

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mentouri de Constantine

Faculté des Sciences Exactes

Département de Chimie

N° d'ordre :.....

Série :.....

Mémoire Présenté pour obtenir le diplôme de magister

En Chimie Organique

Option : Phytochimie

Intitulé :

Recherche et Détermination structurale des métabolites secondaires de

l'espèce : ZYGOPHYLLUM CORNUTUM

(ZYGOPHYLLACEAE)

Par : Radia AYAD

Devant le jury :

Président : A. Belattar

Prof. U.Mentouri-Constantine

Rapporteur : K.Medjroubi

Prof. U.Mentouri-Constantine

Examineur : S.Akkal

Prof. U.Mentouri-Constantine

Examineur : R.Benkiniouar

M.C. U.Mentouri-Constantine

2008

A mes parents, A mon oncle Seddik
Les trois êtres qui m'ont fait au berceau
Le don le plus précieux, celui de la foi

A mes sœurs Dalel, Ryma, Fatima et Meryem

A mes deux frères Mohamed et Ibrahim

A tous mes amis et surtout la promotion de l'année 2005.

Avant-propos

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au laboratoire de : Phytochimie et analyse physico-chimiques et biologiques de l'université Mentouri-Constantine.

Il ne me serait pas possible de présenter ce mémoire sans témoigner de ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Kamel Medjroubi de m'avoir accueilli dans son laboratoire ; de son aide scientifique et de ses conseils. Je suis très sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant d'être Rapporteur et de participer à ce jury.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Abd El Hamid Belattar de m'avoir fait l'honneur d'être président et de participer à ce jury.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Salah Akkal de m'avoir fait l'honneur d'être Examineur et de participer au jury de ce mémoire.

Il m'est aussi agréable de remercier Monsieur Rachid Benkiniouar, Maître de conférences à l'université Mentouri-Constantine de m'avoir fait l'honneur d'être Examineur et de participer au jury de ce mémoire.

Je suis particulièrement reconnaissante envers M^{lle} Souheila Maître assistante à l'université Mentouri-Constantine pour l'aide scientifique et les conseils qu'elle m' a prodigués, sa constante disponibilité, sa grande expérience et sa grande sympathie ont plus que contribué à la réalisation de ce travail de recherche.

Je remercie profondément Monsieur Lakhdar Djjerri Chargé de cours à l'université Mentouri-Constantine pour sa présence très appréciée dans notre laboratoire et ses conseils indiscutables.

Nombreuses sont les personnes qui m'ont aidé à l'élaboration de ce travail. C'est aussi à elles que s'adressent mes remerciements et ma sympathie surtout Salima, Nadjat, Nadjah, Mounia et Mustapha.

SOMMAIRE :

Introduction générale.....	8
Références bibliographiques.....	11

Partie Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : la famille des zygothylaceae

I-1-Introduction.....	14
I-2- La famille des Zygothylaceae.....	14
I-3-Classification	14
I-4-Intérêt biologique de la famille Zygothylaceae.....	15
I-5-Les métabolites secondaires isolés de la famille Zygothylaceae.....	16
I-5-1- Les alcaloïdes.....	16
I-5-2- Les composés flavoniques.....	16
I-5-3- Les lignanes.....	23
I-5-4- Les triterpénoides.....	25
Références bibliographiques.....	26

CHAPITRE II : Terpènes et stéroïdes

II-1-Introduction.....	32
II-2-Les terpènes.....	33
II-3-Règle isoprène et biosynthèse des terpènes.....	34
II-4-Classes des terpènes.....	37
II-4-a-Les monoterpènes.....	38
II-4-b-Les sesquiterpènes.....	39
II-4-c-Les diterpènes.....	40
II-4-d-Les triterpènes.....	41
II-4-e-Les stéroïdes.....	41
II-4-f-Les stérols.....	43
II-4-g-Les tetraterpènes.....	47
II-4-h-Les polyterpènes.....	47
Références bibliographiques.....	48

CHAPITRE III : flavonoides

III-1-Introduction.....	55
III-2-Structure chimique et nomenclature.....	55
III-3-Biosynthèse des flavonoides.....	58
III-4-Classification des flavonoides.....	61
III-4-a-Flavones et flavonols.....	61
III-4-b-Flavanones.....	61
III-4-c-Isoflavones.....	62
III-4-d-Chalcones et auronés.....	63
III-4-e-Anthocyanines et anthocyanidines.....	64
III-5-Substitution de squelette flavonique.....	65
III-5-1-La O-substitution.....	65
III-5-1a-L'hydroxylation.....	65
III-5-1b-La méthylation.....	65
III-5-1c-La O-glycosylation.....	65
III-5-2-La C-substitution.....	66
III-5-2a-La C-méthylation.....	66
III-5-2b-La C-glycosylation.....	66
III-6-Diversité et distribution.....	67
III-7-Le rôle des flavonoides dans les plantes.....	69
III-8-Activité anti-oxydante : Relation structure-activité.....	69
III-9- Flavonoides et santé.....	71
III-10- Flavonoides et synthèse organique.....	73
III-11-Etude chimique des flavonoides.....	76
III-11-1-Extraction.....	76
III-11-2-Séparation et purification.....	76
III-12-Analyse structurale des flavonoides.....	77
III-12-1-Facteur de retardement et comportement chromatographique.....	77
III-12-2-Fluorescence sous lumière de Wood.....	77
III-12-3-La spectrophotométrie UV visible.....	78
III-12-4-L'hydrolyse acide des hétérosides.....	81
III-12-5-La spectrométrie de masse.....	81
III-12-6-La résonance magnétique nucléaire.....	81

Références bibliographiques.....	82
----------------------------------	----

CHAPITRE IV : Partie expérimentale

IV-1-Etude chimique de l'espèce <i>Zygodphyllum Cornutum</i>	92
IV-1-1- Choix du matériel végétal.....	92
IV-1-2-Place dans la systématique.....	92
IV-1-3-Description botanique.....	92
IV-1-4-Récolte de la matière végétale.....	92
IV-1-5-Extraction.....	93
IV-1-6-Séparation chromatographique sur colonne.....	97
IV-1-6-1-Séparation et purification des composés de l'extrait acétate d'éthyle.....	97
IV-1-6-2- Séparation et purification des composés de l'extrait n-butanolique.....	99
Conclusion.....	101
Références bibliographiques.....	102

CHAPITRE V : Résultats et discussions

V-1-Elucidation structurale de composé P ₂₉	105
V-2- Elucidation structurale de composé P ₉₁	109
Références bibliographiques.....	119
Conclusion.....	121

Introduction générale

Introduction générale

Le temps n'est pas si lointain ou l'on ne parlait pas de sa santé. Celle-ci était la condition de l'existence. On ne s'en préoccupait que lorsque le corps refusait par trop et trop péniblement-les services qui lui étaient demandés.il fallait être « dur au mal ».

Aujourd'hui, la santé est devenue pour chacun une préoccupation majeure. Notre société, consciente des risques que comporte le mode de vie actuel, est passé du quasi-refus de la maladie au souci permanent de sa prévention. Et il s'agit d'une évolution des mentalités, sans la quelle aucun bénéfice réel n'aurait pu être espéré des immenses progrès accomplis en médecine au long du XX^e siècle.

Certes, la médecine restera toujours, et fort heureusement à la fois un art et une forme particulière de relation directe entre deux êtres, le malade et son médecin, ce qu'aucun ouvrage ne saurait remplacer, mais, dans le même temps, elle bénéficie de plus en plus, et de manière accélérée, des acquis des autres sciences de la recherche [1].

A l'ère de la médecine moderne, des sulfamides, des antibiotiques, des hormones, des corticoïdes et autres produits de synthèse aux noms extraordinaires toujours plus nombreux, il peut encore paraître étrange à certains, de revenir sur des thérapeutiques constituées par la seule utilisation des plantes, et de certains végétaux.

Comme tout nouvel événement de taille, la fabrication de médicaments de synthèse semblait en effet pouvoir permettre de légitimes espoirs, accaparant l'esprit d'une grande majorité de chercheurs et de praticiens, mais en réalité, les plantes médicinales et les végétaux, n'ont jamais cessé d'être étudiés ni d'être utilisés depuis l'antiquité ; d'abord pour se nourrir, puis pour se soigner [2].En effet au début de l'année 1900 et avant l'ère synthétique,80% de tous les remèdes ont été obtenus à partir des racines,écorces et feuilles des plantes [3].

Si , depuis des années leur étoile a quelque peu ou plus fortement pali, c'est qu'avec l'ère chimique, on crut à tous moments avoir découvert « des substances qui guérissent » ou peu s'en fallait les panacées guérissant rapidement et à coup sur dépourvues par ailleurs de tous inconvénients [2].

De confiance, l'humanité a placé sa foi au sein de la conviction que « pour tous les maux ; il existait un remède qui sera trouvé dans les plantes et les forêts [3], et comme **Rudyard Kipling** écrit en 1910 « Anything green that grew out of the mould was an excellent herb to our fathers of old » [4].

L'utilisation de plantes comme médicaments a exigé la détermination de leurs composés actifs, cela a commencé par l'isolement de la morphine de l'opium au début du 19^{ème} siècle [5,6], et suivie par l'isolement d'autres drogues comme la cocaïne, la codéine, la digitoxine et la quinine dont certains d'entre eux sont utilisées jusqu'à présent [6-8].

Il est intéressant de noter que l'analyse des nouvelles entités chimiques entre 1981 et 2002 révèle que environ 28% de ces composés sont des produits naturels ou leurs dérivés [9], ces produits naturels fournissent un point de départ pour des nouveaux composés synthétiques, avec diverses structures et stéréocentres [10-13], ainsi durant cette période 20% de composés synthétiques sont imités de produits naturels [9]. La combinaison de ces catégories de la recherche sur les produits naturels représente environ 48% des entités chimiques nouvelles signalés entre 1981 et 2002 [10-13].

Personne ne peut nier l'importance des plantes médicinales et la découverte des produits naturels, en fait la plupart de nouvelles applications cliniques de métabolites secondaires des plantes et de leurs dérivés au cours du dernier demi-siècle ont été engagés dans la lutte contre le cancer [7-9], en effet entre 1940 et 2002, 40% des médicaments anti-cancéreux étaient des produits naturels et leurs dérivés, par contre seulement 8% ont été synthétiques et même imités de ces produits [9].

La découverte et l'évolution de médicaments à base de plantes médicinales sont liées à de nombreux domaines de la recherche et diverses méthodes d'analyse :

Le processus commence généralement avec un botaniste, ethnobotaniste, ethnopharmacologiste ou un écologiste de spécialité végétale, qui recueille et identifie la plante d'intérêt, la collection touche les espèces dont on connaît l'activité biologique pour lesquels les composés actifs n'ont pas été isolés ou des taxons qui peuvent être recueillies au hasard pour la découverte[14], les phytochimistes sont responsables de la préparation des extraits des plantes, ces derniers sont ensuite passés au pharmacologistes pour les tests biologiques, lorsque on met l'accent sur l'activité biologique, les phytochimistes commencent à isoler et caractériser les composés actifs[5,6].

Au cours de ce mémoire, notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de molécules d'origine végétale à activités biologiques. Et se divisera donc en cinq chapitres :

Le premier sera consacré à une étude bibliographique concernant la famille des **Zygophyllaceae**, l'intérêt biologique de leurs espèces et leurs métabolites secondaires les plus courants.

Dans le deuxième chapitre, nous aborderons la famille des terpènes, la biosynthèse et la classification de ces composés et d'une façon particulière nous présenterons la famille des

stéroïdes et les phytostérols, leur biosynthèse et quelques activités biologiques attribués à cette branche de composés naturels.

Le troisième chapitre, sera réservé à l'étude chimique (structure et nomenclature), biosynthétique (origine et classification) et nutritionnelle (distribution dans les aliments) des flavonoides, dans ce chapitre nous exposerons également l'intérêt thérapeutique de ces composés, ceci sera suivi par un bref rappel de quelques méthodes de synthèse organique concernant les flavonoides et on termine par l'étude chimique de ces derniers.

Le quatrième chapitre, nous nous intéresserons à l'étude chimique de l'espèce *Zygodhylum Cornutum*, basé sur l'extraction de ses métabolites secondaires en débutant par la macération, puis la séparation et la purification de différents produits isolés. Enfin, dans le dernier chapitre, nous essayerons de déterminer la structure chimique de ces composés isolés par combinaison de différentes méthodes spectroscopiques (UV, RMN¹H, RMN¹³C).

Références bibliographiques :

- [1] Petit Larousse de la médecine, 2002. Larousse, VUEF.
- [2] Valnet, J., 1995. « Traitement des maladies par les légumes, les fruits et les céréales », 9^e Edition, Maloine S.A.-Editeur, pp : 29,31.
- [3] James, D.M., Sylesh, K.V., John, T.H., 2007. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68,2015-2022.
- [4] Kipling, R., 1910. “Our Fathers of Old” in *Rewards and Fairies*. Doubleday, Page and Company, New York.
- [5] Kinghorn, A.D., 2001. Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53 (2), 135–148.
- [6] Samuelsson, G., 2004. *Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy*, 5th Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm.
- [7] Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports* 17 (3), 215– 234.
- [8] Butler, M.S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products* 67 (12), 2141– 2153.
- [9] Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products* 66 (7), 1022– 1037.
- [10] Clardy, J., Walsh, C., 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432 (7019), 829– 837.
- [11] Nicolaou, K.C., Snyder, S.A., 2004. The essence of total synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (33), 11929– 11936.
- [12] Peterson, E.A., Overman, L.E., 2004. Contiguous stereogenic quaternary carbons: a daunting challenge in natural products synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (33), 11943– 11948.
- [13] Koehn, F.E., Carter, G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4 (3), 206– 220.
- [14] Baker, J.T., Borris, R.P., Carte, B., Cordell, G.A., Soejarto, D.D., Cragg, G.M., Gupta, M.P., Iwu, M.M., Madulid, D.R., Tyler, V.E., 1995. Natural products drug discovery and development: new perspectives on international collaboration. *Journal of Natural Products* 58 (9), 1325– 1357.

Partie synthèse bibliographique

Chapitre I : La famille zygophyllaceae

I-1- Introduction :

Il est généralement estimé qu'il y a environ 300.000 espèces de plantes supérieures [1], cependant certains reportent le nombre à 250.000.

D'autres estiment que le nombre est aussi élevé que 500.000, cette disparité du nombre est particulièrement liée à la différence de philosophie systématique chez les botanistes et la grande diversité des environnements et les forêts tropicales où on peut rencontrer des espèces nouvelles de plantes, continuellement.

Parmi ces 300.000 espèces de plantes, environ 1% ; soit 3000 ont été utilisés pour nourriture, dont environ 150 ont été commercialement cultivées.

D'autre part, à peu près 10.000 de ces plantes ont été documentées pour l'usage médicinal ; elles sont beaucoup plus que celles utilisées dans l'alimentation, mais il est encore un très faible pourcentage de toutes les plantes supérieures [2].

Ces espèces sont décrites et nommées suivant la nomenclature introduite en 1753 par **Karl Von Linné**, elles sont regroupées dans 300 familles différentes [3].

La flore algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques [4], reste très peu explorée sur le plan phytochimique ainsi que pharmacologique.

Dans ce qui suit, nous nous allons intéresser à la famille des **Zygophyllaceae** :

I-2- La famille des zygophyllaceae :

Les plantes appartenant à cette famille, sont très reconnaissables à l'aspect de ses herbes, arbustes, ou arbres, elles ont des feuilles stipulées, très polymorphes.

Les fleurs de 4 à 5 mères, isolées ou inflorescences, la corolle, est également de 4 à 5 mères, et parfois nulle.

Généralement, ces plantes renferment 10 étamines, le plus souvent, à stipules unies, un ovaire de 4 à 5 carpelles, à un ou plusieurs ovules par loge.

Ses fruits, sont en général, capsulés, loculicides, ou septicides, se dissociant en coques, parfois bacciformes, ou drupacés [4].

I-3-Classification :

Les zygophyllacées, dans la classification de **Sheahan** et **Chase**, constituent une famille avec environ 285 espèces, qui se subdivisent en cinq sous-familles et 27 genres [5,6].

Elles sont largement distribuées dans les régions arides, semi-arides, les terrains salés, et les pâturages désertiques [4-6].

Les Zygophylloideae, constituent la sous famille la plus large avec 180 espèces, regroupées en quatre genres :

Augea (monotypique), *Tetraena* (monotypique), *Fagonia* (30 espèces), et *Zygophyllum* (150 espèces), de coté de quatre autres sous-familles : Larreoideae, Morkillioideae, Seetzenioideae et Tribuloideae [5-8].

I-4-Intérêt biologique de la famille Zygophyllaceae :

Beaucoup d'espèces de cette famille ont des propriétés thérapeutiques remarquables, et sont utilisés en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance thérapeutique :

Balanites aegyptiaca : c'est une plante riche en saponines [9-10], elle a plusieurs activités : Anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anti-nociceptives [11], anti-fongiques [12], anti-septiques, anti-malaria, anti-syphiliques et anti-virales [13-14], traditionnellement, ses extraits aqueux sont utilisés dans le traitement de la jaunisse et le diabète [15].

Larrea divaricata : c'est une plante populaire en médecine, elle est utilisée dans le traitement des tumeurs : des maladies inflammatoires, des rhumatismes et de la fièvre [16-19].

Larrea tridentata : c'est une plante désertique [20], elle est largement utilisée dans la thérapeutique, ses extraits peuvent soigner l'acné et les psoriasis et en même temps ont des effets cicatrisants, anti-fongiques et anti-viral [21-23], elle a aussi des activités analgésiques, anti-inflammatoires et anti-oxydantes [26-28].

Peganum harmala : ses extraits sont utilisés dans le traitement, de diabète et l'hypertension artérielle [29].

Zygophyllum eichwaldii : cette espèce a des propriétés nombreuses, anti-septiques, anti-eczéma, anti-diabétiques, anti-bactériennes et anti-fongiques [30].

Zygophyllum coccineum : c'est une plante commune en médecine traditionnelle dans les pays méditerranéens, elle est utilisée contre le rhumatisme, la goutte et l'hypertension [31], et le diabète [32].

Zygophyllum gaetulum : très connue avec ses propriétés anti-diabétiques [33], elle est également anti-spasmodique, anti-eczéma et un bon remède pour l'estomac [34].

Zygophyllum album : ses extraits aqueux sont utilisés dans le traitement des diarrhées [35] et du diabète [36]. Ils sont carminatifs, anti-septiques, et stimulants [37].

Zygophyllum geslini : cette espèce est utilisée contre le diabète [38], elle a également des activités cytotoxiques [39].

I-5-Les métabolites secondaires isolés de la famille zygophyllaceae :

I-5- 1-Les alcaloïdes :

Le terme alcaloïde a été introduit pour la première fois par le pharmacien allemand **Meissner** [40], les alcaloïdes représentent un groupe très vaste de métabolites secondaires avec structure, distribution et activités biologiques diverses [41].

Ils sont extraits en majorité (15%-30%) des plantes à fleurs [42], en effet, environ 10.000 alcaloïdes de structures différentes ont été isolés à partir de plusieurs plantes regroupés en ~300 familles [43]. à savoir : on peut trouver 40 alcaloïdes dans la même plante par exemple : *Vinca major* [44].

Concernant la famille des zygophyllaceae, la production d'alcaloïdes est signalée chez l'espèce *Peganum harmala* [45].

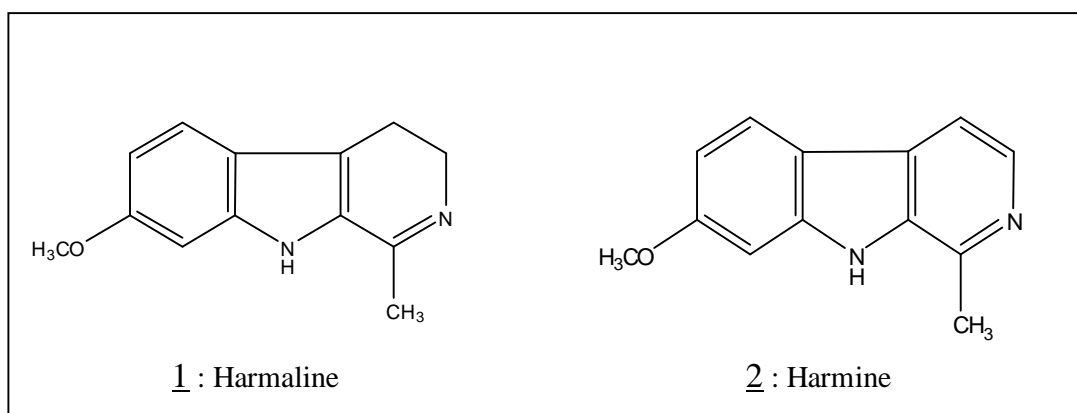


Fig.I-1 : structures chimiques de quelques alcaloïdes isolés de *Peganum harmala*

I-5-2-Les composés flavoniques :

Ces composés sont largement présents dans les plantes, on y trouve comme des pigments de couleur jaune et blanche (latin *Flavus* = Jaune). La rutine a été découverte dans l'espèce « *Ruta Graveolens* » en 1842 ; elle est ensuite connue comme la vitamine P. Les flavonoïdes peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de la plante à côté des chlorophylles et caroténoïdes [44].

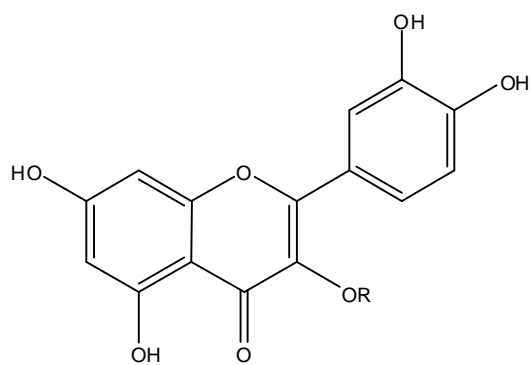
Ces composés phénoliques sont isolés à partir de nombreuses plantes appartenant à la famille des zygophyllaceae.

Le tableau I-1 : montre quelques composés flavoniques isolés d'espèces de cette famille.

Nom de l'espèce	Nom du composé isolé	N°de structure		Réf	
<i>Balanites aegyptiaca</i>	Quercetine-3- <i>O</i> -glucoside	3	3a	[46]	
	Quercetine-3- <i>O</i> -rutinoside		3b		
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -glucoside	4	4a		
	Isorhamnetine-3,7-diglucoside		4b		
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -rutinoside		4c		
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -rhamnogalactoside		4d		
<i>Fagonia arabica</i>	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -glucoside	4	4a	[47]	
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -rutinoside		4c		
	Herbactine-3- <i>O</i> -rutinoside	5	5a		
	Herbactine-3,7-diglucoside		5b		
	Herbactine-3- <i>O</i> -rutinoside-7- <i>O</i> -glucoside		5c		
<i>Fagonia mollis-complex</i>	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	6	6b	[48]	
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -rutinoside	4	4c		
<i>Fagonia taekholmiana</i>	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -glucoside	4	4a	[47]	
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -rutinoside		4c		
	Herbactine-3- <i>O</i> -rutinoside	5	5a		
	Herbactine-3,7-diglucoside		5b		
	Herbactine-3- <i>O</i> -rutinoside-7- <i>O</i> -glucoside		5c		
	Apigenine	7	7a		
	Apigenine-7- <i>O</i> -glucoside		7b		
	Kaempferol-3- <i>O</i> - glucoside	6	6c		
	Kaempferol-3,7-di- <i>O</i> -rhamnoside		6d		
	Kaempferol-3- <i>O</i> -β-L-arabinopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranoside-7- <i>O</i> -α-L- rhamnopyranoside		6e		
	Quercetine	3	3a'		[49]
	Quercetine-3- <i>O</i> -glucoside		3a		

Nom de l'espèce	Nom de produit isolé	N° de structure		Réf
<i>Fagonia tristis</i>	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	6	6b	[48]
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -rutinoside	4	4c	
	8-methoxy herbacetine	5	5d	
<i>Larrea tridentata</i>	3,8,4'-trimethoxy herbacetine	5	5e	[28]
	5,7,4'-trihydroxy-3,8,3'-trimethoxyflavone	8	8a	
	5,7,4'-trihydroxy-3,8-dimethoxyflavone		8b	
	Apigenine	7	7a	
	(+)-dihydroisorhamnetine	4	4j	
	Isokaempferide	6	6i	
<i>Nitraria retusa</i>	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -4-rham- galactosylrobinobioside	4	4k	[49]
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> - robinobioside		4l	
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -rutinoside		4c	
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -galactoside		4m	
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -glucoside		4a	
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -xylosyl-robinobioside		4n	
	Isorhamnetine		4a'	
<i>Peganum harmala</i>	Acacetine-7- <i>O</i> -rhamnoside	9	9a	[50]
	Acacetine-7- <i>O</i> -[6'- <i>O</i> -glucosyl-2''- <i>O</i> -(3''''- acetylramnosyl)] glucoside			
	Acacetine-7- <i>O</i> -(2''''- <i>O</i> -rhamnosyl-2'- <i>O</i> - glucosylglucoside)			

Nom de l'espèce	Nom de produit isolé	N° de structure		Réf
<i>Tribulus alatus</i> <i>Del</i>	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside	4	4e	[51]
	Kaempferol-3- <i>O</i> -(3'',6''-di- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside	6	6e	
	Kaempferol-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside (Tribuloside)		6f	
	Kaempferol-3- <i>O</i> -(3''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside		6h	
	Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside		6c	
	Quercetine-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	3	3a	
<i>Tribulus terrestris</i>	Kaempferol	6	6a	[52]
	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside		6c	
	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside		6b	
	Kaempferol-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside (Tribuloside)		6f	
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside	4	4e	[53]
	Quercetine-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	3	3a	
	Rutine	3	3b	
<i>Tribulus pentandrus</i>	Kaempferol-3- <i>O</i> -(3''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside	6	6h	[53]
	Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside		6c	
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside	4	4e	
	Quercetine-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	3	3a	
<i>Zygophyllum dumosum</i>	Kaempferol	6	6a	[55]
<i>Zygophyllum simplex</i>	Isorhamnetine	4	4a'	[56]
	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -glucoside.		4a	
	Isorhamnetine-6''-(2- <i>E</i> -butenoyl)-3- <i>O</i> -glucoside		4i	

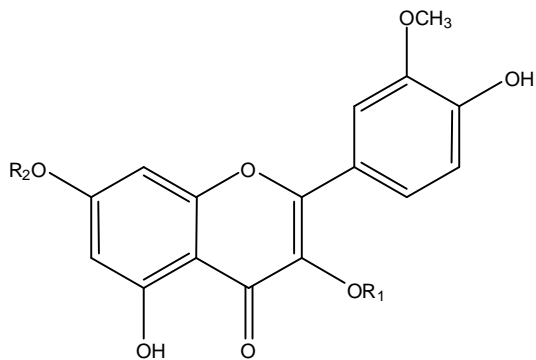


3

3a' : R=H

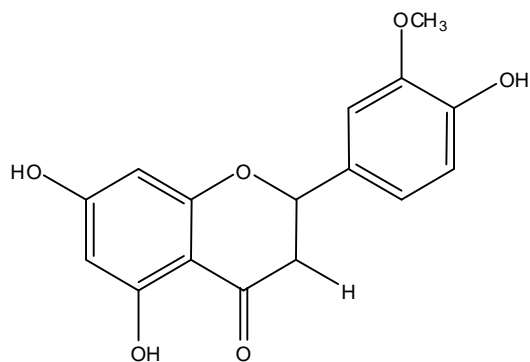
3a : R=Glu

3b : R= Rha (1→6) glu

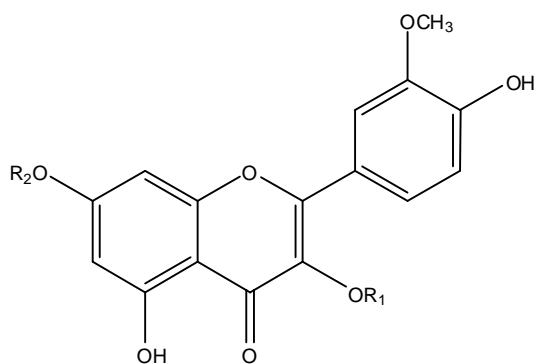


4

	<u>4a'</u>	<u>4a</u>	<u>4b</u>	<u>4c</u>	<u>4d</u>	<u>4m</u>
R₁	H	Glu	Glu	Rha (1→6) glu	Rha- gal	Gal
R₂	H	H	Glu	H	H	H

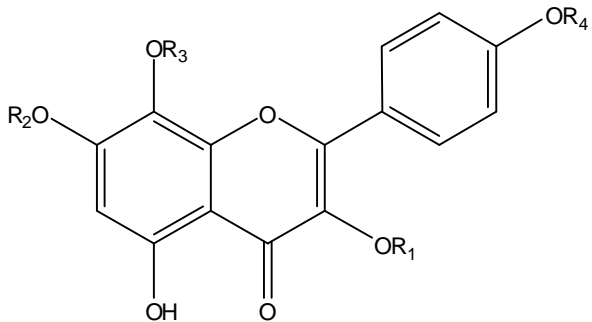


4j



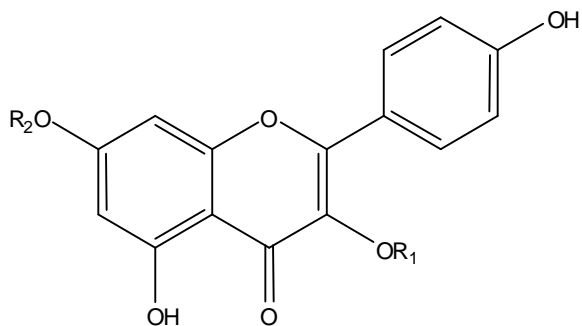
4

	R ₁	R ₂
<u>4k</u>	Rham(1→4)gal-rham(1→6)gal	H
<u>4l</u>	Rham(1→6)gal	H
<u>4n</u>	Xyl-rham(1→6)gal	H
<u>4e</u>	(6''-O-E-p-coum)-glu	H
<u>4i</u>	6''-(2-E-butenoyl)-glu	H



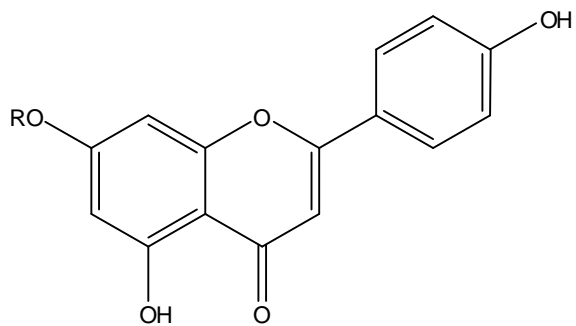
5

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>5a</u>	Rha (1→6) glu	H	H	H
<u>5b</u>	Glu	Glu	H	H
<u>5c</u>	Rha (1→6) glu	Glu	H	H
<u>5d</u>	H	H	OMe	H
<u>5e</u>	OMe	OMe	H	OMe



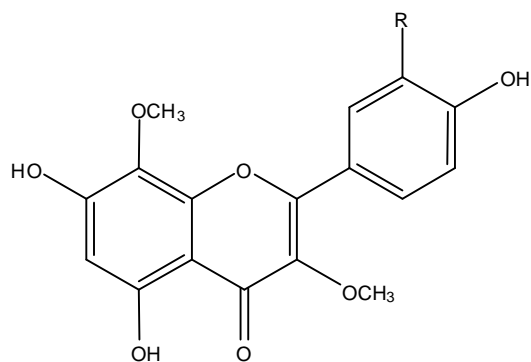
6

	R ₁	R ₂
<u>6a</u>	H	H
<u>6b</u>	Rha (1→6) glu	H
<u>6c</u>	Glu	H
<u>6d</u>	Rha	Rha
<u>6e</u>	Arab(1→4) rha	Rha
<u>6i</u>	OMe	H



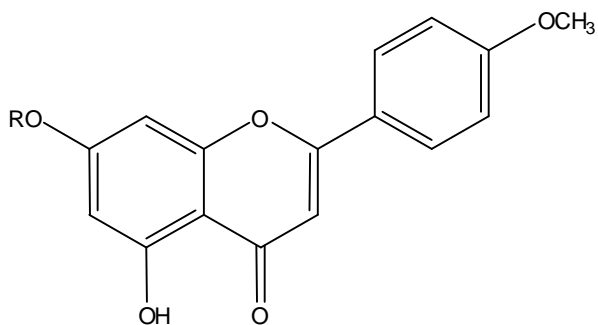
7

7a : R=H
7b : R=Glu



8

8a : R=OMe
8b : R=H



9

9a : R= Rha
9b : R=Glu (1→6)-3'''-Acetyl-rha-glu
9c : R= Rha (1→2) glu-glu

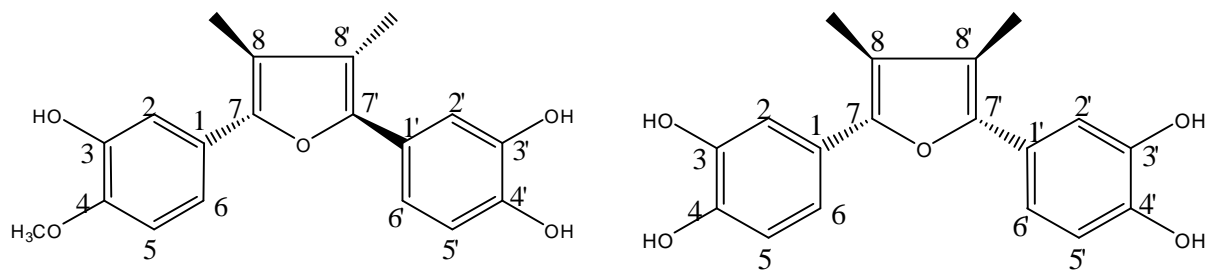
Fig.1-2 : Quelques composés flavoniques isolés d'espèces de la famille Zygophyllaceae

I-4-3-Les lignanes :

Le terme lignane à l'origine présenté par **Haworth** en 1936 [57] .les lignanes sont les dimères des unités de phenylpropane (C₆C₄) [44]. Ils sont isolés à partir de nombreuses plantes médicinales, les travaux phytochimiques effectués sur la famille zygophyllaceae, ont permis l'isolement de ces métabolites essentiellement de l'espèce *Larrea Tridentata* [28,58].

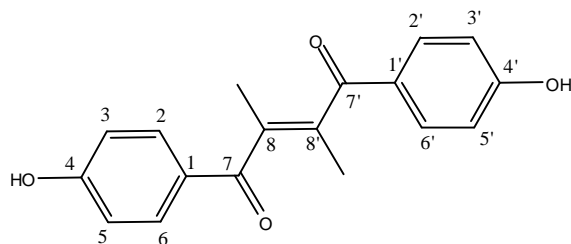
Le tableau I-2 : regroupe quelques structures de ces composés :

Nom de l'espèce	Nom du produit isolé	N°de structure	Réf	
<i>Larrea tridentata</i>	(7S, 8S, 7'S, 8'S)-3,3',4'-trihydroxy-4-methoxy-7, 7'-epoxylignane.	10	[28]	
	Méso-(rel 7S, 8S, 7'R, 8'R)-3, 4,3',4'-tetrahydroxy-7,7'- epoxy-lignane.	11		
	(E)-4,4'-dihydroxy-7,7'-dioxolign-8(8')-ene	12		
	3,4'-dihydroxy-3',4-dimethoxy-6,7'-cyclo-lignane	13	13a	[58]
	3'-demethoxyisoguaiacine		13b	
	4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-6,7'-cyclo-lignane		13c	
	4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxylignane	14	14a	
	3',4-dihydroxy-3,4'-dimethoxylignane		14b	
	3,3'-dihydroxy-4,4'-dimethoxylignane		14c	
	3'-hydroxy-3, 4,4'-trimethoxylignane		14d	

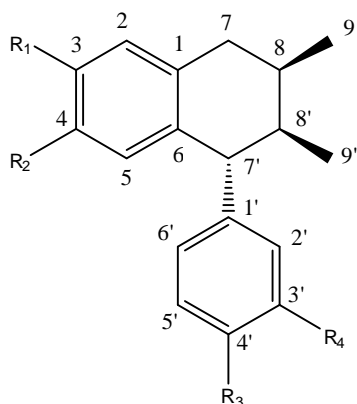


10

11



12

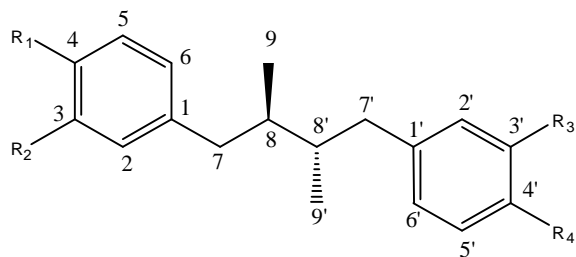


13

13a : R1=R3=OH ; R2=R4=OCH3

13b : R1=R3=OH ; R2= OCH3 ; R4=H

13c : R1= R4= OCH3



14

14a :R1=R4=OH ; R2=R3= OCH3

14b : R1= R3= OH ; R2= R4= OCH3

14c : R1=R4= OCH3 ; R2=R3= OH

14d : R1= R2= R4= OCH3 ; R3= OH

Fig.I-3 : Quelques lignanes isolés de l'espèce *Larrea Tridentata*.

I-4-4-Les triterpénoïdes :

Les triterpènes sont des composés dérivés de leur précurseur en C₃₀, le squalène, qui a été isolé initialement du foie de requin [59]. Ils sont largement distribués dans les deux règnes végétal et animal [44]. Ces métabolites sont isolés de nombreuses plantes appartenant à la famille zygophyllaceae [39,60].

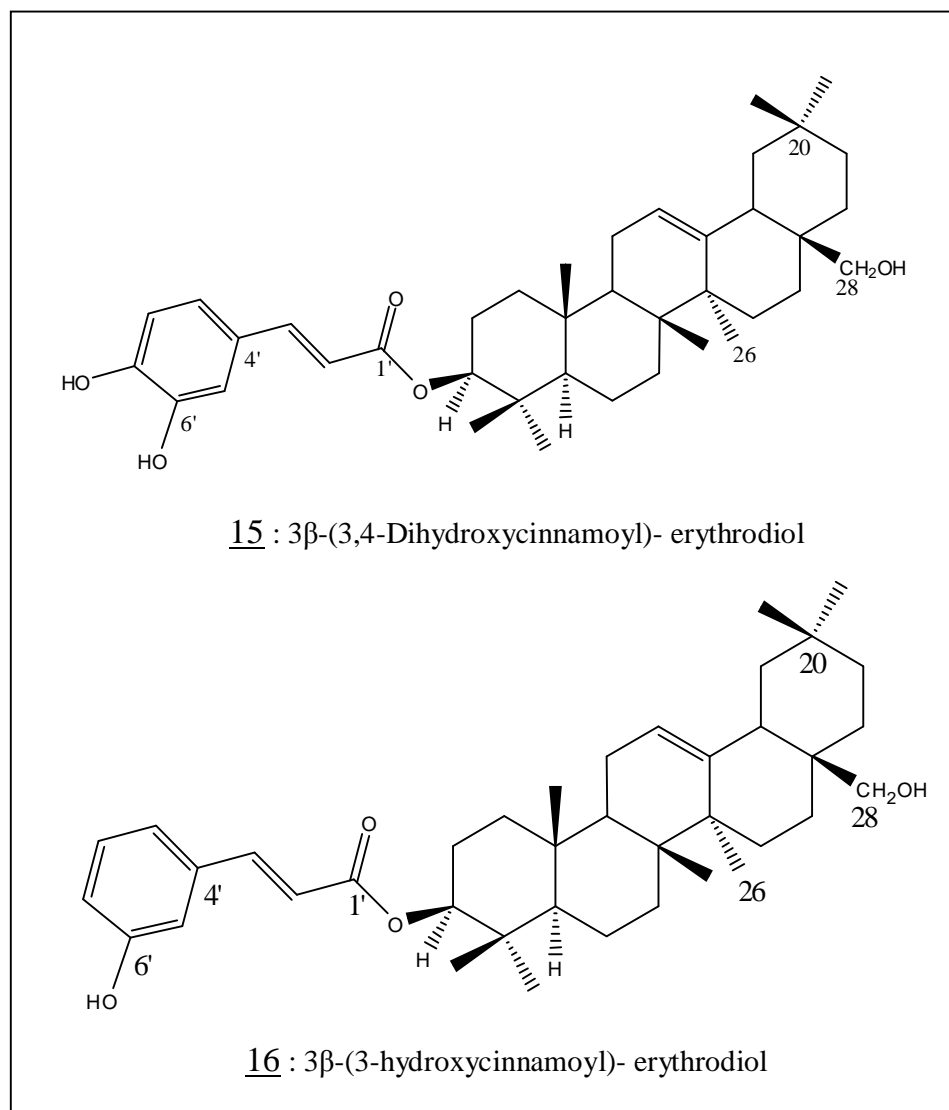


Fig.I-4 : Exemples des triterpènes isolés d'espèces de la famille zygophyllaceae

Références bibliographiques:

- [1] Lawrence, G.H.M., 1951. The taxonomy of Vascular Plants. The Macmillan Company, New York.
- [2] James, D.M., Sylesh, K.V., John, T.H., 2007. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68,2015-2022.
- [3] Roland, D., 2005. Les plantes supérieures : divines et / ou diaboliques, Les débats scientifiques du 21^{ème} siècle, Conférences et débats.
- [4] Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S. Paris.
- [5] Sheahan M. C., Chase M. W., 1996. A phylogenetic analysis of Zygophyllaceae based on morphological, anatomical and rbcL DNA sequence data. *Bot. J. Linn. Soc.* 122: 279–300.
- [6] Sheahan M. C., Chase M. W., 2000. Phylogenetic relationships within Zygophyllaceae based on DNA sequences of three plastid regions, with special emphasis on Zygophylloideae. *Syst. Bot.* 25: 371–384.
- [7] Engler A., 1897. Contribuzioni alla conoscenza della flora dell'Africa orientale. *Ann. Ist. Bot. Roma* 7: 14–15.
- [8] Takhtajan A., 1996. Diversity and classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- [9] Liu, H., Nakanishi, K., 1982. The structures of balanitins, potent molluscicides isolated from *Balanites aegyptiaca*. *Tetrahedron* 38, 513–519.
- [10] Pettit, G.R., Doubek, D.L., Herald, D.L., Numata, A., Takahasi, C., Fujiki, R., Miyamoto, J., 1991. Isolation and structure of cytostatic saponins from the African medicinal plant *Balanites aegyptiaca*. *Journal of Natural Products* 54, 1491–1502.
- [11] Speroni, E., Cervellati, R., Innocenti, G., Costa, S., Guerra, M.C., Dall'Acqua, S., Govoni, P., 2005. Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antioxidant activities of *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 117–125.
- [12] Bishnu, P.C., Zeev, W., Leah, T. (Lahkim), 2007. *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 26, 109–115.
- [13] Duke, J.A., 1983. Medicinal Plants in the Bible. Trado-Medic Books, New York, Chapter 28.

- [14] Kokwano, J.O., 1976. Medicinal plants of East Africa. East Africa Literature Bureau. Dar er Salaam, Kampala, Nairobi, Chapter 34.
- [15] Kamel, M.S., 1991. Studies on *Balanites aegyptiaca* fruits, an antidiabetic Egyptian folk medicine. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 39,1229–1233.
- [16] Anesini ,C., Genaro, A., Cremaschi ,G., Sterin ,B. L., Cazaux, C., Borda ,E. , 1996.Immunomodulatory activity of *Larrea divaricata* Cav. Fitoterapia67,329–33.
- [17] Anesini ,C., Boccio, J., Cremaschi ,G., Genaro, A.S., Zubillaga, M., Sterin, B. L., et al. , 1997.“In vivo” antitumoral and acute toxicity study of *Larrea divaricata* Cav. extract. Phytother Res. 11,521–3.
- [18] Anesini ,C., Genaro, A., Boccio, J., Cremaschi ,G., Zubillaga ,M., Sterin ,B. L., et al., 1998. “In vivo” antitumour activity of *Larrea divaricata* Cav.: comparison of two routes of administration. Phytomedicine 5,41–5.
- [19] Anesini ,C., Genaro, A., Cremaschi, G., Sterin, B. L., Borda ,E., 1999. Antimitogenic effect of *Larrea divaricata* Cav.Participation in arachidonate metabolism. Comp Biochem Physiol C. 122,245–52.
- [20] Van, Auken, O.W., 2000. Shrub invasions of North American semiarid grasslands. Annual Review of Ecology and Systematics 31, 197–215.
- [21] Whitford, W.G., Nielson, R., De Soyza, A., 2001. Establishment and effects of creosote bush, *Larrea tridentata*, on a ChihuahuanDesert watershed. Journal of Arid Environments 47, 1–10.
- [22] Estudillo, R.L., Hinojosa, A.L., 1988. Catalog of Sonoran Medicinal Plants. University of Sonora, Hermosillo, 131 pp. (in Spanish).
- [23] Brent, J., 1999. Three new herbal hepatotoxic syndromes. Journal of Toxicology and Clinical Toxicology 37, 715–719.
- [24] Arteaga, S., 1997. Effect of Gobernadora (*Larrea tridentata*) on cholesterol cholelithiasis in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Bachelor in Biology Thesis. Facultad de Ciencias, UNAM, M´exico (in Spanish).
- [25] Timmermann, B., 1977. Practical uses of *Larrea*. In: Mabry, T., Hunziker, J., Difeo, D. (Eds.), Creosote Bush. Biology and Chemistry of *Larrea* in New World Deserts. Dowden Hutchinson Ross Inc., USA, pp. 252–257.
- [26] Kay, M., 1996. Healing with Plants in the American and Mexican West. University of Arizona Press, Tucson, pp. 178–181.
- [27] Tyler, V., Foster, S., 1999. Tyler’s Honest Herbal: A Sensible Guide to the Use of

- Herbs and Related Remedies. Haworth Herbal Press, New York, pp. 109–111.
- [28] Abou-Gazar, H., Bedir, E., Takamatsu, S., Ferreira, D., Khan, I.A., 2004. Antioxidant lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 65, 2499–2505.
- [29] Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B., 2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *Journal of Ethnopharmacology* 110, 105–117.
- [30] Sasmakov, S.A., Putieva, M. Zh., Saatov, Z., Kachala, V.V., Shashkov, A.S., 2001. Triterpene glycosides of *Zygophyllum eichwaldii* C.A.M. *Chemistry of Natural Compounds* 37, 91–92.
- [31] Saber, A.H., El-Moghazy Shoaib, A.M., 1960. *Zygophyllum coccineum*. V. Chemistry of leaf and stem. *Journal of Pharmaceutical Science of the U.A.R.* 1, 1–6.
- [32] Eskander, E.F., Won Jun, H., 1995. Hypoglycemic and hyperinsulinic effects of some Egyptian herbs used for the treatment of diabetes mellitus (type II) in rats. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences* 36, 331–342.
- [33] Jaouhari, J.T., Lazrek, H.B., Jana, M., 2000. The hypoglycemic activity of *Zygophyllum gaetulum* extracts in alloxan-induced hyperglycemic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 69, 17–20.
- [34] Bellakadhar, J., Claisse, R., Fleurotin, J., Younos, C., 1981. Repertory of standard herbal drugs in the *Moroccan pharmacopoea*. *Journal of Ethnopharmacology* 35, 123–143.
- [35] Maiza, K., Hammiche, V., Brac de la Perrière, R.A., 1993. Traditional saharian pharmacopoeia. In: Schilcher, H., Phillipson, J.D., Loew, D. (Eds.), *ISHS Acta Horticulturae 332: WOCMAP I—Medicinal and Aromatic Plants Conference*. Maastricht, Netherlands (CR-rom).
- [36] Meng, X.L., Riordan, N.H., Casciari, J.J., Zhu, Y., Zhong, J., Gonzalez, M.J., Miranda-Massari, J.R., Riordan, H.D., 2002. Effects of a high molecular mass *Convolvulus arvensis* extract on tumor growth and angiogenesis. *PR Health Science Journal* 21, 323–328.
- [37] Atta, A.H., Mouneir, S.M., 2004. Antidiarrhoeal activity of some Egyptian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 303–309.
- [38] Smati, D., Hammiche, V., Nehari, H., Alamir, B., Merad, R., 1993. *Zygophyllum geslini* Coss.: chemical investigation of hypoglycemic activity. In: Schilcher, H., Phillipson, J.D., Loew, D. (Eds.), *ISHS Acta Horticulturae*

- 332: WOCMAP I—Medicinal and Aromatic Plants Conference. Maastricht, Netherlands (CD-rom).
- [39] Smati, D., Longeon, A., Guyot, M., 2004. 3β -(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol, a cytotoxic constituent of *Zygophyllum geslini* collected in the Algerian Sahara. . Journal of Ethnopharmacology 95, 405-407.
- [40] Bruneton J., 1999. « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ». 3 Edition, Editeur technique et documentation, Paris.
- [41] Milcent,R.,Chau,F.,2003.Chimie organique hétérocyclique : Structure fondamentales , chimie et biochimie des principaux composés naturels,EDP sciences.
- [42] Kapoor,L.D.,1995.Opium Poppy :Botany,Chemistry&Pharmacology,Food Product Press, New York.
- [43] Raffauf,R.E.,1996.Plant alkaloids,Food ProductPress, New York.
- [44] Pengelly,A., 2004.The constituents of Medicinal Plants : An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine.CABI publishing.
- [45] Berrougi,H.,Martin-Cordero,C.,Khalil,A.,Hmamouchi,M.,Ettaib,A., Marhuenda,E.,Dolores,H.M., 2006. Vasorelaxant effects of harmine and harmaline extrated from *Peganum Harmala* L.seed's isolated rat aorta. Pharmacological Research 54,150-157.
- [46] Maksoud,S.A., El Hadidi,M.N.,1988.The flavonoids of *Balnites aegyptiaca* (Balanitaceae) from Egypt.Plant Systematics and Evolution 160,153-158.
- [47] El-Negoumy,S.I., Al-Wakeel,S.A.M., El Hadidi,M.N.,Saleh,N.A.M.,1986. The flavonoids of the *Fagonia >Arabica-Complex*(Zygophyllaceae).Phytochem.25, 2423-2424.
- [48] Al-Wakeel,S.A.M., El-Negoumy,S.I., El Hadidi,M.N., Saleh,N.A.M.,1987. Flavonoids patterns in *Fagonia Mollis-Complex*.Biochemical Systematics and Ecology 15,459-460.
- [49] Ibrahim, L. F. , Kawashty, S.A. , El-Hagrassy,A. M. , Nassar, M. I., and Mabry T.J.,2008. A new kaempferol triglycoside from *Fagonia taeckholmiana*: cytotoxic activity of its extracts. Carbohydrate Research 343,155-158.
- [50] Halim,A.F.,Saad,H-A.A.,Hashish,N.E.,1995.Flavonol glycosides from *Nitraria Retusa*. Phytochemistry 40,349-351.
- [50] Sharaf,M.,El-Ansari,M.A.,Matin,S.A., Saleh,N.A.M.,1997.Four flavonoids glycosides from *Peganum Harmala*. Phytochemistry 44,533-536.
- [51] Temraz,A.,El Gindi,O.D.,Kadry,H.A.,Tommasi,N.D.,Braca,A.,2006.Steroidal

- saponins from the aerial parts of *Tribulus alatus* Del. *Phytochemistry* 67,1011-1018.
- [52] Bhutani, S.P., Chibber, S.S., Seshadri, T.R., 1969. Flavonoids of the fruits and leaves of *Tribulus terrestris* : Constitution of tribuloside. *Phytochemistry* 8, 299-303.
- [53] Saleh, N.A.M., Ahmed, A.A., Abdalla, M.F., 1982. Flavonoid glycosides of *Tribulus pentandrus* and *T. terrestris*. *Phytochemistry* 21, 1995-2000
- [54] Dinchev, D., Janda, B., Evstatieva, L., Oleszek, W., Aslani, M.R., Kostova, I., 2008. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. *Phytochemistry* 69, 176-186.
- [55] Ouf, S.A., Abdel Hady, F.K., El Gamal, M.H., Shaker, K.H., 1994. Isolation of antifungal compounds from some *Zygophyllum* spices and their bioassay against two soil-borne plant pathogens. *Folia Microbiologica* 39, 215-221.
- [56] Hassanean, H.A., Desoky, E.K., 1992. An acylated isorhamnetine glucoside from *Zygophyllum Simplex*. *Phytochemistry* 31, 3293-3294.
- [57] Raffaeilli, B.A., Hoikkala, A.B., Wahala, K., 2002. *Chromatography B* 777, 29-43.
- [58] Lambert, J.D., Sang, S., Dougherty, A., Caldwell, C.G., Meyers, R.O., Dorr, R.T., Timmermann, B.N., 2005. Cytotoxic lignans from *larrea tridentata*. *Phytochemistry* 66, 811-815.
- [59] Bruneton J., 1995. *Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants*, Lavoisier Pubs, Paris.
- [60] Xue, Z.H., Lu, Z.Z., Konno, C., Soejarto, D.D., Cordell, G.A., Fong, H.H.S., Hodgson, W., 1988. 3 β -(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol and 3 β -(4-Dihydroxycinnamoyl) - erythrodiol from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 27, 233-235.

Chapitre II : Terpènes et stéroïdes

II-1-Introduction:

Les produits phytochimiques sont définis comme des composés biologiquement actifs, d'origine naturelle, isolés à partir des plantes; dont leur ingestion fournit certaines fonctions bénéfiques plus que la nutrition comme étant le rôle de base [1].

Les glucides, les acides gras, et les aminoacides des classes très importantes de composés chimiques naturels sont des matériaux qui constituent l'infrastructure des plantes, des fleurs, des légumes et des arbres résultant d'un système de réactions biochimiques appartenant au métabolisme primaire [2,3].

Les plantes photosynthétiques convertissent le dioxyde de carbone (CO₂) en métabolites primaires, qui sont nécessaires pour leur vitalité.

En outre, elles possèdent des métabolites dits "secondaires", ces derniers ne sont pas nécessaires pour leurs événements biochimiques essentiels, et diffèrent en fonctions des espèces. Leur rôle intervient peut être intervient dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent (parasites, pathogènes, prédateurs...) [3-5].

Dans un premier lieu; les plantes photosynthétiques convertissent le dioxyde de carbone et l'eau en carbohydrates simples (monosaccharides), qui se combinent pour donner des polysaccharides et des glucosides complexes d'une part. D'autre part, la dégradation des carbohydrates simples conduit à la formation de l'acide pyruvique; lui-même fonctionne comme le précurseur de l'acide shikimique et de cette manière des composés aromatiques abondants dans la nature. Dans un second lieu, la décarboxylation de l'acide pyruvique donne l'acide acétique, qui joue le rôle d'un précurseur biogénétique pour tous les types de produits naturels.

Les réactions de condensations conduisent au polyketides, l'acide mévalonique agit comme un lien entre l'acétate et les terpènes, de plus, les aminoacides, les peptides, et les alcaloïdes sont formés à partir de l'acide acétique de la même manière [3].

II-2-Les terpènes :

Le terme terpène inventé par **Kékulé** [6], vient de leur origine historique de l'arbre de terebinth : « *Pistacia Terebinthus* » [3].

Du point de vue structural, les terpènes constituent une grande famille de composés prénologues, c'est-à-dire d'homologues à enchaînement isoprénique [7]. Ces substances organiques font parti des métabolites secondaires, les plus répandus dans la nature [8]. En effet, plus de 36.000 structures différentes ont été identifiées [9].

Plusieurs sont isolés à partir des fleurs, des tiges, des racines et différentes parties Des plantes [10]. On peut en rencontrer encore, chez les animaux, les phéromones et hormones juvéniles sesquiterpéniques des insectes et dans les organismes marins [11].

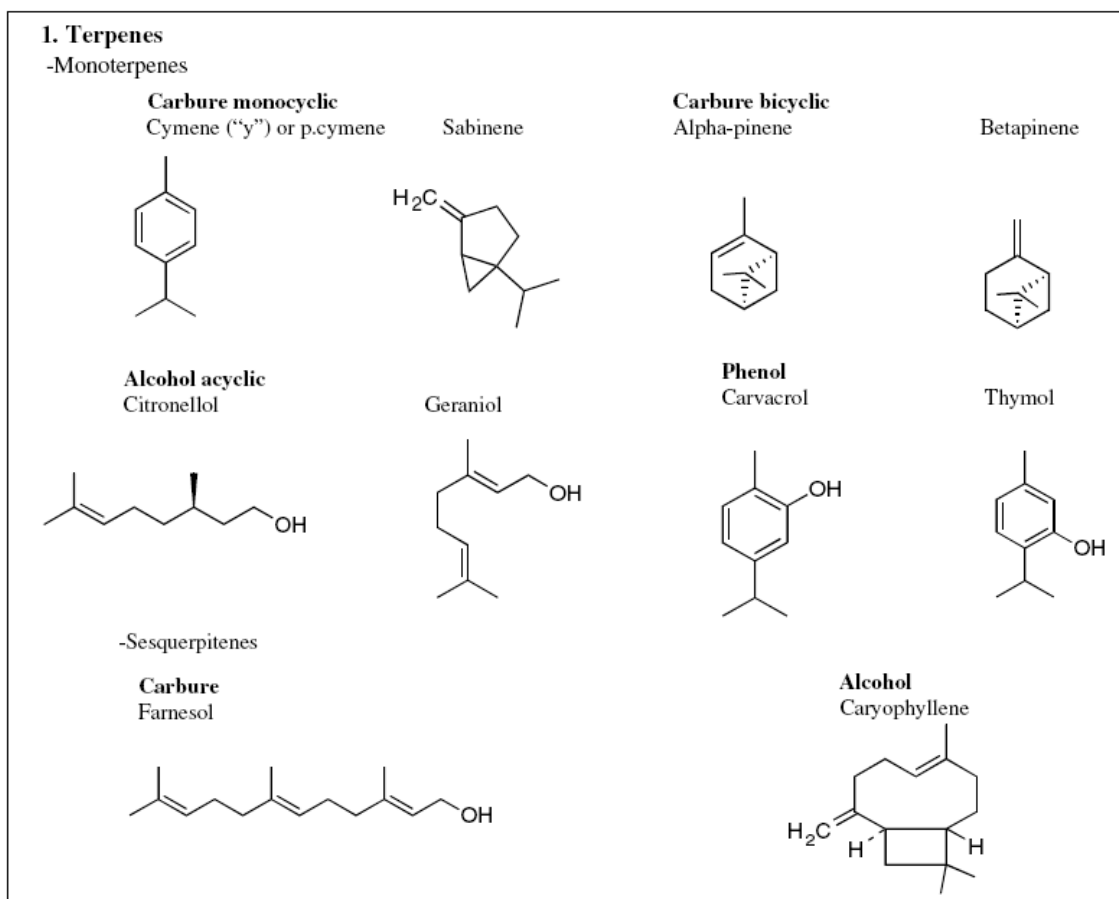


Fig.II-1 : quelques structures de terpènes

Beaucoup de terpènes servent comme des additifs dans les industries alimentaires et cosmétiques [12] et plusieurs d'entre eux possèdent des activités biologiques :

Anti-microbienne, insecticide, anti-carcinogène, anti-inflammatoire [13-16], anesthésique et anti-histaminique (des mono et sesquiterpènes), diurétique (β -eudesmol) [17,18], neuroprotective (α -terpinene, γ -terpinene, et trans-caryophyllene) [19].

On peut citer également les propriétés anti-tumorales et cytotoxiques des diterpènes (taxol), et des activités anti-oxydantes attribuées surtout aux diterpènes phénoliques [20-22].

II-3-Règle isoprène et biosynthèse des terpènes :

Dès 1887, le chimiste **Wallach**, envisage que les terpènes doivent être construits à partir d'unités isopréniques, trente ans plus tard, **R. Robinson** précisa la règle isoprénique de **Wallach** en indiquant que la liaison de ces unités isopréniques doit s'effectuer de façon « tete-queue » [6].

L'isoprène lui-même n'a jamais été rencontré dans les produits naturels et il semble ne jouer aucun rôle dans leur biogénèse. Le véritable intermédiaire à cinq atomes de carbones serait le pyrophosphate d'isopentényle [23].

Biogénétiquement ; le précurseur universel de tous les terpènes est l'acide mévalonique :

La première étape dans la biosynthèse des terpènes consiste à activer une molécule d'acide acétique, par la combinaison avec le groupe thiol du coenzyme A « HS-CoA » pour engendrer l'acétyl-CoA. La condensation aldolique de ce dernier sur l'acétyl-CoA conduit au (3S) 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA. Celui-ci est ensuite irréversiblement réduit par le nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH) en acide (3R) mévalonique (MVA). L'autre isomère n'agit pas comme précurseur. L'étape suivante est l'activation de l'acide mévalonique (MVA) par phosphorylation sous l'action d'enzyme spécifique.

Ensuite, une déshydratation interne et une décarboxylation donne l'isopentényle pyrophosphate (IPP) qui peut s'isomériser pour fournir une molécule très réactive : le pyrophosphate d'isopentén-2-yle ou le diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) (Fig.II-2).

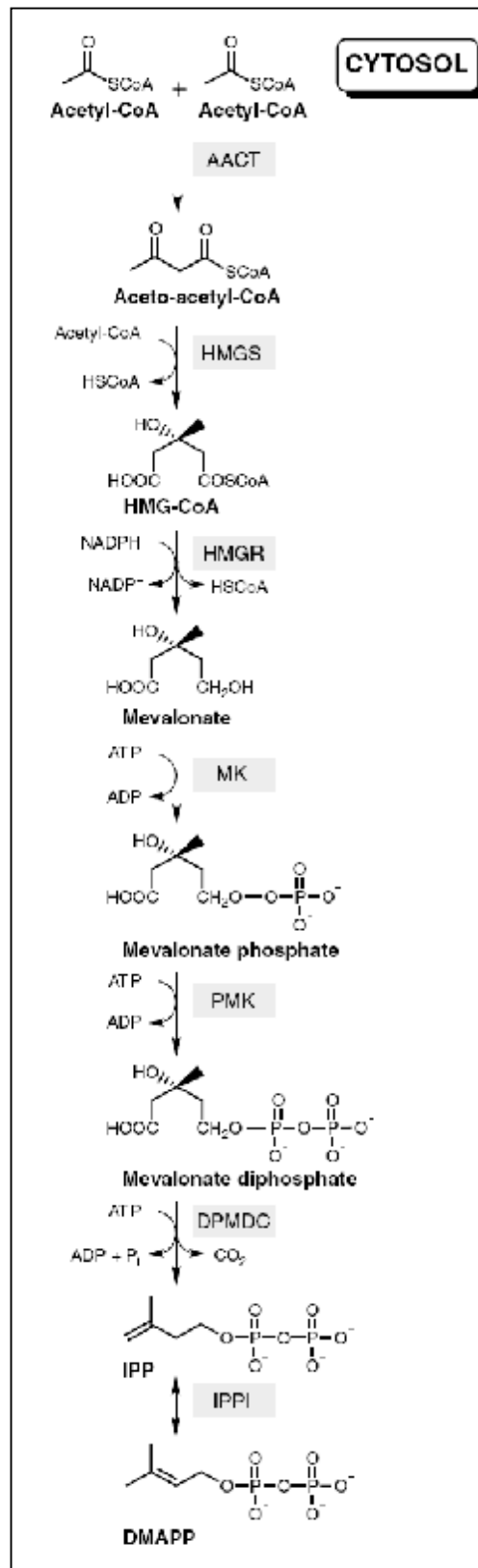


Fig.II-2 : la voie mévalonique de la biosynthèse de diméthylallylpyrophosphate (DMPP)

La condensation d'une molécule (DMPP) avec une molécule (IPP), conduit au (GPP) précurseur des monoterpènes en C-10. Le couplage de ce dernier avec une nouvelle molécule (IPP), conduit au (FPP) précurseur des sesquiterpènes en C-15 qui peut agir avec une autre molécule de (IPP) pour former le (GGP) précurseur des diterpènes en C-20. D'autre part, le couplage réductif de deux unités (FPP) donne : le squalène en C30, précurseur des triterpènes cycliques et stéroïdes [24-27].

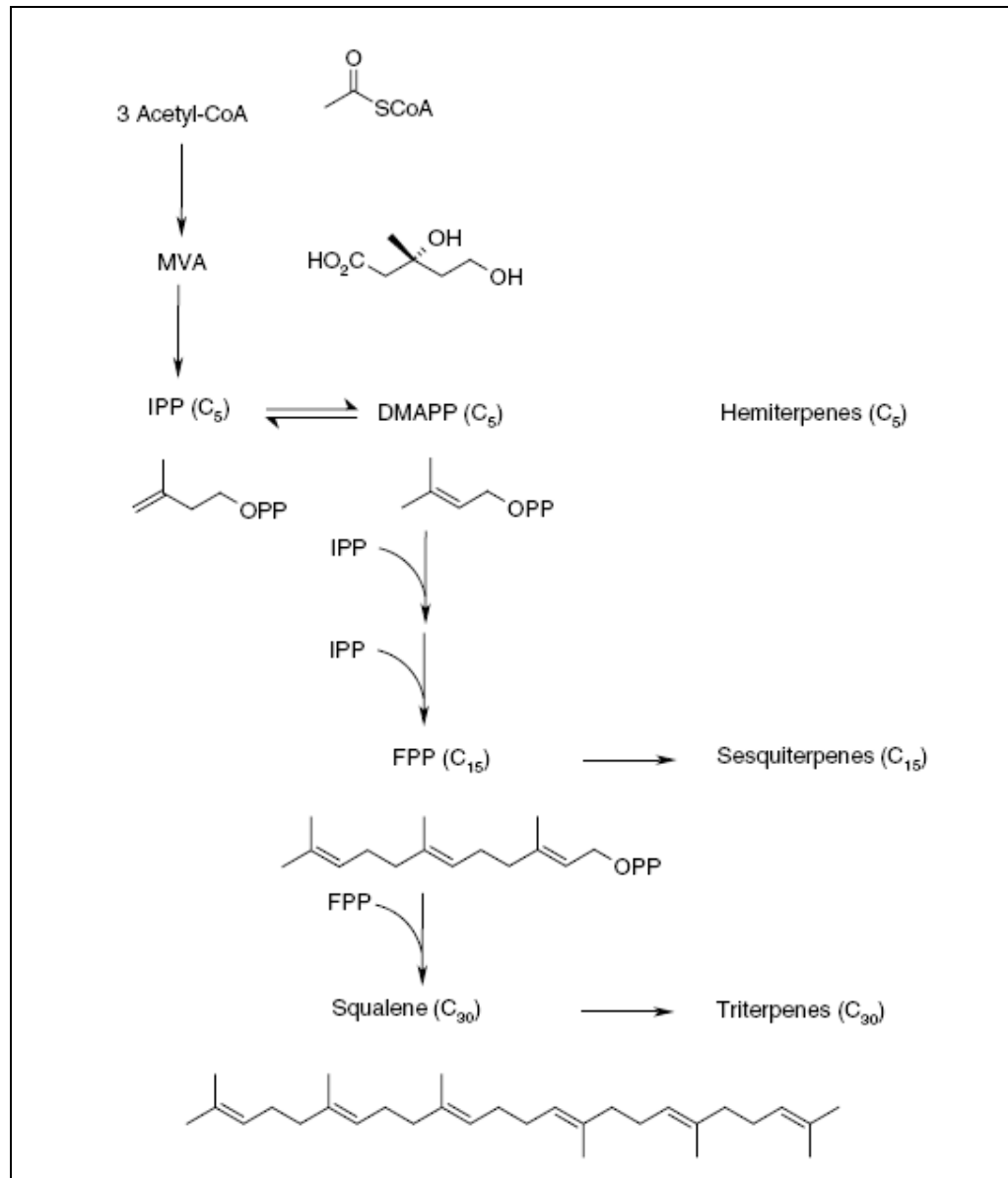
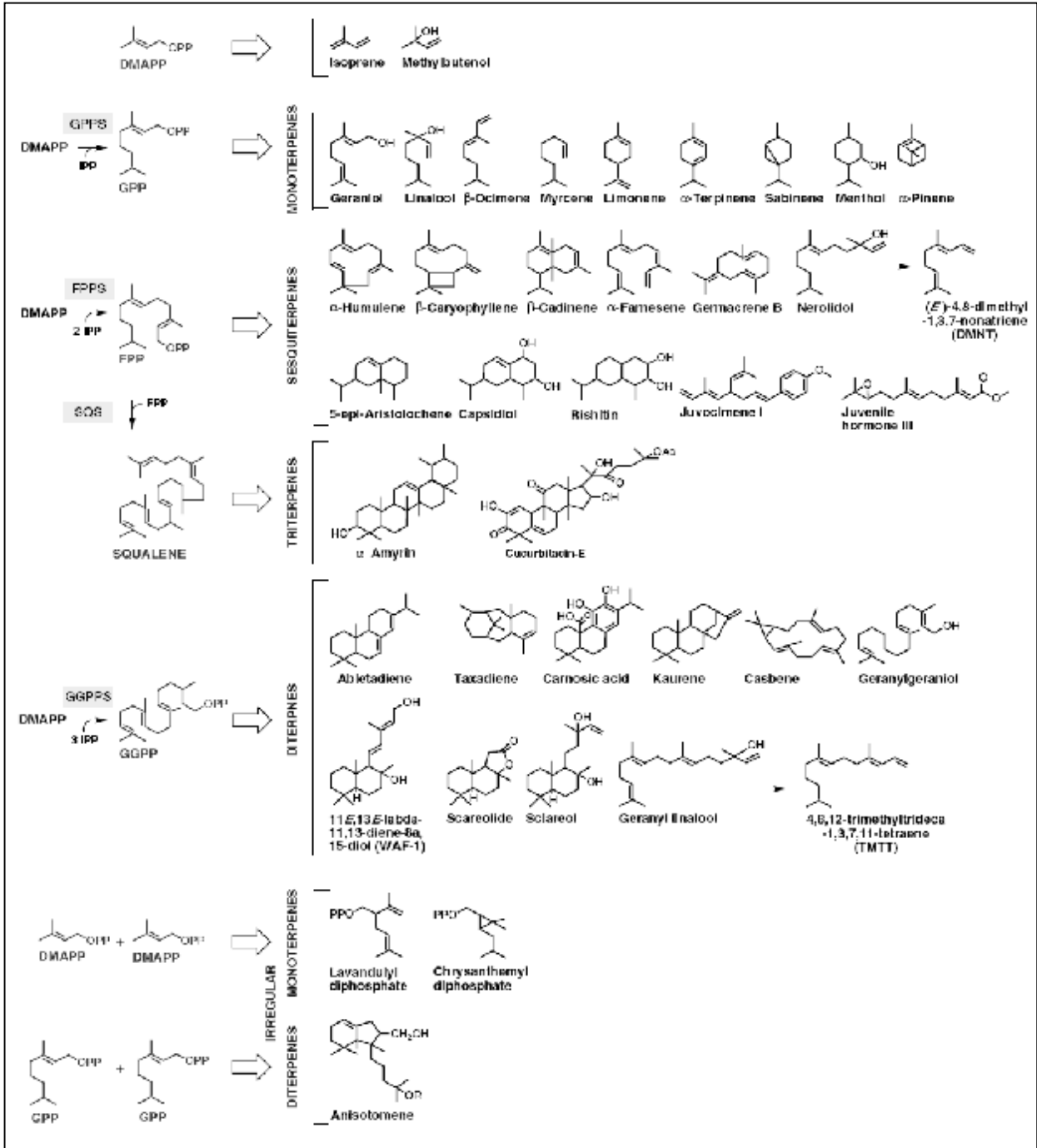


Fig.II-3 : Biosynthèse des terpènes

II-4-Classes des terpènes :

Selon le nombre d'entités isoprène qui sont incorporées dans leur structures, les terpènes sont subdivisés en : Hémiterpènes (C_5H_8), monoterpènes ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$), diterpènes ($C_{20}H_{32}$), Triterpènes ($C_{30}H_{48}$), Tetraterpènes ($C_{40}H_{64}$) et polyterpènes (C_5H_8)ⁿ [10].



FigII-4 : Schéma général illustrant la biosynthèse et les différents types des terpènes

II-4-a-Les monoterpènes :

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90% des huiles essentielles sont des monoterpènes) [28]. Ils comportent dix (10) atomes de carbones et sont issus de la condensation de deux unités isoprène, selon le mode de couplage « tête-queue » [29].

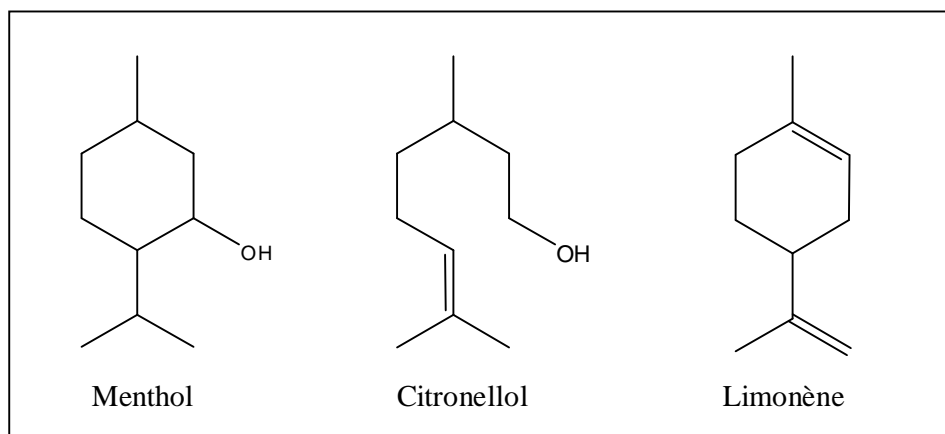


Fig.II-5 : Exemples de quelques monoterpènes

L'arrangement de leur squelette peut être : acyclique, mono, bi, et tricyclique [30].

Les iridoïdes et les pyréthriènes forment deux classes de composés tout à fait particulières des monoterpènes. Les iridoïdes sont des monoterpènes caractérisés par un squelette « cyclopenta[c] pyrane », ou le squelette « iridane ».

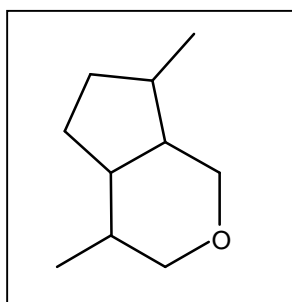


Fig.II-6 : Squelette iridoïde.

Les autres exemples des monoterpènes irréguliers issus par un couplage non classique de l'isopentényle pyrophosphate et le diméthylallyl pyrophosphate sont connus sous le nom de « pyréthriènes » [29]. Les monoterpènes existent à l'état halogéné chez les algues et sont largement distribués chez les végétaux : exemples d'ordre astérales et laurales [11].

II-4-b-Les sesquiterpènes :

Ce n'est qu'en 1910 que **Semmler** détermine la structure correcte du premier composé sesquiterpénique, le β -santène, trois ans plus tard, **Kerschbaum** en 1913 établit la structure du trans -2-trans-6-farnésol, un alcool linéaire, la deuxième structure sesquiterpénique décrite avec précision[6]. Depuis, le nombre de composés sesquiterpéniques dérivant de la cyclisation de leur précurseur universel, le farnésyl diphosphate (FPP) catalysée par « Sesquiterpène synthases », n'a cessé de croître : il est actuellement voisin de 300 composés monocycliques, bicycliques et tricycliques connus avec une grande variété de structures et stéréochimie [31-35].

Les sesquiterpènes forment une série de composés qui renferment 15 atomes de carbones, ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme : les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature. On peut également rencontrer dans les plantes des sesquiterpènes lactones, ces métabolites secondaires issus par l'oxydation d'un groupe méthyle du groupe isopropyle attaché au squelette de base sesquiterpénique pour engendrer le groupe lactone [36]. Les sesquiterpènes et les monoterpènes sont souvent en mélange dans les huiles essentielles des plantes, notamment chez les espèces des familles labiateae, myrtaceae, pinaceae et rutaceae [37].

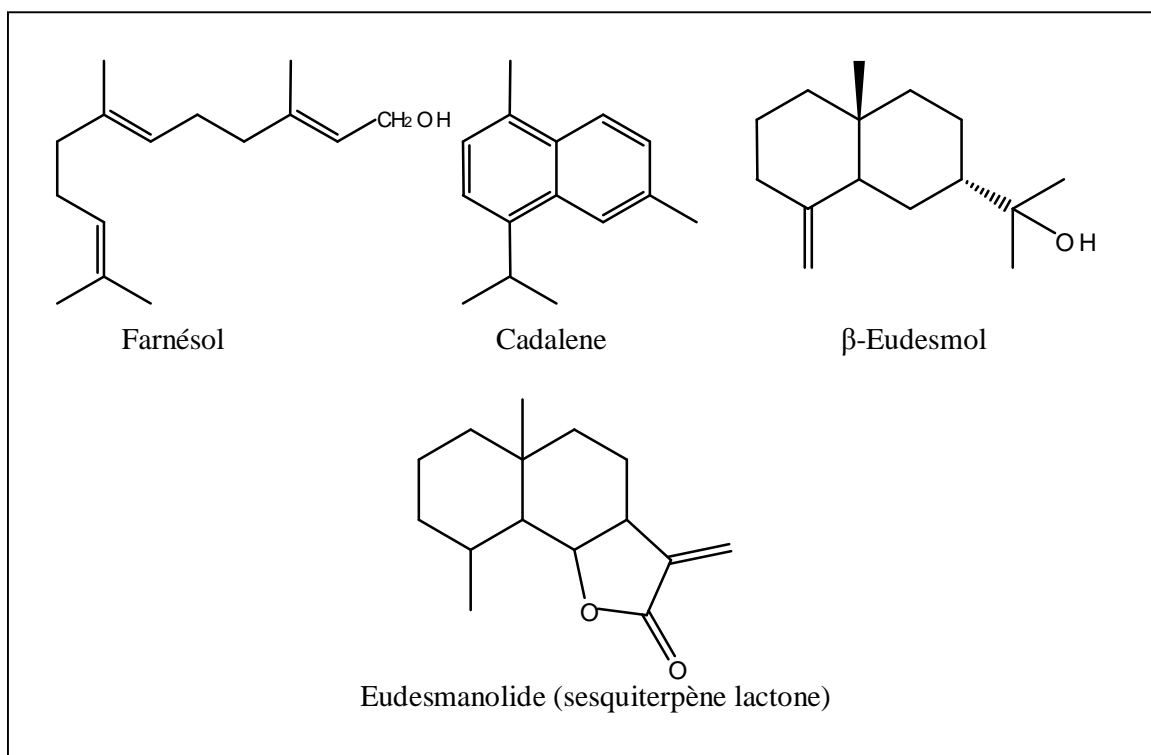


Fig.II-7 : Exemples de quelques sesquiterpènes

II-4-c-Les diterpenes :

Les diterpenes forment une catégorie bien plus vaste de terpènes en C₂₀, avec environ 2500 structures connues qui se répartissent en 20 groupes majeurs [38], ils sont biosynthétisés à la suite du couplage de quatre (4) unités isoprène [39], très répandus chez les végétaux supérieurs, ils sont aussi présent chez certains insectes et chez divers organismes marins [11]. On peut les trouver encore dans les résines, les exsudats et les gommés naturelles.

Il est rare de rencontrer les diterpenes comme constituants des huiles essentielles, à cause de leurs points d'ébullition les plus élevés [39]. Ils peuvent être acycliques ou cycliques.

En série diterpéniques, on connaît deux alcools importants le phytol, qu'on rencontre sous forme d'ester dans la partie porphyrine de la molécule de chlorophylle [23]. Et la vitamine A ; vitamine essentielle à la croissance normale des mammifères et indispensable pour la vue [7].

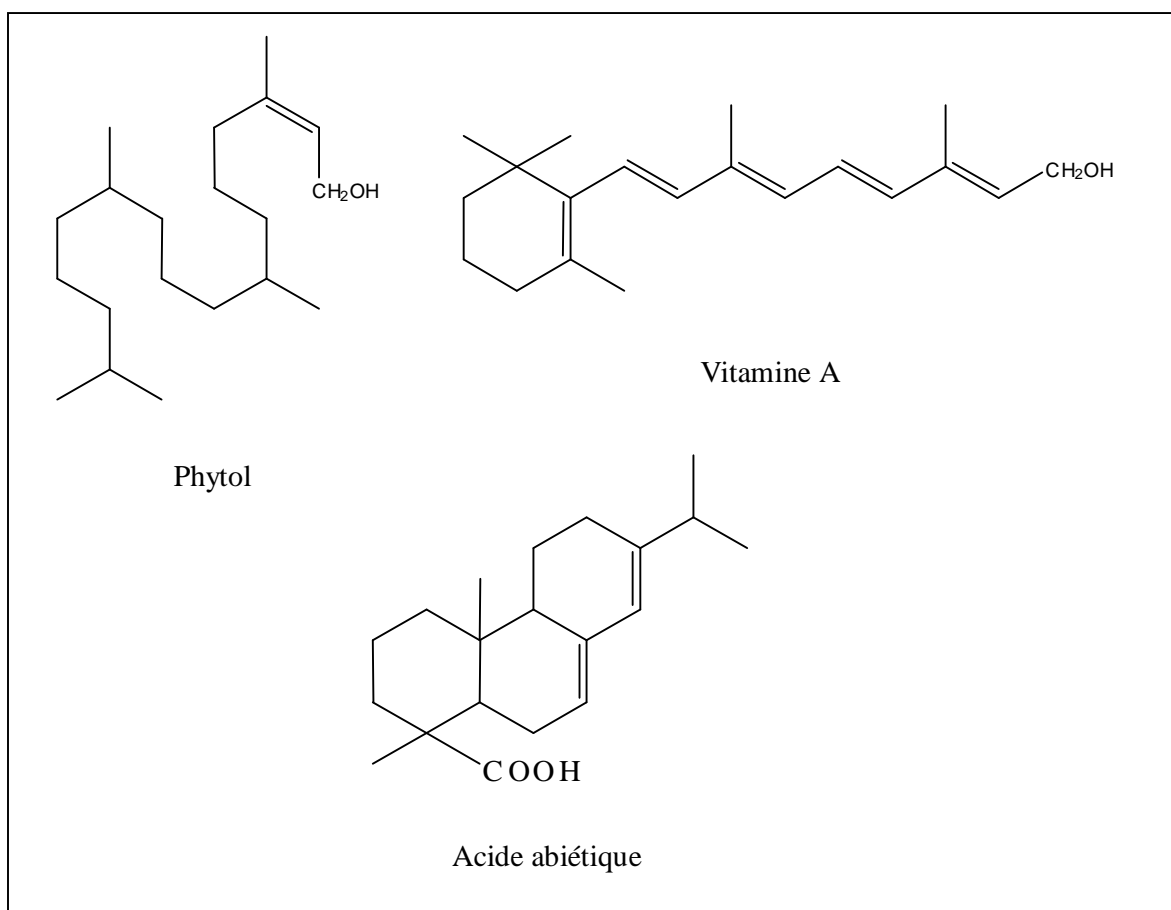


Fig.II-8 : Exemples de quelques diterpène

II-4-d-Les triterpènes :

Les triterpènes forment un groupe de produits naturels contenant dans leur squelette une trentaine d'atomes de carbone et dérivant du squalène, par une variété de cyclisations et d'autres modifications [40]. Ils peuvent être classés en trois groupes : acyclique, tétracyclique et pentacyclique [41].

Parmi ces groupes, la famille des triterpènes tétracycliques présente une importance particulière par son homogénéité et surtout par ses rapports étroits avec les stéroïdes [40]. Leur structure de base commune est le noyau stérane [41]. Les triterpènes et leur dérivés sont intégralement biosynthétisés par tous les êtres vivants avec deux exceptions : les bactéries qui ne les utilisent pas et les insectes qui les empruntent aux plantes souvent de façon spécifique puis les transforment [42].

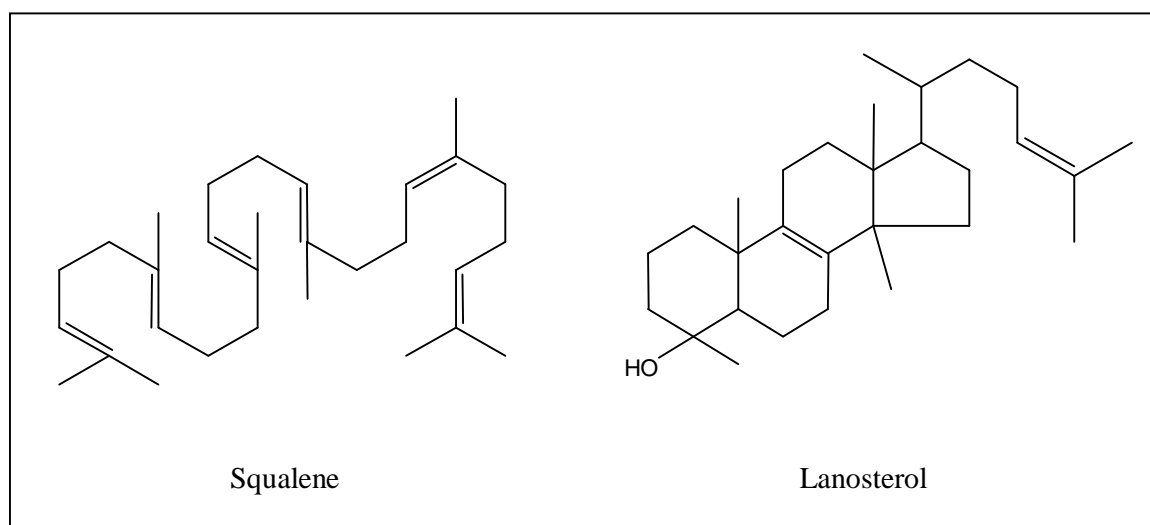


Fig.II-9 : Exemples de quelques triterpènes

II-4-e-Les stéroïdes :

Les stéroïdes sont des composés qui contiennent le noyau perhydrocyclopenténophénanthrène. Ils comprennent une grande variété de composés naturels parmi les quels se trouvent les stérols proprement dits, les acides biliaires, les hormones sexuelles, les hormones corticosurrénales, les glucosides cardiotoniques, les sapogénines, quelque alcaloïdes et d'autres groupes mineurs.

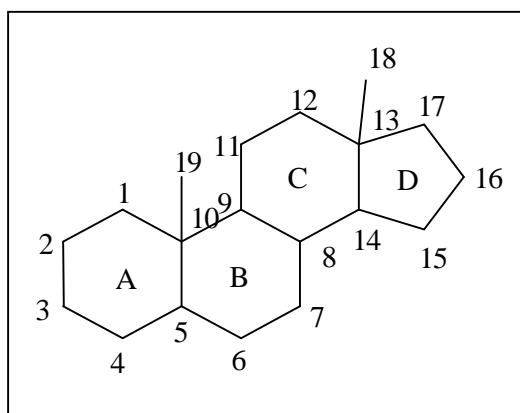


Fig.II-10: Structure de noyau stéroïde

Pratiquement, la position 3 est occupée par l'oxygène dans tous les stéroïdes naturels. Les stérols proprement dits n'ont aucun autre substituant oxygéné. la plupart des acides biliaires ont un ou plusieurs autres substituants dans les cycles B, C et D.

Les hormones sexuelles et surrénales ont des substituants dans le cycle D, ou dans le fragment de chaîne latérale qui y est attaché. Certaines des hormones surrénales se distinguent par l'unique caractéristique d'un substituant en C-11[43]. Les substituants situés du même coté du squelette polycyclique que le groupe méthyle C-19 (En C-10) sont dits β , et les autres α [40].

Le premier de ces composés fut isolé vert 1770, de calculs biliaires, par **Poullétier de la salle**, puis trouvé également, en 1815, dans les graisses animales, par **M.E.Chevreul**. Il fut nommé « cholestérine » (du grec *kholé* = bile et *stéréos* = solide) en souvenir de la source où il avait été découvert initialement. En 1859, **M.berthelot**, prenant en considération la fonction alcool, modifia le nom en cholestérol.

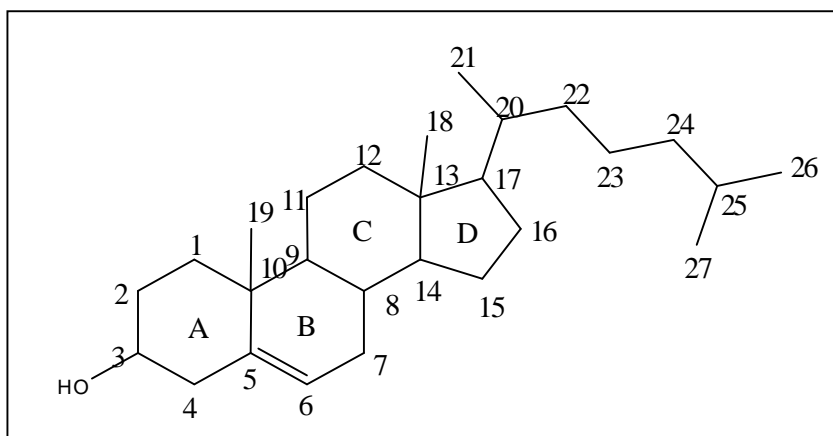


Fig.II-11 : La structure de cholestérol.

Depuis, de nombreux autres composés voisins ont été isolés. ce n'est qu'en 1936 que le terme générique « stéroïde » est donné à tous les corps chimiques qui possèdent un noyau (gonane) identique ou très proche de celui des stérols, alors que la domination « stérol » est réservée aux seuls hydroxy-3 β stéroïdes porteurs d'une longue chaîne en C-17 comme le cholestérol [44-46]. Les stéroïdes sont distribués dans le règne végétal et animal, et formés par une biosynthèse d'origine terpénique [47].

II-4-f-Les stérols :

Les stérols possèdent un groupement hydroxyle sur l'atome de carbone 3, généralement une double liaison entre les atomes de carbone 5 et 6 ainsi qu'une chaîne latérale rattachée au sommet 17 du noyau perhyrocyclopentanophénanthrène [7], leur représentant dans le règne animal est le cholestérol. Le cholestérol se trouve dans les tissus animales, comme constituant principal des membranes cellulaires, il joue un rôle dans la perméabilité membranaire [48]. C'est une molécule amphiphilique en C27, renferme un squelette tétracyclique planaire, avec une queue hydrophobe (le squelette carboné), et un groupement polaire : le groupe hydroxyle [49,51]. Bien que le cholestérol ne se trouve pas dans les plantes, on y rencontre plusieurs stérols apparentés [7]. Les stérols végétaux sont des analogues botaniques du cholestérol qui ne diffèrent de celui-ci que par leur chaîne latérale [52].

Les phytostérols sont donc des composés naturels appartenant à la famille des triterpènes, en rassemblant plus de 200 stérols différents, parmi plus de 4000 autres types de triterpènes [53,54]. Ils sont présents dans les plantes, les oléagineux, le germe de blé et les huiles non raffinées qui en sont issues ainsi que dans l'huile de bois de pin [55], se sont des éléments essentiels des membranes cellulaires végétales [56,57].

Les principaux stérols rencontrés dans les plantes sont : le sitostérol, le stigmastérol, le campestérol [58-60] ; le sitostérol et le campestérol possèdent une structure similaire à celle du cholestérol avec un groupement éthyle et méthyle en C-24 respectivement, cependant la structure du stigmastérol est comparable à celle du sitostérol à l'exception d'une additionnelle double liaison en C-22 [61].

Les stérols sont présents dans les plantes sous plusieurs formes : à l'état libre, estérifiés par combinaison avec les acides gras, et parfois glycosylés [58,62].

Les phytostérols sont divisés en deux groupes majeurs de stérols ; nommés :
Les « Δ^5 -stérols » : stérols avec une double liaison en position 5. Et « stanols » : stérols saturés et n'ont pas de double liaison Δ^5 [63]

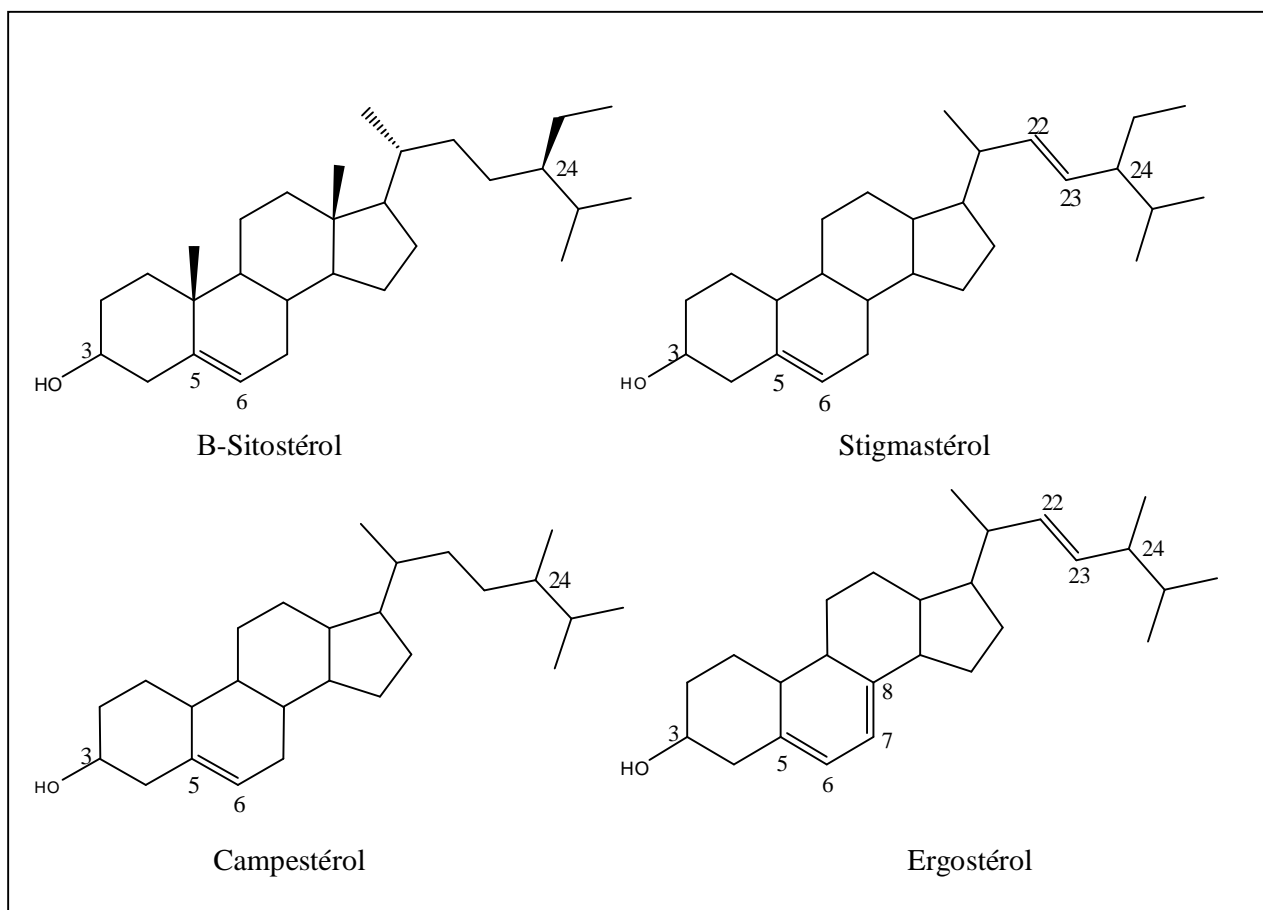


Fig.II-12 : Quelques structures des phytostérols.

Les stérols végétaux ne sont pas pour autant dépourvus de potentialités thérapeutiques ; les phytostérols comme phytostanols inhibent l'absorption du cholestérol par des mécanismes complexes, les phytostanols davantage que les phytostérols [64], en effet, le β -sitostérol a été connu comme agent hypocholestérolémiant, depuis 1951 [65].

Sur le plan de la cancérogenèse, la consommation de β -sitostérol chez le rat, associé à l'administration de carcinogènes diminue l'incidence de tumeurs coliques comparativement au carcinogène seul [66]. D'autres études ont suggéré l'effet anti-inflammatoire [67-71], et anti-atherogénique des phytostérols [72]. Ainsi d'autres données sont en faveur d'un effet anti-oxydant [59,73-75].

On peut citer également que les stérols végétaux sont des matières premières dans la production des stéroïdes thérapeutiques, ce dernier rôle a été performé dans les processus impliqués au domaine de la biotransformation seule, ou les biotransformations couplées avec des transformations chimiques conventionnelles [76-81].

Dans la nature, la voie biosynthétique conduisant à la famille des stéroïdes, à laquelle appartient le cholestérol, de même que les phytostérols est une séquence remarquable de couplages d'alcènes au niveau intramoléculaire.

Dans ce processus, le squalène est tout d'abord oxydé en présence de NADPH et d'oxygène moléculaire O_2 , conduisant au 2,3-oxyde de squalène. L'ouverture enzymatique, catalysée par un acide, du cycle de l'oxacyclopropane est suivie par une tétra ou éventuellement une pentacyclisation, qui donne des carbocations de divers types ou les complexes enzymatiques correspondants

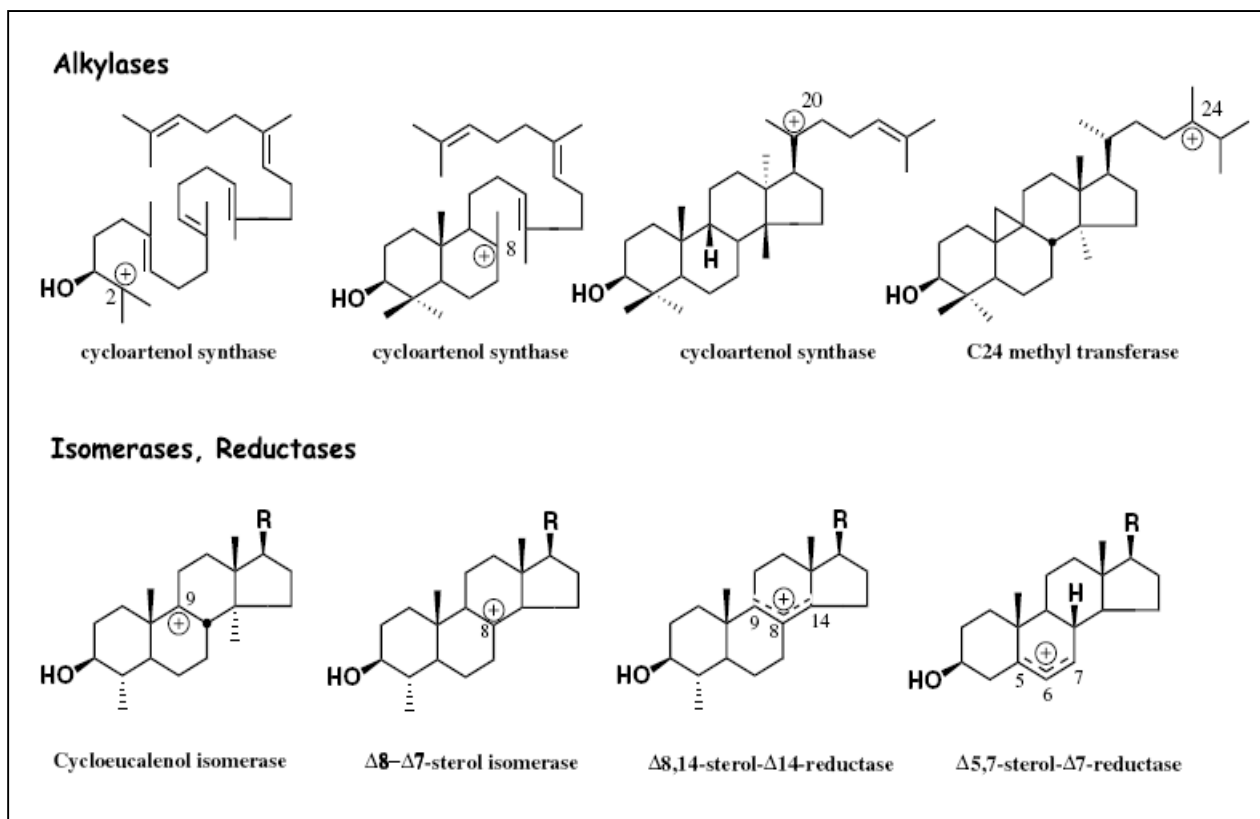


Fig.II-13 : Quelques structures des carbocations de la biosynthèse de stérols.

Toujours sous l'action d'enzymes spécifiques, ces carbocations subissent des transpositions diverses, se terminant par la création d'une double liaison à la suite de la perte d'un proton [2,82-83]. Tous les stérols sont issus de la déméthylation progressive du cycloarténol et de l'ouverture de son cycle 9β -19-cyclopropanique [30,84].

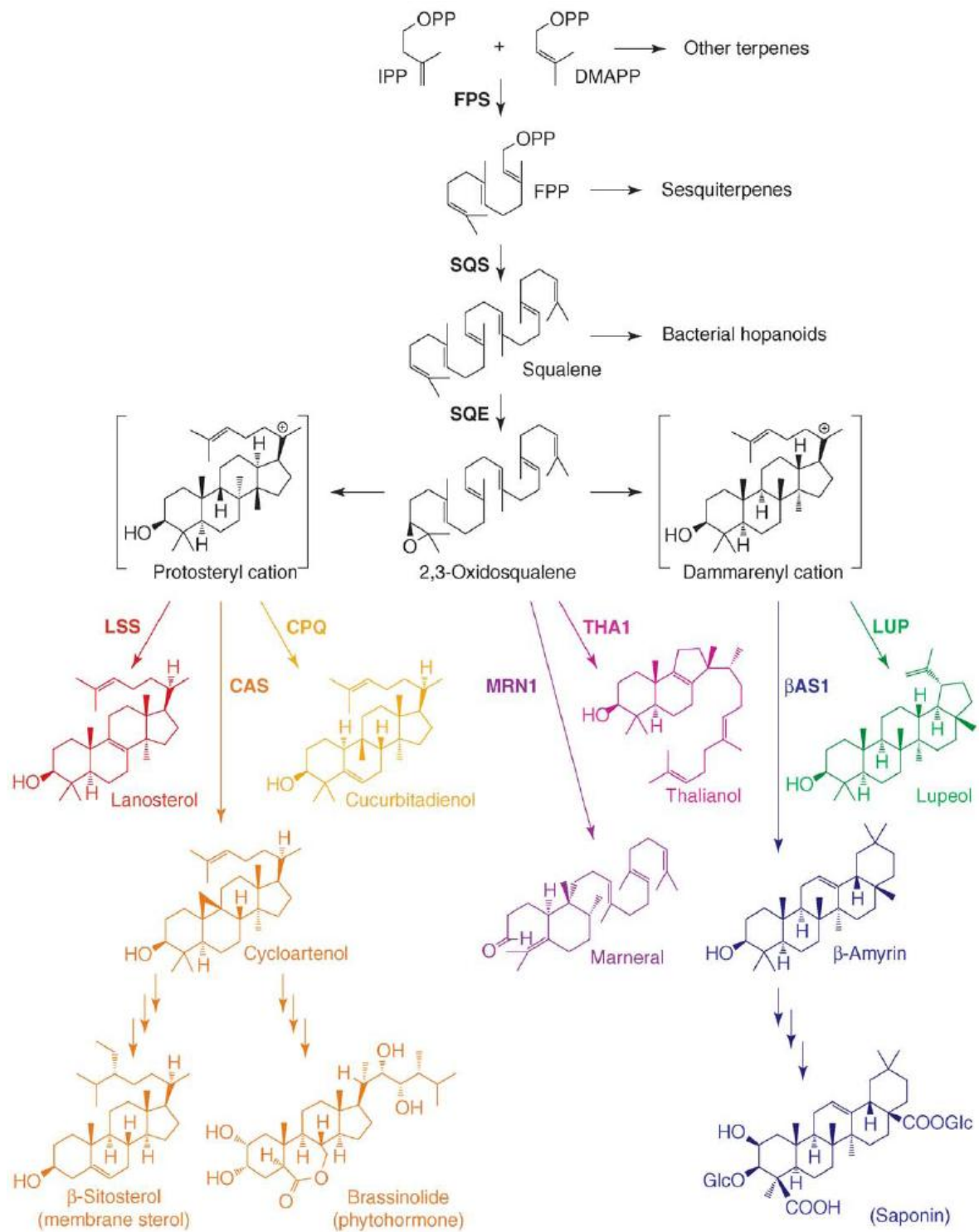


Fig.II-14 : La biosynthèse des stérols.

II-4-g-Les Tétraterpènes :

Les tétraterpènes les mieux connus sont les caroténoïdes, les caroténoïdes représentent un large groupe de pigments naturels de couleurs jaune, orange et rouge. Ils sont très répandus dans les plantes, les algues, et différents microorganismes. Actuellement environ 750 caroténoïdes ont été identifiés dans la nature [85], mais seulement 24 ont été détectés dans les tissus humains [86].

Ces substances contiennent une longue chaîne de 40 carbones, à doubles liaisons conjuguées de configuration « trans » dont les extrémités sont des chaînes ouvertes ou des cycles.

Le lycopène et le β -carotène sont des exemples des caroténoïdes acycliques et cycliques respectivement. Les caroténoïdes sont subdivisés en deux groupes :

Les hydrocarbures (carotènes), et leurs dérivés oxygénés (les xanthophylles).

Les caroténoïdes sont des composés biologiquement importants, car se sont des provitamines, et des agents anti-oxydants [87].

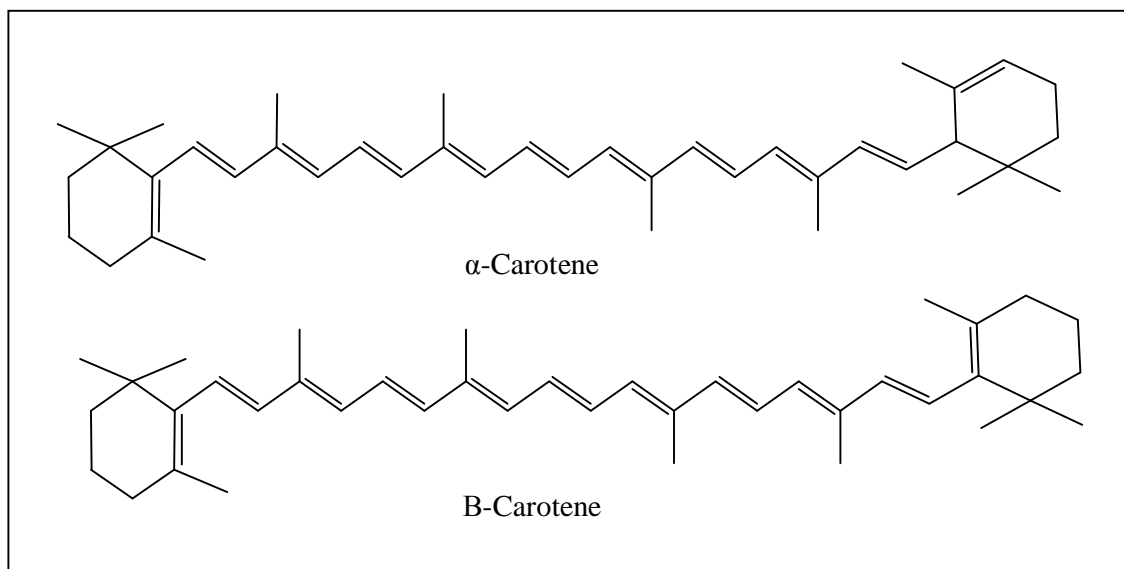


Fig.II-15 : Quelques structures de caroténoïdes.

II-4-h-Les polyterpènes :

Le caoutchouc naturel extrait de *l'Hévéa Brasiliensis* est un haut polymère de l'isoprène (poids moléculaire de 140.000 à 210.000) [88]. Donc les polyterpènes sont des macromolécules de poids moléculaire très élevé, dont le motif de base est l'isoprène. Sur le plan thérapeutique, ces composés n'ont pas des activités biologiques discutées [89].

Références bibliographiques :

- [1] Liu, R.H., 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition* 134, 3479S–3485S.
- [2] Vollhard, K. P.C., E.Schore, N., 1995. « *Traité de chimie organique* », 2 Edition, de boeck-wesmael S.A., Bruxelles, pp.418.
- [3] Koskinen, A., 1993. « *Asymmetric synthesis of natural products* », John Wiley & Sons ltd, England, pp .1-3.
- [4] Koning, G. M. , Wright, A. D., Franzblau, S. G. , 2000. *planta med.*,66,pp.337-342.
- [5] Pereira, R.C., DA Gama, B.A.P., Teixeira, V.L., Yoneshigue-valentin, Y.,2003. *Braz.J.Bio*, 63 (4). pp : 665-672.
- [6] Teisseire, P.J.,1991. « *Chimie de substances odorantes* », Tec et Doc, Lavoisier,Paris,pp :9.
- [7] Donald, J.C., et Gearge S.H.,1968. « *Chimie organique* », 2 Edition,Gautier Villars.
- [8] Bouvier,F., Rahier, A., Camara,B.,2005.Biogenesis,molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in lipid research* 44, 357-429.
- [9] Hill, R.A.,2002.dictionnary of natural products on CD-ROM, Ed. version 10 :2. Chapman & Hall,CRC,New york.
- [10] Schulz,H.,Schrader,B.,Quilitzsch,R.,Pfeffer,S., Kruger, H.,2003.*J.AgricFoodChem.*51,2475.
- [11] Bruneton, J., 1993. « *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* ». 2Edition, Université de paris sud, France,pp .389-617.
- [12] Tsao,R.,Coats, J.R.,1995.Starting from nature to make better insecticides. *Chemtech* 25, 23-28.
- [13] Murakami, A., Tanaka, T., Lee, J.-Y.,Surch, Y.-J., Kim, H.W. , Kawabata, K., Nakamura, Y. , Jiwajinda, S., Ohigashi, H. ,2004.Zerumbone, Asesquiterpene en subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *International journal of cancer*110, 481-490.
- [14] Han,Y., 2005. Ginkgo terpene component has an anti-inflammatory effect on candida albicans-caused arthritic inflammation. *International Immunopharmacology* 5, 1049-1056.
- [15] Grodnitzky, J.A., Coats, J.R.,2002.QSAR evaluation of monoterpenoids insecticidal activity. *Journal of Agricultural and food chemistry* 50, 4576-4580.
- [16] Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L., Leach, D.N. , 1999. The role of structure

- and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. Flavour and fragrance journal 14,322-332.
- [17] Velicković, A.S., Ristić, M.S., Veliković, D.T., Ilić, S.N., Mitić, N.D.2003. J.Serb.Chem.Soc.68(6),pp .435-445.
- [18] Hsiou-Y.D.,Yang-ch.W.,and Hang-ch.L.,2000. Journal of the chinese chemical society,47,pp .561-566.
- [19] Hyun-J.,Hyun ,J.K.,Hyang, S. C.,2007.Quntitative sructure-activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids.Life sciences80,835-841.
- [20] Hill,R.A. ,1993.In the chemistry of natural products, 2 nd edn(Ed.R.H.Thomson),Blackie,Glasgow.124.
- [21] Wani,M.C.,Taylor, H.L. ,Wall,M.E. , Coggon,P., Mc phail,A.T. ,1971. Plant antitumor agents.VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from taxus brevifolia.J.Am.Chem.Soc.93(9),2325-2327.
- [22] Valdés, L.J., 1994.A.J.Psycoactive Drugs.26,pp .277-283.
- [23] John D.R., et Marjorie C.C.,1968. « Chimie organique moderne ».
- [24] Kirschner, K.,1961.Thesis, University of Munich.
- [25] Eggerer, H., lynen, F.,1960.Ann. Chem.830.58.
- [26] Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R., Saunders, C.,1995. Is the raction catalysed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants ? Plant Physiology 109,pp .1337-1343.
- [27] Gerhard, R.,1993. « Métabolisme de végétaux, physiologie et biochimie », Press polytechnique et universitaire romandes, Diffusion, Tec et Doc, France, pp . 291-292.
- [28] Bakkali, F.,2007. Biological effects of essential oils – A review, Food Chem. Toxicol.
- [29] Padua de, L.S., Bunyaphatsara, N., Lemmens, R.H.M.J., 1999. Plant Resources of South-East Asia, No. 12 (1). Medicinal and Poisonous Plants 1. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- [30] Bruneton, J., 1999. « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ». 3 Edition, Editeur technique et documentation, Paris,pp . 472-670.
- [31] Cane, D.E.,1985. Acc.Chem.Res.18 ,220-226.
- [32] Croteau, R., Cane, D.E.,1985. Methods in enzymology steroids and isoprnoids (Part A), Vol.110, Academic Press, New york, pp .383-405.
- [33] Cane, D.E.,1990.Chem.Rev.90,1089-1103.
- [34] Wendt, K.U.,1998. G.E.Structure 6 ,127-133.

- [35] Christianson, D.W.,2006. *Chem.Rev.*106 ,3412-3442.
- [36] Herz, W.,1977. in : V.H.Heywood, J.B.Harbone, B.L.Turner (Eds.), « The biology and chemistry of the compositae », Academic Press, london, P.337, Chapter 11.
- [37] Baranska, M., Schulz, H., Kruger, H., Quilitzsch, R., 2005.*Anal.Bianal.Chem.*381 ,1241.
- [38] Culioli G. , MesguicheV. , PiovettiL.,and vallsR.,1999.*Biochem.Syst.Ecol.*,27,665.
- [39] Langenheim, J.H. ,1990. *Am.Scientist* .78 ,16-24.
- [40] Ourisson G.et Grabbé, P.,1961. « Les triterpènes tétracycliques » , Paris, Hermann Ed.194.
- [41] Raphel, I. ,1966. *Natural products*, Deuxième édition, Academic Press, INC.A laboratory guide,pp : 1-21, pp :169-181.
- [42] Rees, H.H., Googwin, T.W.,1974. *Biochem. Soc.Trans.*, 2, pp . 1027-1066.
- [43] Klyne, W.,1966. « La chimie des steroides », Gauthier-villars,Paris, pp .13,18.
- [44] Chevreul, M.E., 1915. *Ann.Chim* .,95,5.
- [45] Schulze, E.,1872. *Ber.*, 5.175 ; *Ber.*, 57, 177.
- [46] Lewis, D.A., Mc Ghie, J.F.,1956.*Chem.And.Ind.* 550.
- [47] Charles, O.W., Gisvold, O., Doerge, R.F.,1972. *Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry*, 7 Edition, J.B.Lippicolt company philadelphia. Toronto, pp .731,776,810.
- [48] Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D.,2003.*Phytosterols in the prevention of human pathologies. Biomedicine & pharmacotherapy* .57 , 321-325.
- [49] Brown, A.J. , Jessup, W.,1999. *Atherosclerosis* 142, 1.
- [50] Miller, W.L. , *Clin. B.* ,1998.*Endocrinol. Metab.* 12 (1) ,67–81.
- [51] Payne, A.H. , Hales, D.B. ,2004. *Endocr. Rev.* 25 (6) ,947–970.
- [52] Ling ,W.H., Jones ,P.J.H.,1995. *Minireview.Dietary phytosterols. A review of metabolism, benefits and side effects. Life Sci.* ,57 :195-206.
- [53] Goad, J.L., Charlewood, B.V., Banthorpe(Eds.) , D.V., *Methods in plant biochemistry*,Vol.7, Academic press, london,1991,p.369.
- [54] Connolly, J.D., Hill, R.A., Charlewood, B.V., Banthorpe (Eds.) ,D.V.,*Methods in plant biochemistry*,7,Academic press, London,p.331.
- [55] Korpela, R. , Tuomiletto, J. ,Hogstrom, P., Seppo, L .,Piironen ,V., Salovaananew ,P. , et al., 2006.*Safety aspects and cholesterol-lowering efficacy of low fat dairy products containing plants sterols. Eur. J .Clin. Nutr* .,60 , 633-49.
- [56] Ostlund Jr, R.E.,2002. *Annu.Rev.Nutrition*22,533.
- [57] Bays, H. E. , Moore, P.B., Drehobl, M.A. , Rosenblatt, S., Toth, P.D., 2001.

- Clin. Ther.23,1209.
- [58] Moreau, R.A., Whitaker, B.D., Hicks, K.B., 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods : structure diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog.Lipid Res.*41,457-500.
- [59] Berger, A., Jones, P.J.H., Abumweis, S.S., 2004. Plant sterols : factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis.*3,5-23.
- [60] Kritchevsky, D. , Chem, S.C.,2005.Phytosterols-health benefits and potential concerns : A review.*Nutr.Res.*25,413-428.
- [61] Salen, G., Kwiterovich Jr ,P.O., Shefer, S., et al.,1985. Increased plasma cholestanol and 5 alpha-saturated plant sterol derivatives in subjects with sitosterolemia and xanthomatosis. *J. Lipid. Res .*,26,203–9.
- [62] Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Toivo, J.I., Swank, M.A., Simpkins, A.H., 2002. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *J. Food Compos. Anal.* 15, 123–142.
- [63] Katan, M.B., Grundy, S.M. , Jones, P. , Law, M., Miettinen, T., Paoletti, R.,2003. *Mayo. Clin. Proc.* 78 ,965–978.
- [64] Ikeda ,I., Sugano ,M.,1998. Inhibition on cholesterol absorption by plants sterols for mass intervention. *Curr. Opin. Lipidol .*,9:527–31.
- [65] Peterson ,D.W.,1951. Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proc. Soc. Exp .Biol .Med .*,78, 143–7.
- [66] Raicht ,R..F, Cohen ,B.I., Fazzini ,E.P., Sarwal ,A.N., Takahashi ,M.,1980. Prospective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res.*,40,908–13.
- [67] Gomez, M.A., Saenz, M.T., Garcia, M.D., Ferná'ndez, M.A., 1999. Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. *Z. Naturforsch. [C]* 54, 937–941.
- [68] Bouic, P.J.D., 2002. Sterols and sterolins: new drugs for the immune system? *Drug Discovery Today* 7, 775–778.
- [69] Lane, R.H., 2002. Novel anti-inflammatory compositions and methods of use. WO02072035.
- [70] Niazi, S.K., 2003. Composition and method for the treatment of diaper rash using natural products. WO03099200.
- [71] Okoli, C.O., Akah, P.A., 2004. Mechanisms of the anti-inflammatory activity of the

- leaf extracts of *Culcasia scandens* P. Beauv (Araceae).
Pharmacol. Biochem. Behavior 79, 473–481.
- [72] Nashed, B., Yeganeh, B., Hayglass, K.T., Moghadasian, M.H., 2005.
Antiatherogenic effects of dietary plant sterols are associated with inhibition
of proinflammatory cytokine production in Apo E-KO mice. J. Nutr. 135, 2438–2444.
- [73] Eugster, C., Eugster, C., Haldemann, W., Rivara, G., 1993. Sterols, their fatty acid
esters and glucosides; processes for their preparation; fatty acid esters and
glucosides; processes for their preparation; spontaneously dispersible agents
containing these compounds, and their use for treatment of tumors. US5270041.
- [74] Choi, Y.H., Kong, K.R., Kim, Y.A., Jung, K.O., Kil, J.H., Rhee, S.H.,
Park, K.Y., 2003. Induction of Bax and activation of caspases during beta-sitosterol
mediated apoptosis in human colon cancer cells. Int. J. Oncol. 23, 1657–1662.
- [75] Platt, D., Pelled, D., Shulman, A., 2004. Oils enriched with diacylglycerols
and phytosterolesters for use in the reduction of cholesterol
and triglycerides. WO2004069150.
- [76] Ahmad, S., Garg, S.K., Johri, B.N., 1992. Biotransformation of sterols:
selective cleavage of the side chain. Biotechnol. Adv. 10, 1–67.
- [77] Hogg, J.A., 1992. Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective:
a profile of innovation. Steroids 257, 593–616.
- [78] Mahato, S.B., Mazumder, I., 1995. Current trends in microbial steroid
transformation. Phytochemistry 34, 883–898.
- [79] Mahato, S.B., Garai, S., 1997. Advances in microbial steroid biotransformation.
Steroids 62, 332–345.
- [80] Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M.,
Witholt, B., 2001. Industrial biocatalysis: today and tomorrow. Nature 401, 258–268.
- [81] Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H.M., Cabral, J.M.S., 2003.
Microbial conversion of steroid compounds: recent developments.
Enzyme Microb. Technol. 32, 668–705.
- [82] Harrison, D.M., 1990. Natural products reports., 7, pp :459-484.
- [83] Mintto, P., 1981. Biosynthesis of natural products. John Willey and sons.,
New York. Chichester. Brisbane. Toronto.
- [84] Guignard, J.L., 1974. Abrégé de biochimie végétale. pp :170-186.
- [85] Britton, G., 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function.
FASEB Journal 9, 1551–1558.

- [86] Britton, G., Carotenoids Handbook, Birkhauser Verlag AG, Basel, 2004.
- [87] Khachik, F. , Beecher, G.R. , Smith Jr, J., ,Lutein, C.,1995.
lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer,
J. Cell. Biochem. (Suppl. 22) ,236–246.
- [88] Dubois, P., 1968. Plastiques modernes, Tome I, Masson et Cle Editeurs, Paris, pp: 421.
- [89] Buchanan, R.A., Swanson, C.L., Weisleder, D., & Cull, I.M. ,1979. phytochemistry18 ,
1069-1071.

Chapitre III : Flavonoïdes

III-1-Introduction :

Les composés phénoliques correspondent à une grande variété de produits résultant de métabolisme secondaire des plantes, et possédant dans leur squelette, un ou plus d'un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupes hydroxyles, généralement, ils sont subdivisés en : Acides phénoliques, stilbenes, coumarines, tannins, et flavonoïdes [1].

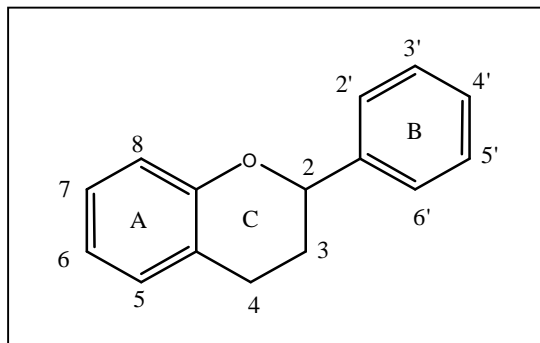
Les phénoliques peuvent avoir des fonctions essentielles dans la reproduction et le développement des plantes [2-4], de plus ils ne sont pas dépourvus des potentialités thérapeutiques. Les flavonoides par exemple ; occupent un rôle central dans la recherche chimique et pharmaceutique, durant des années et jusqu'à présent, en effet, plus de 2000 publications par an contenant « flavonoides » comme mot clé. Ce qui prouve l'association de ces métabolites avec une série plus vaste des effets positifs pour la santé, fondée sur leurs activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires... [5,6].

III-2-Structure chimique et nomenclature :

En 1936, le professeur **Szent Györgyi** a reporté l'isolement d'une substance caractérisée comme un agent fortement réducteur, en jouant le rôle d'un cofacteur dans la réaction entre la peroxydase et l'acide ascorbique. Cette substance a été nommée « vitamine P », plus tard, cette substance a été classifiée comme le flavonoïde « rutine » qui a été ensuite identifié et isolé à partir des citrons et de poivre rouge par le même professeur [7].

Depuis, le nombre des flavonoides isolés n'est cessé de croître et étudier, en effet, plus de 9000 structures ont été identifiées jusqu'à maintenant. Ces composés sont ubiquitaires dans les cellules photosynthétiques, et par conséquent se trouvent largement dans le royaume végétal, on peut les rencontrer également chez quelques mousses [8-10].

La structure chimique des flavonoides est basé principalement sur un squelette de quinze (15) atomes de carbones : le 2- phenyl-benzo [α] pyrane, ou le noyau flavane, constitué de deux cycles benzéniques (A et B) reliés par un hétérocycle, le noyau pyrane (C) [11,12], ce qui donne aux flavonoides, un faible poids moléculaire [13].



FigIII-1 : Le squelette de noyau flavane.

La variation du degré d'oxydation et la différence des substituants de l'hétérocycle C peuvent subdiviser les flavonoides en familles bien distinguées : flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et chalcones [14].

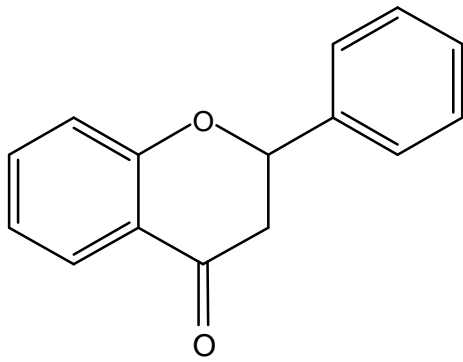
La nature chimique des flavonoides dépend de la structure de chaque classe, le degré de l'hydroxylation, autres substitutions et conjuguaisons et le degré de la polymérisation [15]. Dans les plantes, ils résistent à la chaleur, l'oxygène, la sécheresse, et peuvent modérer leur degré de l'acidité, cependant, ils peuvent se modifier par la lumière du soleil [16], La photostabilité de la molécule des flavonoides dépend de la nature du groupement hydroxyle attaché en position 3 de cycle C. Ainsi l'absence ou la glycosylation de ce groupe résulte à un état élevé de la photostabilité de la molécule [17].

Les flavonoides individuelles sont nommés selon trois méthodes différentes :

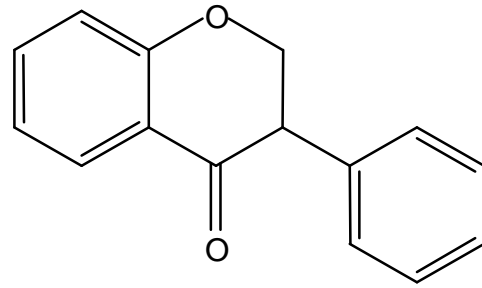
La nomenclature triviale : largement employée, elle indique soit la classe de flavonoïde, soit leur plante source. Par exemple, les noms terminés par « inidine » sont attribués aux anthocyanidines. Ceux qui terminent par « etine », sont généralement désignés des flavonols. Dans un autre exemple, les noms des deux composés « tricine » et « hypolaetine » sont dérivés de leurs origines (ils sont extraire des plantes appartenant au deux genres *triticum* et *hypolaena*, respectivement).

La nomenclature semi systématique : elle est basée sur la nomenclature triviale désignant la classe de flavonoïde et la structure telle qu'elle paraît. Par exemple : 3, 5, 7,3',4'-pentahydroxyflavone, ou 3,3',4', 5,7-pentahydroxyflavone.

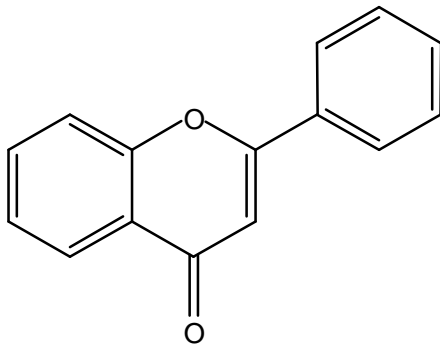
La nomenclature systématique : (selon IUPAC), par exemple, 3,4-dihydro-2-phenyl-2H-1-benzopyrane pour le squelette flavane. Cependant cette dernière méthode est très encombrée, et par conséquent rarement utilisée [18].



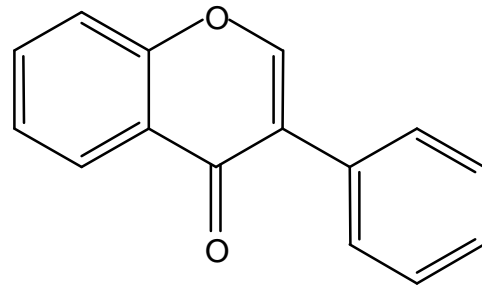
Flavanone



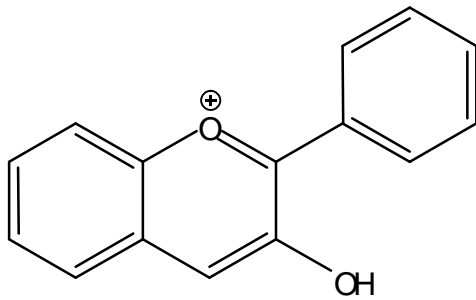
Isoflavanone



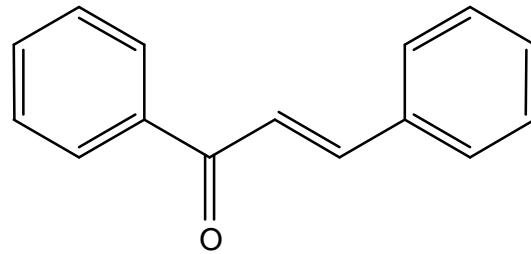
Flavone



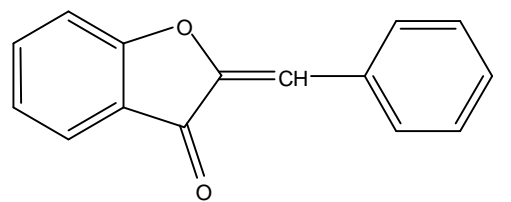
Isoflavone



Anthocyanidine



Chalcone



Aurone

Fig.III-2 : Quelques structures de base des flavonoides

III-3-Biosynthèse des flavonoides :

Les connaissances actuelles sur la biosynthèse et la production des flavonoides catalysée par des enzymes proviennent de plusieurs études réalisées par de nombreux chercheurs [19-22]. Les flavonoides sont formés par la combinaison des dérivés de phénylalanine (via la voie de l'acide shikimique) et l'acide acétique.

La première étape renferme la formation de phénylalanine à partir de phenylpyruvate. La phénylalanine est ensuite transformé en acide cinnamique –trans, ce dernier est hydrolysé en p-acide cinnamique (en C9).

Dans une deuxième étape, les acides en C9 sont condensés avec trois unités en C2 (le malonyl-CoA) pour former la structure de base en C15. C'est la forme de chalcone [13]. Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la biosynthèse des divers flavonoides, elle est en équilibre avec les flavonoides. Cet équilibre étant contrôlé par une enzyme « La chalcone isomérase », cette dernière catalyse une fermeture stéréospécifique du cycle (addition syn., sur la double liaison) conduisant à la seule (2S)-flavanone [23].

Les aurones dérivent directement des chalcones.

Les flavanones sont convertis en isoflavones sous l'action de l'enzyme :

Isoflavone synthase [24].

L'oxydation enzymatique et l'introduction de la double liaison entre les carbones 2 et 3, dans les flavanones, menant à la formation des flavones. Cette réaction est catalysée par : la flavone synthase I et la flavone synthase II (FNS I et FNS II) [25].

L'hydroxylation des flavanones en position 3 conduit aux dihydroflavonols, cette réaction est catalysée par l'enzyme flavanone 3-hydroxylase.

Les flavonols sont formés par l'introduction d'une double liaison entre C2 et C3 dans les dihydroflavonols en présence d'enzyme flavonol synthase [26,19].

Toutes ces étapes sont reportées dans la **fig.III-3** :

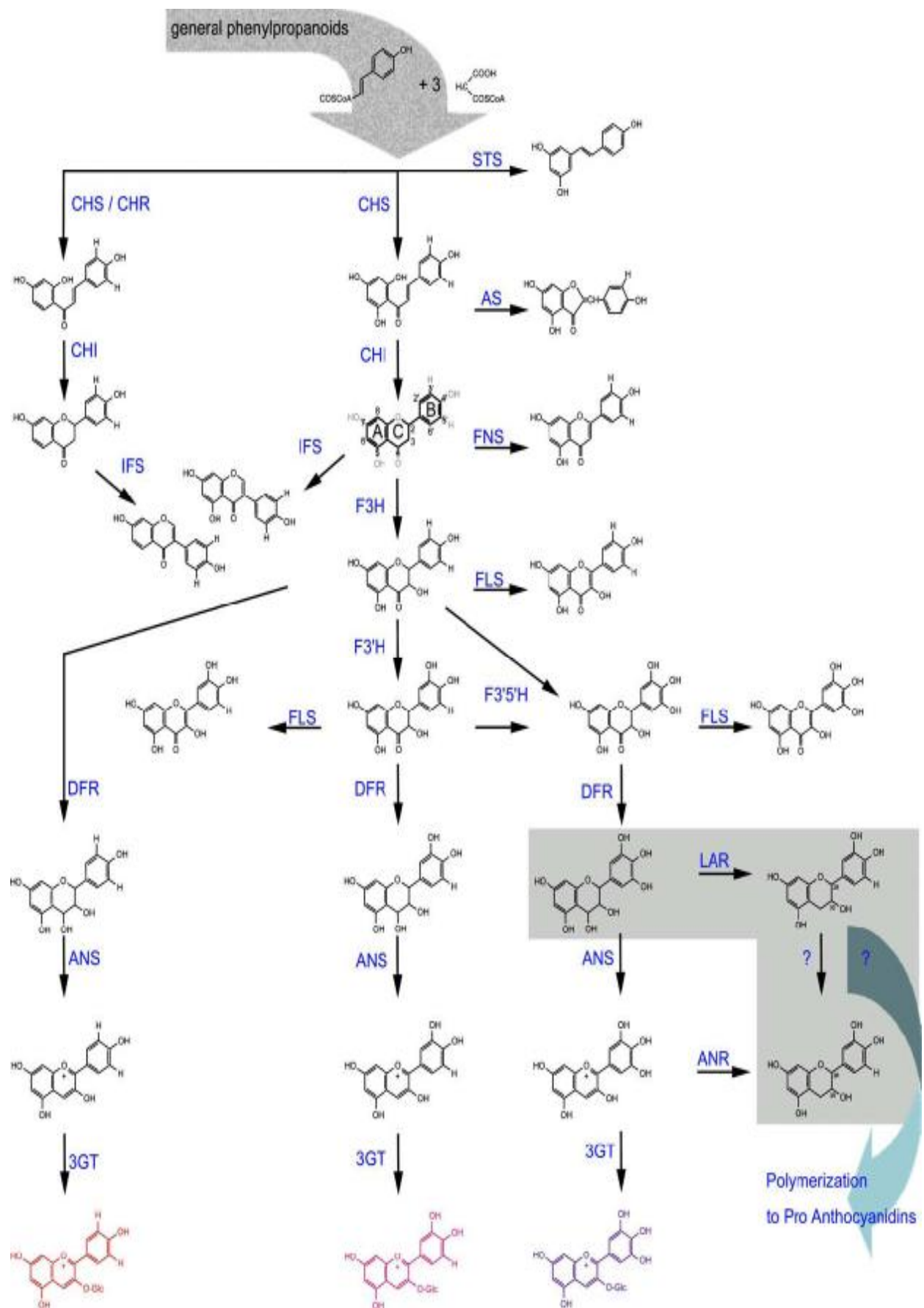


Fig.III-3 : Biosynthèse des flavonoides

Tableau III.1 : Liste des enzymes (indiquées dans la **Fig. III-3**) conduisant aux différentes classes des flavonoïdes.

Abréviations	L'enzyme
CHS	Chalcone synthase
CHR	Chalcone reductase
STS	Stilbene synthase
AS	Aureusidine synthase
CHI	Chalcone isomerase
F3H	Flavanone hydroxylase
FNS	Flavone synthase
IFS	Isoflavone synthase
FLS	Flavonol synthase
F3'H	Flavonoïde-3'-hydroxylase
F3'5'H	Flavonoïde-3',5'-hydroxylase
DFR	Dihydroflavonol -4-reductase
ANS	Anthocyanidine synthase
LAR	Leucoanthocyanidine reductase
ANR	Anthocyanidine reductase
3GT	Flavonoïde-3-glycosyltransferase

III-4-Classification des flavonoides :

III-4-a-Flavones et flavonols :

Le terme flavone a été utilisé pour la première fois en 1895 par **Kostanecki** et **Tambor** [27], désigne une large classe appartenant à la famille des flavonoides, en effet, en 1999, **Harbone** et **Baxter** ont listé plus de 350 flavones et environ 500 flavones glycosides, ce qui indique la grande diversité de ces composés [8-9,28].

Structuralement, les flavones sont caractérisées par la présence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 de l'hétérocycle du squelette flavane, et un groupement carbonyle en position 4 (4-oxo). Le cycle aromatique B est attaché à la position 2, et généralement la position 3 du flavone reste libre. Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement hydroxyle en position C3 [27].

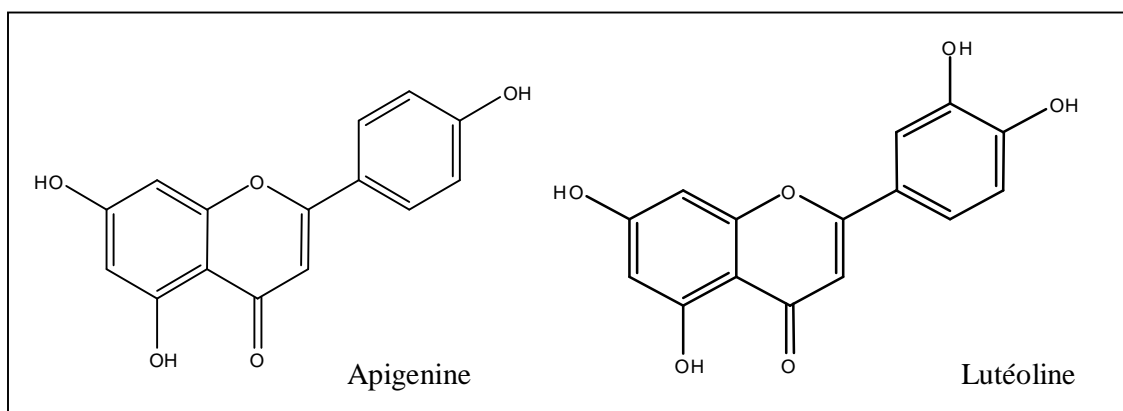


Fig.III-4 : Exemples des flavones

III-4-b-Flavanones et dihydroflavonols :

Les flavanones présentent des structures uniques qui diffèrent des autres flavonoides, par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2, à l'exception des 3-hydroxyflavanones ou les dihydroflavonols qui sont caractérisés par deux carbones chirales en positions 2 et 3 [28,29].

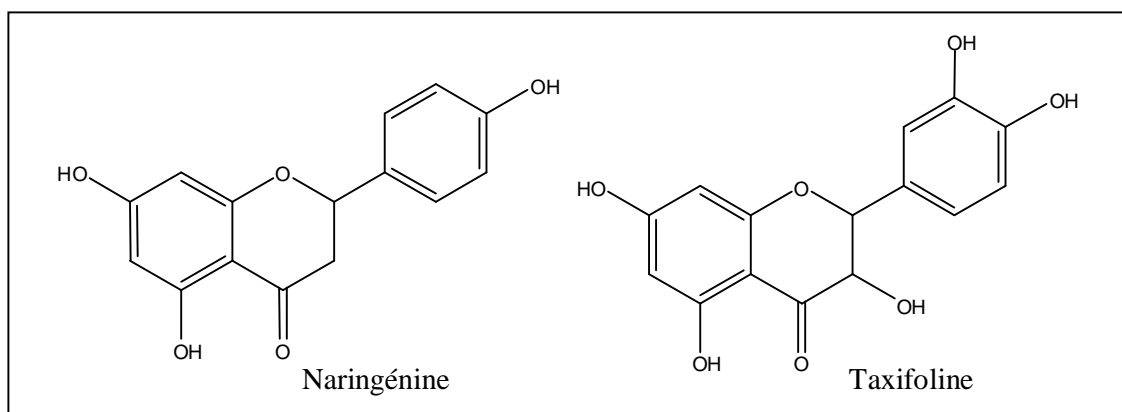


Fig.III-5 : Exemples de flavanones et dihydroflavanols

III-4-c-Isoflavones :

Les isoflavones constituent une spécifique branche des flavonoïdes, qui diffèrent des autres par la position du noyau phénolique B. Jusqu'à présent, plus de 1600 isoflavonoïdes aglycones et glycosides ont été identifiés, dont la grande majorité se trouvent chez la famille des légumineuses [30]. D'autres études récentes, ont reportés la présence des isoflavonoïdes structurellement différents et complexes chez les familles suivantes :

Violaceae [31,32], Sterculiaceae [33], Magnolaceae [34], Rhamnaceae [35], Rubiaceae [36] et Zygophyllaceae [37].

Ainsi, d'autres données préliminaires sont en faveur de la présence de ces composés chez les trois familles : Cannabaceae, Rutaceae et Poaceae [38-40]. En effet, **O.lapcik** a énuméré dans une publication récente l'isolement de 225 isoflavonoïdes à partir de 59 plantes non légumineuses [41].

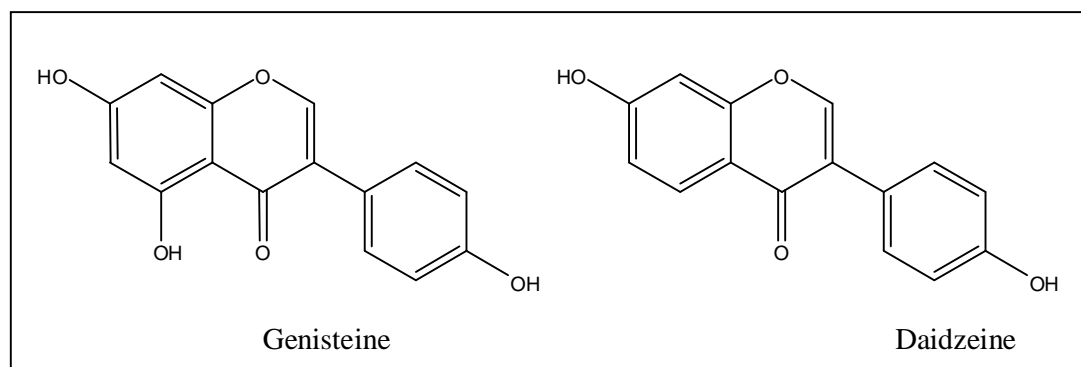


Fig.III-6 : Quelques exemples d'isoflavones.

III-4-d-Chalcones et aurones :

Les chalcones, ou 1,3-diaryl-2-propen-1-ones, représentent une des classes majeures des produits naturels appartenant à la famille des flavonoïdes.

Chimiquement, elles sont constituées par deux unités aromatiques, reliées par une chaîne tricarbonée, ouverte, cétonique et α, β insaturée. Ces substances naturelles sont souvent polyhydroxylées sur les cycles phénoliques, ainsi le noyau catechol est présent chez de nombreuses chalcones [42,43].

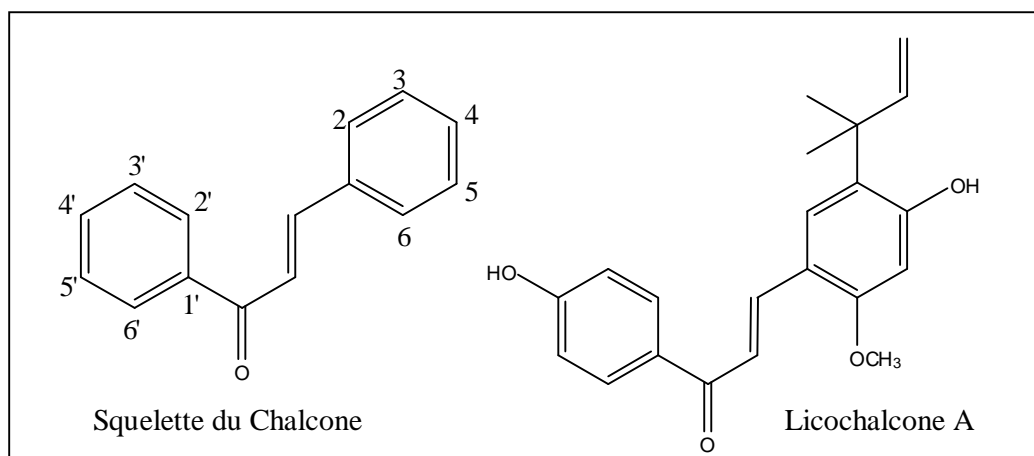


Fig.III-7 : Exemples de chalcones.

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène-coumaran-3-one, renfermant plusieurs fonctions hydroxyles sur leurs cycles aromatiques.

Le terme aurone provenant du latin « *Aurum* » signifiant « Or », car ces composés sont responsables de la coloration dorée (jaune brillante) de nombreuses fleurs ornementales des familles Scroplulariaceae (Snapdragon [*Antirrhinum Majus*]) et Compositae (Coreopsis, Cosmos et Dahlia) [44-47].

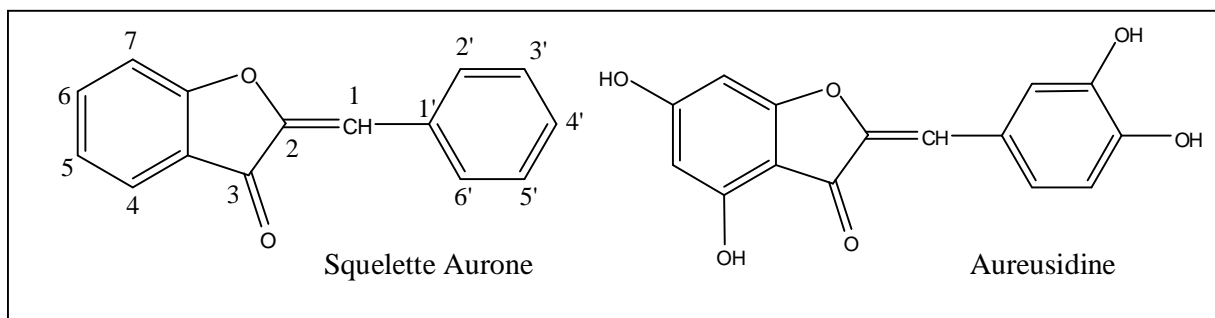


Fig.III-8 : Exemple des aurones

III-4-e-Anthocyanines et anthocyanidines :

Les anthocyanines (en grec *anthos* signifie fleur, et *kyanos* signifie bleue) représentent les pigments les plus importants des plantes, ces pigments sont visibles à l'œil nu.

Les anthocyanines désignent un vaste groupe des flavonoïdes, se sont les glucosides des polyhydroxy et polyméthoxy des dérivés de 2-phenylbenzopyrylium ou les sels de flavylium.

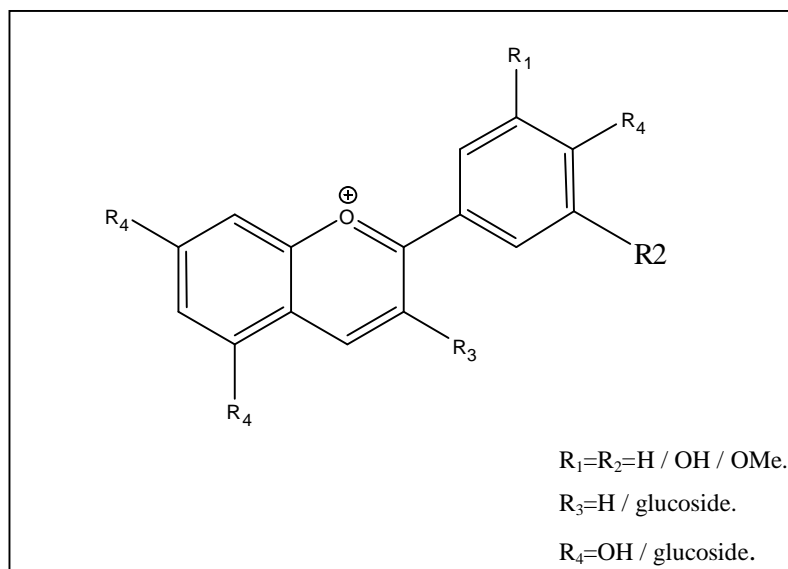


Fig.III-9 : Structure de base de cation flavylium.

Les différences entre les individuelles anthocyanines sont reliées au nombre de groupes hydroxyles, la nature et le nombre des sucres attachés à la molécule, la position de cet attachement, la nature et le nombre des acides aliphatiques ou aromatiques attachés au sucre dans la molécule.

Actuellement, on compte 17 anthocyanidines (aglycones) naturels dont six (6) d'entre eux sont connus dans les plantes supérieures : pelargonidine, peonidine, cyanidine, malvidine, petunidine, et delphinidine. L'anthocyanine le plus fréquent chez les plantes est :

Le cyanidine-3-glucoside.

Basé sur les résultats publiés dans différents revues, il est estimé que le nombre des anthocyanines trouvés dans les plantes a largement dépassé 400 [48-51].

III-5-Substitution du squelette flavonique :

III-5-1-La O-Substitution :

III-5-1a- L'hydroxylation :

D'après la voie biogénétique des flavonoides, les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux, et existent avant la constitution du noyau chalcone (généralement pour les flavones et les flavonols) [52]. L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la formation du squelette chalcone et fermeture de l'hétérocycle C. La polyhydroxylation sur le noyau B (en positions 3', 4', 5') se fera par le biais d'enzymes hydroxylases [53,54]. Les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylées [55].

III-5-1b-La méthylation :

La méthylation peut se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7,8), le noyau B (carbones 2',3',4',5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones et flavonols [53]. Effectivement la fixation du groupement méthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (O-méthyltransferase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la S-adenosyl-méthionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle [53,56].

III-5-1c-La O-glycosylation :

Elle s'effectue entre un hydroxyle du squelette flavonique et un hydroxyle alcoolique du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose, et arabinose).

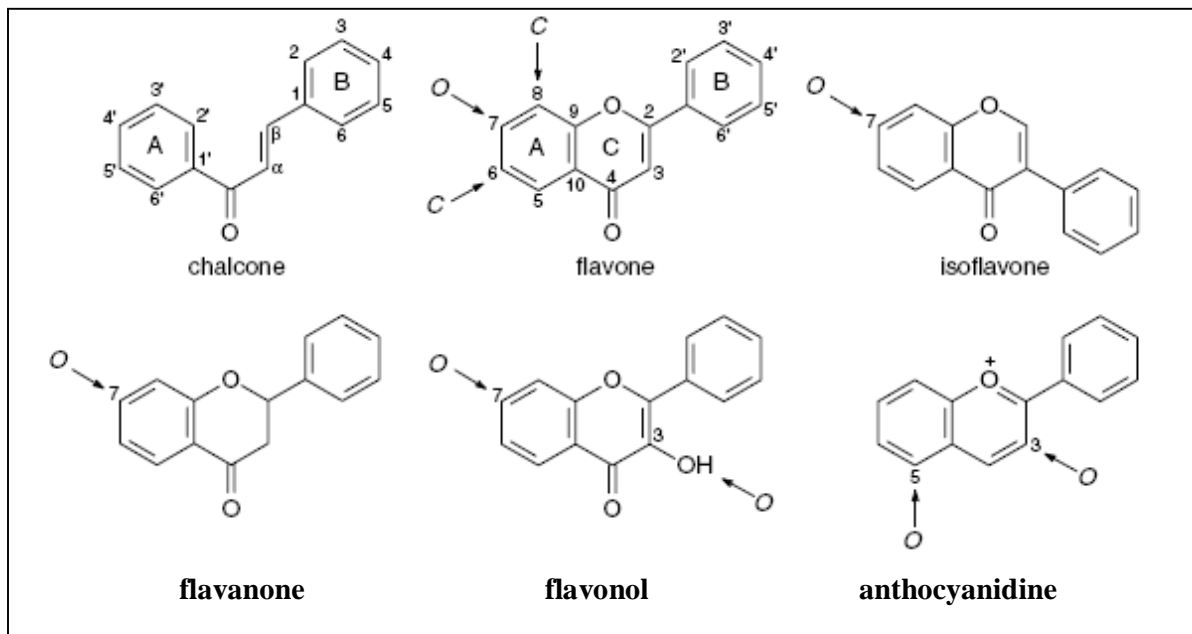
La O-glycosylation se fait en présence de l'enzyme glucosyltransferase, et un donneur de sucre comme UDP-Glu (uridine diphosphate glucose).

D'une manière générale, l'hydroxyle de la position 7 constitue le site préférentiel de la glycosylation dans le cas des flavones, flavanones et isoflavones, alors que dans le cas des flavonols c'est l'hydroxyle de la position 3.

Dans le cas des anthocyanidines c'est les deux hydroxyles en positions 3 et 5.

Les 5-O-glucosides sont rares, pour les composés contenant un groupe carbonyle en position 4, à cause de la liaison hydrogène formée entre ce groupe et le groupe hydroxyle en position 5.

Les disaccharides sont également associés au flavonoides dont les plus communs sont le rutinoside (rhamnosyl-(1-6)-glucose) et le neohesperinoside (rhamnosyl-(1-2)-glucose) [57-60].



FigIII-10 : Les sites préférentiels de la *O*- et la *C*-glycosylation.

III-5-2-La *C*-substitution :

III-5-2a-La *C*-méthylation :

Le radical méthyle dans ce type de substitution va se lier directement au squelette flavonique (cycle benzénique) par une liaison carbone-carbone. Cette liaison est rencontrée en position C-6 ou / et en position C-8 [61].

III-5-2b-La *C*-glycosylation :

Dans les flavonoides *C*-glycosylés, le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone, cette dernière résiste à l'hydrolyse acide [60].

Plus de 350 hétérosides de type *C*-glycosylés sont trouvés dans la nature [62].

La *C*-glycosylation est seulement remarquée en positions C-6 et C-8 des flavonoides aglycones (**Fig.III-10**) [63].

III-6-Diversité et distribution :

Les flavonoides peuvent se trouver sous différentes formes dans les plantes, ces formes sont modifiées par une additionnelle hydroxylation, méthylation et plus généralement la glycosylation [58].

Cette dernière peut changer la polarité de la molécule et même ses propriétés biologiques, et sensiblement accroître le poids moléculaire des flavonoides [15]. La glycosylation joue un rôle très important, en rendant les flavonoides moins réactifs, et plus soluble dans l'eau, et par conséquent elle présente une forme essentielle de protection dans les plantes en empêchant les lésions cytoplasmiques, d'une part, et permet l'accumulation et le stockage des flavonoides dans les vacuoles des cellules, d'autre part [64].

Les flavonoides sont souvent hydroxylés en positions : 3, 5, 7, 3', 4' et /ou 5'. fréquemment un ou plus de ces groupes hydroxyles sont méthylés, acétylés, prénylés, et sulfatés, et parfois deux groupes hydroxyles sont engagés pour former un methylenedioxy. Dans les plantes, les flavonoides sont souvent présents comme des flavonoides *O*- ou *C*-glycosylés ; les *O*-glycosylés sont plus rencontrés que les *C*-glycosylés [58,65].

La distribution des flavonoides dans les plantes dépend de plusieurs facteurs, notamment la variation en fonction de la phylogénétique, l'ordre, la famille de la plante, et la variation des populations à l'intérieur des espèces [15].

Ces composés sont largement abondant dans : les fleurs, les végétaux, les céréales, les noix, les graines, les tiges et les fleurs, et même dans le thé et le vin [66,67], d'autre travaux ont reportés la présence de ces composés dans le miel et la propolis [68], on en trouve également en quantité dans nombreuses plantes médicinales.

Le mode de leurs répartition dépend de leurs degré de l'accessibilité à la lumière et les raisons précédentes, car la formation des flavonoides les plus oxydés est accélérée par la lumière ,en effet, les flavonols sont presque exclusivement présents dans les légumes à feuilles et les fruits à l'état glycosylé.ils sont situés principalement dans les feuilles, les fleurs, et les parties extérieures de la plante comme la peau, cependant, les flavonols sont trouvés sous forme de traces dans les parties de la plante au-dessous de la surface du sol [15-16,69-70], à l'exception notable d'oignons [69].

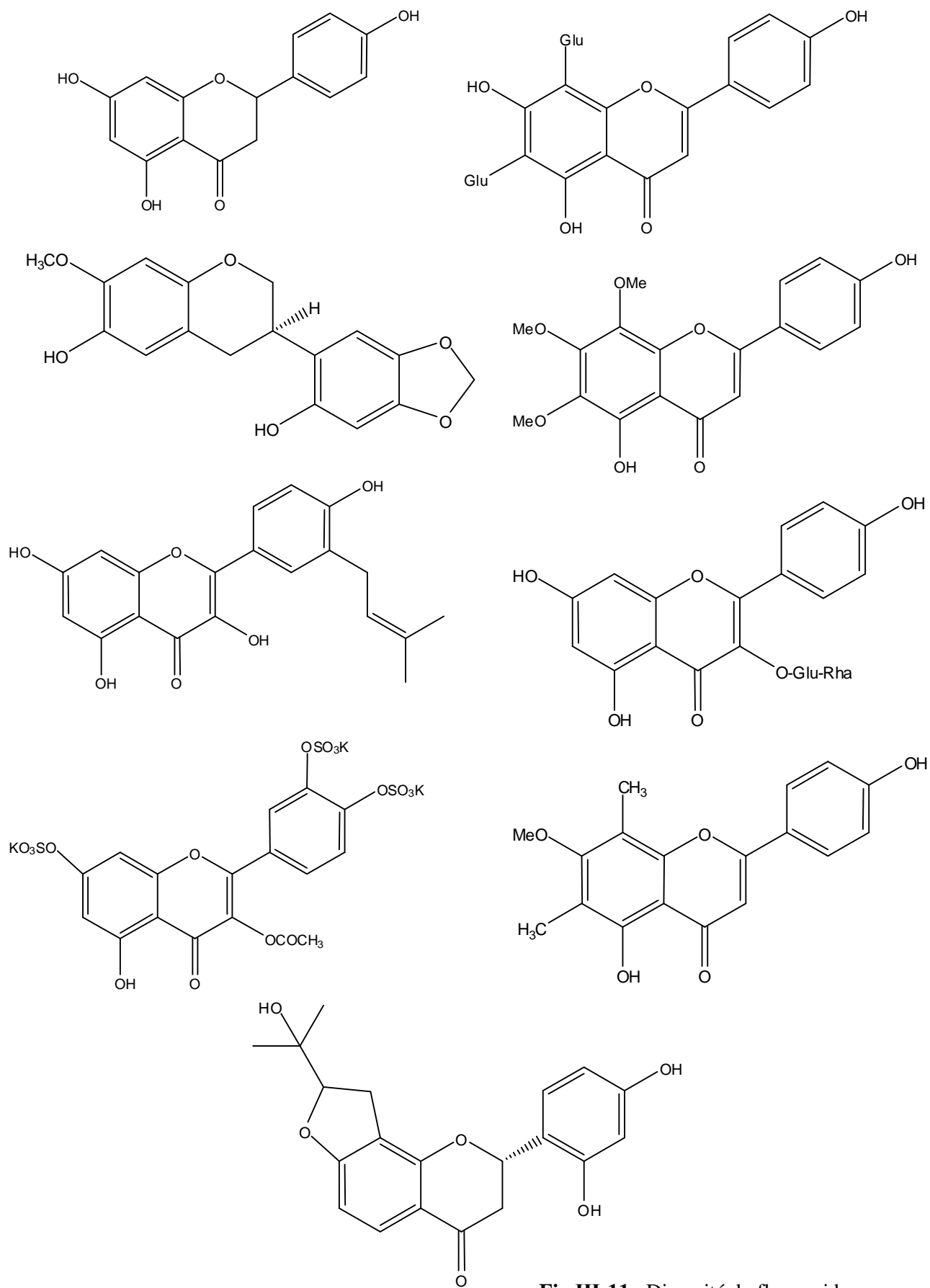


Fig.III-11 : Diversité de flavonoides

III-7-Le rôle des flavonoides dans les plantes :

Il est bien accepté que l'apparition des flavonoides est liée directement à celle de la plante. Ce qui prouve l'importance de ces métabolites [71].

Une des fonctions majeures des flavonoides est la coloration des fleurs, ces couleurs exercent un effet attracteur sur les insectes [66,72], dans les feuilles, ces composés sont associés à de nombreux processus physiologiques et survivals des plantes ; ainsi, les flavonoides protègent la plante vis-à-vis les radiations UV-B, et les pathogènes fongiques [18,71]. De plus les flavonoides sont impliqués dans la photosensibilisation, le transfert d'énergie, et le développement des plantes, en interagissant avec les diverses hormones, et régulateurs de croissance.

On peut également noter que les flavonoides ont un rôle dans le contrôle de la respiration, la photosynthèse et la détermination du sexe [18,71].

III-8-Activité anti-oxydante des flavonoides : Relation Structure-Activité :

Les résultats obtenus pour l'étude de l'activité anti-oxydante des flavonoides in vitro ont montré que leur activité anti-oxydante est liée essentiellement à l'arrangement des groupes fonctionnels attachés à la structure de base [73].

- **Les groupes hydroxyles :**

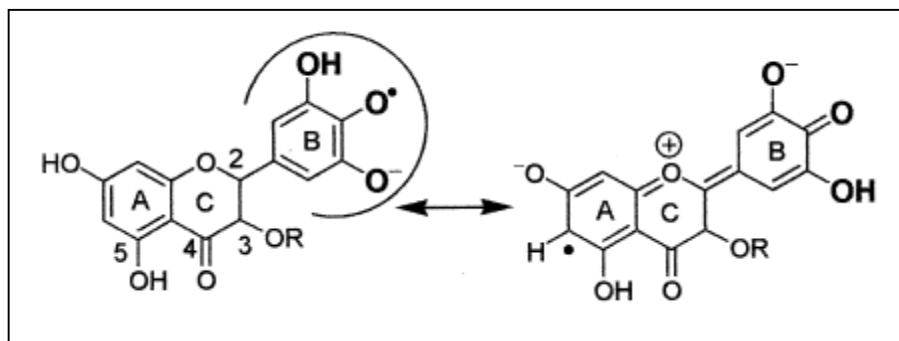
La capacité de piégeage des radicaux libres est fortement attribuée au substituants hydroxyles les plus réactives dans la molécule, en participant à la réaction suivante :



Plusieurs études ont montrées que les hydroxyles attachés au cycle B des flavonoides sont les plus déterminants de ce piégeage, ces groupes peuvent donner un hydrogène et un électron aux radicaux hydroxyles, peroxydes, et peroxytrinitriles, menant à leur stabilisation d'une part, et engendrant des radicaux des flavonoides plus stable, d'autre part [74-76].

En effet, la présence de la structure 3',4'-catechol dans les flavonoides (cycle B) augmente leur activité anti- oxydante, d'une manière remarquable [76-78]. Par exemple la capacité de piégeage des radicaux peroxydes attribuée au luteoline est plus forte que celle attribuée au kaempferol, tout les deux renferment des groupes hydroxyles identiques dans leurs structures, mais le kaempferol est manqué de la structure catechol (sur le cycle B) [79,80]. Cette caractéristique a été expliquée par les raisons suivantes :

L'oxydation des flavonoides, a lieu dans le cycle B, quand le catechol est présent [79], ce qui donne un radical ortho-semiquinone très stable par la délocalisation faciles des électrons [76,81].



FigIII-12 : Délocalisation des électrons dans le radical flavonoxy.

L'hydroxyle en position 5 dans le cycle A, peut participer à l'activité anti-oxydante, tandis que les autres hydroxyles de ce cycle sont corrélés faiblement à cette activité [82].

La présence de 3-OH libre en cycle C augmente le piégeage des radicaux libres par les flavonoides, en raison que ce groupe permet la conjugaison entre les cycles aromatiques A, C, et B. L'activité anti-oxydante, ne dépend pas de la fermeture du cycle C, en effet, les chalcones sont des anti-oxydantes meilleures [83].

- **La O-methylation :**

La 4'-O-méthylation de la structure 3',4'-catechol réduit l'activité anti-oxydante ; des études concernant la 4'-O-méthylation ont montrés que la 4-O-méthylation de quercetine en tamarixetine réduit l'inhibition de la peroxydation lipidique de 98% jusqu'à -2,6% [78]. D'autres études ont reportés que la capacité de 3',4'-diméthoxykaempférol de piéger les peroxydes est la moitié de celle de kaempférol [75].

- **La double liaison 2-3, et la fonction 4-oxo :**

Parmi les caractéristiques des flavonoides est la présence ou l'absence de la double liaison entre les deux carbones 2 et 3, en conjugaison avec la fonction carbonyle en 4 [84].

Une étude comparative entre l'activité anti-oxydante de quercetine et celle de taxifoline a montré que la première est plus forte [77].

L'analyse structurale de ces composés montre que tout les deux renferment un groupe carbonyle en 4 mais la taxifoline n'a pas une double liaison 2-3 ; en effet, la majorité des recherches sont en faveur de la présence d'une double liaison 2-3 en conjugaison avec le groupe 4-oxo [82].

- **La O-glycosylation :**

Les aglycones sont plus réactifs que leur glycosides correspondants [77,85]. Ainsi, les propriétés anti-oxydantes des flavonols glycosides isolés à partir de thé sont réduits en fonction du nombre des glycosides [86].

- **Le degré de polymérisation :**

Les proanthocyanidines dimères et trimères sont plus effectives par rapport au flavonoides monomères contre les anions superoxydes [87], les tétramères sont plus fort [88].

Donc, il est apparaît que les effets anti-oxydants sont fortement corrélé avec l'augmentation de degré de polymérisation [89-90].

III -9-Flavonoides et santé :

L'alimentation est un déterminant majeur du maintien de l'organisme dans un état satisfaisant du point de vue de la santé et l'acquisition de cette connaissance a permis d'établir des recommandations nutritionnelles [91,92]. L'investigation des relations entre nutrition et santé met également en évidence les mécanismes moléculaires auxquels participent les nutriments. Il apparaît ainsi que l'interface de ces mécanismes avec le fonctionnement physiologique dépasse souvent la fonction de nutrition. Cette prise de conscience s'accompagne de nombreux développements autour du caractère fonctionnel des aliments et des nutriments. Des données expérimentales mettent aujourd'hui en évidence l'effet des nutriments et des constituants de l'alimentation sur un grand nombre de cibles biologiques [92,93].

A coté de leurs fonctions importantes, dans la biochimie, la physiologie et l'écologie des plantes, les flavonoides représentent une partie intégrale des composés importants pour la nutrition et la santé humaine [94], à savoir, la consommation quotidienne moyenne des flavonoides est environ 1g pour chaque personne [95].

Le tableau III-2 : regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes [73].

La classe	Le flavonoïde	La source alimentaire
Flavanol	(+)-catechine (-)-epicatechine Epigallocatechine gallate	Thé (<i>Camellia Sinesis</i>) Thé Thé
Flavone	chryisine apigénine rutine luteoline luteoline glucosides	La peau des fruits Persil, céleri Citron, tomate Poivre rouge Poivre rouge
Flavonol	kaempferol quercétine	Poireau, brocoli, chicorée frisé, Thé noir Oignon, salade, brocoli, tomate, thé Huile d'olive, pomme
Flavanone	naringine naringénine taxifoline eriodictyol hesperidine	Citron, fruits Fruits du genre citrus Fruits du genre citrus Citron Oranges
Isoflavone	Genistine Genisteine Daidzine daidzeine	Le soja
Anthocyanidine	apig�nidine cyanidine	Fruits colorés Cerises, framboises, fraises

Donc ces données, permet d'établir le lien entre fruits, et légumes, et effet bénéfique sur la santé, en effet toutes les études épidémiologiques et animales, ont suggérées que l'alimentation riche en flavonoïdes, est plus particulièrement les flavones, peut réduire le risque de nombreux cancers (cancer de poumon et de colon), les maladies coronaires, et les

inflammations chroniques [6,96-100], De nos jours, les propriétés thérapeutiques attribuées au flavonoïdes sont largement étudiées, ils sont notamment :

Anti-oxydantes, anti-carcinogéniques, anti-virales, et anti-œstrogéniques [5,6], inhibiteurs d'enzyme, anti-microbiennes [9,18], anti-allergiques [66], cytotoxiques et anti-tumorales [70].

III -10- Flavonoïdes et synthèse organique :

Les voies synthétiques les plus utilisées pour former le squelette C₁₅ des flavonoïdes, commencent à partir des unités simples, et parfois à partir de la forme chalcone :

La Chryisine est une 5,7-dihydroxyflavone est peut être synthétisée par action du benzoate d'éthyle sur la 2, 4,6-triméthoxyacétophénone, selon la réaction de **Claisen**, suivie d'une déméthylation des méthoxy par l'acide iodhydrique, puis de la cyclisation en flavone, en milieu acide :

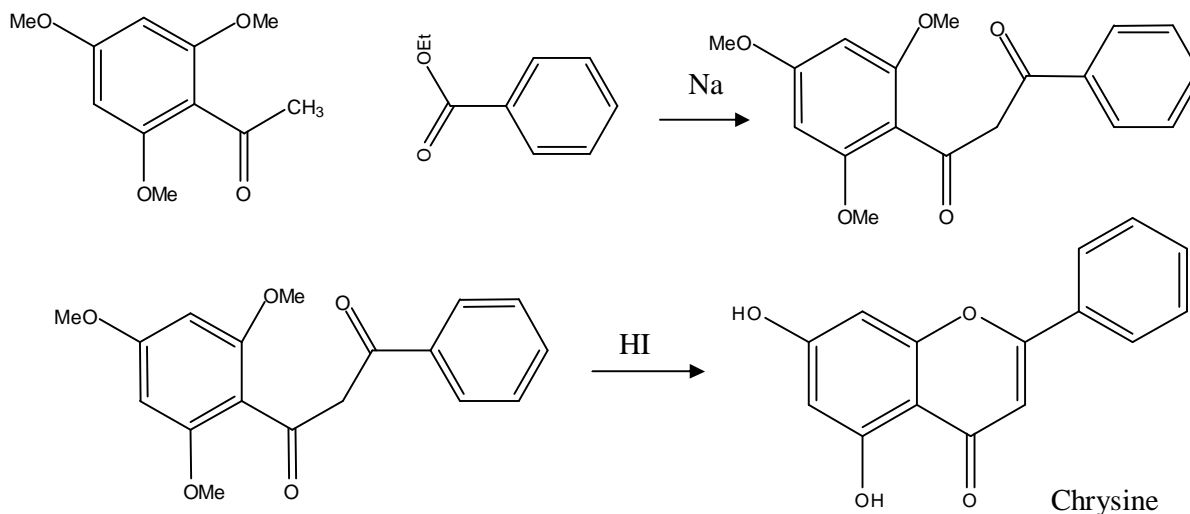


Fig.III-13 : Synthèse de la chryisine

Les flavonols peuvent être préparés par la réaction de **Algar-Flym-Oyanda**. Une 2'-hydroxychalcone est soumise à l'action du peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin ce qui forme un oxirane qui est immédiatement ouvert par l'attaque de l'ion phénate avec cyclisation en une 3-hydroxyflavanone. cette molécule est très facilement oxydée en flavonol :

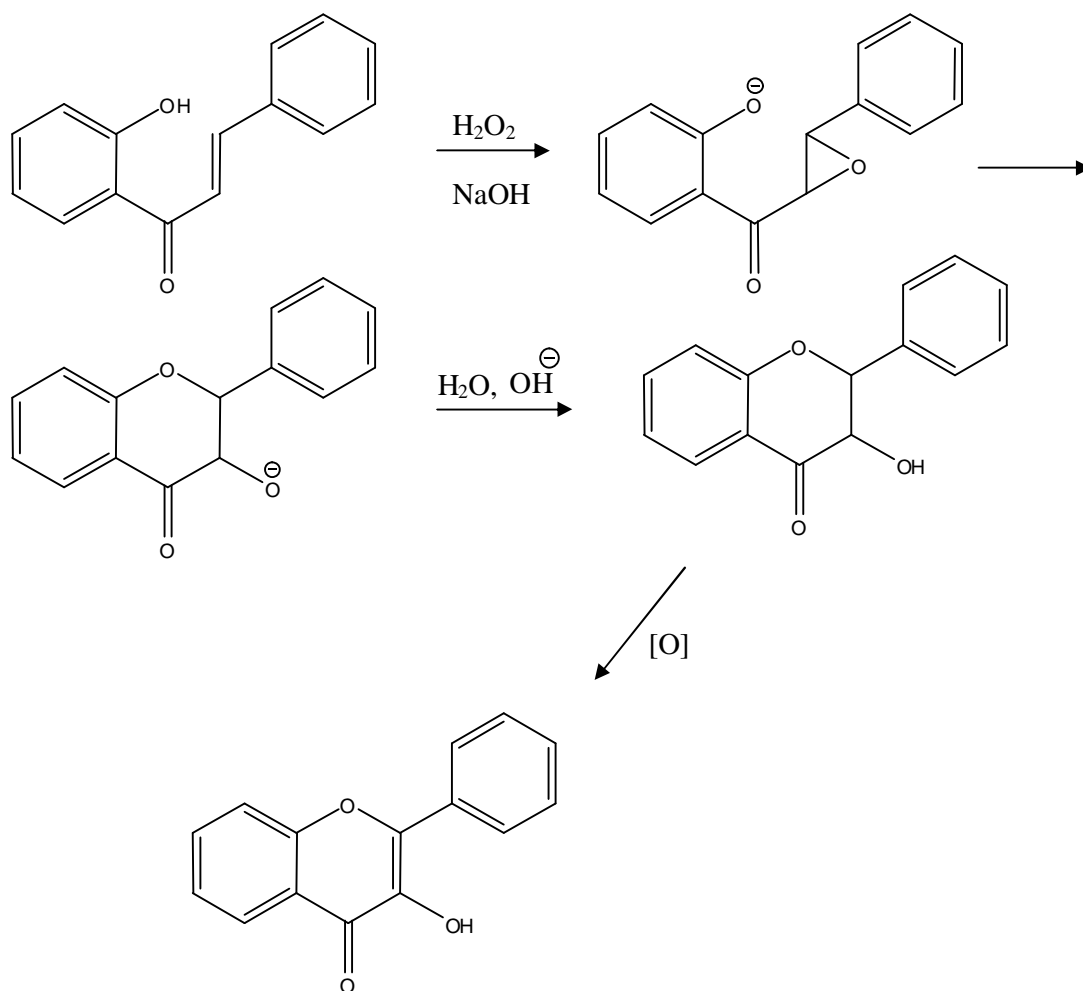
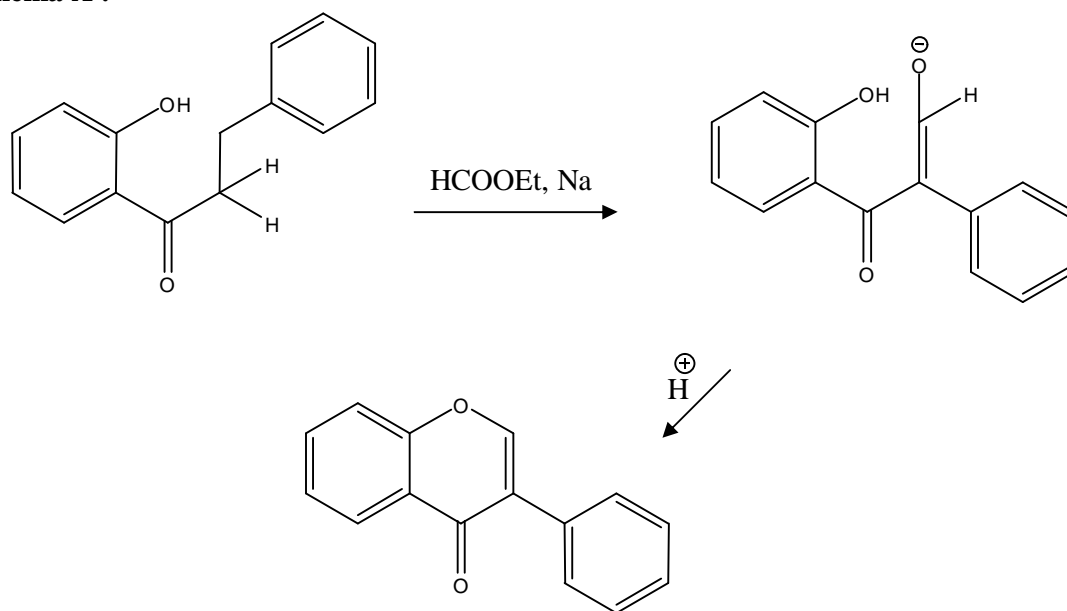


Fig.III-14 : Une méthode de synthèse des flavonols

Les isoflavones peuvent être préparées par de nombreuses méthodes. Deux d'entre elles sont présentées dans les schémas A et B ; la première A consiste en une réaction de **Claisen** entre la benzyl (*O*-hydroxy phényl) cétone et le formiate d'éthyle en présence de sodium, le composé résultant est cyclisé en milieu acide en isoflavones.

Schéma A :

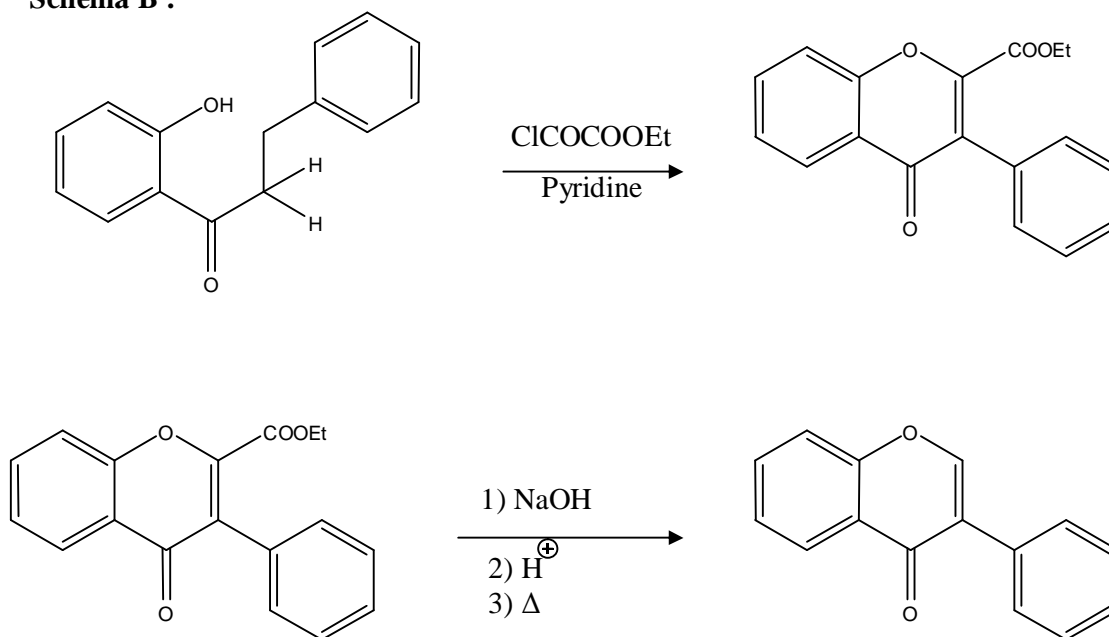


La seconde B débute par l'action du chlorure d'éthoxyle sur la benzyl (*O*-hydroxy phényl) cétone (ou ses dérivés hydroxylés), effectuée en présence de pyridine.

la 2-éthoxycarbonyl Isoflavone ainsi produite est traitée par la soude, puis par chauffage.

C'est la synthèse de **Baker-Ollis** [101].

Schéma B :



III-11-Etude chimique des flavonoides :

III-11-1-Extraction :

Il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques dans la littérature, notamment les flavonoides [62,102]. L'une de ces méthodes est adoptée par notre laboratoire dont leurs étapes essentielles sont résumées ci-dessous :

- La macération de la matière végétale broyée, dans une solution hydroalcoolique (éthanol / eau, ou méthanol / eau), généralement cette opération est répétée trois fois pour extraire le maximum de principes actifs.
- Extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante, les solvants les plus utilisés sont :
Le dichlorométhane ou le chloroforme : permettent l'extraction des aglycones apolaires (méthoxylés, et peu hydroxylés).
L'acétate d'éthyle : permet l'extraction des aglycones de polarité moyenne (polyhydroxylés et monoglycosylés).
Le n-butanol : c'est le dernier solvant qui accède aux hétérosides polyglycosylés et même les hétérosides C-glycosylés.
- L'évaporation à sec des extraits obtenus, puis la pesée de chaque extrait, pour un éventuel traitement de séparation chromatographique.

III-11-2-Séparation et purification :

Les flavonoides généralement, constituent une part des mélanges complexes isolés des extraits des plantes ; donc des séparations et purifications sont nécessaires pour une analyse adéquate [103-104].

La séparation des composés flavoniques est reposée essentiellement sur les différentes techniques chromatographiques telle que :

- **La chromatographie d'adsorption sur colonne (CC) :**

Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire, comme le gel de silice, la cellulose ou le polyamide, et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est utilisable surtout pour la séparation des quantités importantes de mélanges complexes [105].

- **La chromatographie préparative sur papier (CP) :**

Basé sur l'utilisation d'une surface plane de cellulose considérée comme support maintenant par imprégnation, une phase stationnaire liquide, les systèmes de solvants les plus utilisés dans cette technique sont :

L'acide acétique 15 et 30% (système aqueux).

Le n-butanol / acide acétique / eau : (BAW) : 4 / 1 / 5 (phase organique) [106].

- **La chromatographie préparative sur couche mince (CCM) :**

Depuis le début de 1960, la CCM a été utilisée pour l'analyse des flavonoïdes [107] ; c'est une méthode simple et rapide pour la séparation de ces composés, ainsi la purification, en utilisant les diverses phases stationnaires et les systèmes de solvants appropriés [104].

La purification ultime des composés phénoliques isolés se fait généralement sur une colonne de sephadex LH20 en utilisant le méthanol comme éluant

III-12-Analyse structurale des flavonoïdes :

III-12-1-Facteur de retardement et comportement chromatographique :

Le facteur de retardement (R_f) est défini comme étant le rapport de la distance entre la tache du produit et l'origine d'une part, et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part. La valeur du R_f varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de la phase stationnaire, et la structure de flavonoïde lui-même (aglycone, glycosylé, différence de disposition des substituants sur le squelette flavonique) [104-105,108]

Le tableau suivant montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du R_f .

tableau III-3 : la relation entre le R_f et la structure flavonique :

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

III-12-2-Fluorescence sous lumière de Wood :

La fluorescence sous lumière de **Wood** à la longueur d'onde 365 nm donne des renseignements très utiles qui orientent vers des structures préliminaires de flavonoïdes.

Le tableau III-4 montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique flavonique [105].

Tableau III-4 : la relation entre la fluorescence et la structure chimique flavonique

La fluorescence	Les structures possibles
Violette noire	Flavones avec 5, 6,7 ou 5, 7,8 trihydroxyflavonol avec 3-OR. Chalcones.
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5. Flavone avec OH en 3 ou flavonol. 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	Flavone sans 5-OH.

III-12-3-La spectrophotométrie UV-visible :

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle est basée sur l'enregistrement d'un spectre dans le méthanol, ce dernier est caractérisé par deux bandes d'absorption principales [109] :

- **La bande I** : présentant un maximum d'absorption entre 300 et 385 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoylé 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.
- **La bande II** : présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoylé qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A, et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [104].

Le tableau III-5 donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes.

Tableau III-5 : Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes.

Type de composé flavonique	Bande I	Bande II
Flavone	350-350	250-270
Flavonol	352-385	250-280
Flavonone	300-330	245-275
Isoflavone	300-330 Ep	245-275

Le maximum d'absorption des deux bandes dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles, méthoxyles ou glycosylés sur le squelette flavonique.

L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacer le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosylés fait déplacer ce maximum vers des longueurs d'onde plus faibles [110].

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tel que : NaOH, NaOAc, AlCl₃, H₃BO₃ et HCl. Ces derniers réagissent avec les groupements hydroxyles par formation des complexes qui se traduira sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres, sur le squelette flavonique.

Le **tableau III-6** résume les principaux déplacements des bandes I et II en présence des réactifs dans le cas des flavones et flavonols.

Les réactifs	Les déplacements		Interprétation
	Bande I	Bande II	
NaOMe (NaOH)	-stable+45 à +65 1. l'intensité ne diminue pas/MeOH 2. l'intensité diminue/MeOH. -l'intensité diminue avec le temps, décomposition.		4`-OH 4`-OR ; 3-OH 3,4`-OH ; ortho di-OH sur A (6,7) ou (7,8) ; ortho di-OH sur B.
	Nouvelle bande par rapport au spectre MeOH Entre [320-335]		7-OH
NaOAc		+5 à +20 déplacement diminue en présence d'un substituant en 6 ou 8. Pas de déplacement ou très faible. Spectre qui se décompose avec le temps.	7-OH 7-OR 5, 6,7-tri-OH ou 5, 7,8-tri-OH
NaOAc+H ₃ BO ₃	+12 à +36 +05 à +10		Ortho di-OH sur B Ortho di-OH sur A (6,7) ou (7,8).
AlCl ₃	Une seule bande entre 420-430. Une seule bande entre 440-460		Ortho di-OH sur B avec 5-OH (flavone) Ortho di-OH sur B avec 5-OH (flavonol)
MeOH/ (AlCl ₃ +HCl)	+17 à +20 +35 à +55 +50 à +60		5-OH avec une 6-OR 5-OH et 3-OCH ₃ 3-OH avec ou non 5-OH
AlCl ₃ / (AlCl ₃ +HCl)	-20 à -40 nm avec une bande ou épaulement entre 350-360 nm -20 à 25 nm		Ortho di-OH sur B Ortho di-OH sur A avec Ortho di-OH sur B ou tri-OH sur B

III-12-4-L'hydrolyse acide des hétérosides :

Cette manipulation concerne beaucoup plus les flavonoides *O*-glycosylés. Elle renseigne sur la position et la nature du sucre qui peut être étudié une fois détaché, d'une part, et la structure de l'aglycone d'autre part.

L'identification du sucre se fait par co-chromatographie avec des échantillons authentiques. Les hétérosides C-glycosylés résistent à l'hydrolyse acide, cette propriété permet de différencier ce type de liaison dans les flavonoides glycosides.

III-12-5-La spectrométrie de masse :

Cette technique permet la détermination du poids moléculaire des aglycones ainsi que le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles [111-112].

Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements utiles, notamment sur la substitution des noyaux A et B [113]. Parmi les techniques d'analyse en spectrométrie de masse, utilisées pour les flavonoides, on peut citer :

- **L'ionisation par impact électronique (IE)** : permet l'analyse des structures aglycones seulement.
- **Le bombardement par atomes rapides (FAB)** : cette méthode est impliquée dans le cas des flavonoides glycosylés, elle donne des informations utiles concernant la nature, la position et l'arrangement des sucres dans la molécule [111].

III-12-6-La résonance magnétique nucléaire :

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est très employée dans la détermination des structures flavoniques [114]. Cette méthode renferme plusieurs techniques :

- **La RMN du proton**: elle informe sur l'environnement des protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm, elle permet de connaître [114-118] :

La position et le nombre de divers protons portés par le flavonoïde.

Le nombre de substituants méthoxyles porté par le squelette flavonique.

Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

- **La RMN du carbone 13**: donne des informations utiles et parfois nécessaires pour identifier la molécule telles que [104,118] :

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

Références bibliographiques :

- [1] Liu, R.H., 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition* 134, 3479S–3485S.
- [2] Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50, 6182–6187.
- [3] Adom, K.K., Sorrells, M.E., Liu, R.H., 2003. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51, 7825–7834.
- [4] Adom, K.K., Sorrells, M., Liu, R.H., 2005. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 2297–2306.
- [5] Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96, 67–202.
- [6] Middleton Jr., E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heartdisease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52, 673–751.
- [7] Györgyi, A. S., 1936. *Curr. Sci.* ,285.
- [8] Harborne, J.B., Baxter, H., 1999. « Handbook of Natural Flavonoids », 2 vols. Wiley, Chichester.
- [9] Williams, C.A., Grayer, R.J., 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports* 21, 539–573.
- [10] Havsteen B., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* .32,1141–8.
- [11] Heller, W., Forkmann, G., 1993. Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne, J.B. (Ed.), « The Flavonoids: Advances in Research since 1986 ». Chapman & Hall, London, pp. 499–535.
- [12] Brown, J.P., 1980. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutat Res.* 75,243–77.
- [13] Heller W., 1986. Flavonoid biosynthesis: an overview. In: Cody V, Middleton E, Harborne JB, eds. « Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure–activity relationships », Vol 213. New York: Alan R. Liss. 25.
- [14] Ross, S.A., Ziska, D.S., Zhao, K., ElSohly, M.A., 2000b. Variance of

- common flavonoids by brand of grapefruit juice. *Fitoterapia* 71, 154–161.
- [15] Harborne ,J.B. ,1986.Nature, distribution, and function of plant flavonoids. In: Cody V, Middleton E, Harborne JB, eds. « Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure–activity relationships », Vol 213. New York: Alan R. Liss, 15.
- [16] Kuřhnau J. ,1976.The flavonoids, a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* .24,117.
- [17] Smith ,G., Thomsen, S.J., Markham ,K.R., Andary ,C., Cardon ,D. ,2000. The photostabilitiesof naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. *J Photochem Photobiol A*.136,87.
- [18] Harborne ,J.B., Baxter ,H.,1999. « The handbook of natural flavonoids », Vols 1 and 2. Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- [19] Forkman,G.,1992. Structure and biosynthesis of flavonoids. *Proceedings International Conference of Groupe Polyphenols* .V.16,N° 1,19-27.
- [20] Stafford,H. ,A.,1990. Flavonoids metabolism.CRC., Press, Boca Rason.
- [21] Harborne,J.B.,1988.In plant pigments, édition T.W.Goodwin, Academic Press.London,pp.299-343.
- [22] Richter G.,1993. « Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie) ». Presses polytechniques et universitaires romandes, lausanne CH-1015.
- [23] Bruneton, J.,1993. « Phytochimie et pharmacognosie des plantes médicinales » , Techniques et documentation Lavoisier.
- [24] Kochs, G.and Grisebach,H.,1986. *Eur.J.Biochem.*,155,311.
- [25] Stotz, G., Forkmann, G., 1981. Oxidation of flavanones to flavones with flower extracts of *Antirrhinum majus* (snapdragon). *Zeitschrift fu" r Naturforschung* 36c, 737–741.
- [26] Heller, W., Forkmann, G.,Britsh, L.and Grisebach,H.,1985a.*Planta Med.*,163-191.
- [27] Heller, W., Forkmann, G., 1993. Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne, J.B. (Ed.), « The Flavonoids: Advances in Research since 1986 ». Chapman & Hall, London, pp. 499–535.
- [28] Wollenweber, E., 1994. Flavones and flavonols. In: Harborne, J.B. (Ed.), « The Flavonoids – Advances in Research Since 1986 ». Chapman & Hall, London, pp. 259–335.
- [29] Caccamese , S. C., Caruso, N. P., Savarino ,A., 2005.*J. Chromatogr. A* 1076 , 155.
- [30] Veitch, N., 2007. Isoflavonoids of the Leguminosae. *Nat. Prod. Rep.* 24, 417–464.

- [31] Moon, H.I., Lee, J., Kwak, J.H., Zee, O.P., Chung, J.J., 2005a. Isoflavonoid from *Viola hondoensis* regulates the expression of matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 925–928.
- [32] Moon, H.I., Lee, J., Zee, O.P., Chung, J.H., 2005b. A glycosidic isoflavonoid from *Viola hondoensis* W. BECKER et H. BOISSIEU (Violaceae), and its effect on the expression of matrix metalloproteinase-1 caused by ultraviolet irradiation in cultured human skin fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1123–1125.
- [33] Meragelman, T.L., Tucker, K.D., McCloud, T.G., Cardellina, J.H., Shoemaker, R.H., 2005. Antifungal flavonoids from *Hildegardia barteri*. *J. Nat. Prod.* 68, 1790–1792..
- [34] Kuanar, S.K., 2006. 5-Hydroxy 6,20-dimethoxy isoflavone 7-O-beta-Dgalactopyranoside from the stem bark of antirheumatic plant *Liriodendron tulipifera* Linn. *Asian J. Chem* 18, 3126–3128.
- [35] Chin, Y.W., Mdee, L.K., Mbwambo, Z.H., Mi, Q., Chai, H.B., Cragg, G.M., Swanson, S.M., Kinghorn, A.D., 2006. Prenylated flavonoids from the root bark of *Berchemia discolor*, a Tanzanian medicinal plant. *J. Nat. Prod.* 69, 1649–1652.
- [36] Guo, H., Cai, X.H., Qian, J.Q., 2007. A novel isoflavone from *Urophyllum chinensis*. *J. Chem. Res.* 1, 24–25.
- [37] Ahmad, V.U., Iqbal, S., Nawaz, S.A., Choudhary, M.I., Farooq, U., Ali, S.T., Ahmad, A., Bader, S., Kousar, F., Arshad, S., Tareen, R.B., 2006. Isolation of four new pterocarpanes from *Zygophyllum eurypterum* (Syn. *Z. atriplicoides*) with enzyme inhibition properties. *Chem. Biodiversity* 3, 996–1003.
- [38] Koblowska, R., Kokoska, L., Klejdus, B., Lapcick, O., 2006. Isoflavonoids in the Cannabaceae family. *Planta Med.* 72, 1027.
- [39] Wang, J., Yang, X., Di, Y., Wang, Y., Shen, Y., Hao, X., 2006. Isoflavone diglycosides from *Glycosmis pentaphylla*. *J. Nat. Prod.* 69, 778–782.
- [40] Benavides, A., Bassarello, C., Montoro, P., Vilegas, W., Piacente, S., Pizza, C., 2007. Flavonoids and isoflavonoids from *Gynerium sagittatum*. *Phytochemistry* 68, 1277–1284.
- [41] Lapcick, O., 2007. Rev., Isoflavonoids in non-leguminous taxa : A rarity or rule ? *Phytochemistry* 68, 2909–2916.
- [42] Di Carlo, G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso, F., 1999. *Life Sci.* 65, 337–353.
- [43] Dhar, D.N., 1981. « The Chemistry of Chalcones and Related Compounds », John Wiley, New York.

- [44] Bate-Smith, E.C. and Geissman, T.A. ,1951. *Nature* 167, 688.
- [45] Harborne, J. B. and Baxter, H.,1999. « *The handbook of natural flavonoids* », vol. 2, pX1, p. 193-205. John Wiley & Sons, New York .
- [46] Brouillard, R. and Dangles, O. ,1993. *Flavonoids and flower colour*, in: « *The Flavonoids: Advances in Research since 1986* » (Harborne, J.B., Ed.), pp. 565-588, Chapman and Hall, London.
- [47] Olesen, J.M., Ronsted, N., Tolderlund, U., Cornett, C., Melgaard, P., Madsen, J., Jones, C. G., and Olsen, C. E.,1998. *Mauritian red nectar remains a mystery.* *Nature*, 393, 529 .
- [48] Mazza, G., Miniati, E., 1993. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains.* Boca Raton, CRC Press.
- [49] Harborne, J.B., Williams, C.A., 1998. *Anthocyanins and other flavonoids.* *Natural Product Reports* 15 (6), 631–652.
- [50] Harborne, J.B., Williams, C.A., 2001. *Anthocyanins and other flavonoids.* *Natural Product Reports* 18, 310–333.
- [51] Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, Brouillard, T.-F. R., 2003. *Analysis and biological activities of anthocyanins.* *Phytochemistry* 64, 923-933.
- [52] Harborne, J. B. ,1975. « *Flavonoids in phytochemistry* », Vol.II, Edition Lawrence, P.L., Vol.II, Litton Educational Publishing.
- [53] Heller, W., Forkmann, G.,1988. in: *The Flavonoids: Advances in Research since 1980.* ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, London, 399-425.
- [54] Deluca, V. and Ibrahim R. K. ,1985b. *Arch. Biochem. Biophysics*, p.606.
- [55] Inuma, M. and Mizuno, M.,1989. *Phytochemistry*, 28, 681.
- [56] Ebel J. and Hahlbrock, K. ,1982. in: « *The Flavonoids: Advances in Research* » eds J. B. Harborne and T.J. Mabry, Chapman and Hall, London pp.641-659.
- [57] Harborne, J.B., Williams, C.A.,1988. in: « *The Flavonoids: Advances in Research since 1986* ». ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall Ltd. p.303.
- [58] Iwashina T.,2000. *The structure and distribution of the flavonoids in plants.* *J. Plant Res.* 113, 287.
- [59] Markham, K.R.,1982. « *Techniques of Flavonoid Identification* ». Academic Press: London.
- [60] Jay, M.,1994. In « *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986* », Harborne JB (ed). Chapman and Hall: London.
- [61] Heller, W., Forkmann, G.,1993 . In « *The Flavonoids: Advances in Research*

- Since 1986 », Harborne JB (ed). Chapman and Hall: London, pp.499-535.
- [62] Bruneton, J.,1999. « Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales », 3eme édition.3,Lavoisier,Paris.
- [63] Cuyckens, F.,and Claeys, M.,2004.Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids.J.Mass Spectrom .39 ,1-15.
- [64] Harborne, J.B., Mabry ,T.J.,1982. « The Flavonoids: Advances in Research ». Chapman and Hall: London.
- [65] Stumpf, P.K. , Conn (Eds.),E. ,1981. The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise, vol. 7: Secondary Plant Products, Academic Press, New York, NY, USA.
- [66] Middleton Jr, E., Chithan, K. ,1993.The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB, editor. « The flavonoids: advances in researchsince 1986 ». London, UK: Chapman and Hall.
- [67] Dewanto, V., Wu, X.Z., Liu, R.H., 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 4959–4964.
- [68] Grange ,J.M., Davey, R.W. ,1990.Antibacterial properties of propolis (bee glue). J .R .Soc. Med .83,159–60.
- [69] Hertog ,M.G.L., Hollman ,P.C.H., Venema, D.P., 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. J Agric Food Chem 40,1591.
- [70] Crozier, A., Lean ,M.E.J., McDonald, M.S., 1997. Black C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. J .Agric.Food Chem .45,590.
- [71] Lowry, B., Lee, D., Henabt, C., 1980. The origin of land plants: a new look at an old problem. Taxon 29, 183–197.
- [72] Harborne ,J.B., Williams ,C.A.,2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 55,481–504.
- [73] Heim ,K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya D.J.,2002. Flavonoid antioxidants : Chemistry,metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr .Biochem. 13,572-584.
- [74] Pannala, A. S., Chan, T.S. , O'Brien, P.J. , Rice-Evans, C.A., 2001. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics, Biochem Biophys Res Commun 282 , 1161–1168.

- [75] Burda, S. , Oleszek,W. ,2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, J. Agric .Food .Chem .49 , 2774–2779.
- [76] Cao, G. ,Sofic, E., Prior,R.L. ,1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, Free Radic. Biol .Med. 22 ,749–760.
- [77] Mora, A. ,Paya, M. ,Rios, J.L. ,Alcaraz,M.J. ,1990. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation, Biochem .Pharmacol. 40 , 793–797.
- [78] Ratty, A.K. , Das, N.P. ,1988.Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship, Biochem. Med .Metab.Biol .39 , 69–79.
- [79] Dugas Jr, A.J. , Castaneda-Acosta, J. G., Bonin, C. , Price, K.L. , Fischer, N.H. , Winston, G.W. ,2000. Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships, J. Nat .Products .63 , 327–331.
- [80] Van Acker, S.A.B.E. , De Groot, M.J. , van den Berg, D.J. , Tromp, M.N.J.L. , den Kelder, G.D.O. , van der Vijgh, W.J.F. , Bast, A. ,1996.A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoid, Chem. Res. Toxicol .9 ,1305–1312.
- [81] Kerry, N. , Rice-Evans, C. ,1999. Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships, J .Neurochem .73 , 247–253.
- [82] Arora, A. , Nair, M.G. , Strasburg, G.M. .1998. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system, Free. Radic. Biol .Med .24 ,1355–1363.
- [83] Cholbi, M.R. , Paya, M. M.J.,1990.Alcaraz, Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl4-induced microsomal lipid peroxidation, Experientia 47 , 195–199.
- [84] Matthiesen, L. , Malterud, K.E. , Sund, R.B. .1997. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones, Free Radic Biol Med 2 , 307–311.
- [85] Rice-Evans, C.A. , Miller, N.J. Paganga, G. ,1996.Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, Free Radic Biol Med 20 , 933–956.
- [86] Gao, Z. , Huang, K. , Yang, X. , Xu, H. ,1999. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of

- Scutellaria baicalensis* Georgi, Biochim Biophys Acta 472 , 643–650.
- [87] Ioku, K. , Tsushida, T. Takei, Y. , Nakatani, N. , Terao, J. , 1995. Antioxidant activity of quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers, Biochim. Biophys. Acta 1234 , 99–104.
- [88] Vennat, B. , Bos, M.-A. , Pourrat, A. , Bastide, P. , 1994. Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion, Biol. Pharm. Bull. 17 , 1613–1615.
- [89] Arteel, G.E. , Sies, H. , 1999. Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers, FEBS Lett 462 , 167–170.
- [90] Castillo, J. , Benavente-Garcia, O. , Lorente, J. , Alcaraz, M. , Redondo, A. , Ortuno, A. , Del Rio, J.A. , 2000. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds, J Agr Food Chem 48 , 1738–1745.
- [91] Martin, A.C. , 2001. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Edition Ed. Tec&Doc.
- [92] Haut comité de santé publique , 2000. pour une politique nutritionnelle de santé publique en France. Enjeux et propositions. Ed. ENSP.
- [93] Gerber, M., BourtonRault, M.C., Herberg, S., Riboli, E., Scalbert, A., Siess, M.H., 2002. Actualités en cancérologie : fruits, légumes et cancers. Une synthèse du réseau Nacre, Bull. Cancer 89(3), 293-312.
- [94] Martens, S., Mithofer, A., 2005. Molecules of Interest : Flavones and flavones synthases. Phytochemistry 66, 2399-2407.
- [95] Pengelly, A., 2004. The constituents of Medicinal Plants : An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. CABI publishing.
- [96] Krombont, D., 2001. Diet and cardiovascular diseases. Journal of Nutrition, Health and Aging 5, 144-149.
- [97] Tabak, C. , Arts, L.C., Smit, H.A., Heedrik, D., Krombont, D., 2001. Chronic obstructive pulmonary disease and intake of catechins, flavonols, and flavones : the MORGAN study. American Journal Respiratory and Critical Care Medicine 164, 61-64.
- [98] Ross, J.A., Kansun, C.M., 2002. Dietary flavonoids : bioavailability, metabolic effects, and safety. Annual Review of Nutrition 22, 19-34.
- [99] Manach, C., Mazur, A. , Scalbert , A., 2003. Polyphenols and prevention of

- cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology* 16,77-84.
- [100] Arts, I.C., Hollman, P.C., 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81,317-325.
- [101] Milcent, R., Chau, F., 2003. *Chimie organique hétérocyclique : Structure fondamentales, chimie et biochimie des principaux composés naturels*, EDP sciences.
- [102] Ribereau-Gayou, J.B., 1968. « The phenolic compounds of vegetables », Edition Dunod, Paris.
- [103] McGhie, T.K., Markham, K.R., 1994. Separation of flavonols by capillary electrophoresis: the effect of structure on electrophoretic mobility. *Phytochem. Anal.* 5,121.
- [104] Aramendia, M.A., Borau, V., García, I., Jiménez, C., Lafont, F., Marinas, J.M., Porras, A., Urbano, F.J., 1995. Determination of isoflavones by capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom. Rapid Commun. Mass Spectrom.* S153.
- [105] Markham, K.R., 1982. « Technique of flavonoid identification », Academic press, London.
- [106] Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B., 1970. « The systematic identification of flavonoids ». Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.
- [107] I. Fecka, A. Kowalczyk, W. Cisowski, 2004. *J. Planar Chromatogr.* 17, 22.
- [108] Berthillier, A., 1972. « La chromatographie et ses applications », Dunod, Paris.
- [109] Jurd, L. and Horowitz, R., 1962. *Spectral properties of compounds*, Pergamon press, Oxford, 107-2055.
- [110] Markham, K.R. and Mabry, T.J., 1968. *Phytochemistry*, 7, pp.1197.
- [111] Audier, H., 1966. « Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse ».
- [112] Nielsen, J.G. and Møller, J., 1970. *Acta Chem. Scand.*, 24, 2665.
- [113] Markham, K.R. and Geiger, H., 1993. « The Flavonoids: Advances in Research Since 1986 ». Edited by J. B. Harborne, Chapman & Hall, London.
- [114] Combière, H., 1968. Thèse de doctorat, Université de Lyon.
- [115] Wilson, R.G., Bowie, J.H. et Williams, D.H., 1986. *Tetrahedron* 24, 1407.
- [116] Rodríguez, E., Carman, N.J. et Mabry, T.J., 1972. *Phytochemistry* 11, 409.
- [117] Markham, K.R., 1989. Flavones, flavonols and their glycosides, in « *Methods in plant biochemistry* », P.M. Dey and J.B. Harborne, Academic Press pp.197-262.
- [118] Markham, K.R., 1976. ¹³C NMR of flavonoids-II, Flavonoids other than flavone

and flavonol aglycones. Tetrahedron 32,2607-2612.

Chapitre IV : partie expérimentale

IV-1-Etude chimique de l'espèce *Zygophyllum Cornutum* :

IV-1-1-Choix du matériel végétal :

Le choix de cette espèce, repose sur trois critères essentiels :

- L'endémicité de l'espèce nous a poussée de découvrir leurs métabolites secondaires.
- Les résultats des études phytochimiques obtenus des autres espèces de même genre *Zygophyllum*, en particulier, et de la famille Zygophyllaceae, d'une façon générale (La richesse en métabolites secondaires : acides phénoliques, flavonoïdes, lignanes et saponines).
- Les activités biologiques attribuées aux plantes de cette famille [1-13] :
Anti-diabétiques, anti-oxydantes, anti-fongiques, anti-microbiennes, anti-virales, anti- HIV, anti-tumorales et cytotoxiques ; nous ont encouragées à rechercher et isoler les métabolites secondaires de cette espèce.

IV-1-2-Place dans la systématique :

Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes.
Classe :	Dicotylédones.
Ordre :	Zygophyllale
Famille :	Zygophyllaceae.
Sous-famille :	Zygophylloideae.
Genre :	<i>Zygophyllum</i> .
Espèce :	<i>Cornutum</i> .

IV-1-3-Description botanique :

Sous-arbrisseaux, rarement plantes annuelles, les feuilles de cette espèce est simples ou bifoliées, avec des fleurs axillaires de 4 à 5 mères, et 10 étamines.

Ses fruits sont non cornus à l'apex, simplement dilatés en 5 lobes plus ou moins saillants.

Elle est largement distribuée dans les terrains salés ou gypseux, ainsi les pâturages désertiques [14] (Fig.IV-1).

IV-1-4-Récolte de la matière végétale :

La plante *Zygophyllum Cornutum*, est une plante endémique, elle a été récoltée durant le mois de juin 2005 de la région Ouerghla.



Fig.IV-1 : Photo de *Zygophyllum Cornutum*.

IV-1-5-Extraction :

Après séchage dans un endroit sec et aéré, à l'abri de la lumière du soleil, la plante est broyée entièrement, puis pesée (M=1800g). La matière végétale obtenue est mise à macérer dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol / eau ; 70 / 30 ; V / V). Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant, elle dure dans chaque fois 24 heures. (Dans la première macération, le mélange est chauffé).

Après concentration sous vide, l'extrait méthanolique est dilué avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière sèche, on laisse la solution une nuit puis on filtre. Après filtration, la solution a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'acétate d'éthyle, puis Le n-butanol. Chaque extraction est répétée trois fois. Le protocole d'extraction est résumé dans la Fig. IV-2.

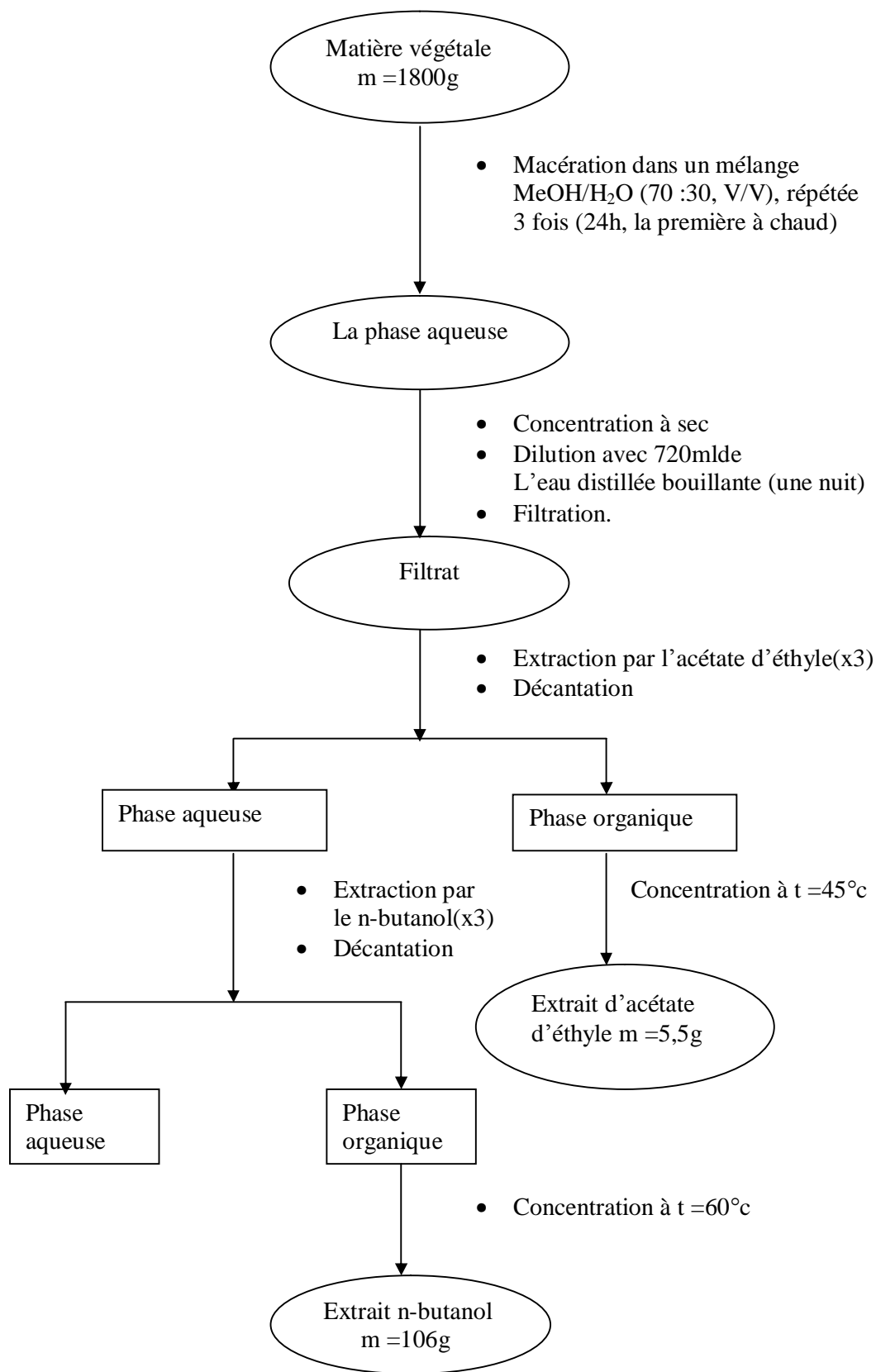
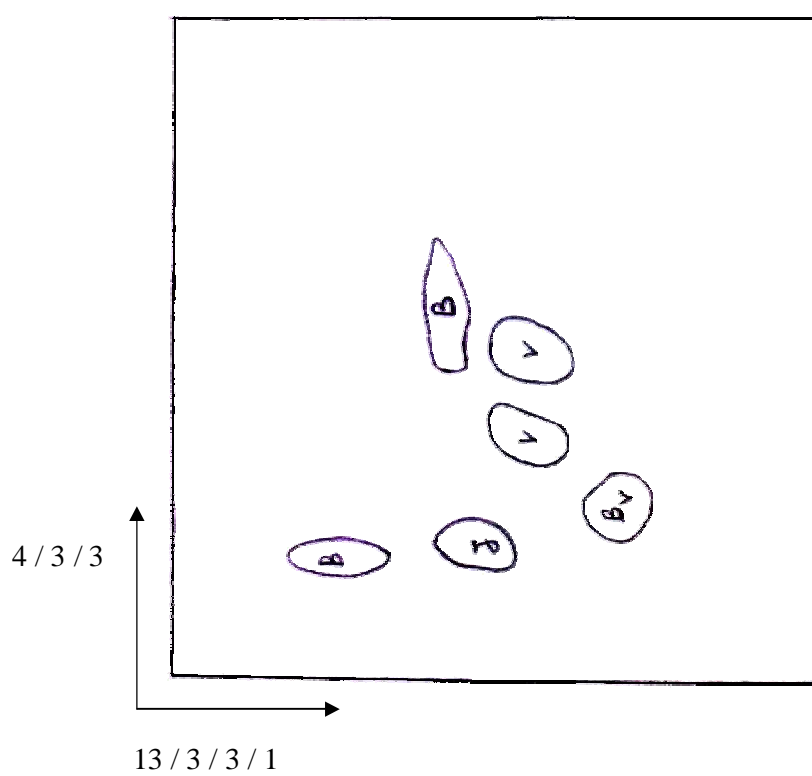


Fig.IV-2 : Les différentes étapes de l'extraction de la plante.

Les deux phases organiques ainsi obtenus (acétate d'éthyle, n-butanol) sont concentrés à sec sous pression réduite, pesées et les rendements sont donnés dans le tableau IV-1.

Tableau IV-1 : Rendements des extraits

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement
1800g	Acétate d'éthyle	5,5	0,30%
	n-butanol	106	5,88%



- B** : Bleue
- B_v** : Bleue violette
- J** : Jaune
- V** : Violette

Fig.IV-3 : Carte de deux dimensions de la phase acétate d'éthyle.

IV-1-6-1-Séparation et purification des composés de l'extrait acétate d'éthyle :

Après les tests effectués pour choisir le meilleur système d'élution, un premier fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de *Zygophyllum Cornutum* (5,5g) a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice SdS (de granulité 35-70 μ m). L'extrait acétate d'éthyle dissout dans le méthanol, est mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette dernière, est déposée sur une colonne de gel de silice, préparée dans le dichlorométhane. La masse de silice utilisée est : 170g.

L'élution a été réalisée par un système isocratique du dichlorométhane jusqu'à le tube 208, puis, le dichlorométhane est enrichi progressivement en méthanol selon les proportions : 99 / 1 ; 98 / 2 ; 95 / 5 ; 0 / 100%. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couche mince de gel de silice, les plaques analytiques ont été développées avec différents systèmes, et visualisées sous lampe UV, à 254 et 365nm, puis révélées avec un révélateur à base d'acide sulfurique et chauffées pendant 3 minutes à 100 °C. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV.2 :

Tableau IV.2 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle (5,5g) de *Zygophyllum Cornutum*.

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'élution	
		% CH ₂ Cl ₂	% MeOH
1-2	F1	100	0
3-7	F2	100	0
8-20	F3	100	0
21-30	F4	100	0
31-33	F5	100	0
34-35	F6	100	0
36-39	F7	100	0
40-57	F8	100	0
58-68	F9	100	0
69-75	F10	100	0
76	F11	100	0
77-83	F12	100	0
84-113	F13	100	0
114-129	F14	100	0
130-159	F15	100	0
160-167	F16	100	0
168-208	F17	100	0
209-239	F18	99	1
240-250	F19	98	2
251-260	F20	98	2
261-269	F21	98	2
270-279	F22	98	2
280-298	F23	95	5
299-314	F24	95	5
315-319	F25	95	5
320-329	F26	95	5
330-335	F27	0	100
336-342	F28	0	100

IV-1-6-1a-Etude des fractions F₄, F₆, F₁₃ :

Ø La fraction F₄ insoluble dans le méthanol contient un précipité blanc, qui après plusieurs lavages successifs à l'aide de ce solvant a donné des cristaux sous forme d'aiguilles blanches, solubles dans le dichlorométhane. Ce produit (P₂₉) incolore sur plaque CCM de gel de silice donne une coloration violette après révélation à base d'acide sulfurique et de la vanilline.

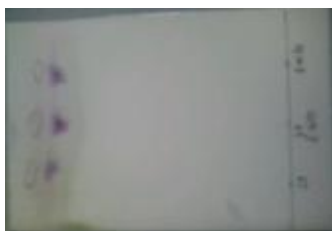


Fig.IV-4 : Révélation de P₂₉.

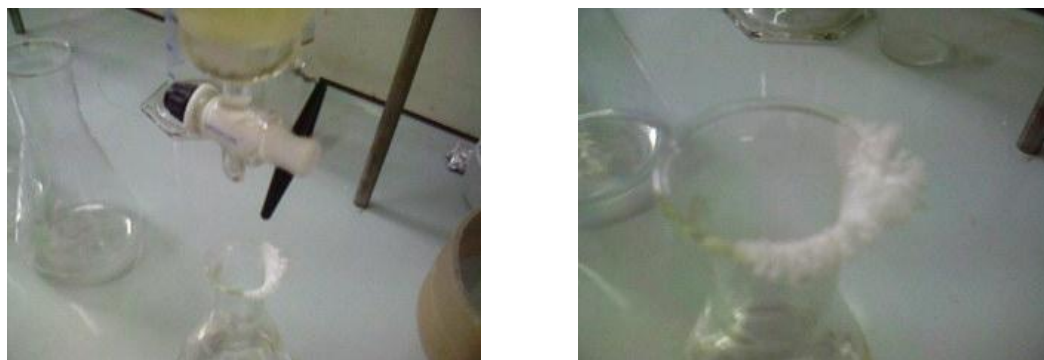


Fig.IV-5 : Précipitation de produit **P₂₉**.

- Ø La fraction F_6 renferme un produit majoritaire (P_{35}) soluble dans le dichlorométhane, ce produit est purifié par lavages successifs à l'aide du méthanol. Il apparaît sous forme d'un spot unique (de couleur bleue) sur plaque analytique de gel de silice sous lampe UV à 365 nm (très faible quantité).
- Ø La fraction F_{13} a subit une séparation sur plaques de gel de silice 60 HF 254, éluées par le système : dichlorométhane / méthanol (95 / 5), qui a permis d'isoler trois produits purs : P_{113A} , P_{113B} , et P_{113C} . P_{113A} (cristaux jaunes), apparaît sous forme d'un spot unique (de couleur bleue), sur plaque analytique de gel de silice sous lampe UV à 365 nm. P_{113B} (cristaux jaunes), et P_{113C} (cristaux jaunes, de très faible quantité) : Deux spots chaque un de couleur violette.

IV-1-6-1b-Etude des fractions F_{15} , F_{25} :

- Ø La fraction F_{15} a subit un lavage successif par le dichlorométhane menant au composé pur (P_{134}) qui apparaît sous forme des cristaux de couleur jaune pâle.
- Ø La fraction F_{25} a subit plusieurs lavages successifs à l'aide de dichlorométhane. Les cristaux blancs obtenus sont solubles dans le méthanol à chaud. Ce produit est testé sur plaque CCM de gel de silice, il apparaît après révélation à base d'acide sulfurique sous forme d'un spot unique de coloration violette (P_{314}) sous lampe UV à 365nm.

IV-1-6-2-Séparation et purification des composés de l'extrait n-butanolique :

L'extrait n-butanolique a été testé avec des systèmes de solvants de polarité différente.

L'éluant utilisé est : toluène / méthanol.

L'extrait n-butanolique (7g), dissout dans le méthanol est mélangé à une petite quantité de polyamide SC-6, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une

poudre homogène. Cette poudre est déposée, sur une colonne de polyamide SC-6, préparée dans le toluène. La masse de polyamide utilisée a été : 170g

L'élution a été réalisée par un système toluène - méthanol avec des polarités croissantes.

La séparation sur colonne est suivie par une lampe UV : (à 254 et 365 nm). Le rassemblement final des fractions a été effectué sur la base d'analyses par CCM de gel de silice analytiques. Les conditions opératoires sont présentées dans le tableau IV-3.

Le tableau IV-3 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait n-butanolique (7g) de *Zygodphyllum Cornutum*.

Lot de fractions	N°de la fraction	Système d'élution	
		% Toluène	% Méthanol
1-20	FB ₁	100	0
21-38	FB ₂	95	5
39-42	FB ₃	90	10
43-59	FB ₄	85	15
60-67	FB ₅	80	20
68-79	FB ₆	75	25
80-130	FB ₇	70	30
131-143	FB ₈	65	35
144-182	FB ₉	60	40
183-195	FB ₁₀	55	45
196-223	FB ₁₁	45	55
224	FB ₁₂	35	65
225	FB ₁₃	25	75
226	FB ₁₄	0	100
227	FB ₁₅		

IV-1-6-2a-Etude des fractions FB4 et FB7 :

- Ø La fraction F_{B4} renferme deux produits, qui après plusieurs lavages successifs avec le méthanol a donnée, des cristaux blancs pour chaque produit. Ces deux produits (P₄₃ et P₅₁) sont incolores sur CCM de gel de silice, ils donnent une coloration violette après révélation à base d'acide sulfurique.
- Ø La fraction F_{B7} a subit une purification sur plaques de polyamide DC 6 éluées par le système : MeOH / H₂O / AcOH : 18 / 1 / 1 menant au produit pur (P₉₁). La coloration de ce produit (des cristaux sous forme d'aiguilles jaunes), sur plaques de polyamide et sous lampe UV est noire-violette, ainsi l'exposition d'une plaque CCM de gel de silice

testée, à des vapeurs d'ammoniac donne une coloration jaune du spot de ce produit indiquant la présence d'un flavonoïde.

Conclusion :

L'étude par chromatographie sur colonnes de gel de silice et de polyamide des extraits acétate d'éthyle et n-butanolique respectivement, a mené à l'isolement de 10 produits.

Tenant compte du poids des produits isolés, on a pu uniquement élucider les structures de deux produits à savoir les: P₂₉, P₉₁.

Références bibliographiques :

- [1] Abou-Gazar, H., Bedir, E., Takamatsu, S., Ferreira, D., Khan, I.A., 2004. Antioxidant lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 65,2499–2505.
- [2] Mabry, T., DiFeo, D., Sakakibara, M., Bohnstedt, C., Sleiger, D., 1979a. The natural products chemistry of *Larrea*. In: Mabry, J., Hunziker, in the New World Desert. Dowden Hutchinson Ross Inc., USA, pp. 115–134.
- [3] Barragán, S., Alvarez, G., Zavalza, A., 1994. In vitro evaluation of the antifungic activity of *Larrea tridentata* against human pathogenic fungi. In: Proceedings of the First Mexican Congress of Ethnobiology, Summaries, Cuernavaca, México, p. 17 (in Spanish).
- [4] Brent, J., 1999. Three new herbal hepatotoxic syndromes. *Journal of Toxicology and Clinical Toxicology* 37, 715–719.
- [5] Gnabre, J., Ito, Y., Ma, Y., Huang, R., 1996. Isolation of anti-HIV-1 lignans from *Larrea tridentata* by counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 719, 353–364.
- [6] Verastegui, M., Sanchez, C., Heredia, N., Garcia, J., 1996. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. *Journal of Ethnopharmacology* 52, 175–177.
- [7] Jaouharia JT, Lazreke B., 1999. Hypoglycemic response to *Zygophyllum gaetulum* extracts in patients with non insulin dependent diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol* 64(3), 211-217.
- [8] Sasmakov, S.A., Putieva, M. Zh., Saatov, Z., Kachala, V.V., Shashkov, A.S., 2001. Triterpene glycosides of *Zygophyllum eichwaldii* C.A.M. *Chemistry of Natural Compounds* 37, 91–92.
- [9] Heller, J.D., Kuo, J., Wu, T.C., Kast, W.M., Huang, R.C., 2001. Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid induces G2 arrest in mammalian cells and exhibits tumoricidal activity in vivo. *Cancer Res.* 61, 5499–5504.
- [10] Tyler, V.E., 1992. *The Honest Herbal, a Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies*. Pharmaceutical Press, New York, pp. 87–88.
- [11] Lambert, J.D., Sang, S., Dougherty, A., Caldwell, C.G., Meyers, R.O., Dorr, R.T., Timmermann, B.N., 2005. Cytotoxic lignans from *larrea tridentata*. *Phytochemistry* 66, 811–815.
- [12] Anesini, C., Boccio, J., Cremaschi, G., Genaro, A.S., Zubillaga, M., Sterin, B. L., et al., 1997. “In vivo” antitumoral and acute toxicity study of *Larrea*

divaricata Cav. extract. Phytother Res. 11,521–3.

- [13] Anesini ,C., Genaro, A., Boccio, J., Cremaschi ,G., Zubillaga ,M., Sterin ,B. L., et al., 1998. “In vivo” antitumour activity of *Larrea divaricata* Cav.: comparison of two routes of administration. Phytomedicine 5,41–5.

Chapitre V : Résultats et discussion

V-1-Elucidation structurale de composé P₂₉ :

Le produit P₂₉, est soluble dans le dichlorométhane, incolore sur CCM de gel de silice sous lampe UV.

La coloration violette de ce produit, après révélation à l'aide d'un révélateur à base d'acide sulfurique oriente vers une structure d'un triterpène ou d'un stérol [1].

Le spectre RMN¹H enregistré dans CDCl₃ à 300 MHz présente dans la région méthylique les signaux suivants :

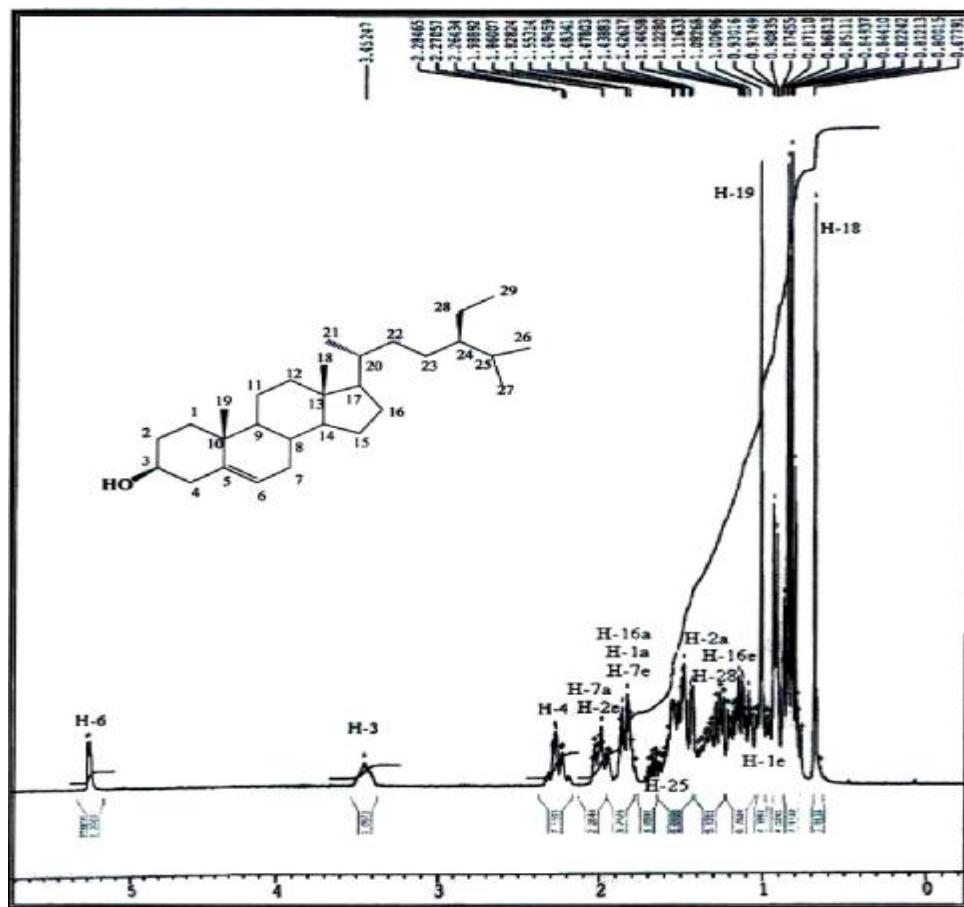


Fig.V-1 : Spectre RMN¹H du composé P₂₉

Deux singlets à $\delta_H=0,67$ ppm et $\delta_H=1,00$ ppm relatifs aux deux groupements méthyliques CH₃-18 et CH₃-19.

Un doublet à $\delta_H=0,92$ ppm ($J=6,3$ Hz) relatif au groupement méthyle CH₃-21.

Un multiplet à $\delta_H=0,78-0,85$ ppm correspondant aux trois groupements méthyliques : CH₃-26 CH₃-27, CH₃-29.

Un multiplet à $\delta_H=3,45$ ppm relatif au proton H-3.

Un doublet large à $\delta_H=5,26$ ppm ($J=8,4$ Hz) correspondant au proton oléfinique H-6.

Le spectre ^{13}C / Jmod montre la présence de 29 atomes de carbone.

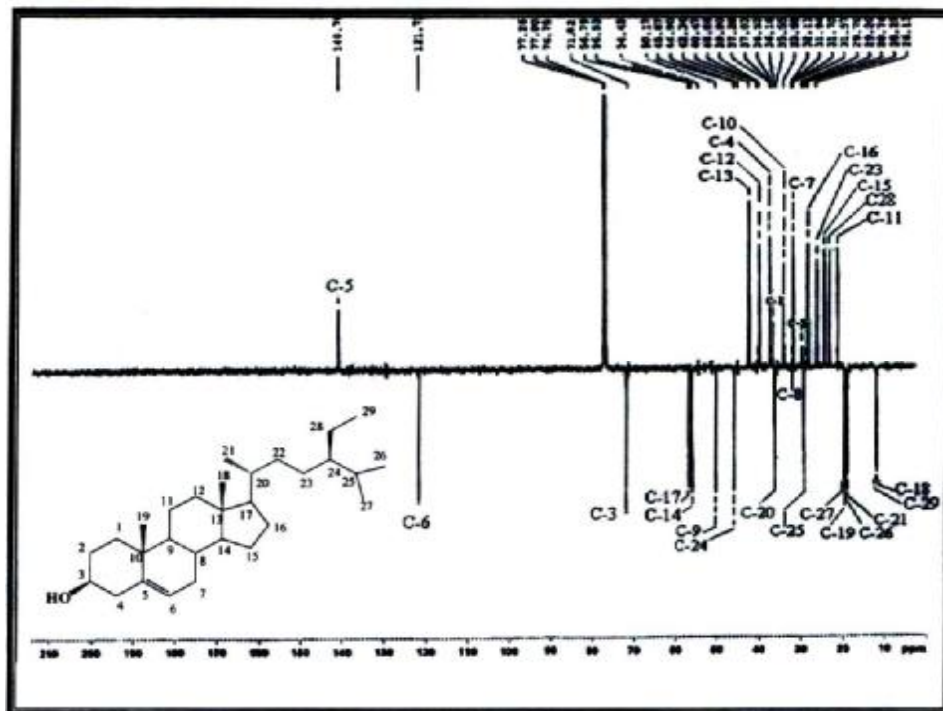


Fig.V-2 : Spectre RMN ^{13}C / Jmod du composé **P₂₉**

Ce spectre confirme la présence de la double liaison par les signaux à $\delta_c=140,78$ ppm relatif au carbone C-5 et à $\delta_c=121,72$ ppm correspondant au carbone éthylénique C-6.

Ce spectre indique également la présence de six groupements méthyliques entre $\delta_c=11,90$ ppm et $\delta_c=19,80$ ppm. Le signal à $\delta_c=71,82$ ppm correspondant au carbone C-3 et indiquant la présence d'un groupement hydroxyle porté par C-3.

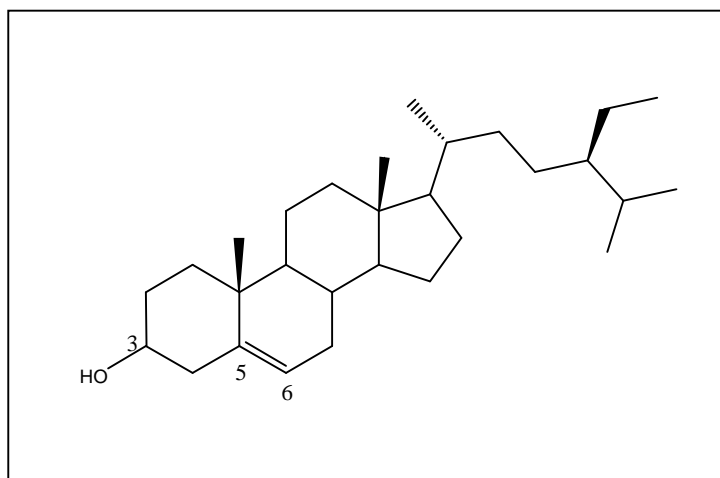
Le tableau V-1 : rassemble les données spectrales de de RMN ^1H et ^{13}C du composé P₂₉.

Tableau V-1 : Les données spectrales de RMN¹H et ¹³C du composé **P₂₉**.

N°	δ _C (ppm)	δ _H (ppm)	<i>J</i> (Hz)
1(CH ₂)	36,52	1,05-1,79	/
2(CH ₂)	29,70	1,42-1,80	/
3(CH)	71,82	3,45	/
4(CH ₂)	37,03	2,27	/
5(C)	140,78	/	/
6(CH)	121,72	5,26	8,4
7(CH ₂)	31,70	1,47-1,92	/
8(CH)	31,94	1,39-1,55	/
9(CH)	50,17	0,81-0,89	/
10 (C)	33,98	/	/
11 (CH ₂)	21,19	1,36-1,58	/
12(CH ₂)	39,80	1,10-1,98	/
13(C)	42,34	/	/
14(CH)	56,53	0,91-0,99	/
15(CH ₂)	24,31	1,49-1,58	/
16(CH ₂)	28,25	1,22-1,79	/
17(CH)	54,40	1,03-1,08	/
18(CH ₃)	11,90	0,67	/
19(CH ₃)	19,40	1,00	/
20(CH)	36,16	1,26-1,35	/
21(CH ₃)	18,84	0,92	6,3
22(CH ₂)	34,00	1,02-1,26	/
23(CH ₂)	26,13	1,08-1,19	/
24(CH)	44,90	0,81-0,89	/
25(CH)	29,20	1,63	/
26(CH ₃)	19,00	0,75-0,85	/
27(CH ₂)	19,80	0,75-0,85	/
28(CH ₂)	23,10	1,20	/
29(CH ₃)	12,00	0,75-0,85	/

Ces données caractérisant un phytostérol portant un groupement hydroxyle sur le carbone C-3 et une double liaison en C5-C6 [2].

L'ensemble de ces données spectrales comparées avec celles de la littérature est en accord avec la structure du β -sitostérol [3-5].

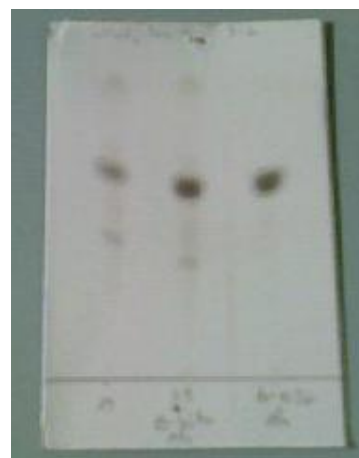


β -sitostérol

Cette structure est confirmée également par la co-chromatographie avec un échantillon authentique (Fig.V-3).



Révélation à base de la vanilline



Révélation à base d'acide sulfurique

Fig.V-3

V-2- Elucidation structurale de produit P₉₁ :

L'allure du spectre RMN¹H enregistré dans DMSO à 250 MHz, oriente vert la structure d'un flavonoïde diglycosylé ; ce spectre montre :

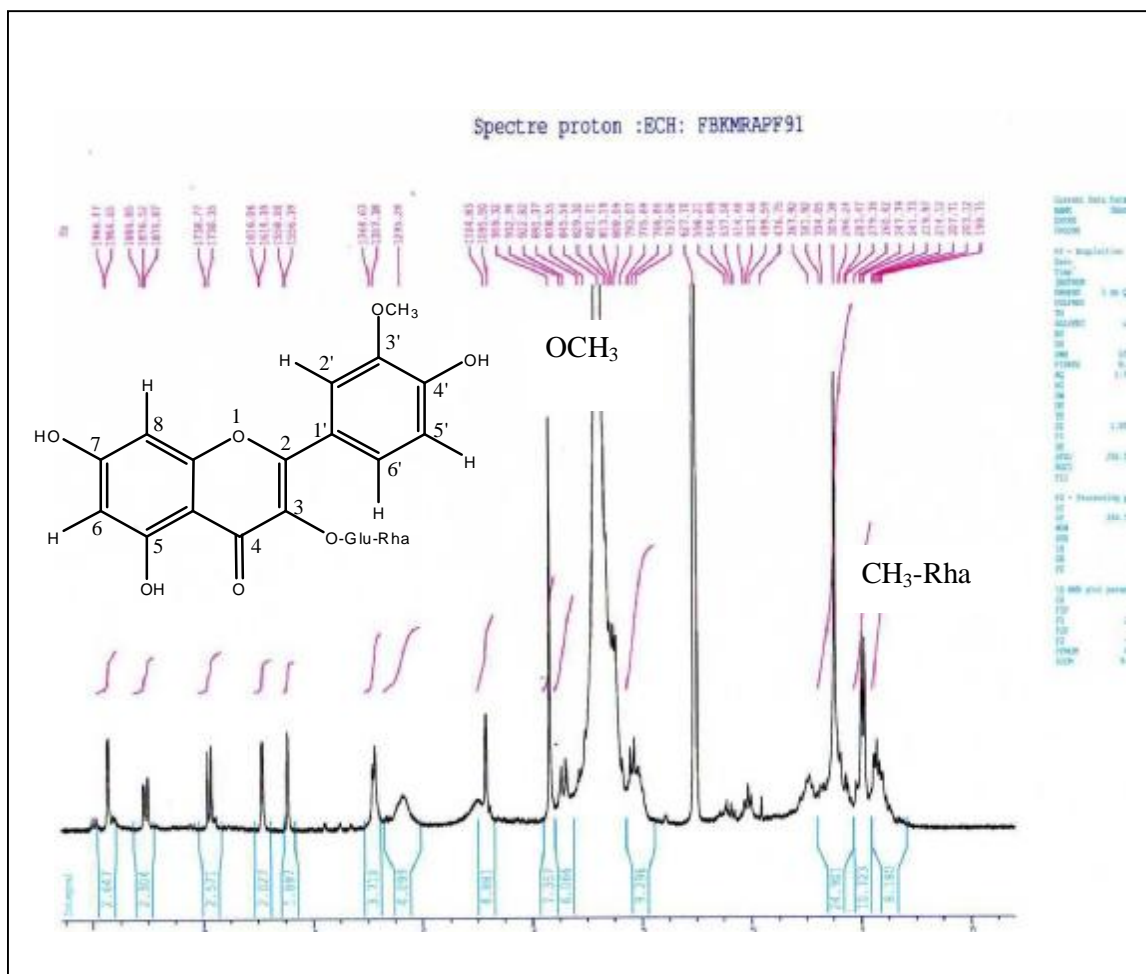


Fig.V-4 : Spectre RMN¹H du composé P₉₁

Un doublet ($J = 1.6$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_H = 7,86$ ppm attribuable à H 2'.

Un doublet de doublet ($J = 8,4$ et $1,6$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_H = 7,52$ ppm, attribuable à H6'.

Un doublet ($J = 8,4$ Hz) d'intégration 1H, à $\delta_H = 6.94$ ppm, attribuable à H5'.

L'ensemble de ces trois signaux oriente vers une disubstitution du noyau B.

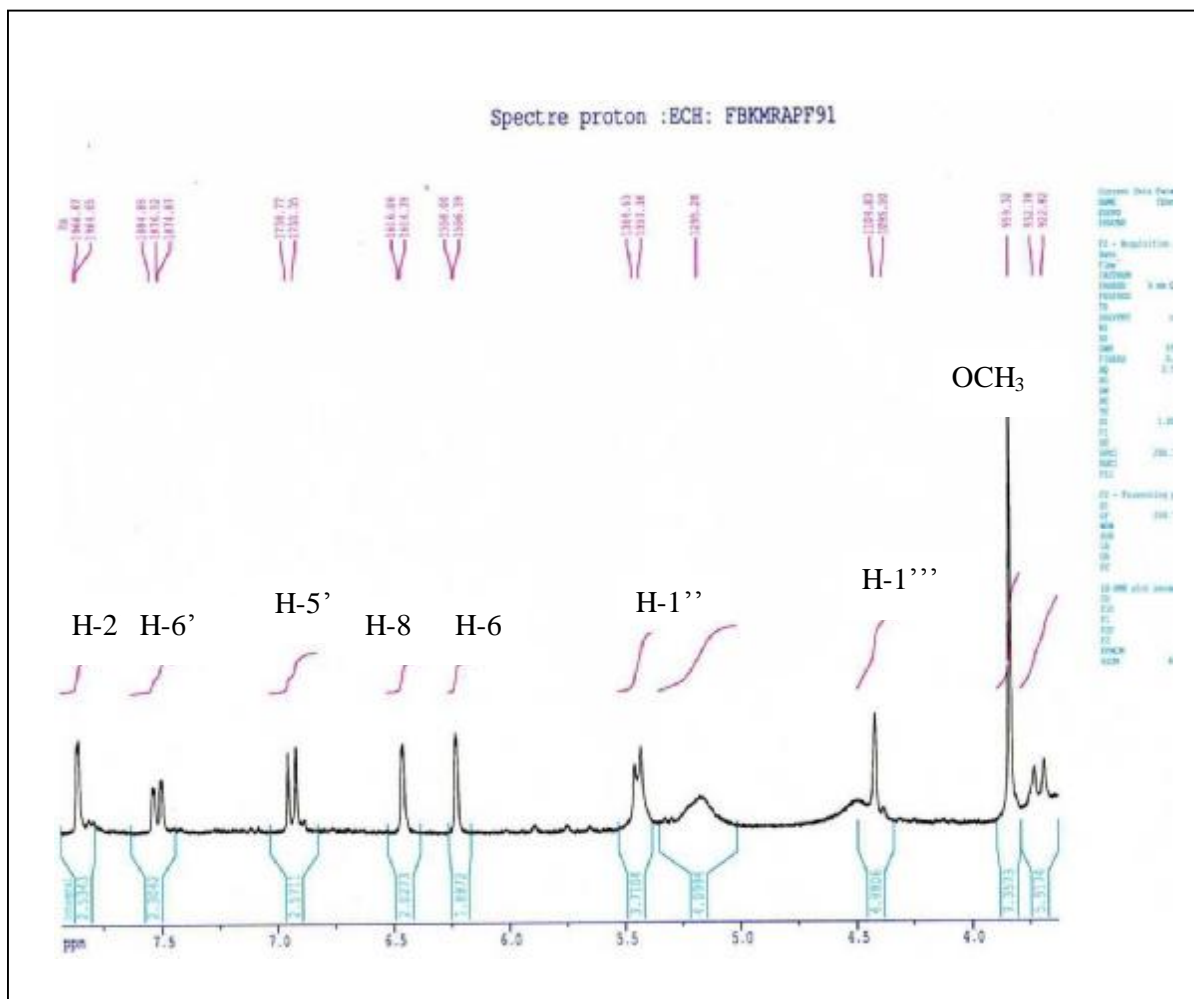


Fig.V-5 : Etalement du spectre dans la région : 3,50-8,00 ppm

Un doublet ($J = 1.6$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_H = 6,49$ ppm, attribuable à H8.

Un doublet ($J = 1,6$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_H = 6,20$ ppm, attribuable à H6.

Un signal sous forme d'un doublet ($J = 7.2$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_H = 5,45$ ppm attribuable au proton anomérique d'un glucose ou d'un galactose ($H''-1$).

L'intervalle 3,00-3,80 ppm, se trouvent les autres protons des sucres

Un signal sous forme d'un singlet d'intégration 1H à $\delta_H = 4,32$ ppm, attribuable au proton anomérique ($H'''-1$) d'un rhamnose, dont la présence de son méthyle est signalé par un doublet ($J = 6,0$ Hz) à $\delta_H = 0,98$ ppm.

Un singlet d'intégration 3H à $\delta_H = 3,85$ ppm, attribuable à un groupe méthoxyle OMe révélant la présence d'un méthoxyle dans la molécule.

L'hydrolyse acide de composé P_{91} , libère le glucose et le rhamnose comme sucres révélés par co-chromatographie avec les échantillons authentiques. Ce résultat exclu la présence de galactose.

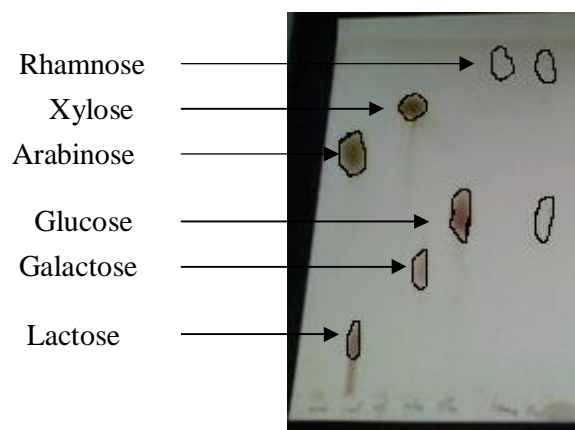


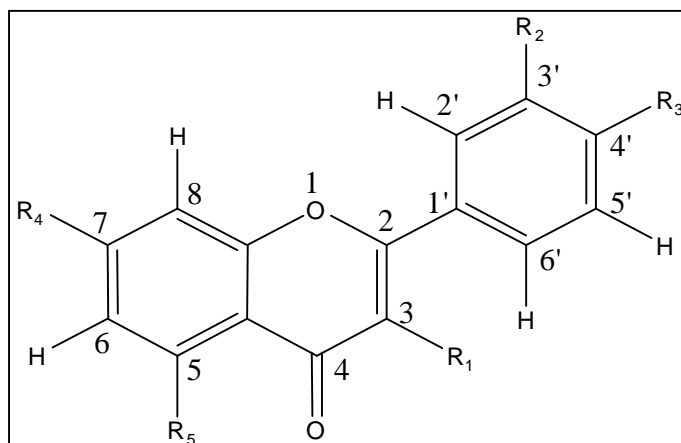
Fig.V-6 : la co-chromatographie des sucres libérés de composé P₉₁

Le tableau V-2 : rassemble les données spectrales de RMN¹H du composé P₉₁.

Tableau V-2 : les données spectrales de RMN¹H de composé P₉₁.

Le déplacement chimique δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	La constante de couplage J (Hz)	Interprétation
0,98	d	3H	6,0	CH ₃ du rhamnose
3,00-3,80	/	/	/	Protons des sucres
3,85	S	3H	/	OCH ₃
4,32	d	1H	/	H-1''''rhamnose
5,45	d	1H	7,25	H-1''glucose
6,20	d	1H	1,6	H-6
6,49	d	1H	1,6	H-8
6,94	d	1H	8,4	H-5'
7,52	dd	1H	8,4 et 1,6	H-6'
7,86	d	1H	1,6	H-2'

Ces données orientent vers la structure partielle suivante :



Le comportement chromatographique :

Le système	SI	SII	SIII
R_f	0.20	0.47	0.30
La fluorescence	Noire violette		

SI : Toluène / MeOH / Mec : 4 / 3 / 3.

SII : MeOH / H₂O / ACOH : 18 / 1 / 1.

SIII : H₂O / MeOH / Mec / Acétylcétone :
13 / 3 / 3 / 1.

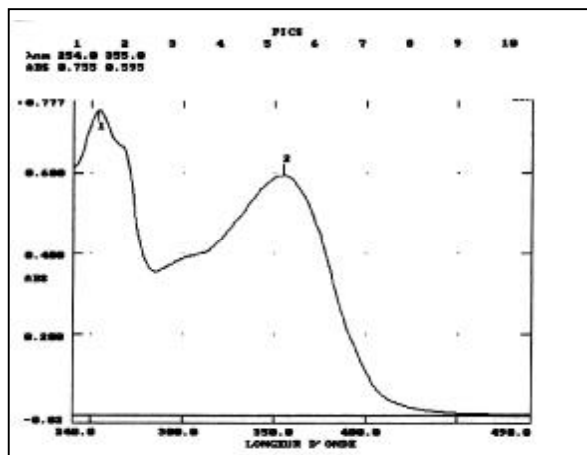
La série spectrale UV de composé P₉₁ :

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	355		254	Flavonol-3OR
+NaOH	413	327	271	OH libre en 4' OH libre en 7
+AlCl ₃	403	364 302	268	Pas de ortho di-OH Pas d'oxydation en C ₆
AlCl ₃ +HCl	401	359	269	OH libre en 5
NaOAc	374	318	274	OH libre en 7
NaOAc+ H ₃ BO ₃	359	268	255	Pas de ortho di-OH
NaOH après 5 min stable				

La fluorescence noire-violette de ce composé sous lumière de **Wood** indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

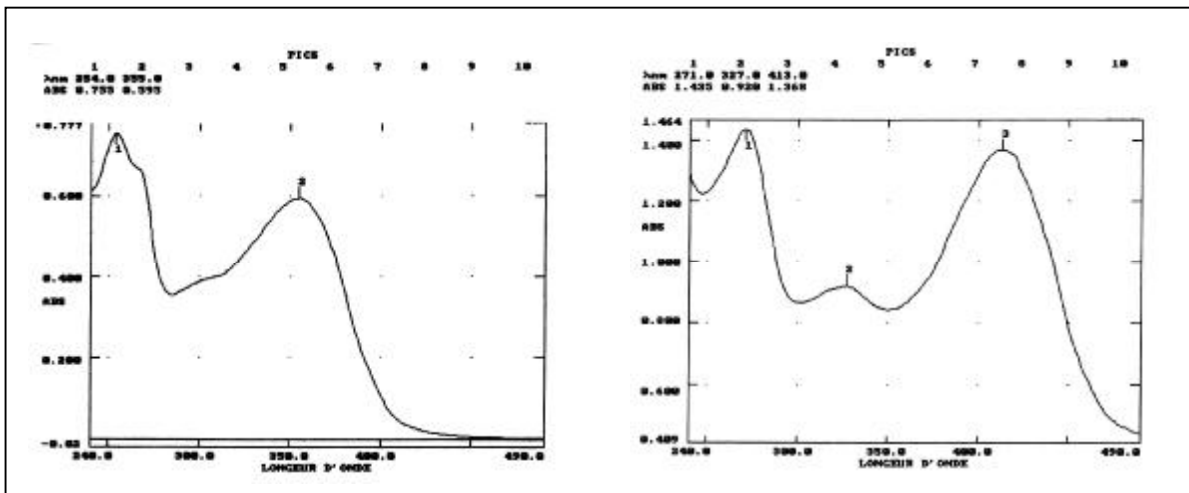
Le R_f de 0,30 dans 13 / 3 / 3 / 1 et le R_f de 0,20 dans 4 / 3 / 3 confirme la structure hétérosidique méthoxylée.

La coloration noire violette sous lumière de **Wood** et la valeur maximale de la longueur d'onde de la bande I en présence du méthanol à 355 nm orientent vers la structure d'un flavonol substitué en 3 (3- OR) et excluent la structure de flavone.



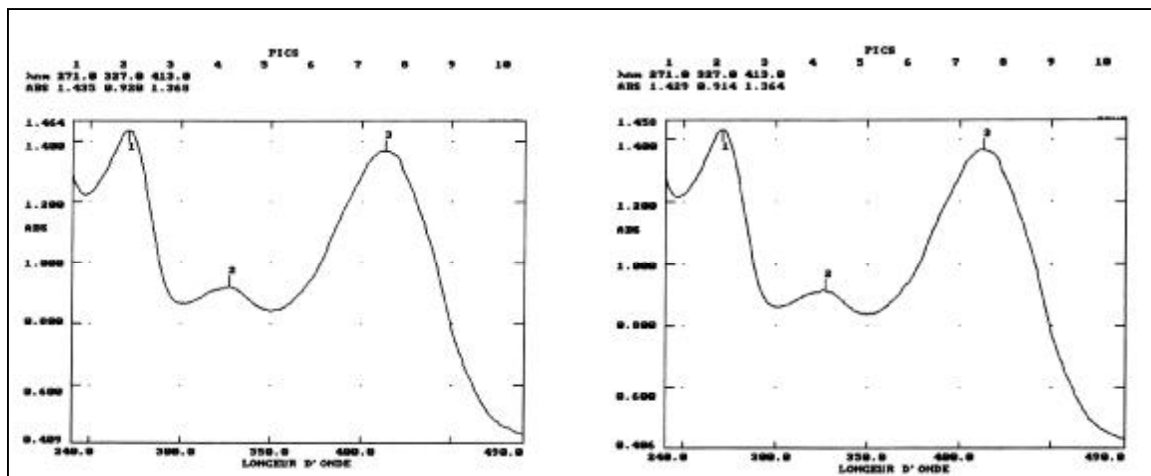
Spectre UV enregistré dans MeOH.

L'addition du réactif NaOH provoque un déplacement bathochrome $\Delta\lambda=+58$ nm, de la bande I, avec augmentation de l'intensité et stabilité après 5 min, suggère la présence d'un groupe OH libre en position 4' ($R_3= OH$). L'apparition d'une nouvelle bande à 327 nm montre la présence d'un groupe OH libre en position 7 ($R_4= OH$) :



Spectre UV enregistré dans MeOH.

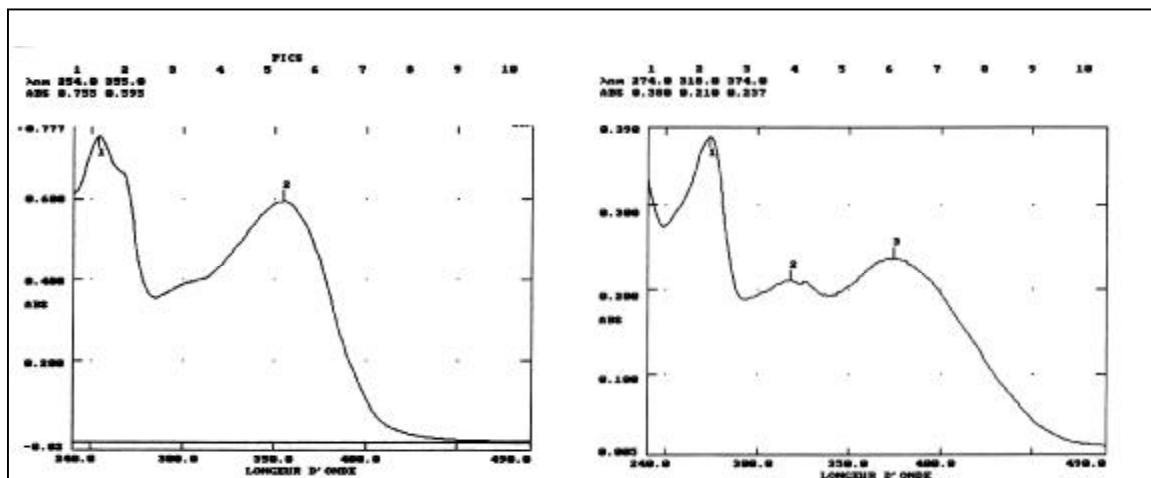
Spectre UV enregistré dans MeOH + NaOH



Spectre UV enregistré dans MeOH + NaOH

Spectre UV enregistré dans MeOH + NaOH
Après 5 min

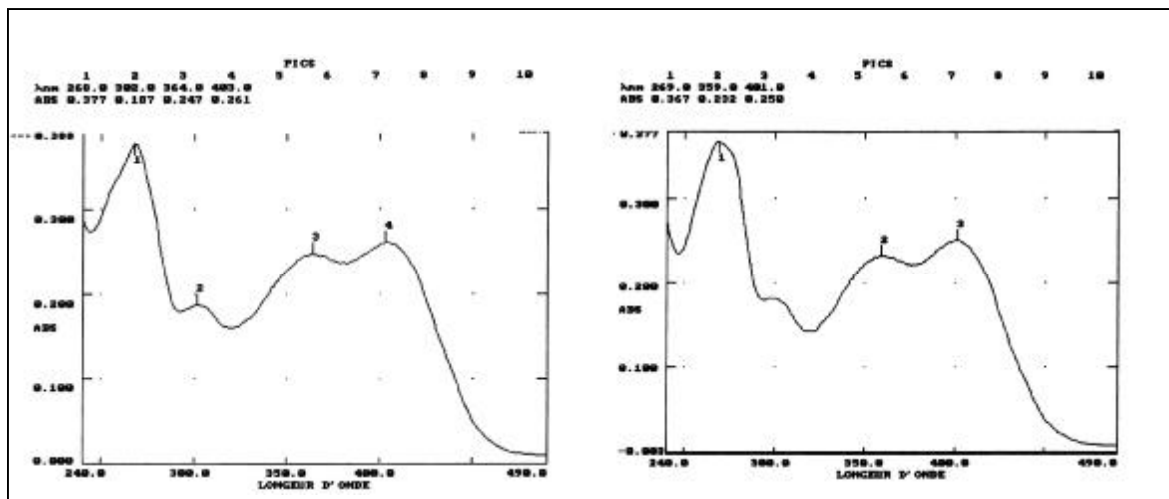
Cette hypothèse est confirmée par l'effet bathochrome $\Delta\lambda=+20$ nm de la bande II dans NaOAc par rapport au spectre methanolique.



Spectre UV enregistré dans MeOH

Spectre UV enregistré dans MeOH+ NaOAc

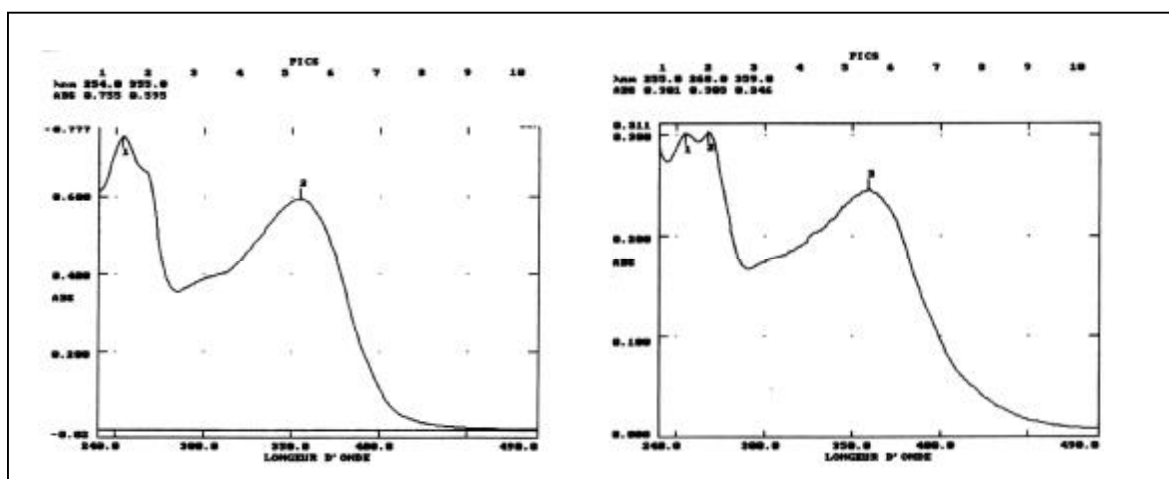
Il n'y a pas de changement notable de la valeur de la bande I ($\Delta\lambda=-2$ nm) en comparant les deux spectres : AlCl_3+HCl et AlCl_3 :



Spectre UV enregistré dans MeOH + AlCl₃

Spectre UV enregistré dans AlCl₃+HCl

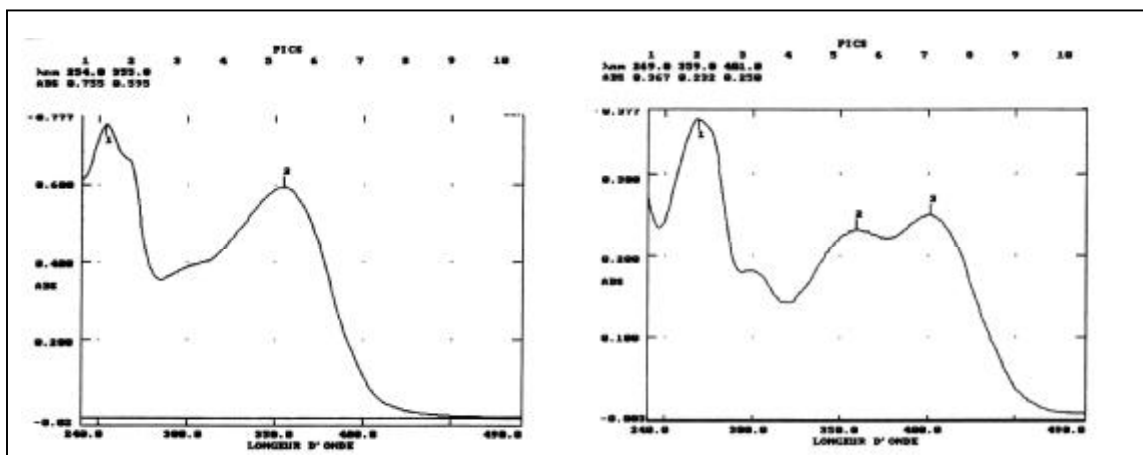
Ainsi l'effet bathochrome faible $\Delta\lambda=+4$ nm de la même bande dans NaOAc+H₃BO₃ par rapport au méthanol excluent le système ortho dihydroxylé sur le cycle B.



Spectre UV enregistré dans MeOH

Spectre UV enregistré dans NaOAc+H₃BO₃

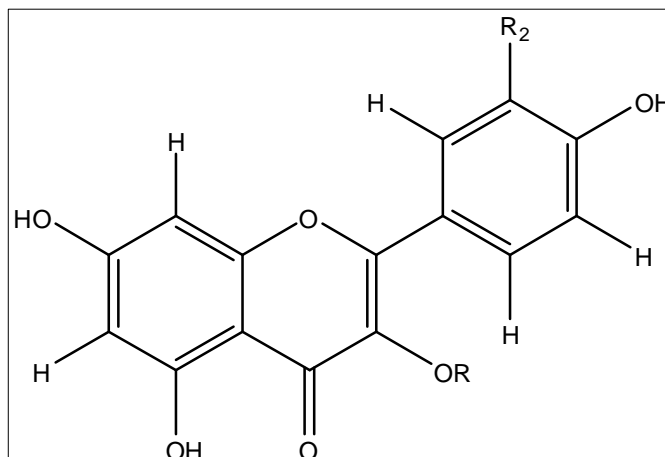
Le déplacement bathochrome $\Delta\lambda=+46$ nm de la bande I dans le spectre AlCl₃+HCl par rapport au spectre enregistré dans le MeOH indique la présence d'un groupe OH libre en 5 (R₅=OH).



Spectre UV enregistré dans MeOH

Spectre UV enregistré dans AlCl₃+HCl

La combinaison de ces données spectrales UV et RMN¹H orientent vers la structure partielle suivante :



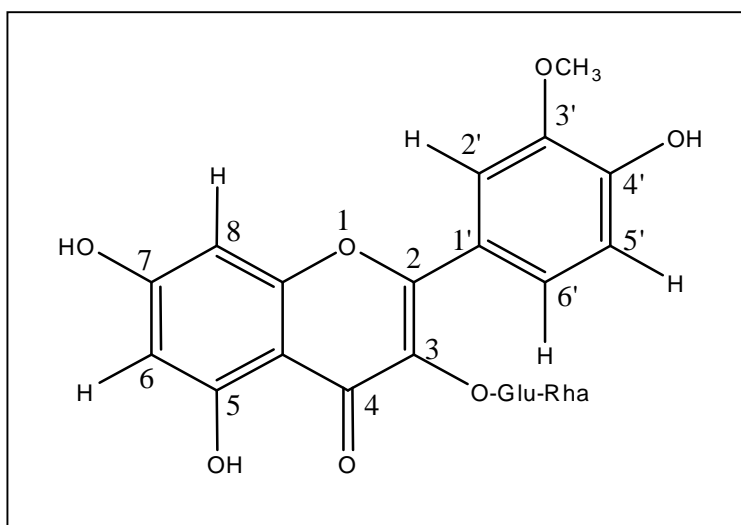
Le problème qui se pose ici est la détermination de la position de méthoxyle et celle des sucres ainsi que la succession des deux sucres le glucose et le rhamnose.

Les déplacements chimiques des deux protons anomériques du glucose et du rhamnose, ainsi les valeurs des constantes de couplage dans le spectre RMN¹H (Fig.V-4) comparés avec celle de la littérature sont en faveur d'un groupement rutinoside [6].

L'aglycone obtenue après l'hydrolyse acide donne une fluorescence jaune sous lampe UV indiquant la présence d'un flavonol.

Alors ces résultats nous permettent d'attribuer le groupe méthoxyle à la position 3' (R₂= OMe) et le groupe rutinoside à la position 3 (R= Glu-rha).

Et par conséquent la structure finale est la suivante [7] :



5, 7,4'trihydroxy, 3'methoxy, 3-O-rhamnoglucosyl-flavonol

Ce composé est connu sous le nom **3-O-rhamnoglucosyl isorhamnétine**.

Références bibliographiques :

- [1] Souri, N., 2003. Thèse de magister. « Etude Phytochimique de l'extrait chloroformique De *Pseudemcaria Teretifolia* », Université El Hadj Lakhdar Batna.
- [2] Kojima,H.,Hatano,A.,Ogura,H.,1990.Phytochemistry29 (7),2351-2355.
- [3] Gonzalez,A.G.,Rodriguez Pérez, E.M. ,Padron, C.H.an Bermejo,J.,1997. Phytochemical investigation of canary island lichens.Virtual activity and Pharmacology,49-60.
- [4] Mitaine-Offer, A.C., Tapondjou, L.A., 2003.Biochemical Systematics and Ecology31, 227-228.
- [5] Wanchai De-Eknakul, Buppachart, P., 2002.Phytochemistry 62,389-398.
- [6] Markham, K.R., Geiger, H., 1994.¹H NMR spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide.In The flavonoids Advance in Research since 1993. In: J.B.Harborne ;(Ed); Chapman and Hall; London.
- [7] Benaissa, O., 2003. Thèse de magister. « Etude du métabolisme flavonique de l'espèce *Hertia Cheirifolia* (Compositae) ».Université Mentouri-Constantine.

Conclusion

Conclusion

Ce travail est destiné à étudier les métabolites secondaires de l'espèce endémique *Zygophyllum cornutum* (Zygophyllaceae), récoltée de la région de Ouergla, à la suite de la recherche sur les plantes d'origine Algériennes. Objectif primordial assigné par notre laboratoire, afin de découvrir l'intérêt biologique de ces dernières et évaluer l'importance de la flore de notre pays.

L'étude phytochimique de *Zygophyllum cornutum* nous a permis de séparer et identifier deux produits :

- **β -sitostérol**
- **3-O-rhamnoglucosyl isorhamnétine**

L'élucidation structurale de ces derniers repose sur la combinaison de différentes méthodes d'analyses spectrales (UV, RMN¹H et ¹³C) et la comparaison avec les données de la littérature.

Abstract

Our work consisted to identify the secondary metabolites of the endemic species *Zygophyllum cornutum*, belonging to the Zygophyllaceae. This family includes about 285 species and 27 genus, it is widely distributed in arid areas and deserts.

Phytochemicals investigation of the whole plant of *Zygophyllum cornutum* resulted in the isolation of tow compounds:

- **β -sitostérol**
- **3-O-rhamnoglucosyl isorhamnétine**

The structures elucidations of these compounds were based on combination of the spectroscopic methods (UV, NMR¹H and ¹³C).

According to our bibliographic research, the first compound (β -sitosterol) is isolated for the first time from the family Zygophyllaceae The second flavonoid is isolated for the first time from the genus *Zygophyllum*.

Key words: *Zygophyllum cornutum*; Zygophyllaceae; sterols; flavonoids.

الملخص:

يهدف بحثنا هذا إلى فصل و تحديد البنى الكيميائية لنواتج الايض الثانوي للنوع الأصل *Zygophyllum Cornutum* الذي ينتمي إلى عائلة Zygophyllaceae، هذه الأخيرة تضم حوالي 285 نوع و 27 جنس من النباتات العشبية التي تتوزع خاصة في المناطق الصحراوية. و قد تمكنا من فصل مركبين باستعمال مختلف التقنيات الكروماتوغرافية:

• β -sitostérol

• 3-O-rhamnoglucosyl isorhamnétine

و تم التعرف عليهما بواسطة طرق التحليل الفيزيائية المختلفة ($RMN^{13}C+UV +RMN^1H$). حسب دراستنا البيبليوغرافية، المركب الأول فصل لأول مرة في العائلة أما الثاني فقد فصل لأول مرة في الجنس *Zygophyllum*.

الكلمات المفتاح: *Zygophyllum Cornutum*، Zygophyllaceae، الفلافونيدات، الستيرويدات.

Résumé :

Nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de l'espèce endémique *Zygothymum Cornutum* appartenant à la famille des **Zygophyllaceae**. Elle compte environ 285 espèces et 27 genres de plantes distribuées surtout dans les régions désertiques.

L'extraction suivie de séparations et de purifications en combinant diverses techniques chromatographiques a conduit à deux produits :

- **β -sitosterol.**
- **3-O-rhamnoglucosyl isorhamnétine.**

L'élucidation structurale de ces derniers a été basée sur la combinaison de différentes méthodes spectroscopiques (UV, RMN¹H et ¹³C).

Selon nos recherches bibliographiques, le β -sitostérol a été isolé pour la première fois dans la famille Zygophyllaceae.

Le flavonoïde 3-O-rhamnoglucosyl isorhamnétine a été isolé pour la première fois à partir de genre *Zygothymum*.

Mots clés : *Zygothymum Cornutum*, Zygophyllaceae, Stéroïls, Flavonoïdes.