	1H	d (2.09)	H-8
7.30	2H	S	H-2', H-6'

Le comportement de ce composé tout au long des différentes manipulations, sa fluorescence sous lumière de Wood jaunâtre, ses différentes valeurs de Rf ajouté aux positions des bandes I et II (376 et 254nm) de son spectre méthanolique font que le composé A₂ se présente comme étant un aglycone de flavonol avec un OH libre en position 3.

Toujours concernant le spectre méthanolique, le fait que la bande II présente aussi un épaulement vers 270nm, cela indique que le cycle B est au moins disubstitué.

L'hydroxyle libre en position 5 et la confirmation de l'OH libre en position 3 peuvent être expliqués par le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda=+55\text{nm}$) du spectre (AlCl_3+HCl) par rapport au spectre méthanolique.

La bande I du spectre (AlCl_3+HCl) présente un maximum d'absorption vers 431nm bien après son homologue du spectre (AlCl_3) d'où un effet hypsochrome de 17nm ; ce qui présume la présence d'un système ortho-di-OH sur le noyau B.

Cette dernière est bien confirmée par la présence du déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda=+19\text{nm}$) du spectre ($\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$) vis-à-vis son homologue sur le spectre méthanolique.

Le spectre en présence de l'hydroxyde de sodium comparé au spectre méthanolique présente un effet bathochrome généralisé (bande I et bande II) : ce qui milite et confirme la présence de plusieurs hydroxyles libres sur les cycles A et B et spécialement en position 4' (bande I : $\Delta\lambda=+54\text{nm}$). La décomposition de la bande I confirme le 3 et le 4'-di-OH avec une

possibilité de la présence de tri-OH adjacent sur le noyau B. Enfin, l'apparition d'une nouvelle bande vers 321nm indique la présence d'un OH libre en position 7 sur le noyau A.

La bande II du spectre en présence de l'acétate de sodium comparée au spectre méthanolique présente un déplacement bathochrome de +14nm d'où la confirmation de l'hydroxyle libre en position 7.

Le spectre de masse en APCI présente une indication précieuse quand à la formule brute. En effet, le pic à $m/z=319$ étant le pic de base (100%) tout comme d'ailleurs celui à $m/z=317$ ne peuvent que symboliser les pics pseudo-moléculaires à savoir $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ tirés respectivement en APCI positive et en APCI négative d'où la formule brute pour ce composé A_2 : $C_{15}H_{10}O_8$ c'est-à-dire la structure d'un aglycone de flavonol avec en tout un nombre de 6 hydroxyles libres portés par les cycles A, B et l'hétérocycle C.

En combinant ces données avec celles de l'UV-Visible, on peut prédire pour ce composé la structure de 3, 5, 7, 3', 4', 5'-hexahydroxyflavone.

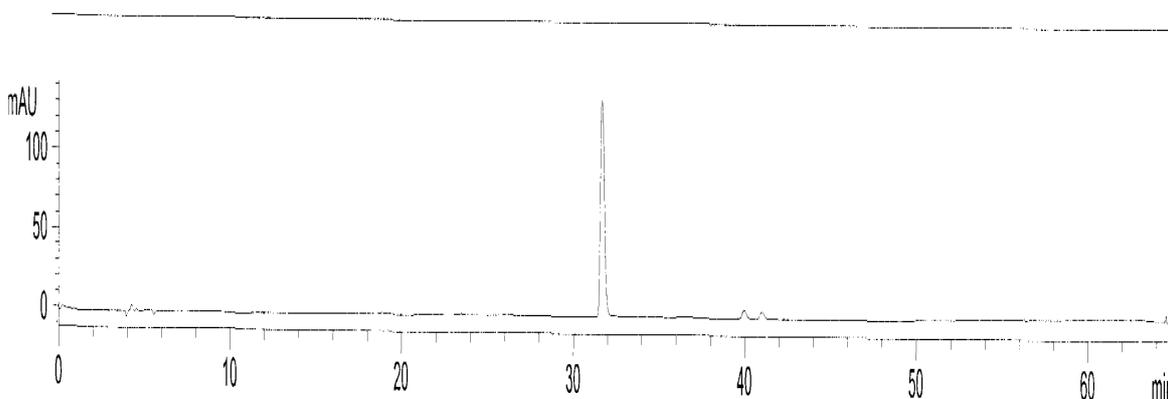
Cette structure est encore confirmée par le spectre RMN 1H , En effet, à partir du spectre RMN- 1H (250MHz) dans DMSO- d_6 , on peut voir aisément la présence de deux doublets d'intégration 1H chacun, à $\delta=6.08ppm$ et $\delta=6.25ppm$ de même constante de couplage $J=2.09Hz$, montrant un couplage méta attribuables à H-6 et H-8 respectivement indiquant ainsi la disubstitution du cycle A dans les positions 5et 7.

Un singulet d'intégration 2H à 7.30 ppm attribuables aux protons à H-2' et H-6' (existence d'une symétrie sur le noyau B) traduisant ainsi la substitution des positions 3',4'et 5' du noyau B.

L'ensemble de ces données permettent de suggérer pour ce composé la structure : 3, 5, 7,3',4',5'- hexahydroxyflavone : Myricétine.

Remarque :

Une co-chromatographie sur couche mince de polyamide et les spectres de SM, RMN- 1H , et UV-visible ont permis de constater que A_1 et A_2 sont identiques.



**Fig. IV-1 : chromatogramme (HPLC) du composé A_2
(Confirmation de la pureté de ce dernier).**

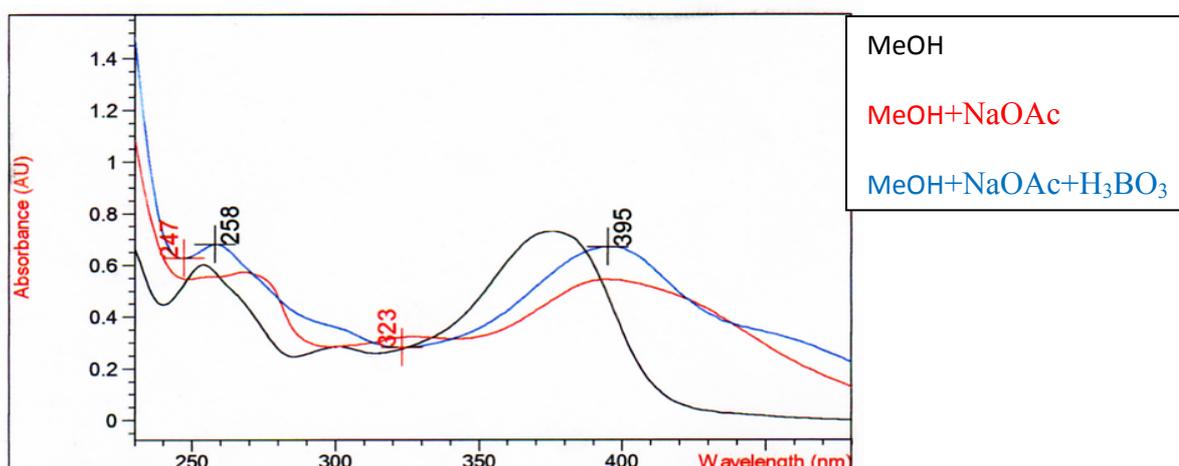
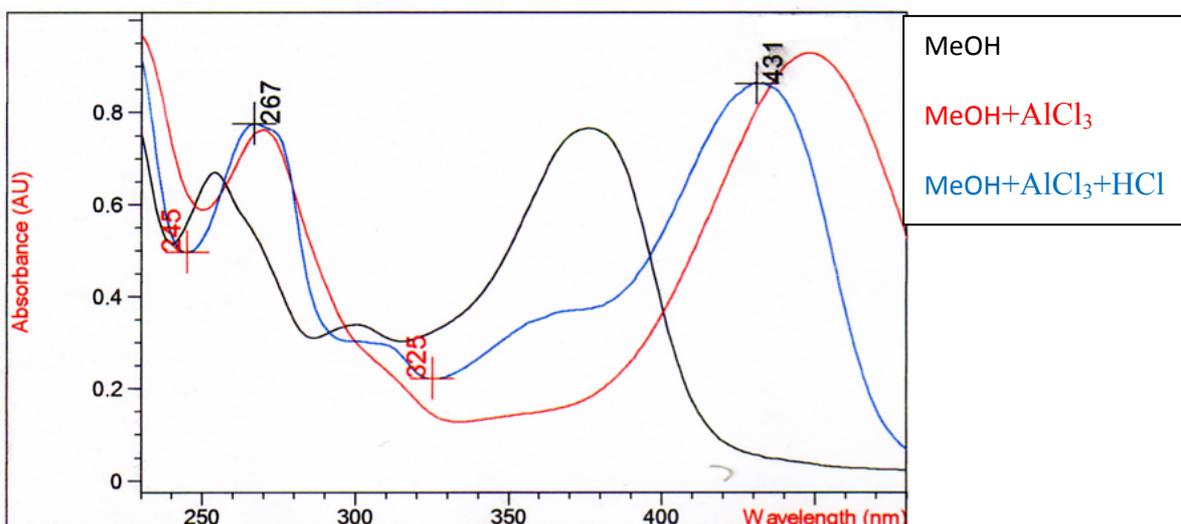
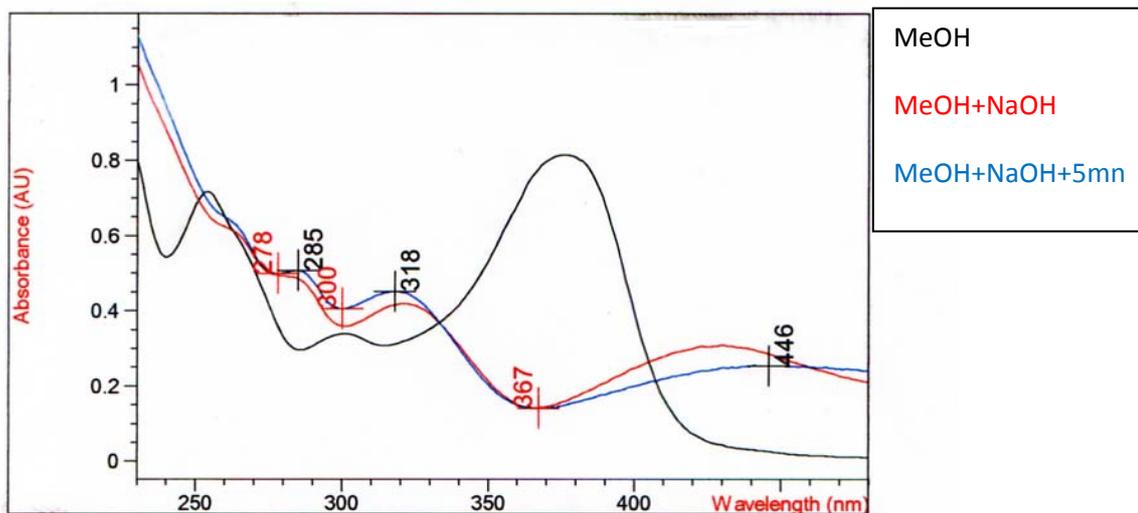


Fig. IV-2 : Série Spéctrale UV-Visible du composé A₂

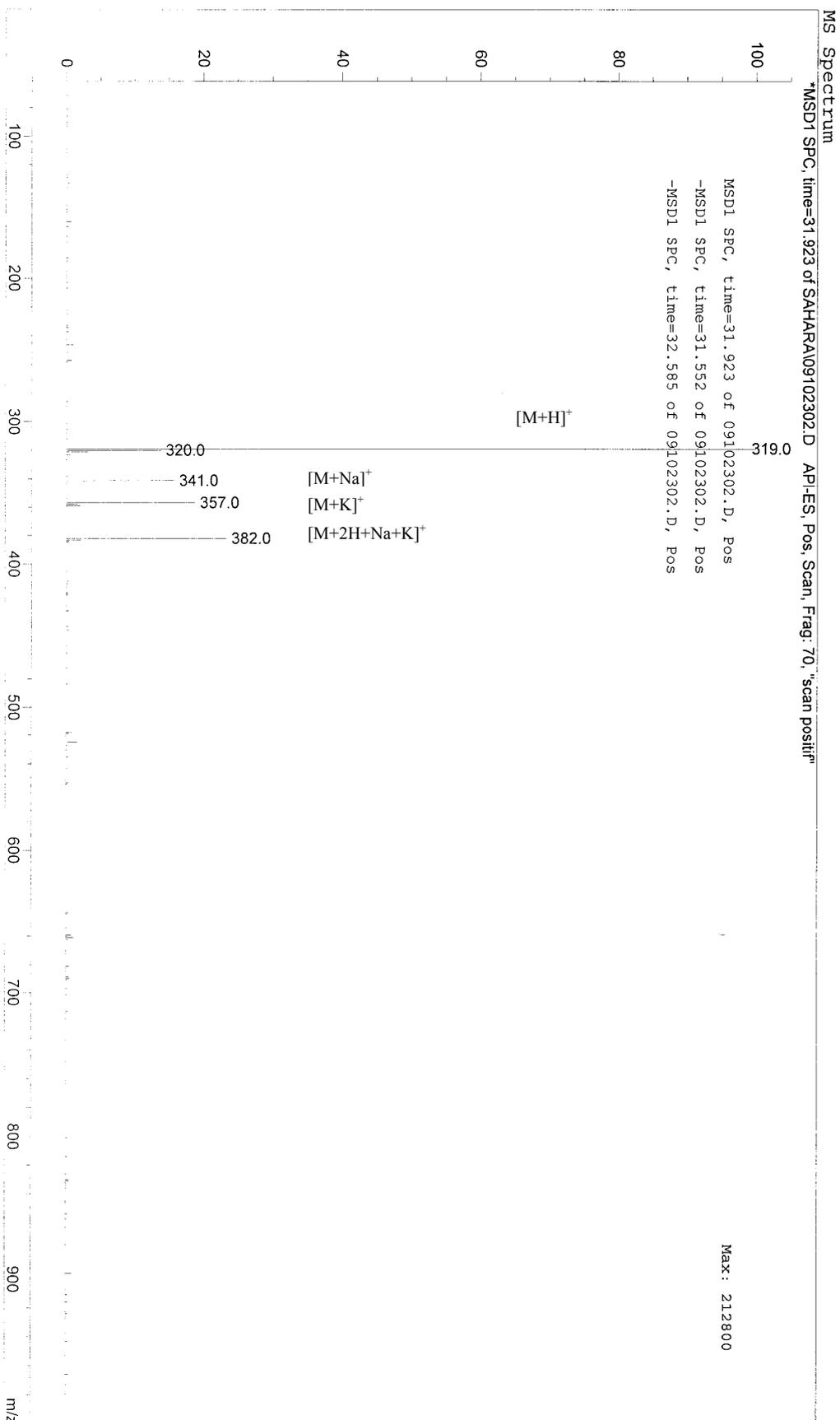


Fig. IV-3 : Spectre de masse en APCI positive du composé A₂

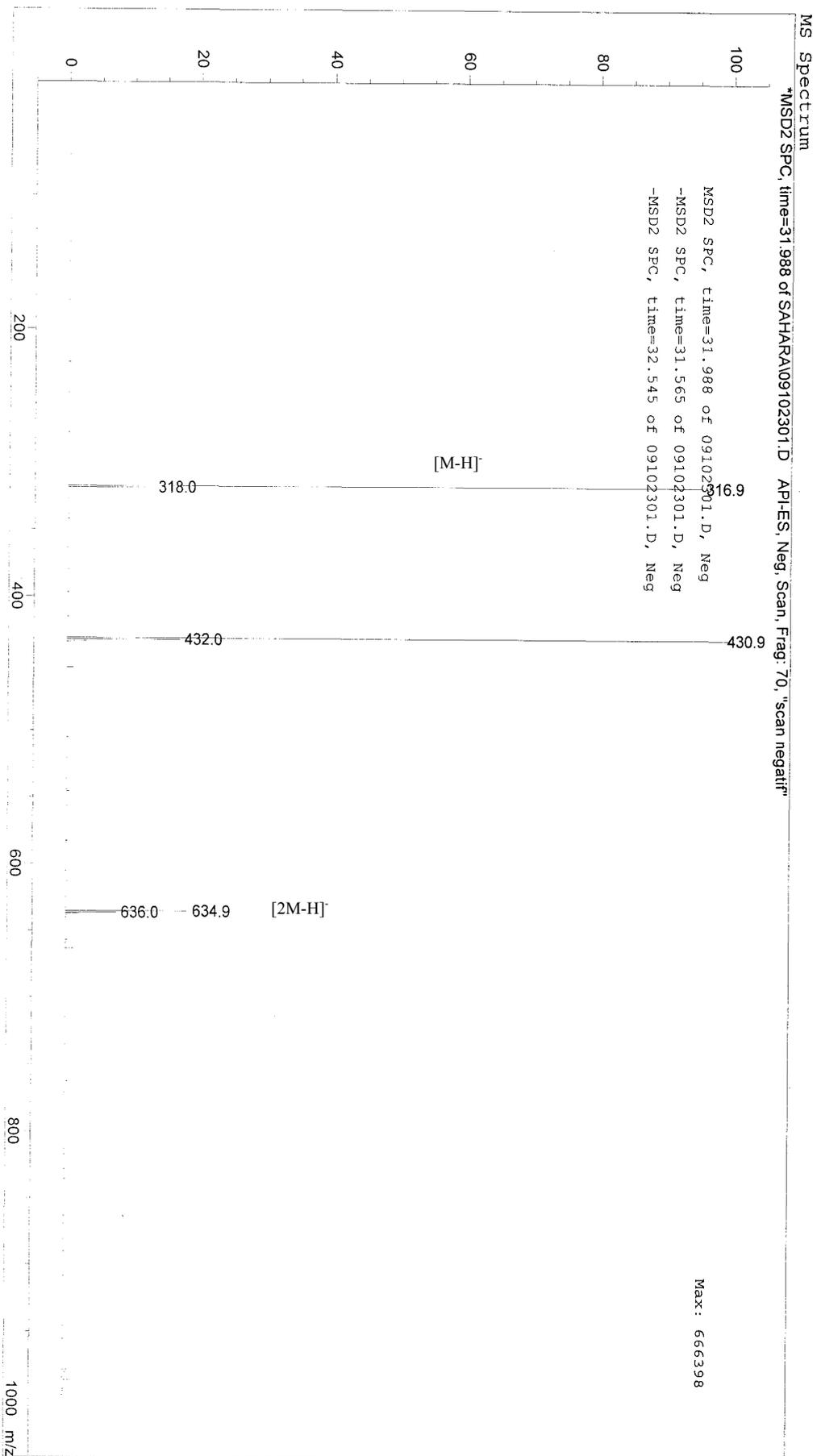


Fig. IV-4 : Spectre de masse en APCI négative du composé A₂

Fig. IV-5 : Spectre RMN-¹H (250 MHz, DMSO-d₆, δ/ppm, J/Hz) du composé A₂

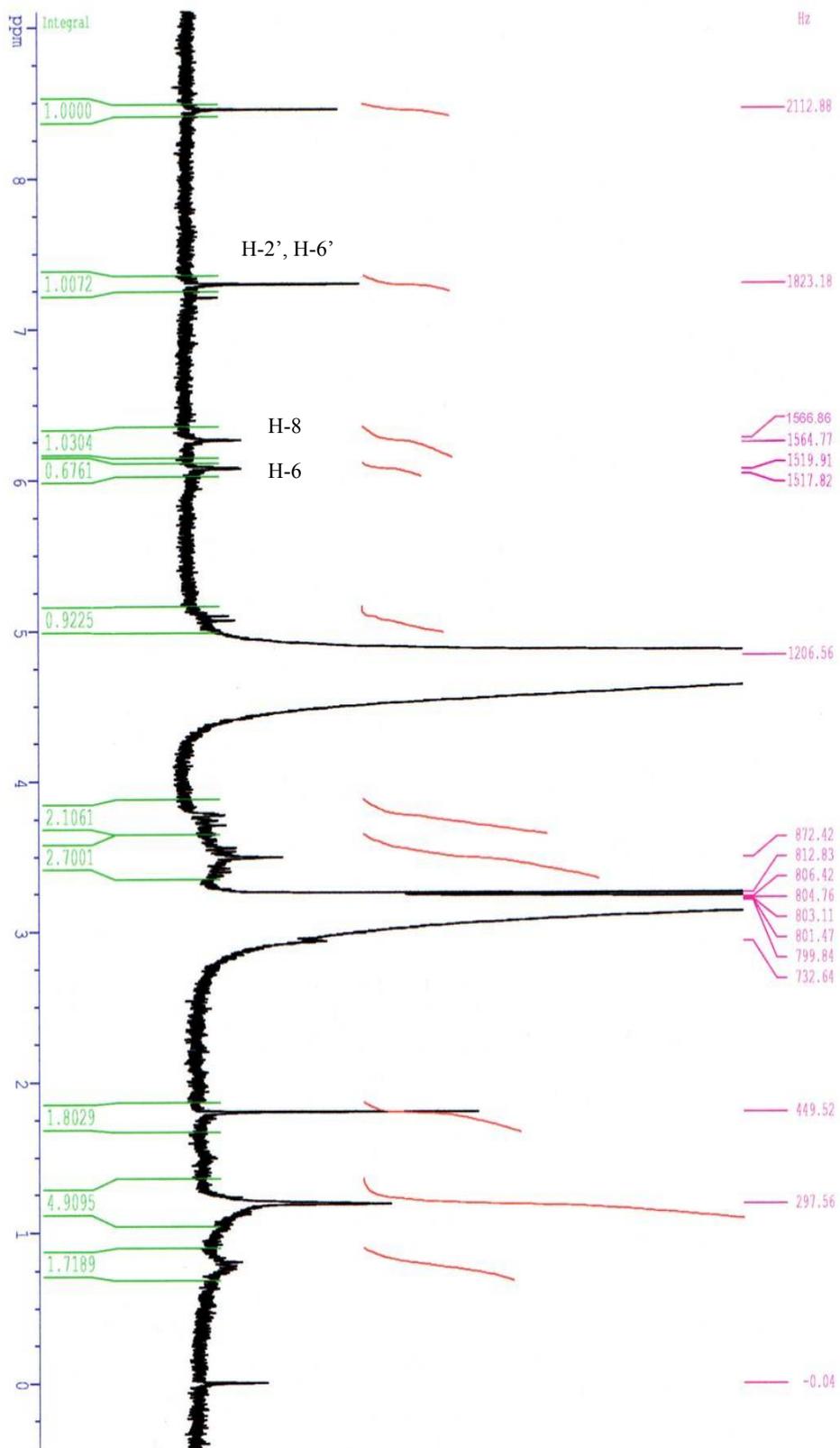
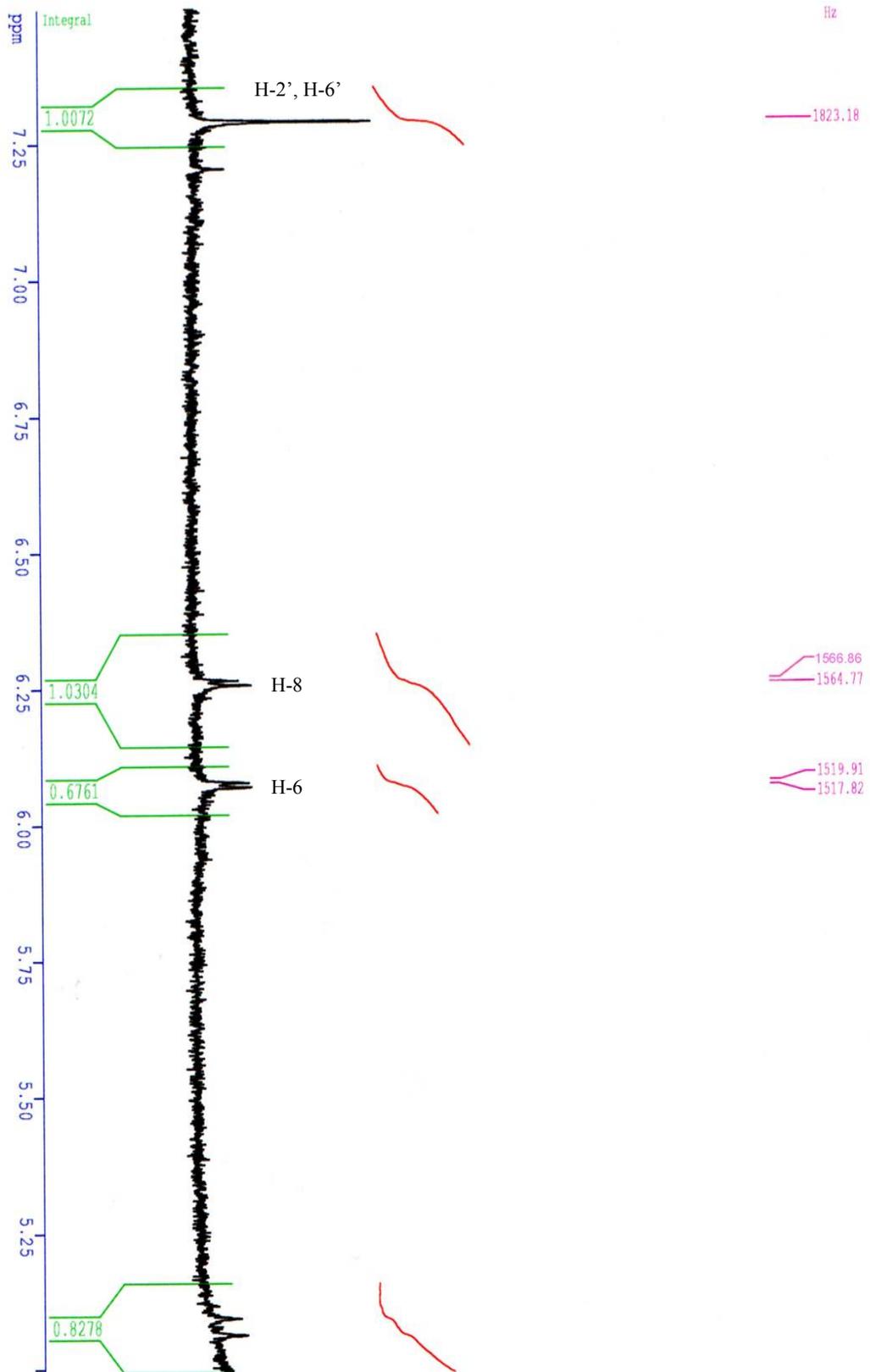
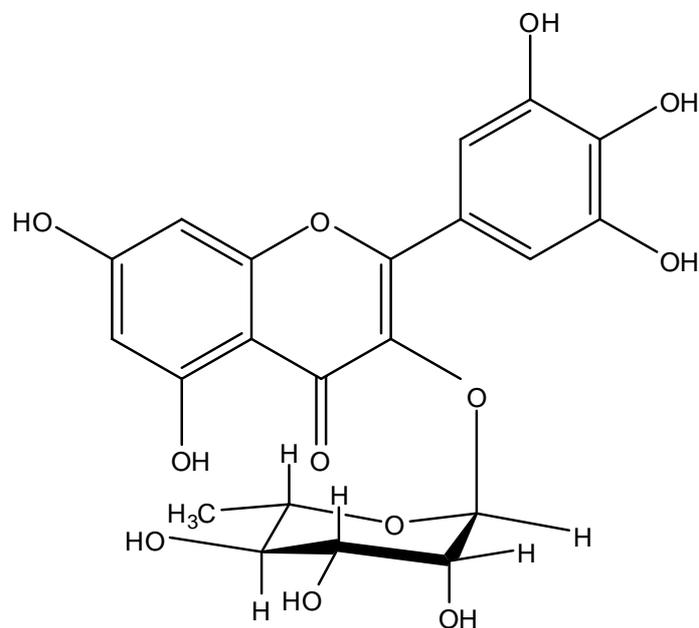


Fig. IV-6 : Spectre RMN-¹H (250 MHz, DMSO-d₆, δ/ppm, J/Hz) étalé (5 à 7.5ppm) du composé A₂



IV-2- Elucidation structurale du composé R₁₁₁ :
5, 7, 3', 4', 5'-pentahydroxyflavone-3-O- α - rhamnoside
(Myrécitine-3-O- α -rhamnoside).



IV-2- 1-Comportement chromatographique :

Systemes	SI	SII	SIII
Rf	0.09	0.21	0.4
Fluorescence	Violette		
Temps de rétention t _R (mn)	20.8		

IV-2- 2-Les données spectrales :

a- Données des spectres UV-Visible :

	Réactifs	Maximum d'absorption : λ_{\max} (nm)			
		Bande I	Bandes intermédiaires	Bande II	
1 ^{ère} série	MeOH	350		/	256
	+NaOH	390		325	268
	+NaOH+5mn	359		/	267
2 ^{ème} série	MeOH	350		/	256
	+AlCl ₃	440	384	/	265
	+AlCl ₃ +HCl	400	352	304	266
3 ^{ème} série	MeOH	350		298	256
	+NaOAc	369		359	266
	+NaOAc+H ₃ BO ₃	370		/	258

b- Spectre RMN-¹H :

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité J(Hz)	Attribution
7.00	2H	S	H-2', H-6'
6.20	1H	d (2.12)	H-6
6.40	1H	d (2.15)	H-8
5.30	1H	d (1.85)	H-1'' du rhamnose
1.00	3H	d (6.12)	CH ₃ du rhamnose

c - Spectre RMN-¹³C :

Déplacement chimique δ (ppm)	Attribution
176.512	C-4
165.422	C-7
162.513	C-5
158.731	C-2
157.631	C-9
146.978	C-3' - C-5'
137.687	C-4'
135.485	C-3
120.802	C-1'
109.109	C-2' - C-6'
105.243	C-10
103.141	C-1"
98.714	C-6
94.773	C-8
72.474	C-4"
71.796	C-3"
71.575	C-2"
71.235	C-5"
18.742	C-6"

d- Spectre de masse :

m/z	Ions	Pourcentage %
465	$[M+H]^+$	100
319	$[M+H\text{-rhamnosyl}]^+$	50
487	$[M+Na]^+$	15
503	$[M+K]^+$	10
951	$[2M+Na]^+$	25

La fluorescence violette sous lumière de Wood, les différentes valeurs de Rf et les positions des deux bandes I et II (350 et 256nm) du spectre méthanolique indiquent que le composé R₁₁₁ est un flavonol monoglycosylé bloqué en position 3.

Le spectre en présence de l'hydroxyde de sodium présente un effet bathochrome général (les deux bandes I et II) comparativement à celui enregistré dans le méthanol; ceci indique la présence de plusieurs hydroxyles libres sur les noyaux A et B. Cet effet est plus important sur la bande I ($\Delta\lambda=+40\text{nm}$), ce qui montre la présence d'un hydroxyle libre en position 4'. Sur le même spectre, l'apparition d'une nouvelle bande à 325 nm est révélatrice de la présence d'un hydroxyle libre en position 7 ; ceci est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande II comme indiqué sur le spectre en présence de l'acétate de sodium ($\Delta\lambda=+10\text{nm}$) par rapport au spectre méthanolique.

L'effet hypsochrome de la bande I de 40nm du spectre (AlCl_3+HCl) par rapport à celui du AlCl_3 suggère la présence d'un système ortho-di-OH sur le noyau B. Cette hypothèse est confirmée par l'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda=+20\text{nm}$) du spectre ($\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$) comparativement au spectre méthanolique.

Le déplacement bathochrome de la bande I de 52nm du spectre en présence (AlCl_3+HCl) comparativement au spectre méthanolique indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5.

L'hydrolyse acide de ce composé a montré la présence du sucre rhamnose et ceci par co-chromatographie de la phase aqueuse, alors que la génine a été identifiée comme étant la Myricétine par co-chromatographie en présence de témoins authentiques ainsi par sa nouvelle fluorescence jaune sous lumière de Wood, ce qui nous orientent vers une jonction sucre-aglycone en position 3.

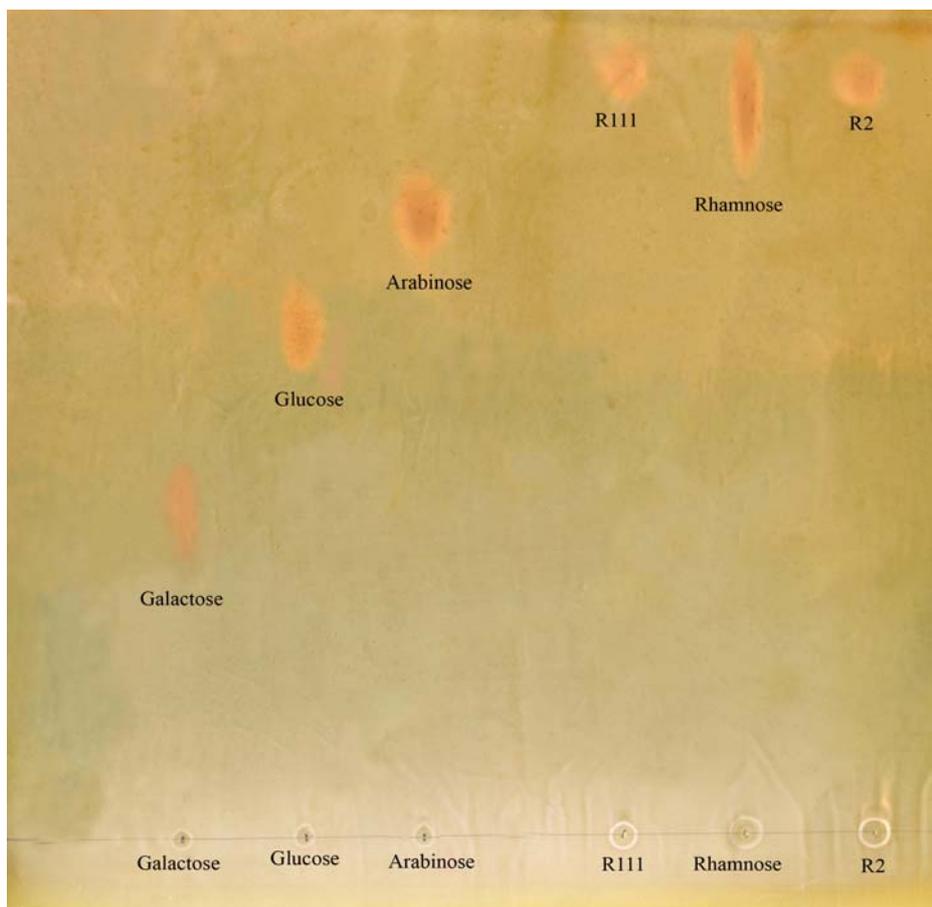


Fig. IV-7 :Co-chromatographie de la phase aqueuse du composé R₁₁₁

Le spectre RMN proton enregistré sur un spectromètre RMN, 250MHz dans le méthanol deutéré montre :

Un singulet d'intégration 2H à $\delta = 7$ ppm attribuables à H-2' et H-6' (existence d'une symétrie sur le cycle B) indiquant ainsi la substitution des carbones 3', 4' et 5' du noyau B.

Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6.20$ ppm; le second à $\delta = 6.4$ ppm de même constante de couplage $J=2.1$ Hz (couplage méta) attribuable à H-6 et H-8 respectivement indiquant ainsi que le noyau A est substitué en 5 et en 7.

Le proton anomérique du sucre rhamnose résonnant à 5.30 ppm est représenté par un doublet de constante de couplage $J= 1.85$ Hz qui montre que le sucre rhamnose est α liée à la génine.

Le doublet à 1 ppm avec une constante de couplage de 6.12 Hz dont l'intégration correspondant à trois protons est caractéristique du méthyle terminal du rhamnose et dans l'intervalle 3.5 – 3.8 ppm se trouvent les autres protons du rhamnose.

Les signaux du sucre rhamnose apparaissent plus clairement sur le spectre RMN-¹³C, un signal à 103.141ppm du carbone anomérique d'un groupement O-rhamnosyl et le carbone 6" à 18.742 est caractéristique du méthyle de rhamnose. Les autres carbones résonnent comme suit : 72.474 (C-4"), 71.796 (C-3"), 71.575 (C-2") et 71.235 (C-5").

Toutes ces données mènent à la structure 5, 7, 3', 4', 5'- pentahydroxyflavone-3-O- α - rhamnoside.

Cette structure est encore confirmée par le spectre de masse en APCI positif qui présente un pic de base (100%) à m/z = 465 et un deuxième pic (50%) à m/z = 319 correspondants respectivement à [M+H]⁺ et [M+H-rhamnosyl]⁺, ce qui montre que la masse moléculaire du composé R₁₁₁ est 464 correspondante à la structure 5, 7, 3', 4', 5'- pentahydroxyflavone-3-O - α- rhamnoside connue sous le nom : Myricétine-3-O-α - rhamnoside.

Remarque :

Une co-chromatographie sur couche mince de polyamide et les spectres de SM, RMN-¹H, RMN-¹³C et UV-visible ont permis de constater que R₁₁₁ est identique à R₂.

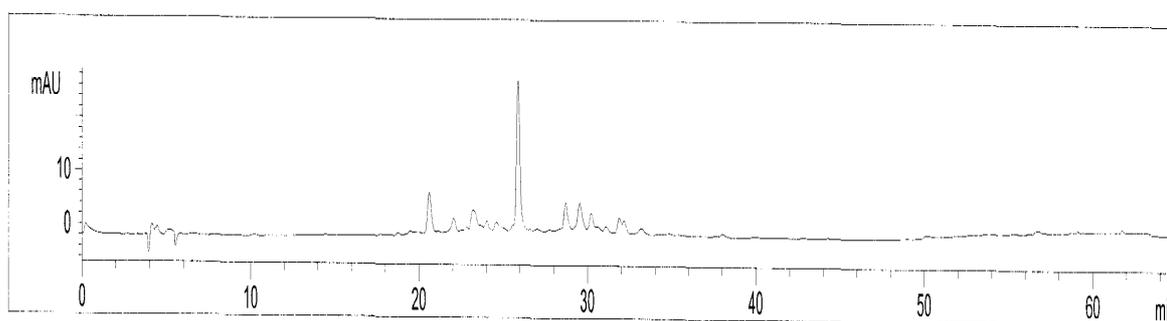


Fig. IV-8 : chromatogramme (HPLC) du composé R₁₁₁

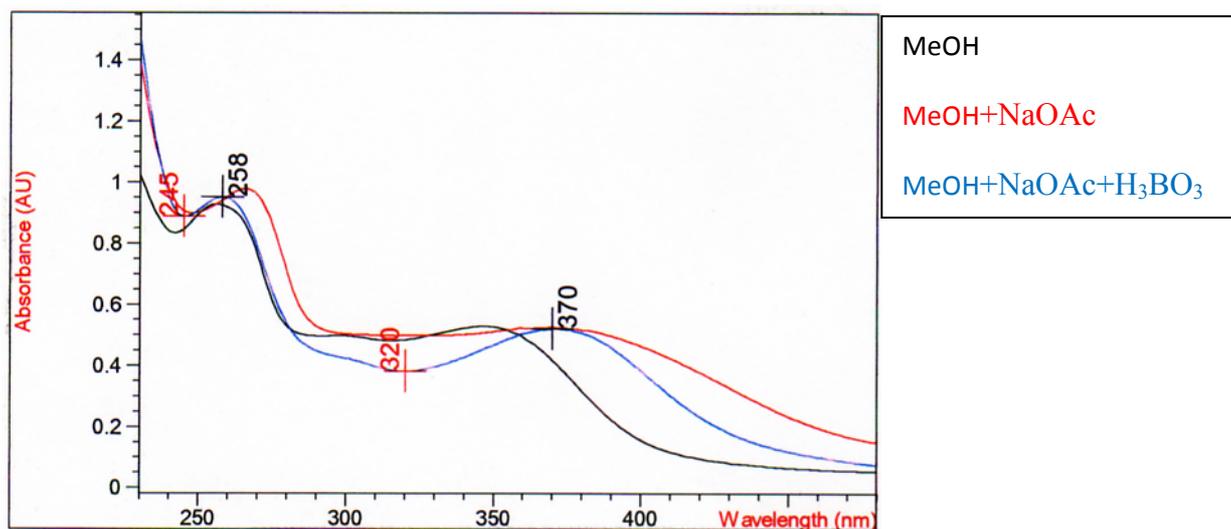
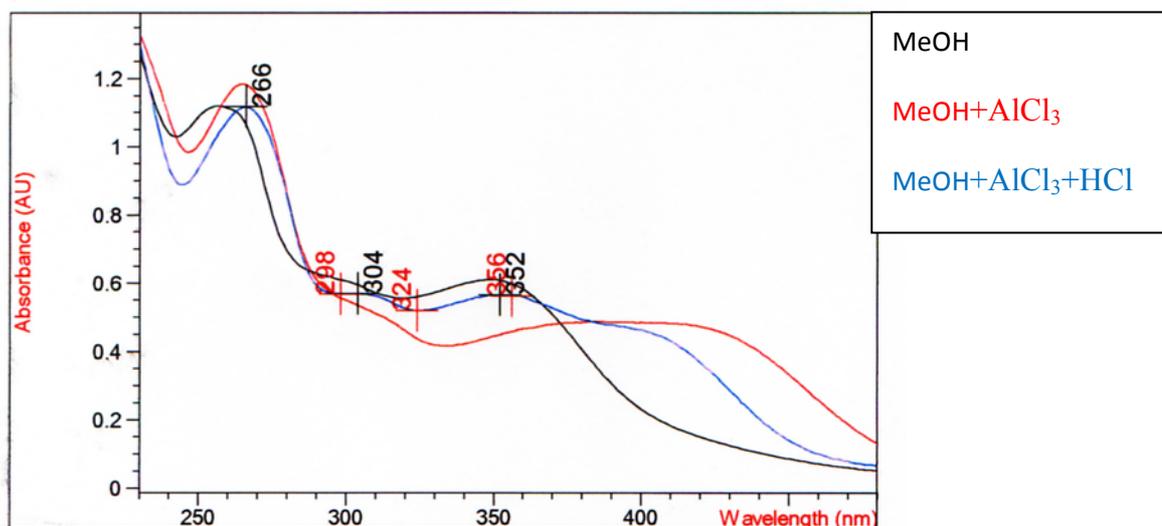
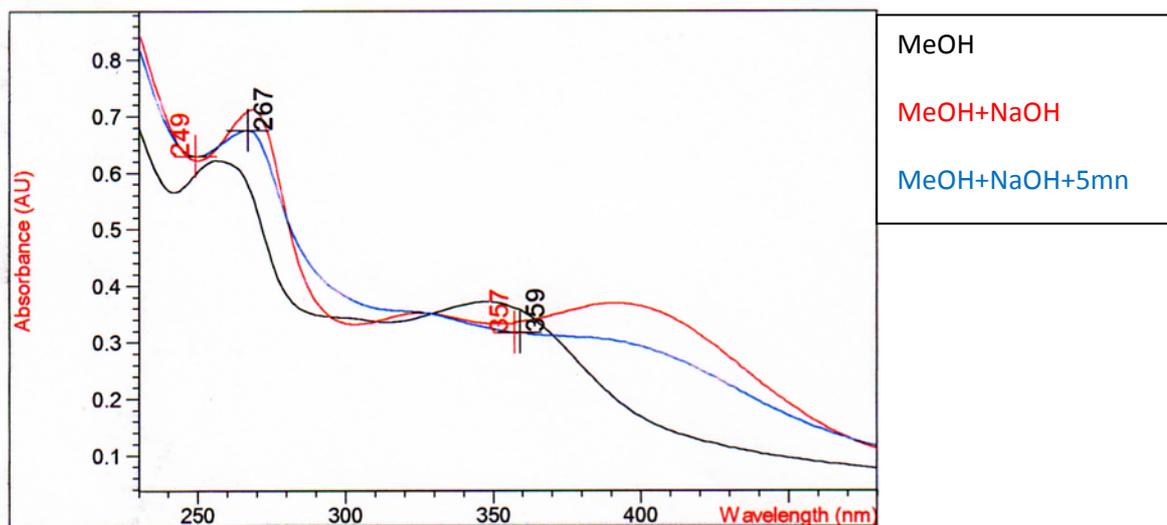


Fig. IV-9 : Série Spectrale UV-Visible du composé R₁₁₁

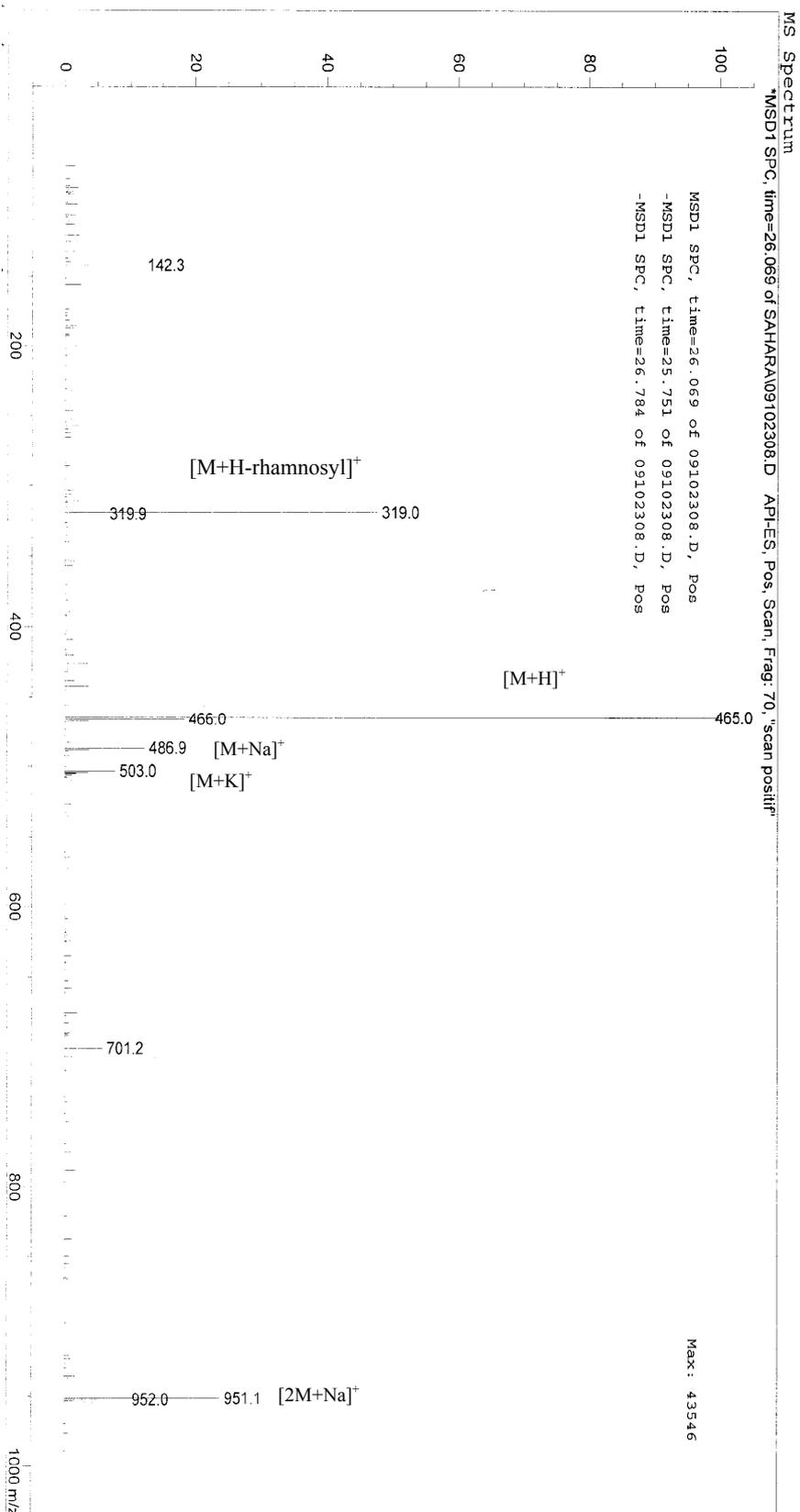


Fig. IV-10: Spectre de masse en APCI positive du composé R₁₁₁₁

Fig. IV-11 : Spectre RMN -¹H (250 MHz, MeOD, δ/ppm, J/Hz) du composé R₁₁₁

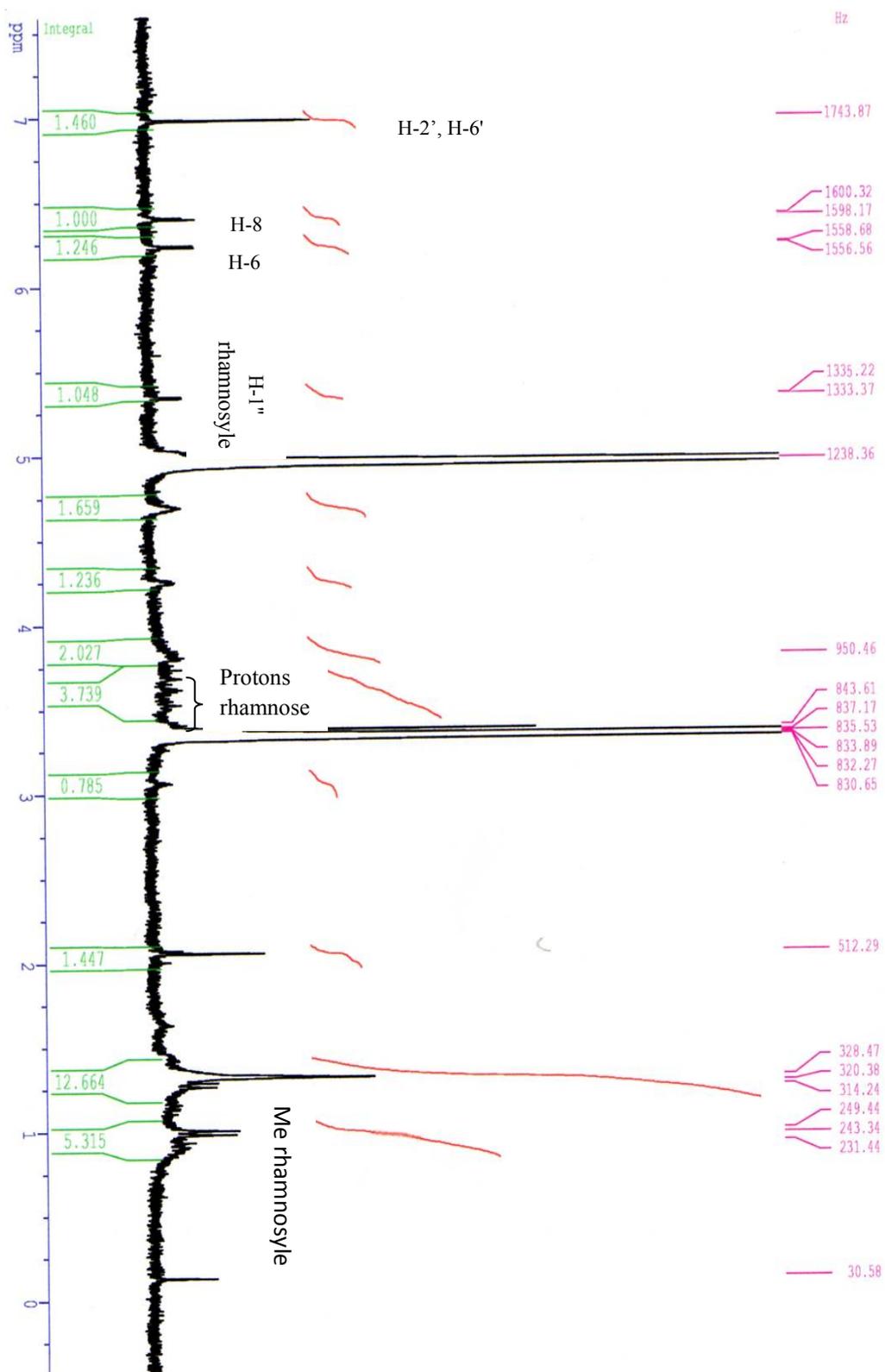


Fig. IV-12 : Spectre RMN-¹H (250 MHz, MeOD, δ/ppm, J/Hz) étalé (5.25 à 7 ppm) du composé R₁₁₁

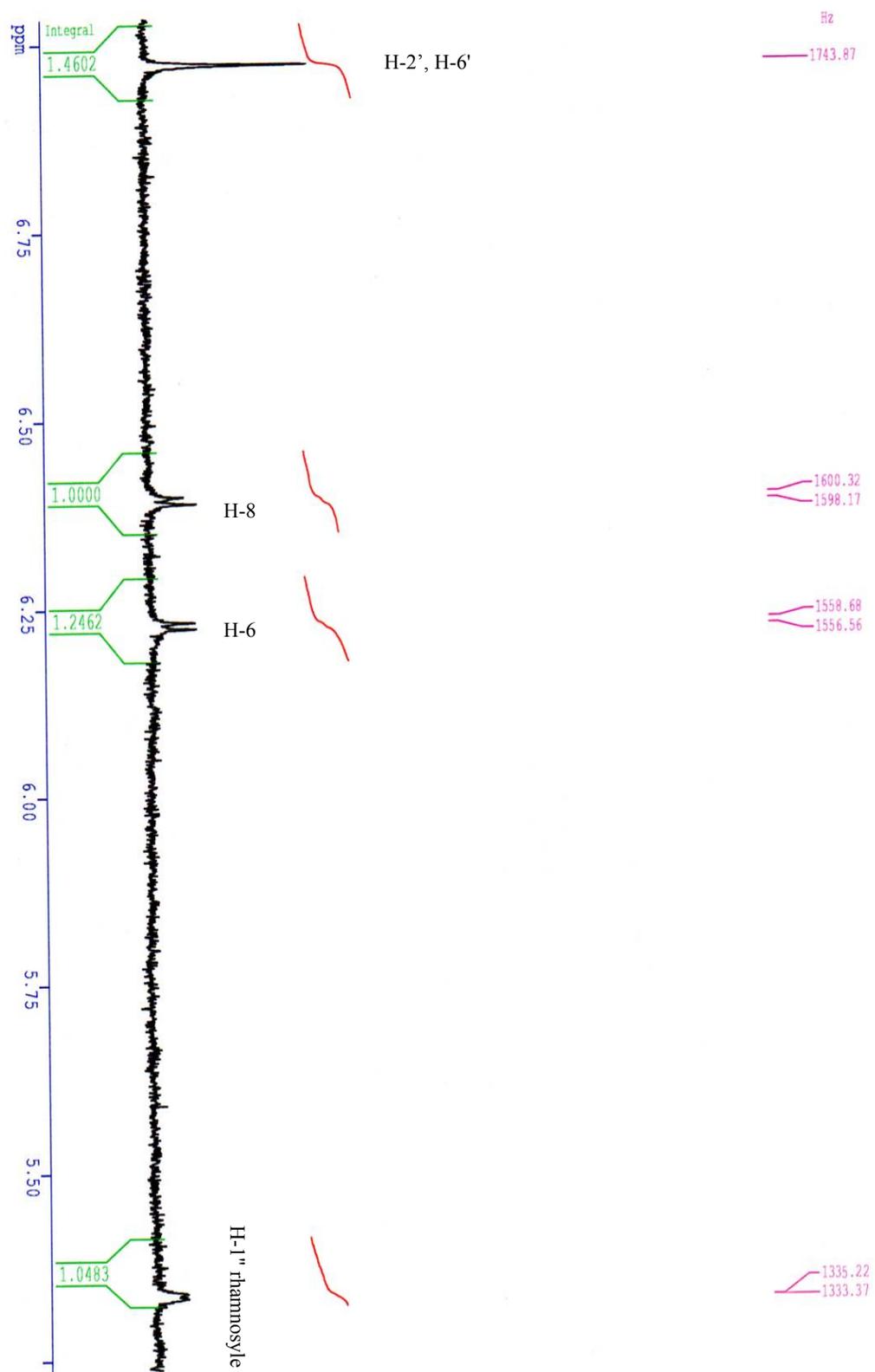
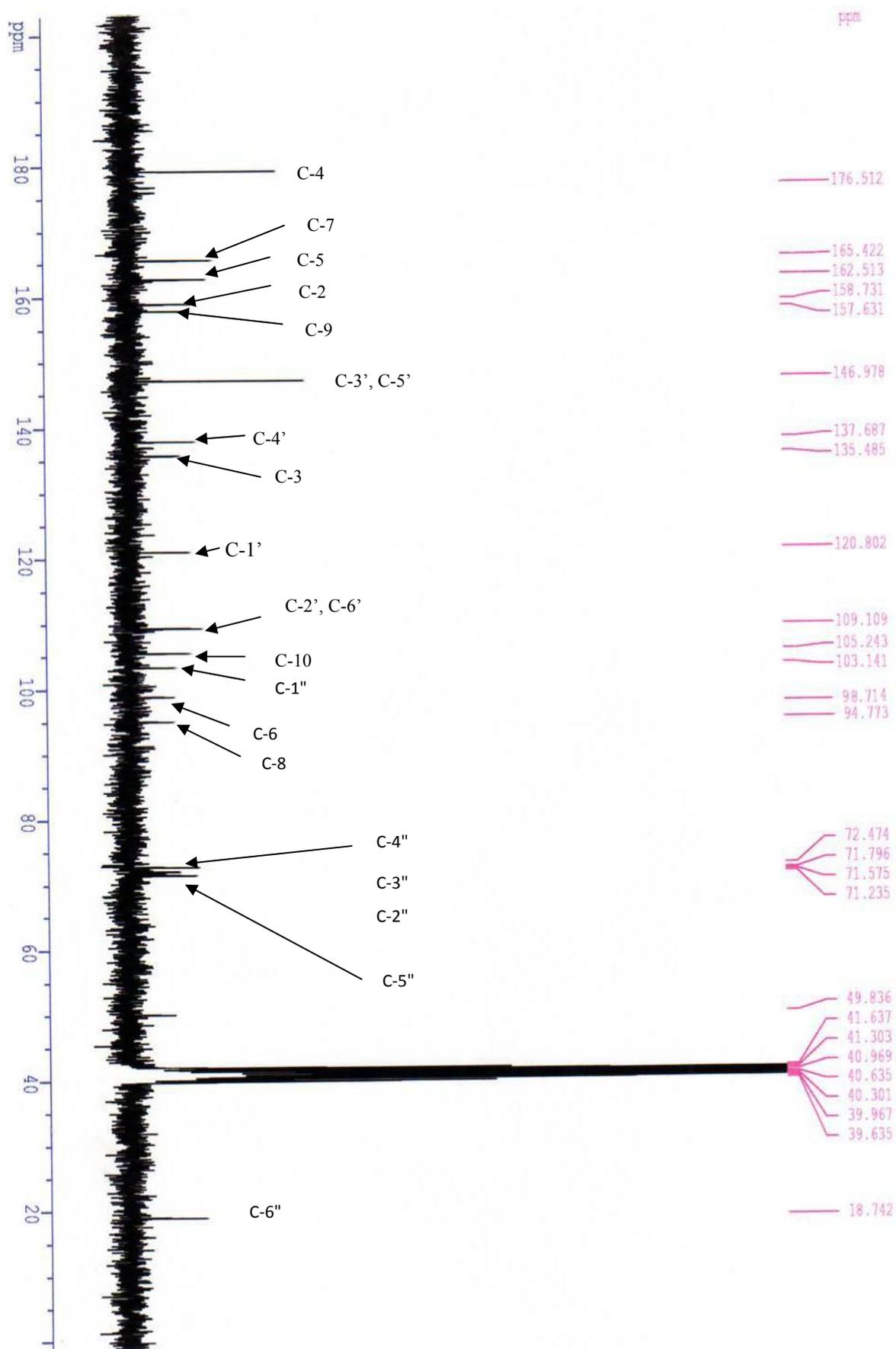


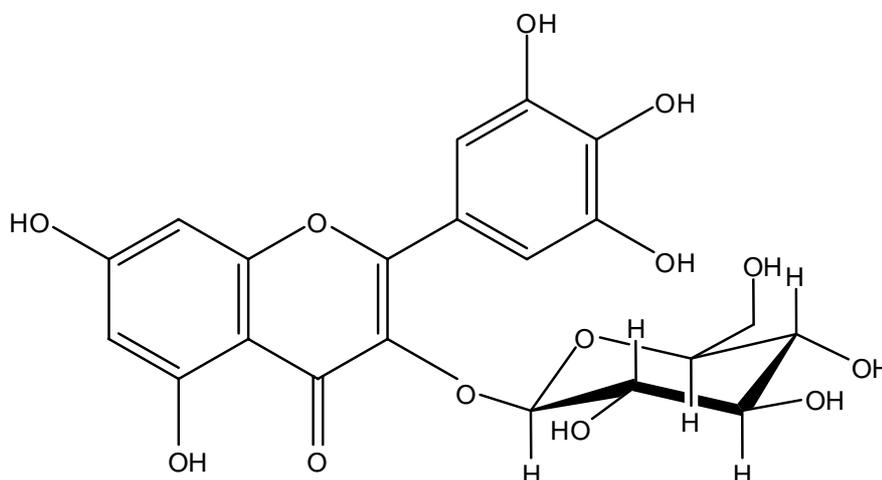
Fig. IV-13 : Spectre RMN-¹³C (250MHz, DMSO-d₆, δ/ppm) du composé R₁₁₁



IV-3- Elucidation structurale du composé G₁₁₁ :

5, 7, 3', 4', 5'- pentahydroxyflavone -3-O-β - glucoside

(Myricétine-3-O-β - glucoside).



IV-3- 1-Comportement chromatographique :

Systèmes	SI	SII	SIII
Rf	0.08	0.18	0.22
Fluorescence	Violette		
Temps de rétention t _R (mn)	20.36		

IV-3- 2-Les données spectrales :

a- Données des spectres UV-Visible :

	Réactifs	Maximum d'absorption : λ_{max} (nm)		
		Bande I	Bandes intermédiaires	Bande II
1 ^{ère} série	MeOH	365	303	259
	+NaOH	414	324	271
	+NaOH+5mn	408	/	271
2 ^{ème} série	MeOH	364	305	258
	+AlCl ₃	406	/	265
	+AlCl ₃ +HCl	373	310	268
3 ^{ème} série	MeOH	364	304	258
	+NaOAc	378	330	273
	+NaOAc+H ₃ BO ₃	390	299	260

b- Spectre RMN-¹H :

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité J(Hz)	Attribution
12.70	1H	S	OH en 5
7.24	2H	S	H-2', H-6'
6.4	1H	d (1.97)	H-8
6.2	1H	d (1.99)	H-6
5.38	1H	d (7.72)	H-1'' du glucose
Les autres protons du glucose résonnent entre 3.25 et 3.75 ppm.			

c- Spectre RMN-¹³C :

Déplacement chimique δ (ppm)	Attribution
177.822	C-4
164.559	C-7
161.628	C-5
156.645	C-2
156.585	C-9
145.791	C-3', C-5'
137.114	C-4'
134.127	C-3
120.342	C-1'
108.927	C-2', C-6'
104.295	C-10
102.384	C-1''
99.081	C-6
93.804	C-8
76.343	C-5''
73.661	C-3''
71.598	C-2''
68.414	C-4''
60.449	C-6''

d- Spectre de masse :

m/z	Ions	Pourcentage
481	$[M+H]^+$	100
319	$[M+H\text{-glucosyl}]^+$	10
503	$[M+Na]^+$	10
519	$[M+K]^+$	10
983	$[2M+Na]^+$	25

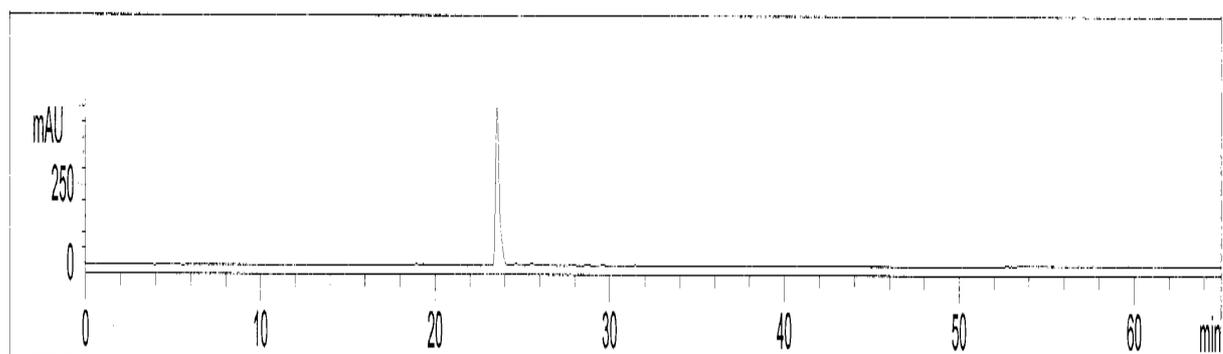


Fig. IV-14 : chromatogramme (HPLC) de G₁₁₁

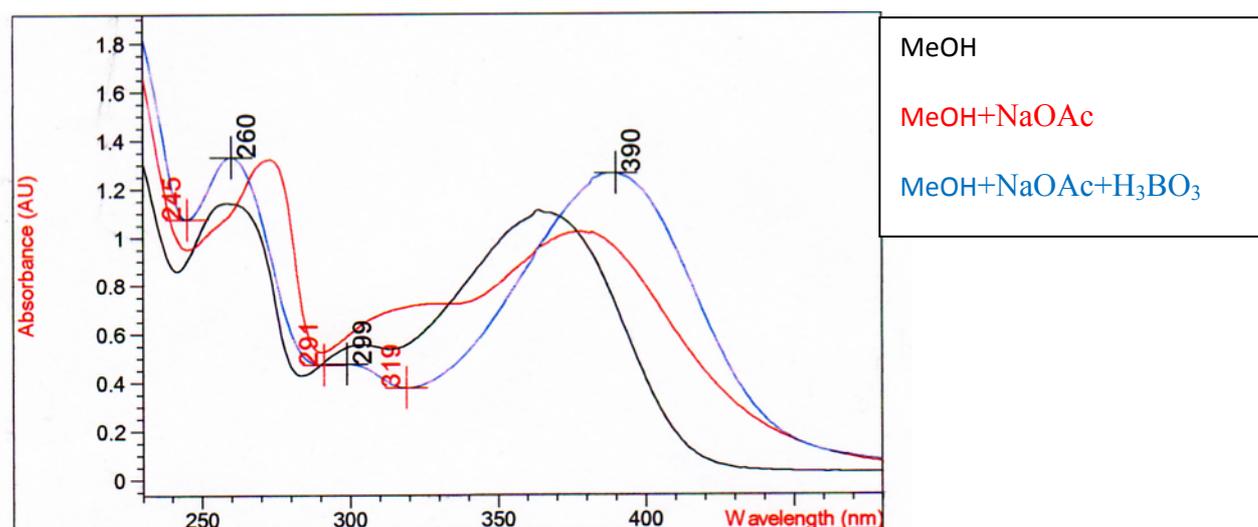
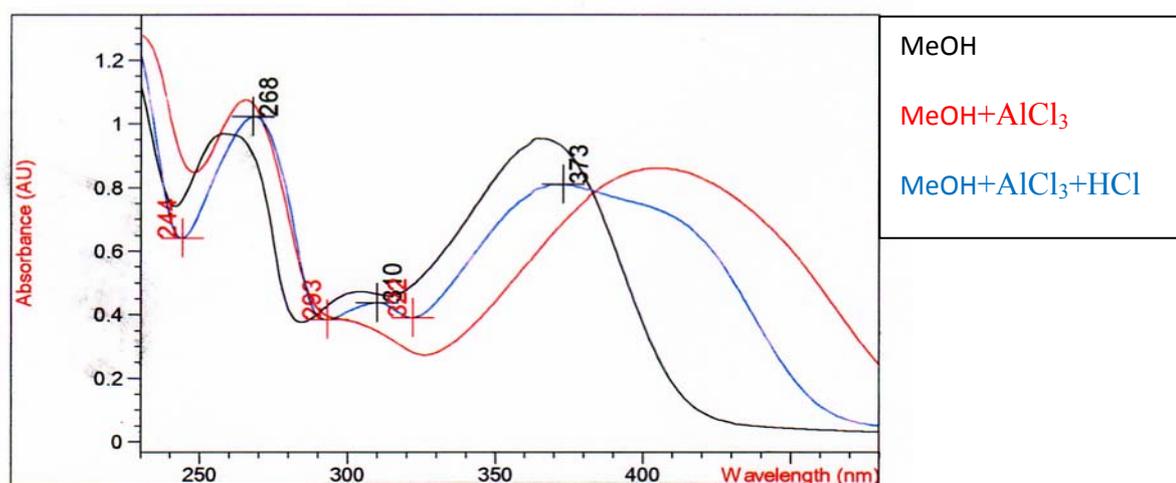
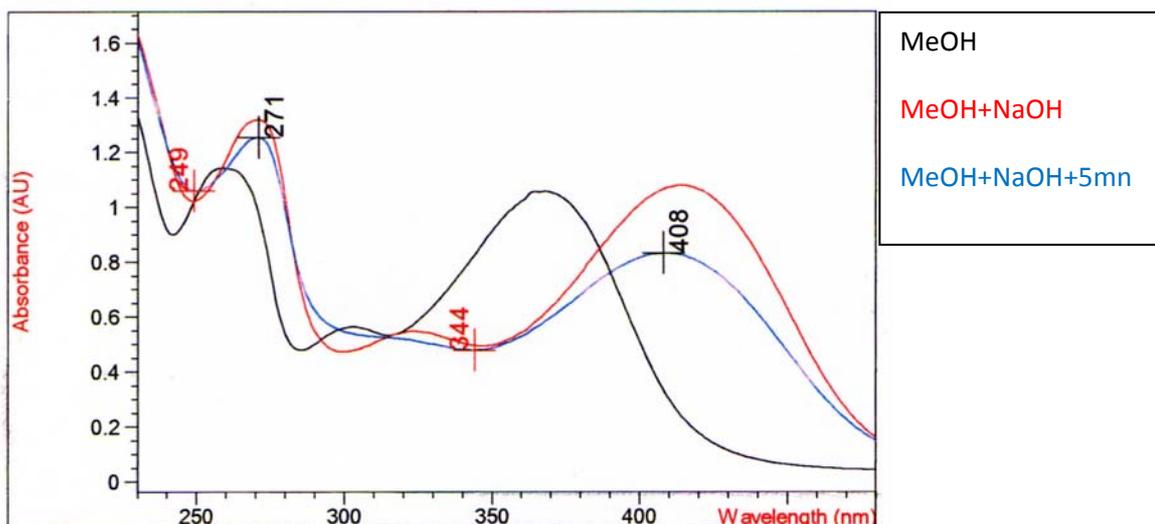


Fig. IV-15 : Série Spectrale UV-Visible du composé G₁₁₁

Le produit G₁₁₁ présente une fluorescence violette sous lumière de Wood. Ses différentes valeurs de R_f dans les systèmes de solvants SI, SII et SIII respectivement égales à 0.08, 0.18, et 0.22 ; la valeur de son temps de rétention de 20.36nm et son spectre UV-visible dans le méthanol présentant deux bandes d'absorption, l'une à $\lambda_{\text{max}} = 365\text{nm}$ (bande I) et l'autre à $\lambda_{\text{max}} = 259\text{nm}$ (bande II) militent pour une approche d'un flavonol (mono hétéroside) bloqué en position 3.

Le spectre en présence de l'hydroxyde de sodium présente un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +49\text{nm}$) par rapport au spectre méthanolique révèle la présence d'un hydroxyle libre en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans ce spectre à 324nm indique la présence d'un OH libre en position 7, confirmé par l'effet bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +15\text{nm}$) du spectre en présence de l'acétate de sodium comparé au spectre méthanolique.

La bande I du spectre ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) présente un déplacement hypsochrome de 33nm par rapport au spectre enregistré dans AlCl_3 , montre que le noyau B est orthodihydroxylé. Cette dernière est confirmée par la présence du déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +26\text{nm}$) du spectre ($\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$) par rapport à celui du méthanol.

L'hydrolyse acide de ce composé libère le glucose comme sucre révélé par co-chromatographie en présence des échantillons authentiques alors que la génine a été identifiée comme étant la Myricétine par sa fluorescence jaune sous lumière de Wood et son comportement chromatographique en présence de témoins authentiques. Tous ces résultats confirment que la substitution est en position 3.

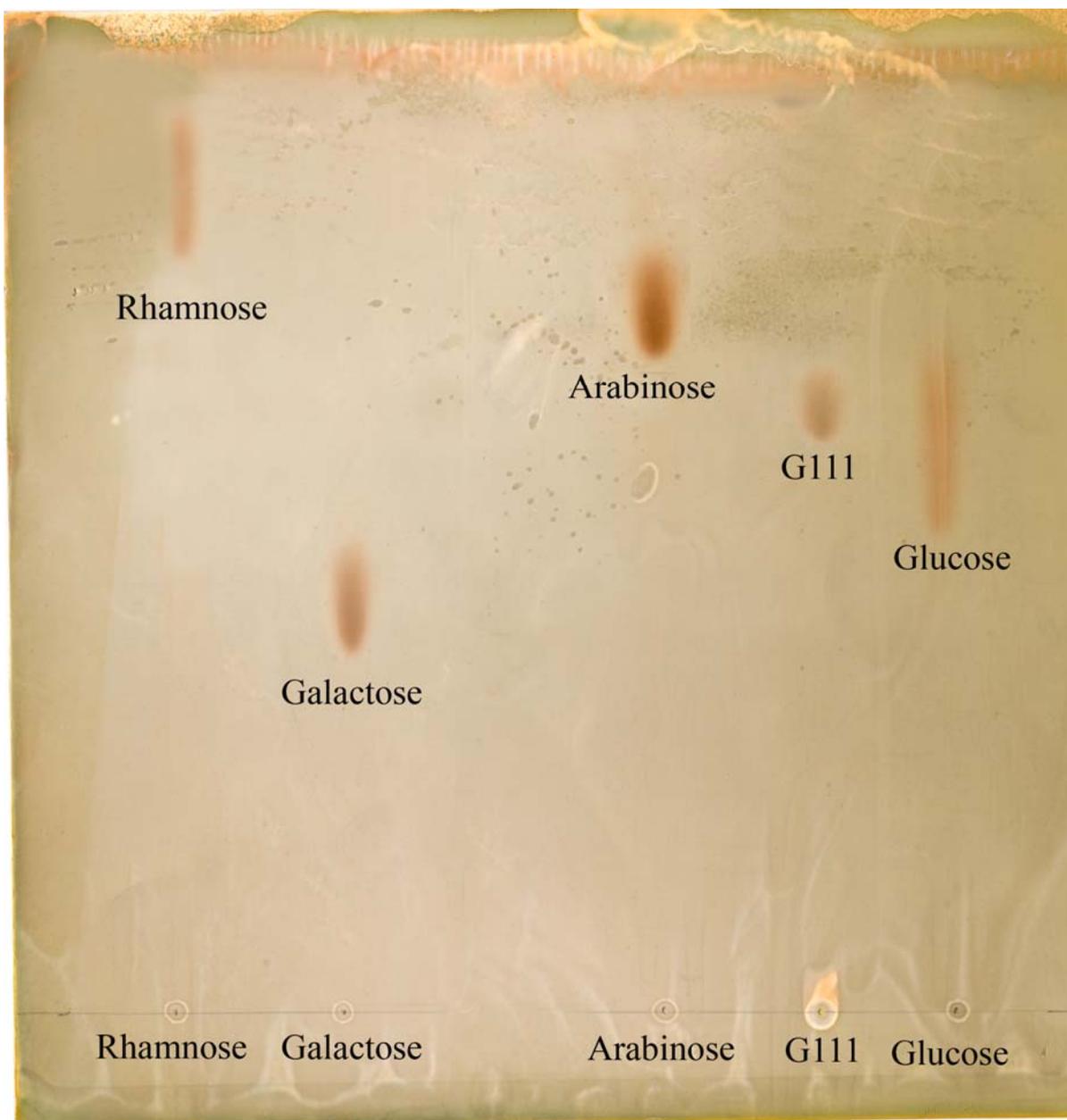


Fig. IV-16 :Co-chromatographie de la phase aqueuse du composé G₁₁₁

Le spectre RMN proton enregistré sur un spectromètre RMN, 250Hz dans le DMSO montre la présence d'un groupement glucosyle dont le proton anomérique est observé sous forme d'un doublet à $\delta = 5.38\text{ppm}$ avec une constante de couplage $J = 7.72\text{Hz}$ qui montre que le sucre glucose est β lié à la génine et dans l'intervalle $3.25 - 3.75\text{ppm}$ se trouvent les autres protons du sucre glucose.

Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6.4\text{ppm}$ et le second à $\delta = 6.2\text{ ppm}$ de même constante de couplage $J=1.9\text{Hz}$ (couplage méta) attribuable à H-8 et H-6 respectivement indiquant la substitution du cycle A dans les positions 5 et 7. Le signal d'intégration 1H à $\delta = 12.70\text{ppm}$ confirme la présence d'un OH libre en position 5 du cycle A.

Un singulet d'intégration 2H à 7.24ppm attribuables à H-2' et H-6' (existence d'une symétrie sur le cycle B), confirme l'hydroxylation des positions 3', 4', 5' du noyau B.

La présence du groupement glucosyl est encore confirmée par le spectre du carbone-13 qui montre la résonance de ses carbones comme suit : 102.38 (C-1'') , 76.343 (C-5'') , 73.661 (C-3'') , 71.598 (C-2'') , 68.414 (C-4'') , 60.449 (C-6'') .

Toutes ces informations mènent à la structure : 5, 7, 3', 4', 5', pentahydroxyflavone - 3-O- β - glucoside.

Cette structure est confirmée par le spectre de masse en APCI positive qui présente un pic à $m/z = 481$ (pic de base 100%) et un deuxième pic à 319 (10%) correspondants respectivement à $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}+\text{H}\text{-glucosyl}]^+$ d'où la masse moléculaire de ce composé G_{111} est 480 .

Avec toutes ces indications, on peut affirmer qu'il s'agit bien de 5, 7, 3', 4', 5', pentahydroxyflavone -3-O- β - glucoside connue sous le nom Myricétine-3-O- β - glucoside.

Fig. IV-17 : Spectre RMN ¹H (250MH,DMSO,δppm) du composé G₁₁₁

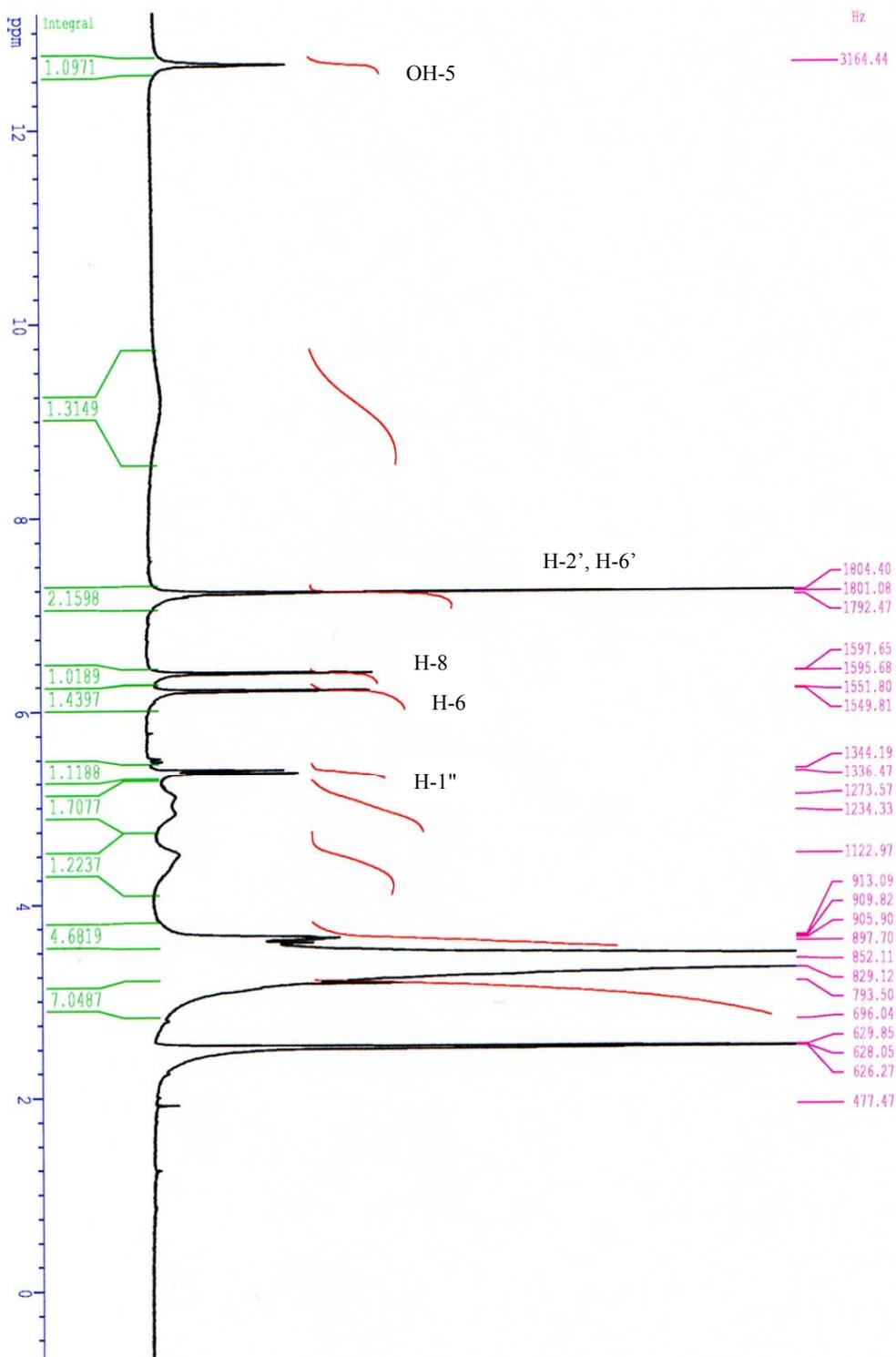


Fig. IV-18 : Spectre RMN ^1H (250MHz, DMSO, δ ppm) du composé G₁₁₁ après étalement (4.25à 6.5ppm)

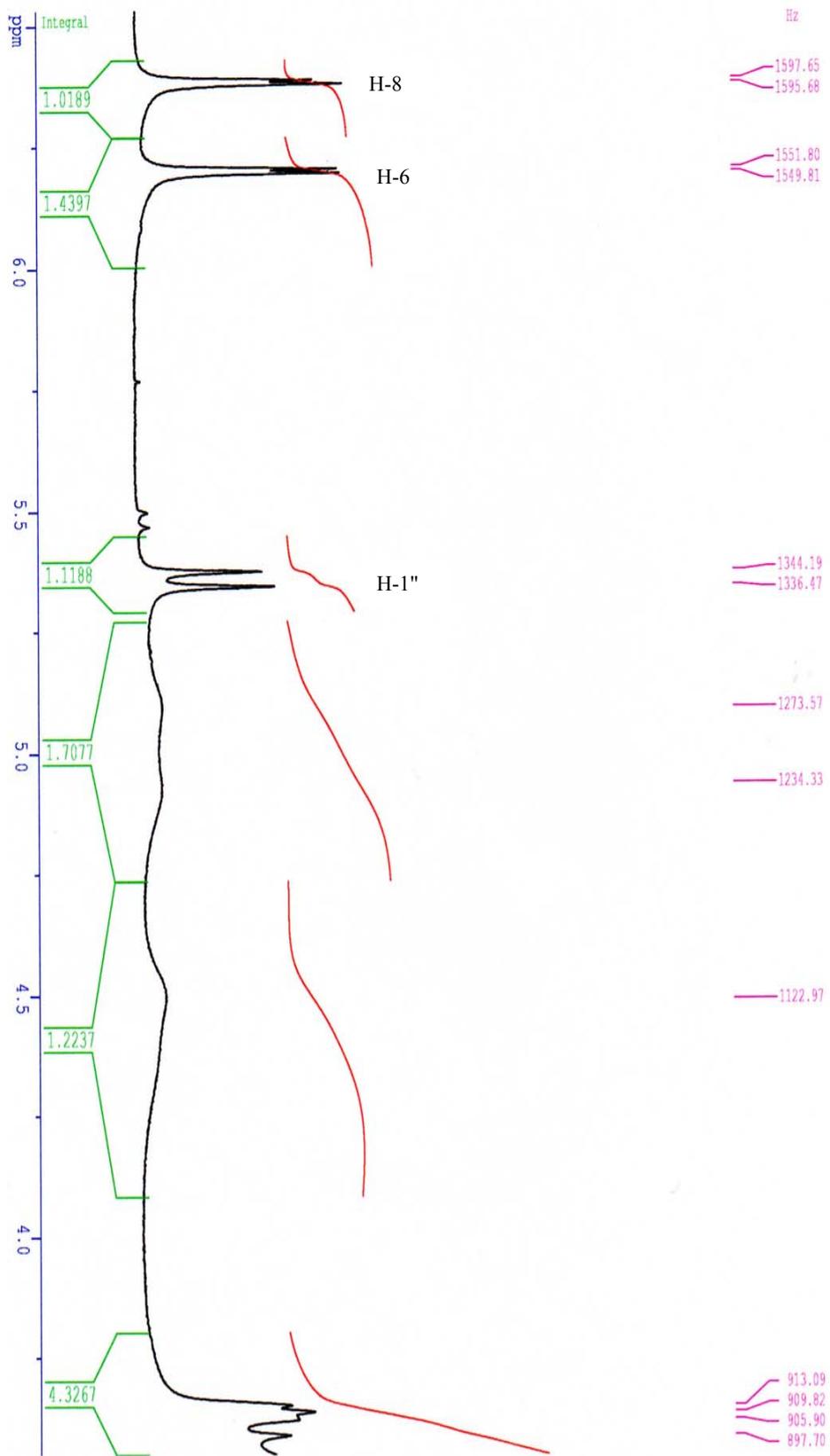
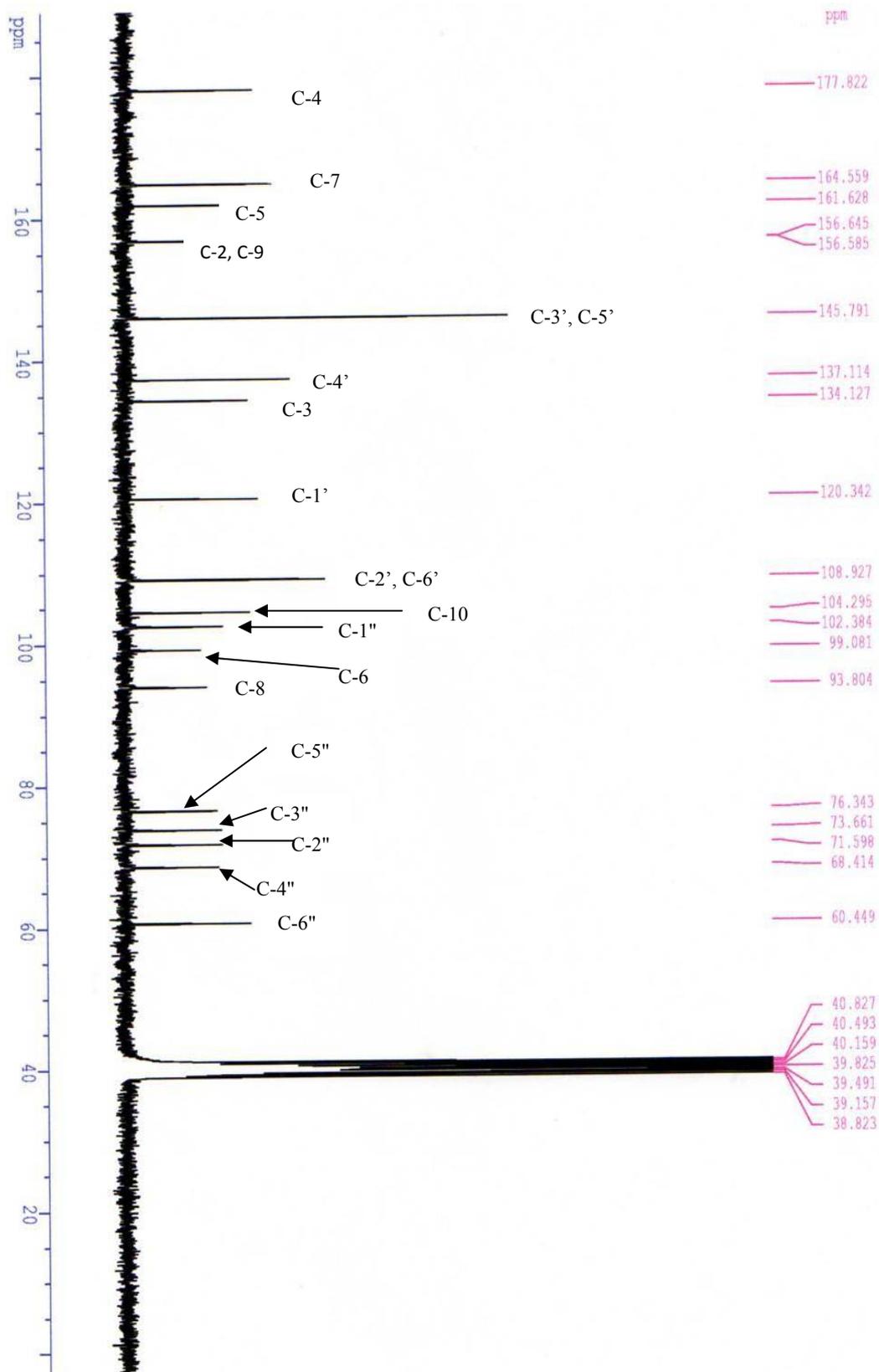


Fig. IV-19 : Spectre RMN ^{13}C (250MH,DMSO, δ ppm) du composé G_{111}



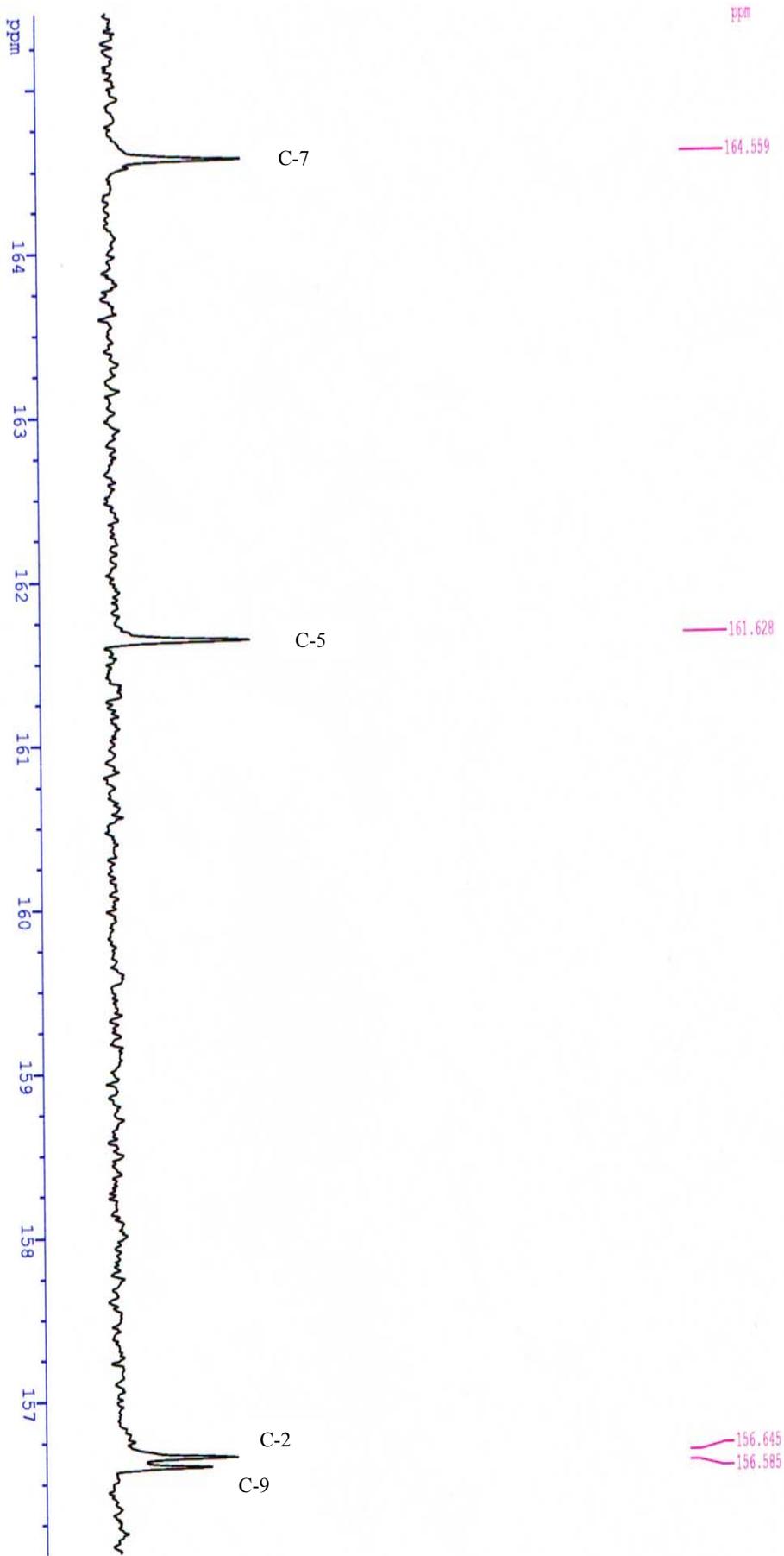


Fig. IV-20: Spectre RMN ^{13}C (250MH,DMSO, δ ppm) du composé G_{111} après étallement

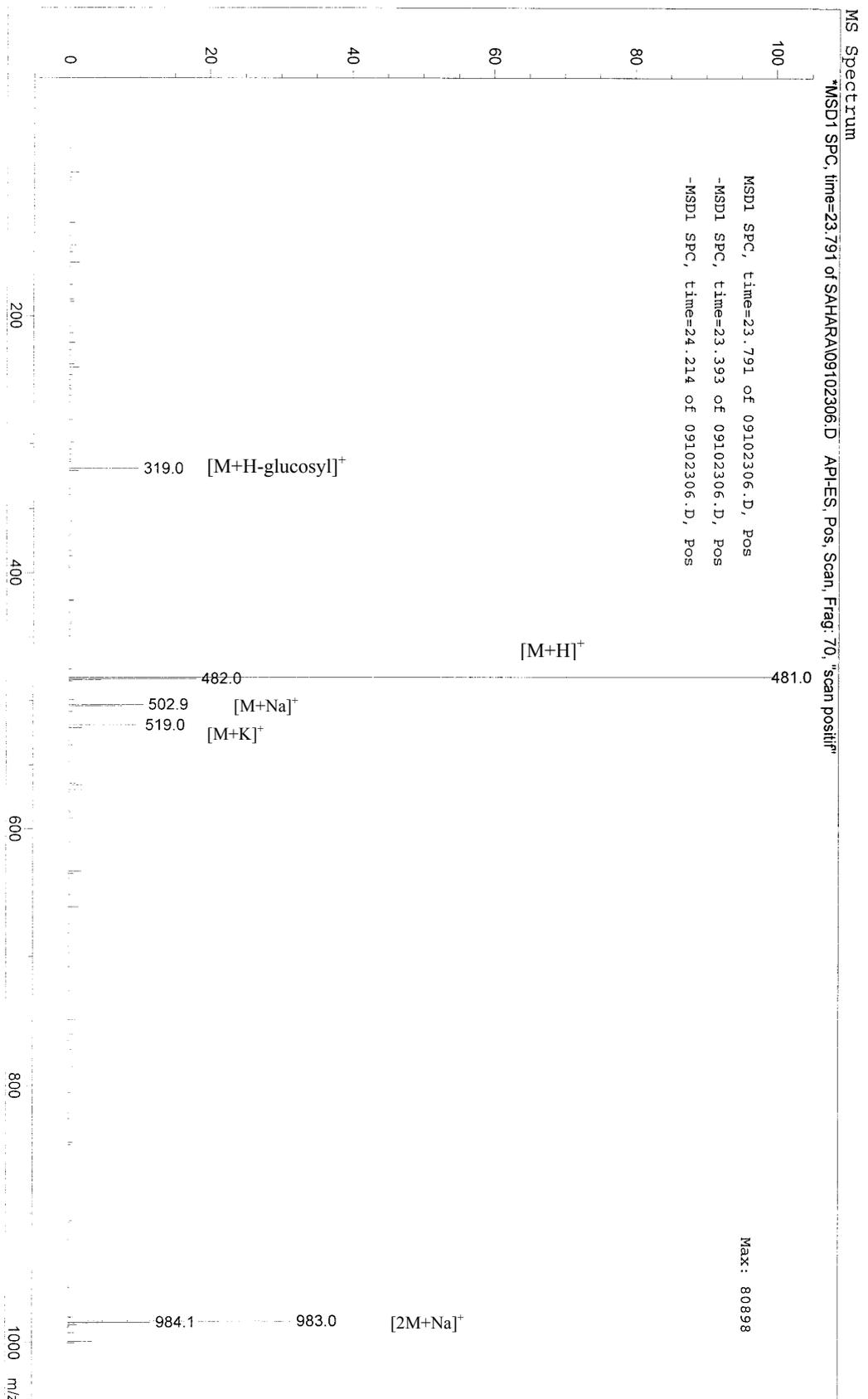


Fig. IV-21 : Spectre de masse AP-ESI positif du composé G₁₁₁

Conclusion générale

L'objectif principal fixé au départ et qui peut être défini comme étant (à travers l'obtention puis l'identification structurale de quelques flavonoïdes de l'espèce *Myrtus communis* L. Un exemple bien complet d'une pratique phytochimique non pas totale mais plutôt spécifique à un genre de produits naturels issus de végétaux en l'occurrence les flavonoïdes et qui a notre sens a été atteint.

En effet, ce travail nous a permis d'apprendre comment aborder et gérer une suite d'opérations de purification et bien sûr apprendre à utiliser des données d'ordre spectroscopiques afin d'identifier un composé organique.

D'autre part, au cours de la réalisation de ce travail, nous avons appris surtout comment optimiser les méthodes ; ce qui permettra à coup sûr de gagner du temps et de l'argent.

Pour ce qui est des résultats, on a pu isoler et identifier trois produits de type flavonol :

- 3, 5, 7, 3', 4', 5'- hexahydroxyflavone (Myricétine).
- 5, 7, 3', 4', 5'-pentahydroxyflavone-3-O- α - rhamnoside
(Myricétine-3-O- α - rhamnoside).
- 5, 7, 3', 4', 5'- pentahydroxyflavone -3-O- β - glucoside
(Myricétine-3-O- β - glucoside).

Ce nombre de composé représente une partie de la carte flavonique de *Myrtus communis* L. à partir du moment où notre objectif premier était de bien mener ce travail et surtout d'aller au bout ; chose qui a été élucidée pour les trois composés.

Ceci étant, on espère dans un avenir proche continuer ce travail de manière à établir toute la carte flavonique pour cette espèce et à l'occasion aborder d'autres techniques de séparation et surtout d'analyse structurale et peut être aborder aussi le côté tests biologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Ahmed, F.Z., Rizk, A.M. and Hamouda, F.M. (1970),**
Postep Dziedzinie Lzku Rosl, Pr. Ref. Dosw. Wygloszone Symp, p. 20-23.
- [2] **Audier, H. (1966),**
Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse.
Bull. Soc. Chim. Fr. 9, p. 2892-2899
- [3] **Aylin, S., Ilhan, G., Cemal, C., Erdem, Y. (2004),**
Journal of Ethnopharmacology 93, p. 311-318.
- [4] **Becchi, M. and Fraisse, D. (1989),**
Biomedical and environmental mass spectrometry 18, p.122-130.
- [5] **Berthillier, A. (1972),**
La chromatographie et ses applications», Dunod paris.
- [6] **Bhavna, S., Chandrajeet, B., Partha, R. (2008),**
Food and chemical Toxicology 46, p. 2376-2383 .
- [7] **Bruneton, J. (1964),**
Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 1^{ème} édition, Lavoisier, Paris.
- [8] **Bruneton, J. (1993),**
Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2^{ème} édition, Lavoisier, Paris.
- [9] **Bruneton, J. (1999),**
Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3^{ème} édition, Lavoisier, Paris.
- [10] **Burret, F., Lebreton, Ph, and Voirin, B. (1982),**
J. Nat. Prod. , 45, p. 687.

- [11] **Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L. (1997),**
Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships,
Free Radic. Biol. Med. 22, p. 749-760.
- [12] **Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., Varma, S.D. (1983),**
Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin.
Biochem Pharmacol. 32, p. 1995-1998.
- [13] **Chun, L.Y., Jian, W. L., Dong, Z.W., Yan, H.L., Feng, Q. (2004),**
Pharmacological Research 50, p. 505-510.
- [14] **Chun, L.Y., Yan, H.L., Dong, Z.w. (2004),**
Phytochemistry 65 , p. 445-447.
- [15] **Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., Bruyne, T.D., Hermans, N., Totté, J.,
Pieters, L., Vlietinck, A.J. (2002),**
Journal of Ethnopharmacology 79, p. 213-220.
- [16] **Cook, N.C. and Samman , S. (1996),**
Flavonoids – Chemistry , Metabolism , Cardioprotectives effects and dietary sources ,
J. Nutr. Biochem. , Vol .7 .
- [17] **Chopin, J. (1966),**
Actualité de phytochimie fondamentale, 2^{ème} série, édition Masson, Paris, p.119.
- [18] **Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L.,
Vlietinck, A.J. and Berphe, D.V. (1998),**
Structure- Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of
Xanthine Oxidase and Superoxide scavengers,
J. Nat. Prod. 61, p. 71-76.

- [19] **Deluca, V. and Ibrahim R. K. (1985b),**
Arch. Biochem. Biophysics, p. 606.
- [20] **Duval, C., Duval, R. (1978),**
« Dictionnaire de la Chimie et de ses applications », Edition. Tec & doc Lavoisier, Paris.
- [21] **Ebel, J. and Hahlbrock, K. (1982),**
In the flavonoids advances in research edts J. B. Harborne and T. J. Mabry, Chapman and Hall, London, p. 641-659.
- [22] **Eckhard, W., Rüdiger, W., Marion, D., Günter, L., Stevens, J.F. (2000),**
Phytochemistry 55, p. 965-970.
- [23] **Farid Baba Aïssa (1991),**
Encyclopedie des plantes utiles.
Flore d'algerie et du Maghrab.
- [24] **Gàbor, M. (1988),**
Plants Flavonoids in Biology and Medicine II : Biochemical, Cellular and Medicinal Properties , éd. V. Cody , E. Middleton Jr., J. B. Harborne, A. Beretz , A. R. Liss, inc., New York, p. 1-15.
- [25] **Grêté, P. (1965),**
Précis de botanique, Systématique des angiospermes Tome II ; 2^{ème} édition révisée ,
Faculté de Pharmacie de Paris – Masson , p. 429.
- [26] **Gunther, H. (1994),**
La spectroscopie de RMN, édition Masson, Paris.
- [27] **Gonnet, J.F. (1989),**
Thèse de Doctorat d'état, Université Claude- Bernard, Lyon.

- [28] **Häberlein, H., Tschiersch, K.P. (1994),**
Phytochemistry 35, p.765-768.
- [29] **Hahida, F. and Wanasundara, P.K.J.P.D. (1992),**
Phenolic antioxidants, Crit. Rev.
Food Sci. Nutr. 32 (1), p. 67-103.
- [30] **Halbrock, K., Grisebach, H. (1975),**
Biosynthesis of flavonoids in the flavonoids, edition: Harborne, J.B., Mabry.T.J.,
Mabry, Chapman and Hall, London, p. 866.
- [31] **Harborne, J.B. (1964),**
Biochemistry of phenolic compounds, Academic press, New York.
- [32] **Harborne, J.B. (1966),**
In «Comparative Phytochemistry» (Goodwin, T.W.ed), Academic Press London.
- [33] **Harborne, J. B. (1973),**
Flavonoids in phytochemistry, Lawrence, P. L., Vol. II, Litton Editorial
Publishing, p. 344.
- [34] **HARBORNE, J.B. (1988),**
The flavonoids: advances in research since 1980.
Ed Chapman and Hall, New York.
- [35] **Hassan .A. (1976),**
Thèse de Doctorat de spécialité (3^{ème} cycle), Lyon .
- [36] **Hayder,N., Skandrani, I., Kilani, S., Bouhlel, I., Abdelwahed, A., Ben Ammar,
R., Mahmoud, A., Ghedira, K. , Chekir-Ghedira, L. (2008),**
South Africar Journal of botany 74, p. 121-125.

- [37] **Heller, W. and Forkmann, G. (1988),**
In the flavonoids advances in research since 1980. ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, London, p. 399-425.
- [38] **Hideo, O., Akio, M., Yasuko, Y., Mitsuru, N., Yoshimasa, T. (1993),**
Phytochemistry 33, p. 557-561.
- [39] **Hillis, W.E., Koichiro, I. (1964),**
Phytochemistry 4, p. 541-550.
- [40] **Hostettmann, K., Potteray, O. and Wolfender, J. L. (1998),**
The potential of higher plants as a source of new drugs. Chimie, 52, 10-17.
- [41] **Hussein, S.A.M., Hashem, A.N.M., Seliem, M.A., Lindequist, U., Nawwar, M.A.M. (2003),**
Phytochemistry 64, p. 883-889.
- [42] **Iinuma, M. and Mizuno, M. (1989),**
Phytochemistry, 28, p. 681
- [43] **Jeannette, M., Masahisa, H., Anna, R.B., Ivano, M. (1994),**
Phytochemistry 36, p. 1087-1088.
- [44] **Jurd, L. and Horowitz, R. (1962),**
Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, P. 107-2055.
- [45] **Kamarul'Ain, M., Nigel, B.P., Rex, T. W. (2003),**
Phytochemistry 64, p. 1285-1293.
- [46] **Kamarul'Ain, M., Nigel, B.P. (2005),**
Biochemical systematics and Ecology 33, p. 1049-1059.

- [47] **Kim, H.M., Lee, E.H., Hong, S.H., Song, H.J., Shin, M.K., Kim, S.H., Shin, T.Y. (1998),**
Journal of Ethnopharmacology 60 , p. 125-131.
- [48] **Ling, L.Y., Chih, Y.L., Kun, Y.Y. (2000),**
Cancer letters 157, p. 65-75.
- [49] **Mabry, T.J. (1969),**
In perspectives in phytochemistry (Ed. J.B.Harbone and T.Swain),
P.20, Acad, press, London.
- [50] **Mabry, T.J. (1969),**
The Ultraviolet and nuclear magnetic resonance, Analysis of flavonoids in perspective
in phytochemistry, Edited by J.B.Harbone , p. 1-45 .
- [51] **Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. (1970),**
The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New york , Heidelberg
p. 254.
- [52] **Mahmoud, I.I., Marzouk, M.S.A., Moharram, F.A., El-Gindi,M.R.,
Hassan,A.M.K. (2001),**
Phytochemistry 58, p. 1239-1244.
- [53] **Mahmoud, I.N. (2006),**
Carbohydrate Research 341, p. 160-163.
- [54] **Malcolm , H.D., John, W.V.K., Bruce, M.S., Nigel, B.P., Rosemary, E.A., Peter, J.,
Weavers, R.T. (2004),**
Phytochemistry 65, p. 1255-1264.

- [55] **Marfak ,A. (2003),**
Thèse de Doctorat de spécialité, Université de Limoges.
- [56] **[Markham, K.R. and Mabry, T.J. (1968),**
Phytochemistry 7, p. 1197.
- [57] **Markham, K.R. (1976),**
¹³C NMR of flavonoids-II, Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones.
Tetrahedron 32, p. 2607-2612.
- [58] **Markham, K.R. and Mabry, T.J. (1975),**
In the flavonoids , (Harborne, J.B. , Mabry , T, J and Mabry , H . editions Chapman
and Hall, London, p. 45.
- [59] **Markham, K.R. (1982),**
Technique of flavonoids identification, Academic press, London.
- [60] **Markham, K.R. (1989),**
Flavones, flavonols and their glycosides. In Methods in plant
biochemistry. vol. I, Plant phenolics. New York Academic Press: J. B. Harborne, Ed,
p. 197-235.
- [61] **Markham, K.R. and Geiger, H. (1993),**
The Flavonoids Advances in research since 1986. Edited by J. B. HARBORNE,
Chapman & Hall. London.
- [62] **Mario, J.S., Seiji, A., Satoshi, T., Yang, H., Kurt, A.R., Margaret, J.B.,
Roberto, R.G., Bernard, I.W., Edward, J.K. (2008),**
Food chemistry 107, p. 813-819.

- [63] **Michael , F.R., Southwell , I.A. (2003),**
Phytochemistry 62 , p. 683-689.
- [64] **Middleton. E., Kardasnam. Jr.C. (1993),**
The Flavonoids, Advances in research since 1986 ,éd. Harborne J.B., Chapman and Hall
London , p. 617 – 652.
- [65] **Montoro, P., Tuberoso, C.I.G., Piacente, S., Perrone, A., Vincenzo, D.F.,
Cabras, P., comiso, P. (2006),**
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41 , P. 1614-1619.
- [66] **Morio, Y., Hideyuk, I., Kyoko, M., Tsutomu, H., Shoko, T., Yoshiaki, A.,
Takashi, Y. (2008),**
Phytochemistry 69, p. 3062-3069.
- [67] **Muhamed, F.A., Sabry, I.N., Hosny, M.L., Nabel, A.N. (1980),**
Phytochemistry 19, p. 2629-2632.
- [68] **Murakami ,N., Mostaqi,H.M., Tamura, S., Itagak, S., and Horü, T. (2001),**
A new anti- malaria flavonol glucoside from hydrangea dulcis Folium
(Hydrangea macrophylla) Bioorg Med. Chem. Lett.11, p. 2445-2447.
- [69] **Nair, A.G.R., Krishnan, S., Ravikrishna, C., Madhusudanan, K.P. (1999),**
Fitoterapia 70, p. 148-151.
- [70] **Nguyen, T.D., Jung, M.K., Sun, C.K. (2008),**
Food and chemical Toxicology 46, p. 3632-3639.
- [71] **Nguyen, T.D., Vivek, K.B., Jung, I.Y., Sun, C.K. (2009),**
Food and chemical Toxicology 47, p. 449-453.

- [72] **Ogunwande, I.A., Olawore, N.O., Ekundayo, O., Walker, T.M., Schmidt, J.M., Setzer, W.N. (2005),**
International journal of Aromatherapy 15, p. 147-152.
- [73] **Okamura, H., Mimura, A., Yakou, Y., Niwano, M., Takahara, Y. (1993),**
Phytochemistry 33, P.557-561.
- [74] **Oldrich, L., Klejdus, B., Ladislav, K., Michaela, D., Khaled, A., Vlastimil, K., Richard, H. (2005),**
Biochemical systematics and Ecology 33, p. 983-992.
- [75] **Ong, K.C., Khoo, H.E. (1997),**
Biological Effects of Myricetin. General Pharmacol. 29, p. 121-126.
- [76] **Ong, K.C., Khoo, H.E. (2000),**
Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. Life Sci. 67, p. 1695-1705.
- [77] **Ozenda, P. (1983),**
Flore du Sahara, Edition du CNRS, Paris.
- [78] **Painuly, P., Tandon, J.S. (1983),**
Phytochemistry 22, p. 243-245.
- [79] **Quezel, P., Santa, S. (1963),**
Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales ; Tome II, CNRS, Paris.
- [80] **Raffaelli, A. (1997),**
Selected Topics and Mass Spectrometry in the Biomolecular sciences . Kluwer Academic. The Netherlands.

- [81] **Ratna, C.P., Birger, H., Braden, B., Lauren, S., Waltner-Law M. (2005),**
Journal of Ethnopharmacology 96 , p. 295-301.
- [82] **Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. (2007),**
Fitoterapia 78 , p. 434-436.
- [83] **Ribereau- Gayou , J. B . (1968),**
The phenolic compounds of vegetals, Edition Dundo, Paris.
- [84] **Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996),**
Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free
Radic. Biol. Med. 20, p. 933-956.
- [85] **Richter, G. (1993),**
Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie). Presses polytechniques
et universitaires romandes, Lansanne CH-1015
- [86] **Romina, V.B., Miriam, G.E. (2008),**
Food microbiology 25, P. 324-334
- [87] **Rosa, M.P.G., Sylvia, M., Rosario, V.S. (2008) ,**
Journal of Ethnopharmacology 117, p. 1-27.
- [88] **Sarker, S.D., Bartholomew, B., Nash , R.J., Simmonds, M.S.J. (2001),**
Biochemical systematics and Ecology 29, p. 759-762.
- [89] **Simirgiotics, M.J., Adachi, S., Satoshi, T., Yang, H., Reynertson, K.A., Basile,
M.J., Roberto, R.G., Weinstein, I.B., Kennelly, E.J. (2008),**
Food chemistry 107 , p. 813-819.
- [90] **Slowing, K., Söllhuber, M., Carretero, E., Villar, A. (1994),**
Phytochemistry 37, p.255-258.

- [91] **Stefan, M., Mithöfer, A. (2006),**
Phytochemistry 67, p. 521.
- [92] **Tatsuya, H., Fumihide, T., Takanobu, T., Masato, N., Tomihisa, O. (2008),**
Phytochemistry 69, p. 747-753.
- [93] **Thermo Electron . (2003),**
Finnigan Ion Max APPI Source , Operator's Manual , Revision A 97055 – 97021.
- [94] **Van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996),**
Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids.
Free Rad. Biol. Med. 20, p. 331-342.
- [95] **Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I. (2006),**
Phytochemistry 67, p. 1249-1255.
- [96] **Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerzys, R. (2007),**
Food chemistry 105, p. 940-949.
- [97] **Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.-I. and Nishioka, I. (1998),**
Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, Biochem.Pharmacol. 56 (2), p. 213-222.
- [98] **Yoshimura, M., Hideyuki, I., Miyashita, K., hatano T., Taniguchi, S., Amakura, Y., Yoshida, T. (2008),**
Phytochemistry 69, p. 3062-3069.
- [99] **Zaidi, F., (2005),**
Thèse Doctorat d'Etat en chimie Organique Option Phytochimie.

Résumé

Le but principal de ce travail est d'isoler et d'identifier les métabolites secondaires de type flavonoïde de l'espèce *Myrtus communis* L. appartenant à la famille des myrtacées.

L'utilisation des différentes méthodes de séparations chromatographiques (colonne, papier, couche mince) a permis d'isoler trois composés flavoniques, et grâce à l'hydrolyse acide et aux méthodes spectroscopiques usuelles (UV, RMN, masse), les structures de ces flavonoïdes ont été établies comme suivant :

- 3, 5, 7, 3', 4', 5' - hexahydroxyflavone (Myricétine).
- 5, 7, 3', 4', 5' - pentahydroxyflavone-3-O- α - rhamnoside
(Myricétine-3-O- α - rhamnoside).
- 5, 7, 3', 4', 5' - pentahydroxyflavone -3-O- β - glucoside
(Myricétine-3-O- β - glucoside).

ملخص

الهدف الرئيسي لهذا البحث هو فصل و تحديد البنى الكيميائية لنواتج الأيض الثانوي الفلافونيدي للنبته *Myrtus communis* L. التي تنتمي إلى العائلة myrtaceae ، و قد تمكنا من فصل ثلاث مركبات فلافونيدية باستعمال مختلف التقنيات الكروماتوغرافية (كروماتوغرافيا العمود CC ، كروماتوغرافيا الورق CP، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM)، باستعمال الإماهة الحمضية ، و مختلف طرق التحليل الفيزيائية من مطيافية الأشعة فوق البنفسجية، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي و مطيافية الكتلة، تم تحديد بنى المركبات المفصولة:

- 3, 5, 7, 3', 4', 5'- hexahydroxyflavone (Myricétine).
- 5, 7, 3', 4', 5'-pentahydroxyflavone-3- O- α - rhamnoside
(Myricétine-3- O - α - rhamnoside).
- 5, 7, 3', 4', 5'- pentahydroxyflavone - 3- O- β - glucoside
(Myricétine -3- O- β - glucoside).

Abstract

The principal aim of the present work consisted to identify the secondary metabolites (flavonoïds) of *Myrtus communis* L. belonging of the Myrtaceae family.

The use of the different chromatographic methods (column, paper, thin layer) permitted the isolation of three flavonoïds, and with using the acid hydrolysis and usual spectroscopic methods (UV, NMR, Mass), the structures of this compounds were established as :

- 3, 5, 7, 3', 4', 5' - hexahydroxyflavone (Myricetin).
- 5, 7, 3', 4', 5' - pentahydroxyflavone -3- O- α - rhamnoside
(Myrecitin-3- O - α - rhamnoside).
- 5, 7, 3', 4', 5' - pentahydroxyflavone -3- O- β - glucoside
(Myricetin- 3- O- β - glucoside).