

**République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de
L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du grade de

MAGISTER en

Chimie organique

Option : Analyse Physico-Chimique et Chimie Organique

INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT

***n*-BUTANOL DE L'ESPECE CENTAUREA AFRICANA.**

Sous la direction de :

Dr R.SEGHIRI

Par :

MANSOUR Amira

Devant le jury :

M ^f	S. BENAYACHE	Pr. Université Mentouri	Président
M ^f	R.SEGHIRI	M.C. Université Mentouri	Rapporteur
M ^{me}	F. BENAYACHE	Pr. Université Mentouri	Examinatrice
M ^{me}	O. BOUMAAZA	M.C. Université Mentouri	Examinatrice
M ^{elle}	R. MEKKIOU	M.C. Université Mentouri	Examinatrice

Constantine 2009

REMERCIEMENTS

Ces recherches ont été réalisées sous la direction de Monsieur **SEGHIRI Ramdane**

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour avoir encadré ce travail pendant cette année, aussi pour m'avoir accordé votre confiance. Merci pour avoir toujours été disponible, pour être à mon écoute, pour m'avoir guidée tout en me laissant libre dans mes choix. Je tiens à vous exprimer également infiniment toute ma gratitude pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit.

A Madame **F. BENAYACHE** Professeur à l'université de Constantine

Veillez trouver ici l'expression de ma gratitude pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie. Soyez assurée de mon profond respect et de ma vive reconnaissance pour m'avoir donné les moyens d'effectuer ce travail dans votre laboratoire et m'avoir fait bénéficier de vos précieux conseils.

Je tiens à remercier Monsieur **S. BENAYACHE**, Professeur à l'université de Constantine, et Mme **O. BOUMAAZA** maître de conférences pour le grand honneur qu'ils me font en acceptant de faire partie de mon jury de thèse.

Un immense merci à Melle **R. MEKKIOU**, pour sa patience, sa gentillesse, sa disponibilité et pour la chaleur humaine qu'elle apporte.

Je tiens à la remercier aussi d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Ma sincère gratitude est adressée à :

Monsieur **M. BOUHROOM**, pour sa disponibilité, et sa bonne humeur, ainsi qu'à monsieur **L.ZAITER**.

Je remercie également tous mes collègues de l'institut de Chimie. Parmi ces personnes, j'aimerais en particulier remercier : Louisa, Siham, Fairouz, Samira, Hanane, Lamia, Samia, Amel, Leila, Radouane, Nounou, Omar, Mouhamed, Seif, Labib, et Farid.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation et au bon déroulement de cette thèse.

ABBREVIATIONS ET SYMBOLES

AcOEt	Acétate d'éthyle
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ara	Arabinose
ATPase	Adénosine triphosphatase
CAS	Chemical Abstracts Service
CC	Chromatographie sur colonne ouverte
CCM	Chromatographie sur couche mince
COSY	Spectroscopie de corrélation
¹³ C	Carbone 13
<i>d</i>	Doublet
ép	Epaulement
F	Fraction
Fru	Fructose
glu	Glucose
gal	Galactose
¹ H	Proton
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single-quantum correlation</i>
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance/pression
LDL	Low density lipoprotein
MeOH	Méthanol
m	Masse
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NO	Oxyde nitrique
NOE	Effet nucléaire Overhauser
NOESY	Spectroscopie NOE et d'échange
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rha	Rhamnose
ryb	Rybose
<i>s</i>	Singulet
SM	Spectroscopie de masse
<i>t</i>	Triplet
TOCSY	Spectroscopie de corrélation totale
UV	Ultraviolet

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
- Histoire du médicament à base de plantes.....	1
Références.....	6

CHAPITRE I : Les Métabolites secondaires les plus courant chez le genre *Centaurea*

I. Généralités sur les métabolites secondaires.....	7
A- définition.....	7
B- Rôles et distribution.....	7
I.1. Les terpènes.....	8
I.1.1. Monoterpènes.....	9
I.1.2. Sesquiterpènes.....	10
I.1.3. Diterpènes.....	12
I.1.4. Triterpènes.....	13
I.1.5. Tétraterpènes.....	14
I.1.6. Polyterpènes.....	14
I.1.7. Les stéroïdes.....	15
I.2. Les produits phénoliques.....	18
I.2.1. Les coumarines.....	19
A- Usage en médecine.....	21

B- Usage alimentaire	21
C- Autres usages.....	22
I.2.2. Les flavonoïdes.....	23
I.2.2.1. Structure chimique et classification.....	24
A- Flavones et flavonols.....	25
B- Flavanones et dihydroflavonols.....	26
C- Chalcones et aurones.....	26
I.2.2.2. Origine biosynthétique des flavonoïdes.....	29
A- Biosynthèse des chalcones.....	32
B- Distribution et localisation des chalcones.....	33
I.2.2.3. Etude chimique des flavonoïdes.....	35
1- Extraction.....	35
2- Séparation.....	37
A- Séparation par HPLC et par électrophorèse capillaire	37
B- Séparation chromatographique sur papier, couche mince et colonne....	38
3- Identification	39
A- CCM analytique.....	39
B- L'hydrolyse.....	42
C- Spectrométrie de masse.....	42
D- La résonance magnétique nucléaire RMN.....	43
a- RMN monodimensionnelle.....	43
b- RMN bidimensionnelles.....	44
E- Spectrophotométrie UV-visible.....	45
a) <i>Addition de NaOH</i>	47
b) <i>Addition de NaOAc</i>	47

c) <i>Addition de NaOAc + H₃BO₃</i>	48
d) <i>Addition de AlCl₃ et AlCl₃+HCl</i>	48
I .2.2.4 Pharmacocinétique des flavonoïdes.....	51
I .2.2.5 Activités biologiques des flavonoïdes	51
1- Propriétés antioxydantes et piègeurs de radicaux libres	51
2- Propriétés inhibitrices d'enzymes.....	52
3- Effets protecteurs vasculaires.....	52
4- Propriétés antihépatotoxiques.....	52
5- Propriétés antiallergiques.....	53
6- Activité anti-inflammatoire.....	53
7- Activité anti-ulcérogène.....	53
8- Flavonoïdes et NO.....	54
9- Autres effets biologiques.....	54
10- Alimentation riche en flavonoïdes et prophylaxie des maladies cardio-vasculaires et des cancers	54
11- Toxicité.....	55
I .2.3. Conclusion.....	56
Références.....	57

Chapitre II : Etude phytochimique de *Centaurea africana*

II.1. Place dans la systématique (botanique).....	69
II.2. Description de l'espèce.....	70
II.3. Travaux antérieurs	71
II.4. Récolte de la matière végétale.....	74

II.5. Extraction de <i>Centaurea africana</i>	74
II.6. Travaux personnels.....	76
II.6.1. Séparation et purification des composants de l'extrait n-butanol de <i>C. africana</i>	76
II.6.1.1. Matériels et méthodes utilisés.....	76
II.6.1.2. Méthodologie générale	77
a) . <i>Fractionnement de l'extrait n-butanol</i>	78
b) . <i>Etude des fractions F17, F20</i>	80
c) . <i>Etude de la fraction F10</i>	82
d) . <i>Etude de la fraction F15</i>	82
e) . <i>Etude de la fraction F7</i>	82
f) . <i>Etude de la fraction F6</i>	83
II.6.2. Conclusion.....	83
Références	85

Chapitre III : Résultat et discussion

III.1. Identification des produits isolés de la phase <i>n</i> -butanol de <i>C. africana</i>	86
III.1.1. Elucidation structurale du composé AM1	87
III.1.1. Elucidation structurale du composé AM2.....	95
Conclusion générale.....	103

Introduction :

Aujourd'hui comme jadis, la médecine moderne dépend beaucoup des plantes. Ainsi, sous leurs conditionnements hermétiques, gélules et comprimés contiennent souvent des extraits végétaux ou des produits d'hémisynthèse d'origine naturelle. Est-il nécessaire de rappeler que des « remèdes » aussi efficaces que la quinine, chef de file des antimalariques, la morphine, analgésique majeur, l'ergot de seigle aux vertus antimigraineuses ou le curare aux propriétés myorelaxantes sont d'origine végétale ! Comme nombre d'activités humaines, la médecine a connu en ces deux derniers siècles, des progrès si révolutionnaires qu'ils paraissent égaler ou surpasser tous ceux accomplis au cours des millénaires précédents. Ainsi, alors que la composition et la concentration des actifs d'une plante varient selon la saison et la partie employée, les techniques modernes permettent d'isoler les molécules chimiques des végétaux, de les doser rigoureusement et d'assurer une efficacité qui restera inchangée plusieurs années. L'extraordinaire richesse du vocabulaire populaire pour désigner les plantes nous en dit long sur les connaissances médicales de l'homme des champs des temps passés, qui voyait au bord du chemin, à l'ombre des haies, dans les bois et dans les prés, la pharmacie du bon Dieu qu'il avait sous la main. Au vu de l'abondante littérature contemporaine consacrée aux plantes médicinales, il semble bien que celles-ci suscitent un regain d'intérêt chez les Occidentaux. Face aux situations de mal-être qui peuvent gâcher leur quotidien, les femmes et les hommes d'aujourd'hui sont à la recherche d'une prise en charge appropriée. Que ce soit pour atténuer une symptomatologie ou pour se maintenir en bonne santé, la phytothérapie répond aux préoccupations du citoyen du XXI^e siècle. Traditionnellement, elle est perçue comme respectueuse de savoirs ancestraux. Naturelle, elle est pensée comme non dangereuse. Disponible sans contrainte, elle permet l'automédication [1].

Cette thèse est l'occasion de se rappeler quelques faits historiques marquants de l'épopée glorieuse qu'est celle de la médecine à base de plantes, des grandes civilisations de l'Antiquité à nos jours.

Histoire du médicament à base de plantes :

❖ Les origines

Longtemps considéré comme la plus ancienne pharmacopée du monde, le Pen-Ts'ao King fut écrit par l'empereur chinois Shen Nong vers 2800 avant notre ère. Des exégèses récentes contestent cette origine lointaine, et c'est aujourd'hui à la tablette sumérienne de Nippur que

l'on attribue la palme de l'ancienneté. Gravée durant le troisième millénaire avant notre ère, elle comporte la liste des drogues utilisées à cette époque, parmi lesquelles figurent déjà l'opium et la jusquiame. La traduction des hiéroglyphes a montré que les Égyptiens employaient de nombreuses drogues végétales majeures. Le papyrus d'Ebers écrit à Thèbes vers 1600 av. J.-C., cite plus de sept cents noms de drogues : on y retrouve des sédatifs tels que l'opium, le chanvre indien, la mandragore et des purgatifs tels que le séné et le ricin. À ces plantes s'ajoute une foule de substances hétéroclites, dont l'action favorable ne peut s'expliquer que par la confiance qu'y plaçait le malade et la charge mystique ou religieuse dont s'entourait leur emploi [2].

❖ *L'Antiquité gréco-latine*

C'est en Grèce vers l'an 400 av. J.-C. que naît vraiment la médecine occidentale sous l'impulsion d'Hippocrate (**Figure.1**).

À la fois médecin et pharmacien, ce précurseur sépare la médecine des préceptes religieux et magiques et lui donne ses premiers fondements scientifiques. Son œuvre médicale domine toute l'Antiquité, car ses connaissances s'étendaient aux drogues de l'Occident, mais aussi de l'Orient, que les Grecs avaient héritées des Perses. On ne peut qu'être frappé par la justesse des réflexions et des connaissances rapportées dans le *Corpus hippocratum*, ouvrage paru cent ans après la mort du célèbre médecin. Ainsi, au cours des grandes épidémies de peste d'Athènes, Hippocrate prescrit d'allumer dans tous les



Figure.1.Hippocrate avec les attributs de la médecine [3]

quartiers de la ville des feux alimentés par des herbes aromatiques (romarin, hysope, sarriette, lavande) qui, en brûlant, libèrent leurs essences terpéniques aux propriétés antiseptiques. L'œuvre d'Hippocrate est élargie quelques siècles plus tard par Dioscoride qui inventorie plus de cinq cents drogues dans un livre écrit en 77 ap. J.-C., puis traduit en latin au XV^e siècle sous le titre de *De Materia medica*. Ce traité, qui répertorie toutes les drogues connues du monde antique, vaut à son auteur d'être considéré comme le père de la pharmacognosie [4].

❖ *Le Moyen Âge* (Figure .2)

Durant la longue période d'obscurantisme médiéval, la science médicale et pharmaceutique se réfugie dans les couvents et les monastères. Chaque lieu de culte dispose d'un jardin botanique dans lequel sont cultivées les principales plantes médicinales, connues alors sous le terme de « simples ». Bien des phénomènes de cette époque trouble, restés longtemps obscurs, trouvent dans les découvertes récentes de la science des commencements d'explication. Par exemple, on sait aujourd'hui que certains états pathologiques, appelés par les auteurs de cette époque « mal des ardents » ou « feu de saint Antoine », ne sont que les signes d'une intoxication par l'ergot de seigle, consécutive à l'ingestion de farine contaminée. Durant cette période où règne l'alchimie sur l'Europe occidentale, la science pharmaceutique ne fait guère de progrès significatifs.



Figure.2.Représentation médiévale d'un apothicaire avec un mortier in *Medicina Antiqua* [5]

❖ *La Renaissance*

La navigation au long cours, la découverte des Amériques et de la route maritime des Indes engendrent de nouveaux progrès ; drogues exotiques et épices venant des continents lointains convergent en Europe. C'est ainsi que le quinquina, les baumes de Tolu et du Pérou viennent d'Amérique du Sud *via* l'Espagne. La Renaissance est également l'ère des idées nouvelles. Un éminent médecin suisse, Paracelse, a un rôle déterminant sur l'orientation de la thérapeutique. Influencé par l'alchimie, il a le premier l'idée de rechercher dans les simples leur « quintessence ». Aussi prescrit-il de les utiliser en teintures ou en extraits, afin de recueillir la substance active sous une forme nouvelle et un volume réduit. Alors que les Anciens recherchaient la panacée, le remède universel, composant des mélanges extraordinairement complexes, telle la célèbre thériaque comportant plus de 100 constituants (Figure.3), Paracelse estime au contraire que chaque plante possède des vertus spécifiques



Figure.3. Vase de monstre en faïence. Décor aux cinq couleurs, Fabrique rouennaise, XVIIIe siècle, Musée des Beaux-Arts de Rouen [6]

correspondant à un mal particulier. Pour reconnaître cette propriété, il suffit de savoir lire le grand livre de la nature, car chaque plante signe par une particularité quelconque son action. À vrai dire, cette théorie des signatures était déjà en honneur en Chine dans l'Antiquité, et on en trouve l'expression empirique dans toutes les sociétés primitives. Par la suite, les connaissances en botanique progressent rapidement avec Césalpin (médecin italien) au XVIe siècle, Tournefort (botaniste français) au XVIIe, puis Linné (médecin et naturaliste suédois) au XVIIIe siècle.

❖ *Le grand siècle de la pharmacie moderne*

Le XIXe siècle s'ouvre par la loi du 21 germinal an XI (1803) qui organise la pharmacie moderne et confirme aux pharmaciens leur monopole. Plusieurs principes actifs d'origine végétale sont isolés : le sel d'opium, mélange de narcotine et de morphine par Dérosne en 1803, puis la quinine, extraite de l'écorce de quinquina par Pelletier et Caventou en 1820. Charles Tanret, pharmacien à Troyes, obtient les premiers alcaloïdes de l'ergot de seigle en 1875, ouvrant la voie à une série de recherches chimiques particulièrement brillantes, qui se poursuivent depuis plus d'un siècle, et qui ont conduit à la découverte de nombreuses molécules utilisées dans le traitement de la migraine et du déficit cognitif du sujet âgé.

Nativelle et Arnault associent leur nom à l'isolement de principes tonocardiaques aussi fondamentaux que la digitaline et l'ouabaïne [2].

❖ *Situation actuelle*

Au cours des siècles, la notion de médicament s'est dégagée peu à peu de la notion plus vaste de drogue active. Les anciennes pharmacopées nous livrent des listes hétéroclites de drogues héroïques ou étranges empruntées aux trois règnes : minéral, végétal et animal. Les progrès de la chimie organique ont fait naître une catégorie d'actifs entièrement nouvelle formant une sorte de quatrième règne : les substances de synthèse. Cette évolution se retrouve dans celle

de la définition du médicament : drogue autrefois, substance aux propriétés thérapeutiques aujourd'hui.

De nos jours, on peut distinguer clairement deux catégories de médicaments issus du règne végétal. Tout d'abord, les médicaments ne contenant qu'une entité chimique définie, qui sont utilisés dans le traitement de pathologies majeures et d'autres issus d'un usage traditionnel, qui contiennent des plantes entières ou leurs extraits, recelant de nombreuses molécules. Ceux-ci disposent d'une réglementation spécifique et sont disponibles sans ordonnance. Ces médicaments traditionnels, toujours présents sur le marché, nous rappellent que parfois une seule molécule ne peut être active, mais que c'est alors l'ensemble des constituants associés qui dispose de propriétés thérapeutiques, découvertes naguère. L'expression de Gaston Bachelard « les simples sont particulièrement complexes » exprime avec humour une vérité profonde [8].

La recherche des principes actifs extraits des plantes est donc d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels. C'est pour cette raison que dans notre laboratoire on s'intéresse à l'étude des plantes médicinales notamment les plantes du genre *Centaurea* de la famille des composées caractérisées par leur richesse en métabolites secondaires reconnus par leurs diverses activités biologiques. Cette étude repose sur : l'extraction, l'isolement, la purification et la détermination structurale de ces métabolites secondaires.

Dans cette thèse on a étudié une plante endémique pour l'Algérie et la Tunisie: *Centaurea africana* qui a été étudié pour la première fois dans notre laboratoire.

La première partie de ce travail concerne tout d'abord une synthèse bibliographique portant sur les diverses familles de substances naturelles issues du genre *Centaurea*.

La deuxième partie est consacrée à la description botanique de *C. africana*, description qui permet de positionner cette espèce dans la systématique des composées. Elle se poursuit par la présentation des résultats phytochimiques personnels obtenus à partir de la plante décrivant l'isolement et la purification de trois molécules.

La troisième partie est consacrée à la caractérisation structurale des trois molécules isolées ainsi que les techniques chromatographiques et spectroscopiques utilisées à cet effet.

Références Bibliographiques :

- [1]. Bruneton J (2002) Phytothérapie : les données de l'évaluation. Éditions techniques et Documentation et Éditions médicales internationales, Paris
- [2]. Pelt JM (1969) Les Médicaments. Éditions du Seuil, Paris
- [3]. Kallinich G (1975) Pharmacies anciennes : intérieurs et objets. 1re édition. Société française du livre. Fribourg : Office du Livre & Paris
- [4]. Delaveau P (1983) Histoire et renouveau des plantes médicinales. 1re édition. Albin Michel, Paris
- [5]. Lefébure C (1999) La France des pharmacies anciennes. Éditions Privat, Toulouse
- [6]. Fourest HP, Sainte-Fare-Garnot PN (1982) Les pots de pharmacie : Rouen et la Normandie, la Picardie et la Bretagne. Roger Dacosta, Paris
- [7]. Clément RP (2003) La phytothérapie dans les pays occidentaux : Aspects réglementaires et commerciaux. De la tradition à l'harmonisation. Thèse pour le diplôme d'État de docteur en pharmacie. Chatenay- Malabry, Paris-XI, n° 23/2002

I. GÉNÉRALITÉS SUR LES MÉTABOLITES SECONDAIRES:

A. DÉFINITION:

Les métabolites secondaires des végétaux peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires (protéines lipides et glucides) qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal. Ces métabolites secondaires exercent cependant une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes, prédateurs d'insectes, sécheresse, lumière UV...). D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales. La grande valeur thérapeutique de certains de ces métabolites (taxanes de l'if, alcaloïdes de la pervenche de Madagascar...), alliée à leur difficulté de production, à partir de végétaux (généralement moins de 1% du poids de matière sèche), explique les difficultés d'approvisionnement liées à ces molécules et, conséquemment, un prix de marché souvent exorbitant. Chez l'Homme, ces éléments traces jouent également un rôle important, en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leurs impacts sur la santé des consommateurs sont maintenant avérés (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers, ou au contraire micro toxiques indésirables). En dépit de ces rôles importants, peu de données sont aujourd'hui disponibles en ce qui concerne l'effet combiné des facteurs du milieu sur l'élaboration des métabolites secondaires par des végétaux cultivés.

B. RÔLES ET DISTRIBUTION:

Leurs rôles sont multiples:

- _____ » Ils ont une action anti-herbivores (menthe)
- _____ » Ils peuvent se comporter comme des réducteurs de la digestibilité
- _____ » Ils inhibent les attaques des bactéries et des champignons
- _____ » Ils interviennent dans la structure des plantes (lignines et tannins)

Beaucoup de composés secondaires sont toxiques, ils sont alors stockés dans des vésicules spécifiques ou dans la vacuole.

On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties des plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une plante à l'autre.

- On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine.

Il est bien sûr impensable de présenter dans le cadre de cette thèse un exposé détaillé des différents types de substances synthétisés par les plantes. Tout au plus, les pages qui suivent tracent un aperçu non exhaustif de différents composés rencontrés chez le genre *Centaurea*, de leur rôle lorsqu'il est connu, de leur activité biologique et de leur utilisation.

I.1.LES TERPENES :

Ils constituent entre autre le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones. Extraites ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Nombre d'entre eux possèdent des propriétés antiseptiques [1], d'où divers emplois dont l'embaumement qui est resté dans le terme balsamique donné aux plantes et aux huiles qui en sont tirées. Ces terpènes sont biosynthétisés à la suite du couplage d'au moins 2 entités à 5 carbones dont la structure est celle de l'isoprène ou 2-méthylbuta-1,3-diène.

➤ CLASSIFICATION :

En fonction du nombre n (entier) d'unités pentacarbonés (C5) ramifiées [2,3], on peut distinguer pour :

n = 2 : les monoterpènes (C10). Ce sont les plus communs. Ils ont pour formule $C_{10}H_{16}$ et comptent de nombreux isomères

n = 3 : les sesquiterpènes (C15), $C_{15}H_{24}$

n = 4 : les diterpènes (C20), $C_{20}H_{32}$

n = 5 : les sesterpènes (C25)

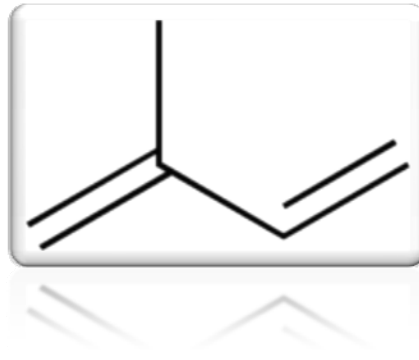
n = 6 : les triterpènes (C30)

n = 8 et le caoutchouc naturel : les polyterpènes

Bien que les terpènes au sens strict ne soient que des hydrocarbures, de nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont également considérés comme des composés terpéniques.

Il n'y a pas de fonction chimique commune aux terpènes, seule leur structure et leur biosynthèse en font une catégorie, aussi se contente-t-on ici d'en citer quelques exemples et certaines de leur propriétés.

L'isoprène :



I.1.1.Monoterpènes:

Les **monoterpènes** sont une classe de terpènes constitués de deux molécules d'isoprène C_5H_8 . Ils peuvent être linéaire ou contenir des cycles. Les monoterpènes sont avec les sesquiterpènes, un des éléments principaux des essences végétales aromatiques appelées huiles essentielles. Par exemple : camphre, géraniol, menthol, limonène, citral. On peut trouver des monoterpènes dans plus de deux milles plantes de soixante familles différentes.

Les monoterpènes sont émis par les plantes. Ils forment des aérosols pouvant servir de noyau de condensation des nuages. Ils augmentent la clarté des nuages et refroidissent le climat [13]. Ils sont un des principaux vecteurs de la propagation rapide des incendies de forêt.

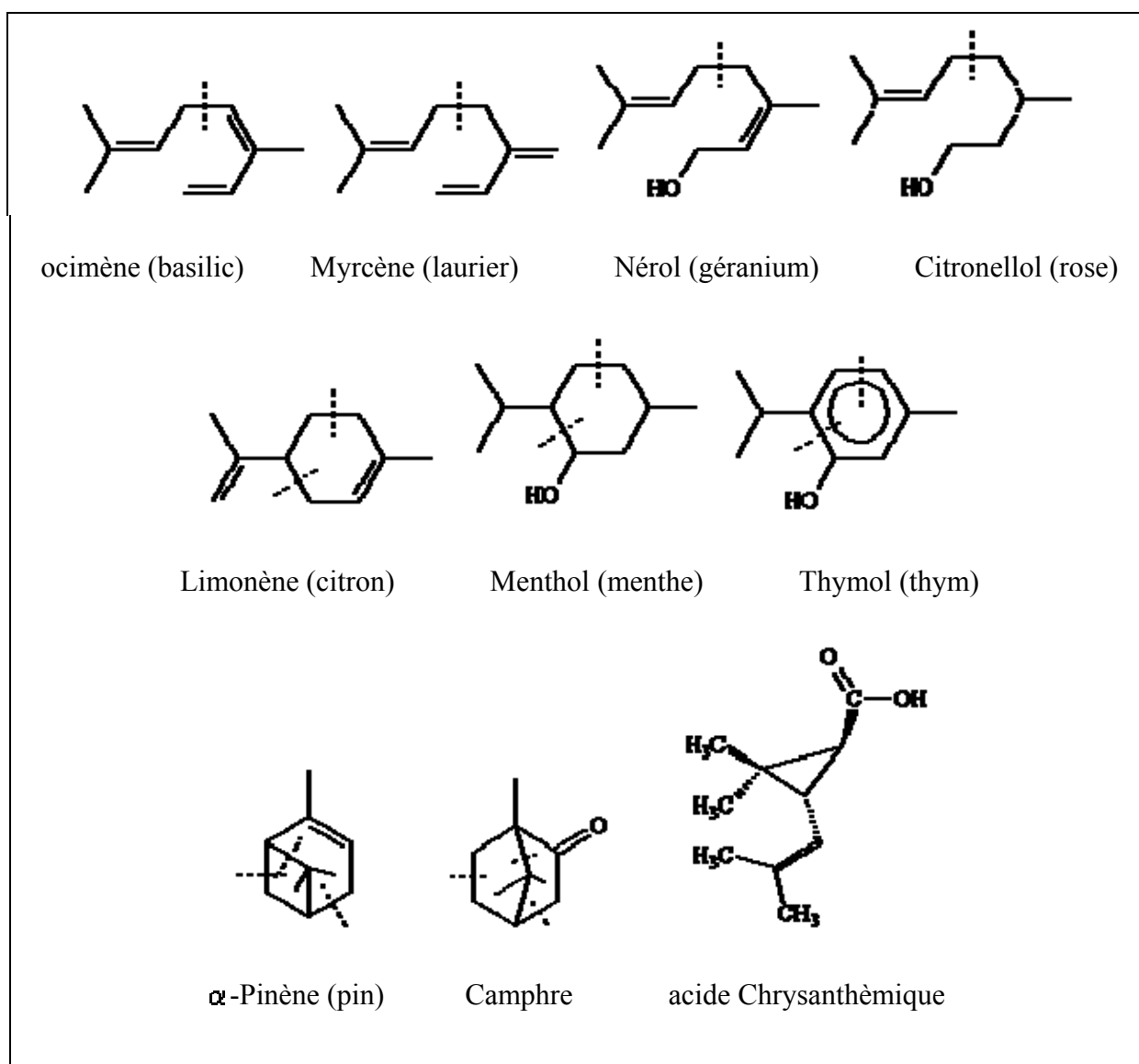
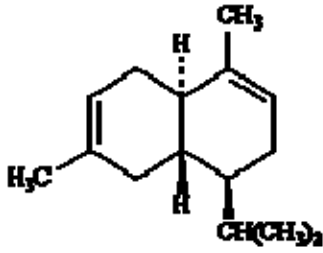


Figure I.1 : Structure de quelques monoterpènes et leurs sources

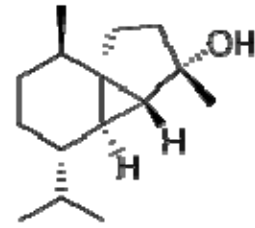
I.1.2. Sesquiterpènes:

Les **sesquiterpènes** sont une classe de terpène formée de 3 unités isoprènes. Comme les monoterpènes, une molécule de sesquiterpène peut être acyclique ou contenir 1 à 2 cycles (comme le polygodial), de très nombreuses combinaisons sont possibles. Les dérivés des sesquiterpènes obtenu par biochimie ou synthèse (oxydation ou réarrangement) sont appelés sesquiterpenoïdes.

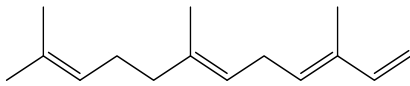
Les sesquiterpènes sont présent dans les essences végétales aromatiques ou huiles essentielles, par exemple le farnésol dans l'huile essentielle de citronnelle. Dans les plantes, ils ont le rôle d'agent de défense.



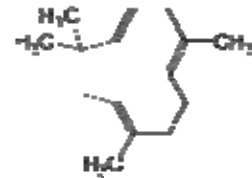
β -Cadinène (cade)



Le cubebol, sesquiterpénoïde tricyclique.

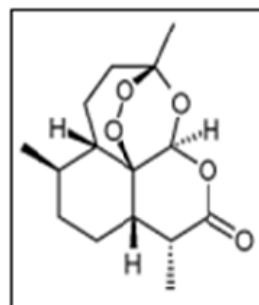


L' α -farnésène, sesquiterpène linéaire.



L'humulène, sesquiterpène monocyclique.

Les lactones sesquiterpéniques sont caractérisées par la présence d'une γ -lactone. Elles sont majoritairement trouvées dans les Asteraceae où elles sont fréquemment localisées dans les poils sécréteurs des feuilles, des tiges et des bractées de l'inflorescence [4]. Elles sont souvent responsables de phénomènes allergiques. Certaines sont antibactériennes et antifongiques et l'artémisinine isolée de *Artemisia annua*, Asteraceae, a une forte action antipaludique. Cette armoise d'origine asiatique était traditionnellement utilisée en médecine chinoise pour traiter les fièvres et le paludisme. Des dérivés (artéméther, artéether, artésunate) ont été préparés et sont utilisés dans le traitement du paludisme.

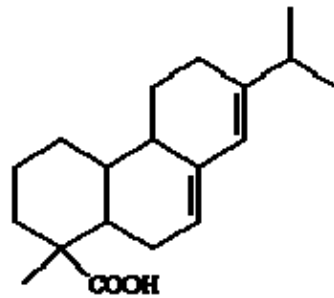


L'artémisinine

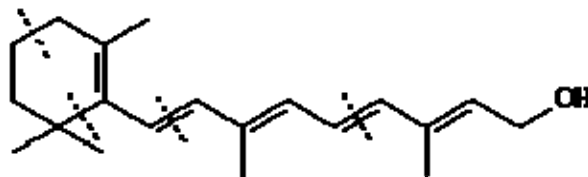
I.1.3.Diterpènes:

Ce type de molécule a comme origine les produits cristallins des résines et des latex, du suint. Sur le plan chimique, ces molécules sont classées comme alcool.

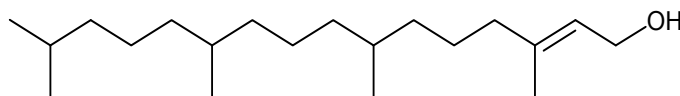
Dans la nature, les molécules de diterpènes sont formées par biosynthèse de geranylgeranyl pyrophosphate.



Acide abiétique (colophane = résidu de la distillation de la résine de pin en essence de thérébentine)



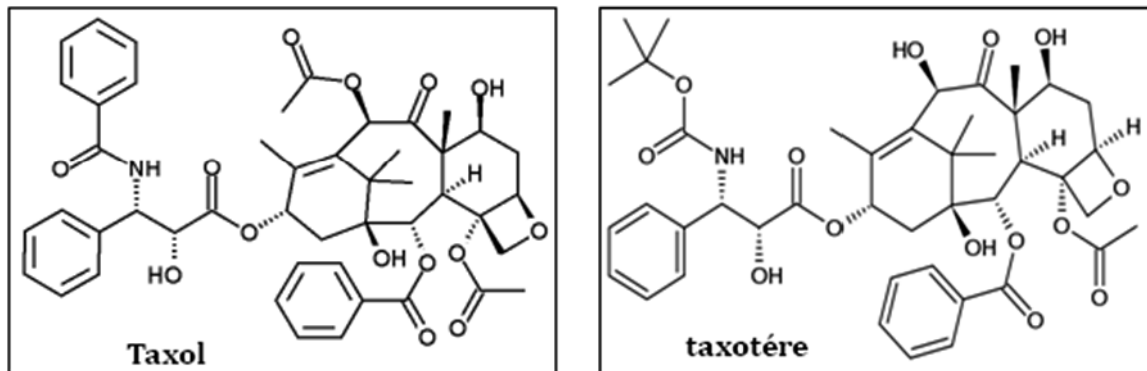
Vitamine A résultant de la coupure du carotène



Phytol, présent dans la Chlorophylle

Les diterpènes peuvent être acycliques ou bi- ou tri-cycliques. Les plus intéressants sur le plan pharmacologique sont les diterpènes tricycliques à noyau taxane, issus de différentes espèces d'ifs mais surtout de *Taxus baccata* L., Taxaceae. Le taxol et son analogue hémisynthétique, le docétaxel (Taxotère R), mis au point par P. Potier, F. Guéritte et D. Guénard à l'ICSN, Gif-sur-Yvette, sont utilisés dans le traitement des tumeurs de l'ovaire résistant aux autres thérapeutiques et dans celui des cancers du poumon et du sein.

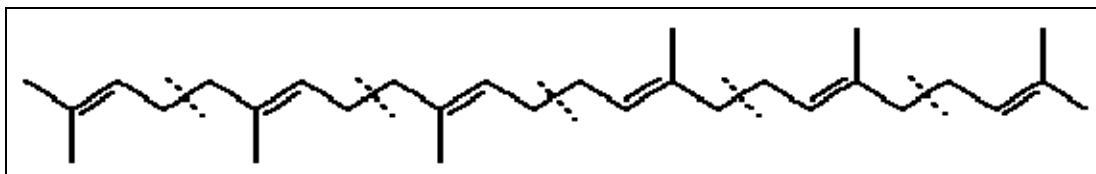
Des diterpènes toxiques induisant des troubles digestifs violents ou des irritations cutanées ou oculaires graves ont été isolés d'Euphorbiaceae et de Thymelaceae.



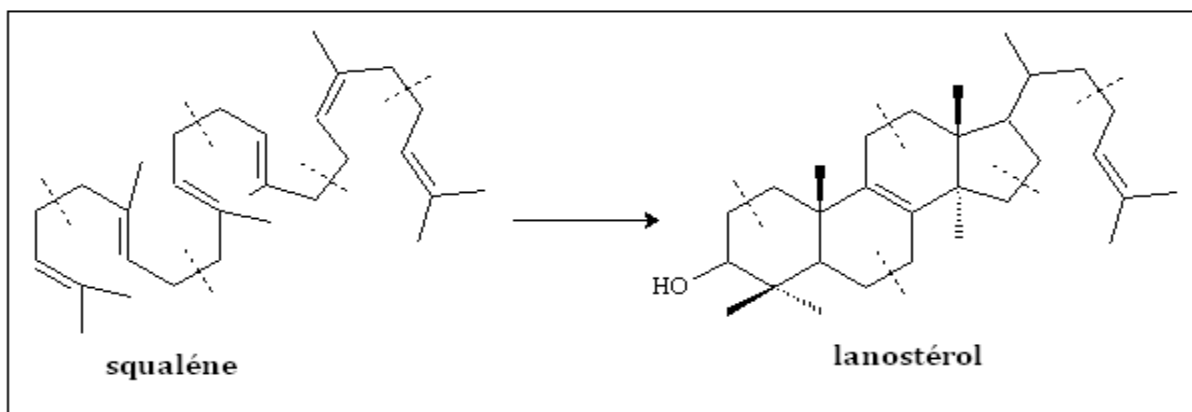
I.1.4. Triterpènes:

Le squalène, précurseur du lanostérol est un triterpène. Le lanostérol est un des composants du suint des moutons. C'est à partir de ce produit plutôt malodorant que l'on fabrique la lanoline (mélange complexe de graisses et de cires contenant 33 alcools de haut poids moléculaire et 36 acides gras).

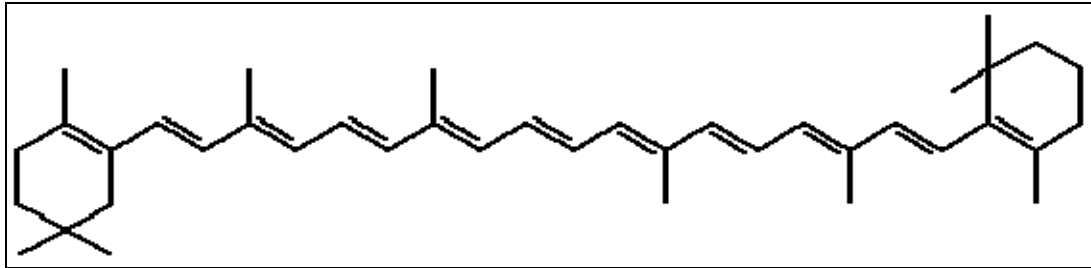
Le lanostérol est facilement transformé en cholestérol. Ceci fait apparaître le lien entre les terpènes et les stéroïdes.



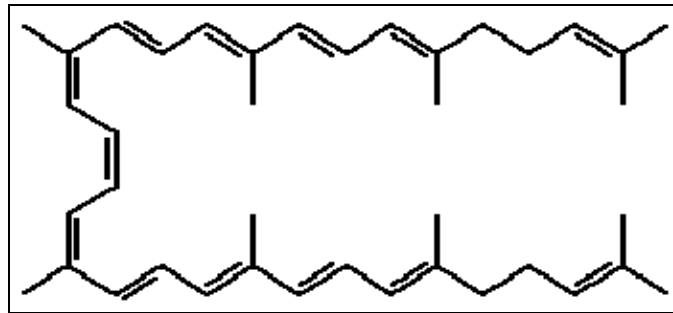
Le squalène, (forme linéaire ci-dessus et forme replié dessous)



I.1.5. Tétraterpènes:



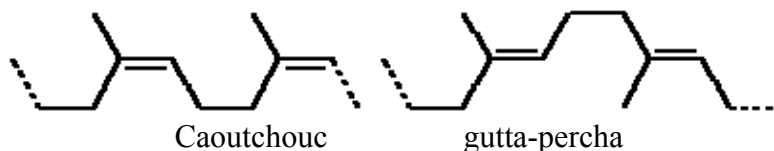
Le **β -Carotène**. Il possède 11 doubles liaisons conjuguées, d'où sa couleur, qu'il donne aux carottes. Il joue un rôle essentiel dans la croissance et la vision, son oxydation provoque la coupure de la double liaison centrale et la formation de deux molécules d'un aldéhyde le Rétinal dont la réduction donne la vitamine A.



Le **Lycopène** se trouve dans la tomate mure (0,02 g/k), il est entièrement acyclique.

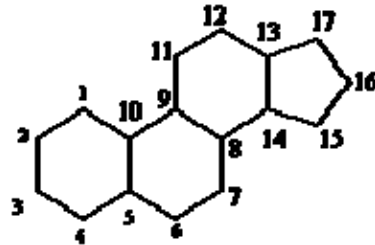
I.1.6. Polyterpènes:

Le caoutchouc naturel est un polymère de l'isoprène. Il est produit par la coagulation par la chaleur de la sève de l'hévéa. Toutes ses doubles liaisons sont Z (chaîne prioritaire) chaque molécule comporte de 1000 à 5000 motifs isopréniques. L'isomère où toutes les liaisons sont E est la gutta-percha qui est une matière dure et cassante.



I.1.7. Les stéroïdes:

Abondant dans les végétaux et les animaux, ils ont en commun une structure chimique comportant un squelette perhydrocyclopentanophénatrène, (avec une numérotation UICPA spécifique).



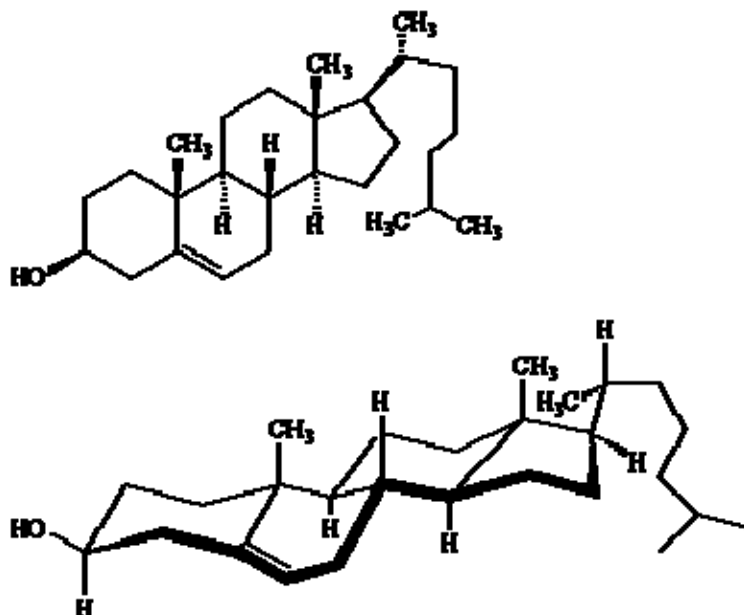
Ils comportent généralement des méthyles en C-10 et C-13 et souvent une chaîne alkylée en C-17. Les Stérols comportent un hydroxyle en position C-3.

α et β sont des affixes spécifiques selon que le groupe substituant est dessous ou dessus le plan de la molécule projetée selon le schéma précédent.

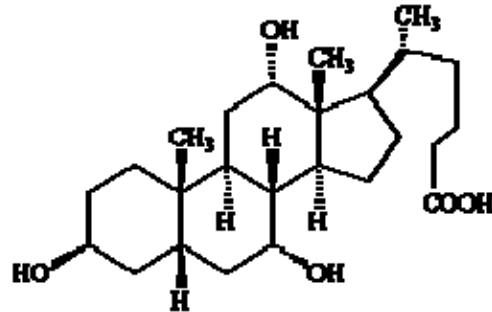
Bien que n'étant pas des terpènes, ils sont biogénétiquement dérivés des triterpènes.

✓ **Cholestérol.**

C'est le plus ancien des stéroïdes connus. Isolés dans les calculs biliaires dès le XVIII^{ème} siècle. Sa formule globale fut établie en 1888 et sa structure complète en 1955. Il comporte 8 carbones asymétriques, un seul isomère, sur les 256 possibles, existe naturellement.



Il est présent dans tous les tissus nerveux des mammifères soit sous forme libre soit sous forme d'ester d'acide gras. C'est un précurseur de l'acide cholique (acide biliaire) et des hormones stéroïdiques.

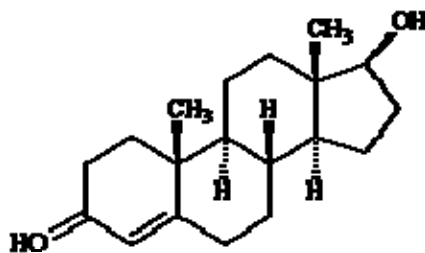


Acide cholique

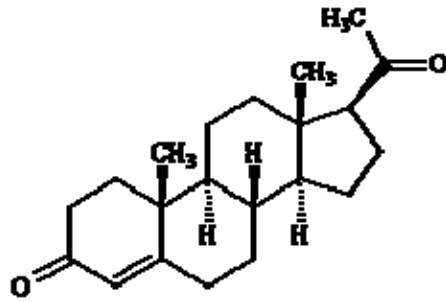
✓ Hormones stéroïdiennes.

Les hormones sont des molécules émises par une glande dans le sang, chargée de transmettre une information à un organe récepteur, qui peut seul la reconnaître, afin de le faire agir. Elles ont des structures différentes, acides aminés, polypeptides ou stéroïdes. Ces dernières sont les hormones sexuelles. Elles règlent les caractères sexuels secondaires et la physiologie de la reproduction.

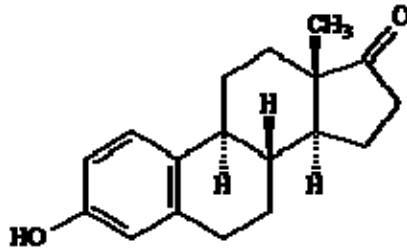
Les hormones mâles, la testostérone et l'androstérone, sont produites par les testicules. Les hormones femelles, œstrone (folliculine), œstradiol et progestérones règlent le cycle menstruel et l'évolution de la grossesse.



Testostérone



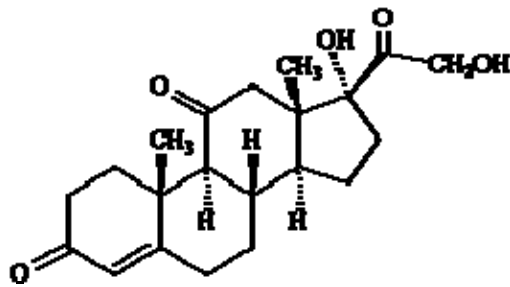
Progestérone



Estrone

L'usage des hormones sexuelles est le contrôle de l'ovulation et de différentes perturbations liées aux déséquilibres de la production naturelle d'hormones, traitement de l'ostéoporose post-ménopause etc.

D'autres hormones sont produites au niveau des glandes surrénales, la principale est la cortisone, utilisée comme anti-inflammatoire.



Cortisone.

I.2. LES PRODUITS PHENOLIQUES :

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Les représentants les plus nombreux (plus de 5 000 molécules isolées) et les plus connus en sont les « flavonoïdes ». Sous cette qualification un peu abusive se cachent en fait trois familles de molécules de structures voisines : les flavonoïdes *stricto sensu*, les anthocyanes et les proanthocyanidines [5]. Néanmoins, de nombreuses autres structures existent, tels que les acides phénols (dérivés de l'acide cinnamique, par exemple), tanins hydrolysables, coumarines, lignanes, quinones et autres phloroglucinols. Il est à noter que certains composés appartenant à ces groupes chimiques ne comportent en fait aucun hydroxyle libre, de même qu'on peut signaler la présence de fonctions phénoliques chez des composés naturels appartenant à d'autres groupes phytochimiques (terpènes, alcaloïdes...) [6]. Cette grande variété structurale annonce une certaine difficulté à connaître l'intérêt des polyphénols en tant que tels : quelles propriétés viennent de la nature polyphénolique d'une molécule et que doit-on aux particularités structurales de chaque molécule ?

Les composés phénoliques des végétaux sont les composés issus de deux grandes voies d'aromagenèse qui sont la voie du métabolisme de l'acide shikimique et la voie du métabolisme des polyacétates. Certains sont issus d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate entraînant ainsi la formation de composés mixtes. Cette voie intermédiaire est notamment à l'origine de tous les flavonoïdes [4].

Les éventuels bénéfices que pourraient apporter à la santé humaine les polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie – puisque l'explication de l'efficacité supposée de nombreuses plantes médicinales repose en tout ou partie sur la présence de composés phénoliques dans ces plantes – et l'hygiène alimentaire, de plus en plus d'études indiquant que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) [10].

Les composés phénoliques les plus importants et les plus actifs biologiquement chez le genre *Centaurea* sont les coumarines et les flavonoïdes.

- I.2.1 LES COUMARINES :

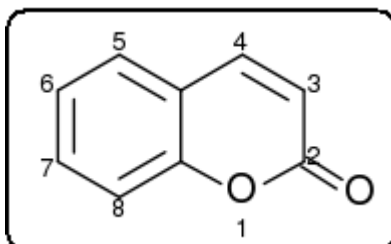


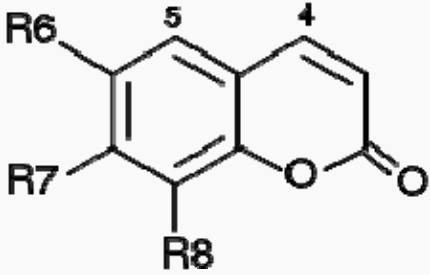
Figure I. 2: *Coumarine*

La **coumarine** est une substance naturelle organique aromatique connue dans la nomenclature internationale comme 1-benzopyrane-2-one qui peut être considérée en première approximation, comme une lactone de l'acide 2-hydroxy-*Z*-cinnamique. Son odeur de foin fraîchement coupé a attiré l'attention des parfumeurs sur elle dès le XIX^e siècle.

Le même terme de coumarine désigne aussi la *classe* des composés phénoliques dérivés de cette dernière molécule, la 2H-1-benzopyrane-2-one. Ces composés possèdent des hydroxyles phénoliques qui peuvent être méthylés ou être engagés dans des liaisons hétérosides. Plus d'un millier de coumarines naturelles ont été décrites. Elles sont très largement distribuées dans le règne végétal [8].

La coumarine tire son nom de *kumarú*, le nom dans une langue amérindienne tupi de Guyane de l'arbre poussant en Amérique du sud, le gaiac de Cayenne (*Dipteryx odorata*) de la famille des Fabacées, donnant la *fève tonka* d'où cette molécule fut isolée en 1820 par Vogel. Le nom de *tonka* vient aussi du tupi et d'une langue caraïbe de Guyane, le *kali'na* (ou galibi) [18].

Tableau. I.1 : quelques exemples de coumarines

Les coumarines aglycones					
	R6	R7	R8	Formules	
Coumarine (non phénolique)	H	H	H		
Ombelliférone	H	OH	H		
Herniarine	H	OCH3	H		
Esculétol	OH	OH	H		
Scopolétol	OCH3	OH	H		
Scopanone	OCH3	OCH3	H		
Fraxétol	OCH3	OH	OH		
Quelques glucosides de coumarine Gluc= β-D-glucopyranosyloxy					
	CAS	synonyme	R6	R7	R8
Skimmine	93-39-0	7-O-glucosyl-ombelliférone	H	Gluc	H
Esculoside	531-75-9	6-O-glucosyl-esculétol	Gluc	OH	H
Cichoriine	531-58-8	7-O-glucosyl-esculétol	OH	Gluc	H
Scopoline	531-44-2	7-O-Glucosyl-6-méthoxycoumarine	OCH3	Gluc	H

A- Usage en médecine :

En médecine, la coumarine est utilisée dans le traitement adjuvant du lymphœdème post-mastectomie, en complément des méthodes de contention. Son action antioœdématisante résulte de l'augmentation du drainage lymphatique et de la stimulation de l'activité protéolytique des macrophages [9]. Mais la multiplication des cas d'hépatite chez les patientes traitées à fortes doses avec cette molécule a conduit au retrait du marché de la spécialité correspondante.

La coumarine reste utilisée en phytothérapie, mais à des doses beaucoup plus faibles, comme dans les spécialités contenant du mélilot.

L'action commune des coumarines de différente origine est celle contre les différents types de troubles gastriques [10], antivirale [11], antimicrobienne [12].

A la différence de ses dérivés (comme la coumadine), la coumarine elle-même n'a pas d'activité anticoagulante.

Mais la fermentation humide de foin qui renferme de la coumarine (en raison de la présence de mélilot) génère des dérivés anticoagulants, qui entraînent des hémorragies chez les herbivores qui en consomment. Le 4-hydroxy-3-[1-(4-nitrophényl)-3-oxobutyl]coumarine, appelé usuellement acénocoumarol, est antagoniste de la vitamine K et inhibiteur de la synthèse des facteurs de la coagulation vitamino-K-dépendants. Ses propriétés anticoagulantes sont utilisées dans la thérapie des maladies thromboemboliques.

B- Usage alimentaire :

Le codex alimentarius a recommandé en 1985 (réaffirmé en 2006) de ne pas ajouter la coumarine telle quelle aux aliments et aux boissons. Elle peut être présente dans les aliments et les boissons seulement sous la forme de préparations aromatisantes naturelles (par exemple l'extrait de fève tonka) et pas à plus de 2 mg/kg dans les denrées alimentaires et les boissons et de 10 mg/kg dans les caramels spéciaux. En 2004 puis en juillet 2008, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (efsa) a recommandé une dose journalière acceptable (DJA) de 0,1 mg de coumarine/kg de poids corporel. Un calcul simple permet de s'apercevoir que la DJA est très largement dépassée par une cuillerée à café de cannelle de Chine. D'où l'importance de bien distinguer cette cannelle de la cannelle de Ceylan, indemne de coumarine.

En cuisine, les fleurs d'aspérule odorante, au parfum caractéristique, sont utilisées dans la région d'Arlon (Belgique) pour la fabrication du *Maitrank*. La coumarine est aussi présente dans certaines variétés de cannelle.

Enfin la coumarine est fortement contenue dans l'herbe de bison, une plante utilisée notamment pour la fabrication de la vodka polonaise Żubrówka. Cette vodka a d'ailleurs été interdite à la vente aux États-Unis pour cette raison en 1978.

C- Autres usages :

L'odeur de foin fraîchement coupé de la coumarine est très utilisée en parfumerie. Actuellement, elle entre dans la composition de 90% des parfums (dans 60% avec une teneur supérieure à 1%). Elle s'associe bien à la vanilline dont elle atténue le côté alimentaire. Elle est aussi utilisée dans les produits cosmétiques (déodorants, eaux de toilette, crèmes, shampoings, savons de toilette, dentifrice, etc.).

On trouve aussi de la coumarine dans les cigarettes indiennes, les bidî, et les cigarettes aux clous de girofle indonésiennes, les kreteks [135].

Pour neutraliser ou masquer les mauvaises odeurs, la coumarine est aussi ajoutée aux peintures, insecticides, encres, aux aérosols, au caoutchouc ou aux matières plastiques [136].

- I.2.2 . LES FLAVONOÏDES :

Les flavonoïdes au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux [4]. Vers l'an 2000 plus de 6500 flavonoïdes différents simples ou glycosylés ont été identifiés. Plus ou moins hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs [14], des fruits et parfois des feuilles. C'est le cas notamment des flavonoïdes jaune, (leur nom venant du mot latin *flavus* : jaune) [15], dont font partie les chalcones, les aurones et les flavonols jaunes. Les anthocyanes peuvent être de couleur rouge, bleue ou violette. Quand ils ne sont pas directement visibles, appelés proanthocyanidines, très hydrosolubles, ils contribuent à la coloration en jouant le rôle de co-pigments, tels que les flavones et les flavonols incolores. Certaines de ces molécules absorbent également dans une zone proche de l'ultraviolet. La « coloration » de ces molécules n'est alors perçue que par les insectes qui vont permettre la pollinisation des végétaux assurant ainsi la survie de l'espèce [4].

Les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles au niveau desquelles ils assurent la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement solaire.

Les céréales, les épices, les herbes aromatiques, les fruits et les légumes sont des sources importantes de flavonoïdes (**tableau I.2**). De nombreuses études ont montré que les flavonoïdes ont une grande capacité à piéger les radicaux peroxydes (ROO^\cdot), alkoxydes (RO^\cdot), superoxydes (O_2^\cdot) et hydroxydes (OH^\cdot) [16]. Des études épidémiologiques ont également démontré qu'une consommation régulière de fruits et de légumes diminue le risque de développement des maladies cardiovasculaires et de l'apparition de certains cancers [17]

Dans les plantes, les chalcones sont des précurseurs de certains flavonoïdes. Catalysée par la chalcone synthase, la cyclisation des 6'-*hydroxy* chalcones forme des flavanones et finalement plusieurs classes de flavonoïdes, tels que les flavones, flavonols, dihydroflavonols, aurones et isoflavones [18]. Les chalcones sont particulièrement présentes dans le vin rouge, le thé, certains citrus, les pommes, l'acacia et le bois de réglisse [19]. Comme les autres flavonoïdes, les chalcones sont reconnues pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple des activités anti-allergiques, antivirales, anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques et antioxydantes [20]. Ces activités sont dues en partie à leur capacité à piéger les radicaux libres.

Tableau I.2 : quelques sources naturelles de flavonoïdes

Flavonoïde	Source : produits alimentaires et plantes médicinales	Flavonoïde	Source : produits alimentaires et plantes médicinales
Flavones Apigénine	Apium graveolens, passiflora incarnata, Petroselinum sativum	Myricétine	Thea sinensis, Vaccinium macrocarpon, Vitis vinifera
Flavones glycosylés Baicaline	Scutellaria baicalensis	Flavonols glycosylés Rutine (rutoside)	Eucalyptus macrorrhyncha, Fagopyrum esculentum, Stellaria media, Sophora japonica
Flavonols Quercétine	Allium cepa, Crataegus cuneata, Ginkgo biloba, Glycyrrhiza glabra, Morus alba, Olea europea, solanum lycopersicum, Thea sinensis, Vaccinium macrocarpon, Vitis vinifera, Pueraria thumbergiana Cichorea endivia, Ginkgo biloba, Raphanus sativus, Thea sinensis, Vitis vinifera	Flavan-3-ols Catéchine	Thea sinensis, Vitis vinifera
		Flavanones Naringénine	Fruits du genre Citrus (sp.aurantium, limon, etc)
		Isoflavones Génistéine	Soya hispida, Stellaria media, Pueraria lobata, Sophora japonica

I.2.2.1. STRUCTURE CHIMIQUE ET CLASSIFICATION DES FLAVONOÏDES :

Leur structure se caractérise par la présence d'un squelette de base constitué de quinze atomes de carbone assemblés en trois cycles nommés A, C et B (2-phénylchromane, **figure I.3**). Selon la structure du cycle intermédiaire (cycle C), les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols, les flavan-3,4-diols et les chalcones, caractérisées par un cycle C ouvert.

Les flavonoïdes peuvent se présenter sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues du reste osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques).

Flavones et flavonols sont les composés flavonoïdiques les plus répandus dont notamment : la quercétine, le kaempférol, la myricétine et l'apigénine. Les flavanones (naringénine) et les flavanols (catéchine) ainsi que les dihydroflavonols (dihydrokaempférol, dihydroquercétine)

et les dihydroflavan-3,4-diols (leucopélargonidol, leucocyanidol) sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte [14, 21].

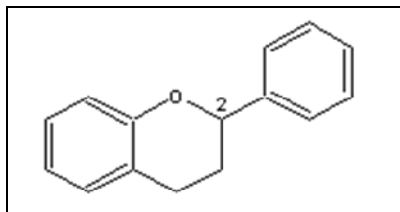


Figure I.3: *Squelette de base commun d'un 2-phénylchromane*

A-Flavones et flavonols :

Les flavones (R = H, **Figure I.4**) sont dérivées de la 2-phényl-chromone : elles représentent avec les flavonols (R = OH, **Figure I.4**) la plus grande classe des flavonoïdes connus.

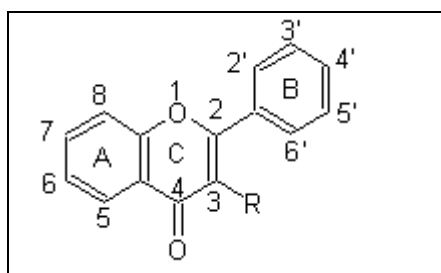


Figure I.4 : *Squelette de base des flavones (R = H) et flavonols (R = OH)*

Le cycle A est, dans plus de 90% des cas, substitué par deux groupes hydroxyles en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. L'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique. D'autres substitutions peuvent intervenir avec des fréquences variables notamment en C-6 et C-8, où l'on peut observer des groupements hydroxyles libres ou étherifiés, des isoprénylations, des méthylations, ou encore des liaisons carbone-carbone avec un sucre.

Le cycle B, substitué dans 80% des cas en C-4', peut être 3', 4'-disubstitué, 2', 4'-disubstitué, voire 3', 4', 5'-trisubstitué. Les substituants sont des groupements hydroxyles ou méthoxyles. La position 6' est très exceptionnellement substituée.

Les flavonols diffèrent des flavones par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3.

B- Flavanones et dihydroflavonols :

Les flavanones et les dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison 2,3 et donc par la présence d'un ou de deux centres d'asymétrie. Les dihydroflavonols se différencient des flavanones par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 (**Figure I.5**). Pour les flavanones naturelles, le carbone C-2 est normalement de configuration *S*. La presque totalité des dihydroflavonols sont de configuration *2R*, *3R*. Le phényle et l'hydroxyle de ces molécules sont *trans*, mais des formes *cis* ont également été observées [22]. Les variations structurales de ces composés sont les mêmes que celles décrites pour les flavones et flavonols. Ces composés sont toutefois moins fréquents que leurs homologues insaturés.

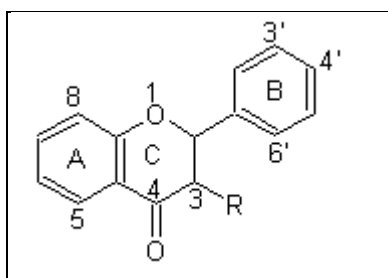


Figure I.5 : *Squelette de base des flavanones (R = H) et dihydroflavonols (R = OH)*

C- Chalcones et aurones :

Les chalcones (**Figure I.6**) sont dépourvues du cycle pyranique central et sont, chimiquement parlant, des 1,3-diaryl-2-propen-1-ones. Ces composés sont caractérisés par la présence d'un chaînon tricarboné, cétonique, α,β -insaturé. On remarquera sur la **Figure I.6** que la numérotation est inversée par rapport à celle des autres flavonoïdes (**Figures I.4 et I.5**). Sur le noyau A, les substitutions en C-2' et C-4' sont courantes, comme pour les autres flavonoïdes. Les atomes C-6', C3', C2, C-3 et C-4 peuvent également être substitués par des groupes hydroxyles ou méthoxyles. Les aurones (**Figure I.6**) sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène-coumaranone.

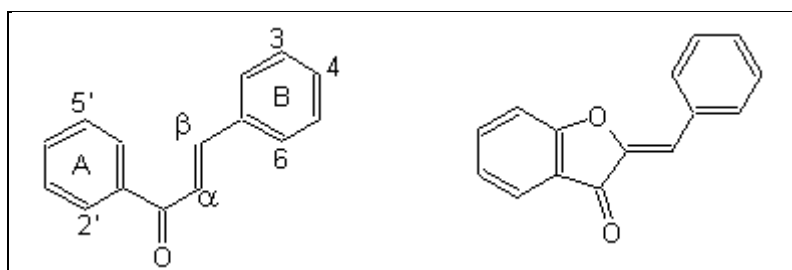


Figure I.6 : *Squelettes de base des chalcones et des aurones*

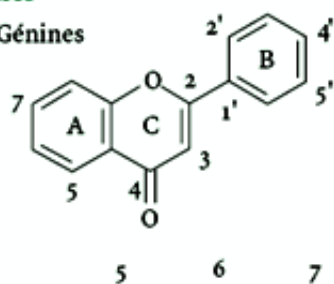
Les dihydrochalcones sont des molécules privées de la double liaison au niveau de la chaîne aliphatique. Les exemples les plus connus et les plus étudiés sont la phloridzine et son équivalent aglycone qui est la phlorétine (2,4,4',6-tétrahydroxychalcone).

A l'intérieur de chacune des classes, les variations autour du squelette chimique de base en C15 portant principalement sur trois points :

- *Le degré d'hydroxylation* des différents cycles: ainsi, le cycle B est mono-hydroxylé chez le kaempférol ou la pélargonodine, di-hydroxylé chez la quercétine ou la cyanidine, tri-hydroxylé chez la myricétine ou la delphinidine. Il en résulte des différences de spectre d'absorption donc de couleur chez les anthocyanidines et les autres pigments.
- *Le niveau de méthylation* (groupements O-CH₃ à la place des seules fonctions phénoliques): par exemple, chez les anthocyanes du vin, on rencontre la pétunidine, monométhoxylée et de couleur violacée et la malvidine, la plus abondante, diméthoxylée et de couleur mauve (**Tableau.1.2**). la méthylation diminue l'hydrosolubilité des molécules qui, dans des cas extrêmes, sont alors présentes dans les exsudats de certains bourgeons (peuplier) ou liées à des structures lipidiques comme les cires de feuilles d'eucalyptus.
- *Le niveau de glycosylation*. En dehors de quelques exceptions (d'une part le groupe des flavanes et d'autre part quelques flavonoïdes excrétés dans les exsudats), les flavonoïdes des végétaux sont presque tous liés à des sucres. A ce titre, ils appartiennent au grand groupe des hétérosides, la partie phénolique représentant ici l'aglycone.

Flavones

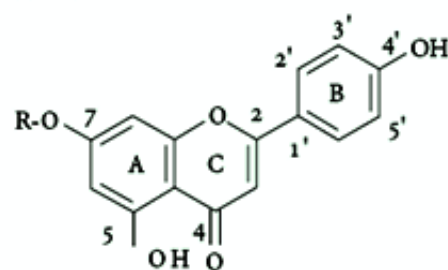
Génines



5 6 7 4'

Apigénine	OH	-	OH	OH
Lutéoline	OH	-	OH	-

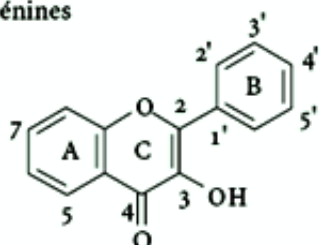
Hétérosides



R = néohespéridoside (Glc-Rha) :
Apigénine-7-néohespéridoside

Flavonols

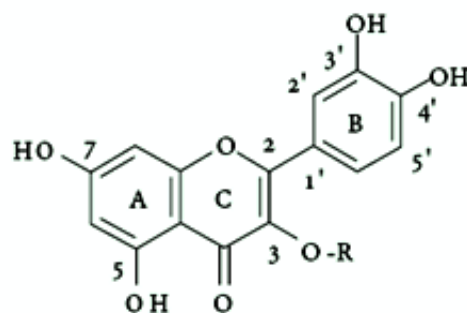
Génines



5 7 3' 4' 5'

Quercétine	OH	OH	OH	OH	-
Kaempférol	OH	OH	-	OH	-
Myricétine	OH	OH	OH	OH	OH

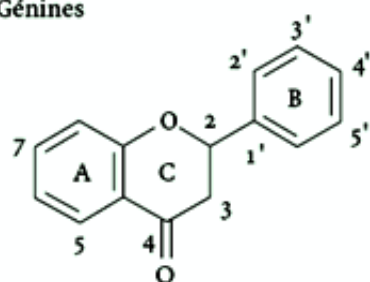
Hétérosides



R = rhamnose : Quercitroside

Flavanones

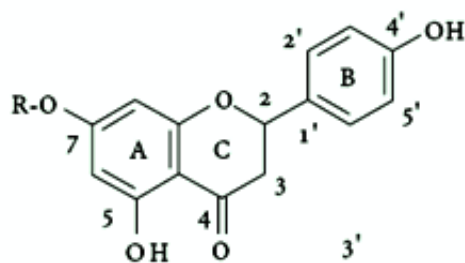
Génines



5 7 4'

Naringénine	OH	OH	OH
-------------	----	----	----

Hétérosides



R = néohespéridoside : Naringine

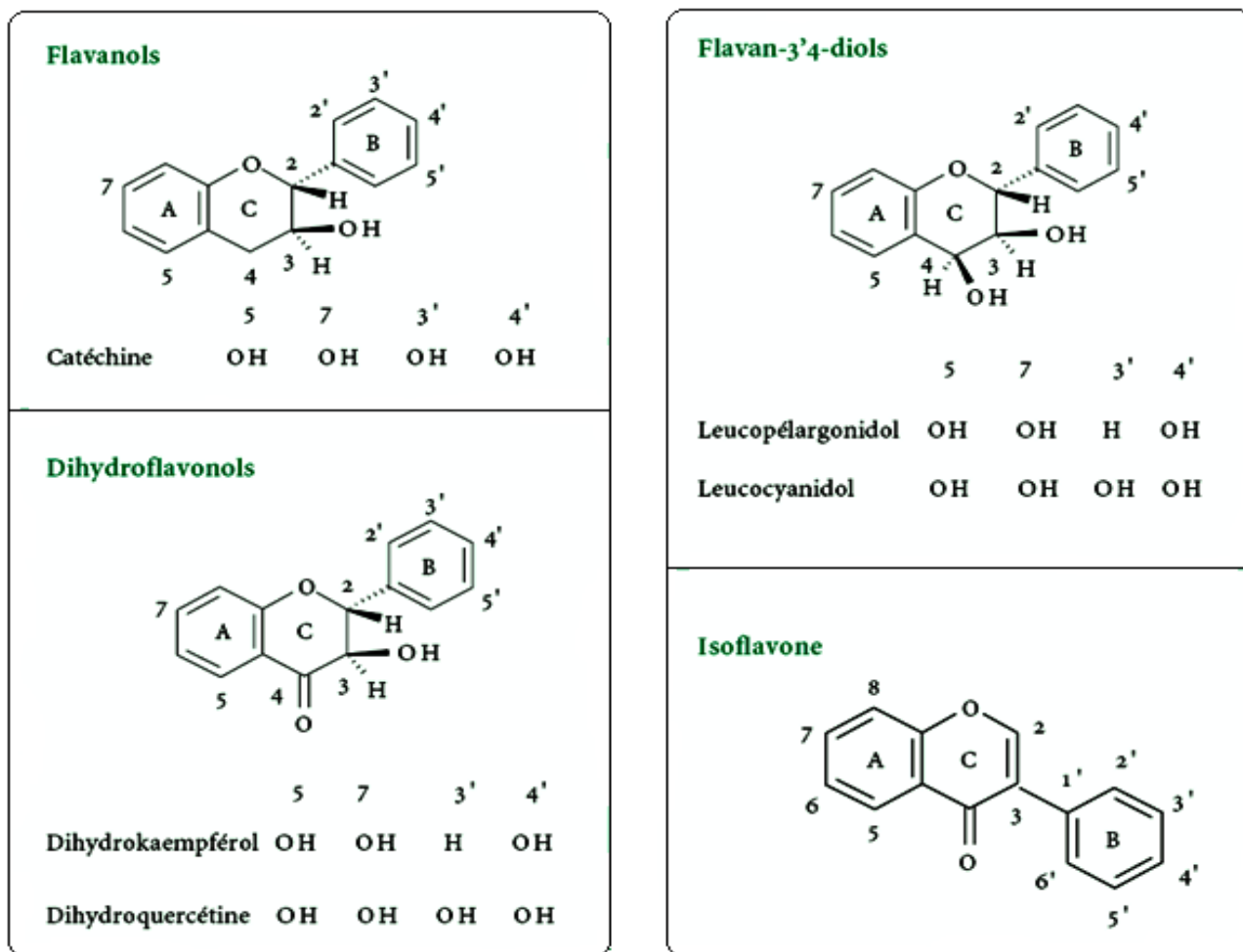


Figure I.7 : Différents types structuraux de flavonoïdes.

I.2.2.2. ORIGINE BIOSYNTHETIQUE DES FLAVONOÏDES :

Les chalcones occupent une place importante parmi les produits naturels, ce sont des intermédiaires clés dans la biosynthèse des autres flavonoïdes. Elles peuvent être obtenues par condensation aldolique de dérivés d'acétophénone et de benzaldéhydes substitués (catalyse acide ou basique).

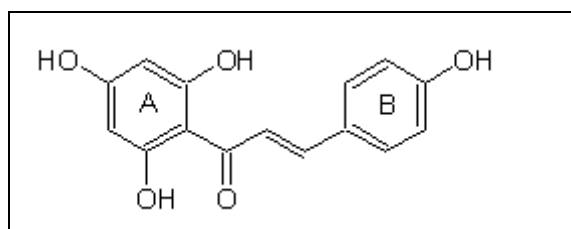


Figure I.8 : structure de la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone.

Comme nous le détaillerons dans le paragraphe suivant, la formation des chalcones est catalysée par la chalcone-synthase (CHS). Les chalcones sont les métabolites principaux dans la biosynthèse des flavonoïdes (**Figure I.9**), en réalité, le précurseur commun des flavonoïdes est la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone [23]. Dans les conditions physiologiques normales, la chalcone tend à s'isomériser spontanément en flavanone racémique. En effet, la cyclisation de la chalcone est catalysée par une enzyme, la chalcone-isomérase (CHI), qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle central (C), c'est une addition *syn* sur la double liaison *E* conduisant à la (2-S)-flavanone [24]. Sous l'action de la flavone-synthase ou de la β -hydroxylase (F₃H), cette flavanone se métabolise pour donner la formation de la flavone ou du dihydroflavonol, respectivement (**Figure I.9**). Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3 en présence de l'oxoglutarate, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3 de façon univoque. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol-synthase ou de la dihydroflavonol-4-réductase (DFR), se métabolise respectivement en flavonol ou en flavan-3,4-diol (leucoanthocyanidol) (**Figure I.9**). Le mécanisme de formation des anthocyanosides se fait par glucosylation sous l'action de l'uridine flavonoïde glycosyl-transférase (UFGT). Tous ces composés sont substitués différemment (groupements hydroxyles, méthoxyles ou encore des sucres) sur les deux cycles aromatiques A et B et sur le cycle C en C3.

Une majorité de ces produits se trouve, à l'état naturel, sous forme de glycosides, une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées.

De ce qui précède, nous constatons l'importance des chalcones dans la biosynthèse des flavonoïdes, ainsi que leur rôle dans le processus de métabolisation des plantes, fruits et légumes.

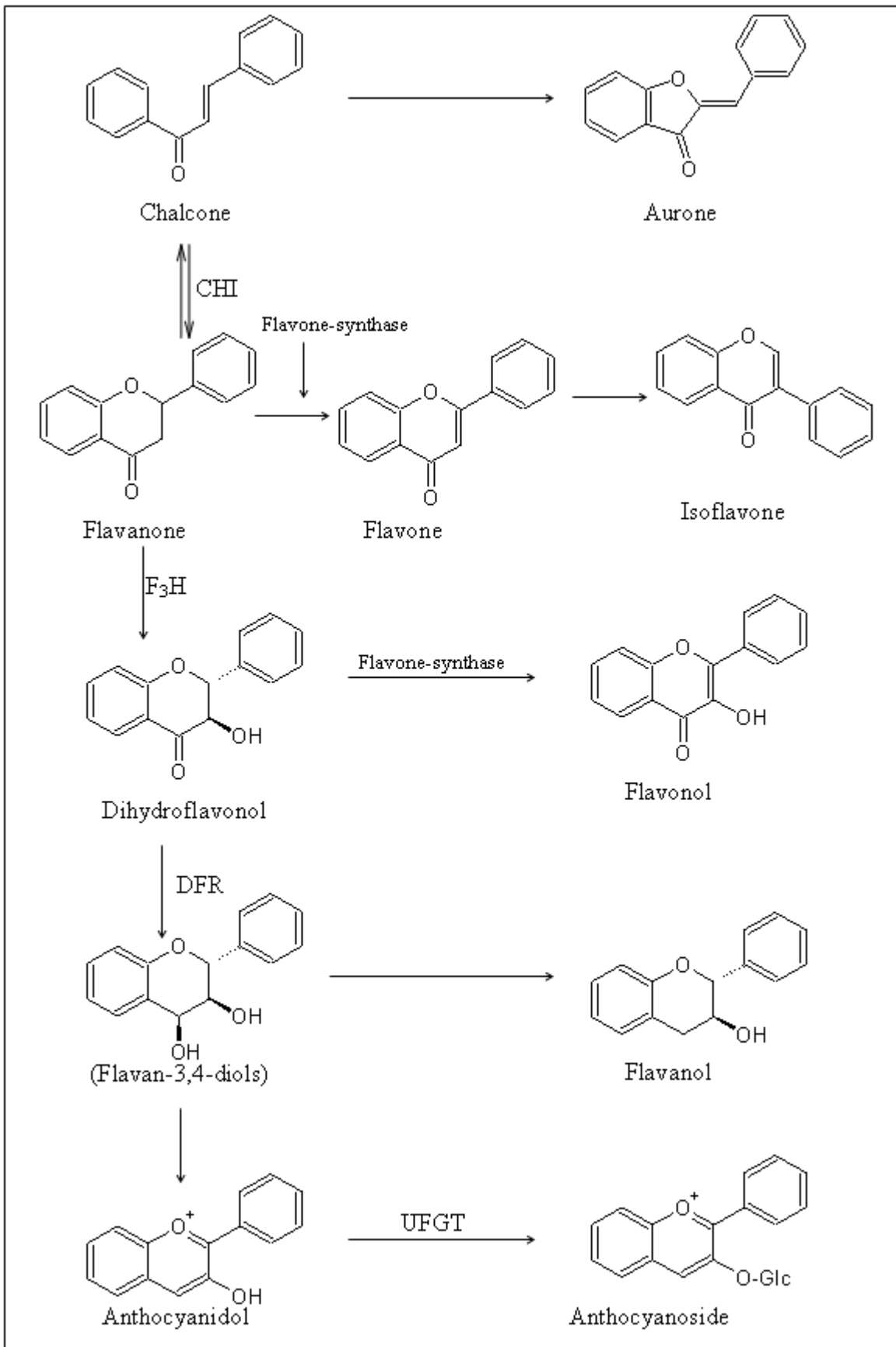


Figure I.9 : La biosynthèse des principaux types de flavonoïdes [13,18].

- PRESENTATION DETAILLEE DES CHALCONES :

A- *Biosynthèse des chalcones :*

La biosynthèse des chalcones se fait principalement par condensation d'un triacétate (cycle A) et d'un acide cinnamique (4-coumaroylCoA, cycle B), après addition de trois malonates et d'un cinnamoyl-CoA (**Figure I.10**).

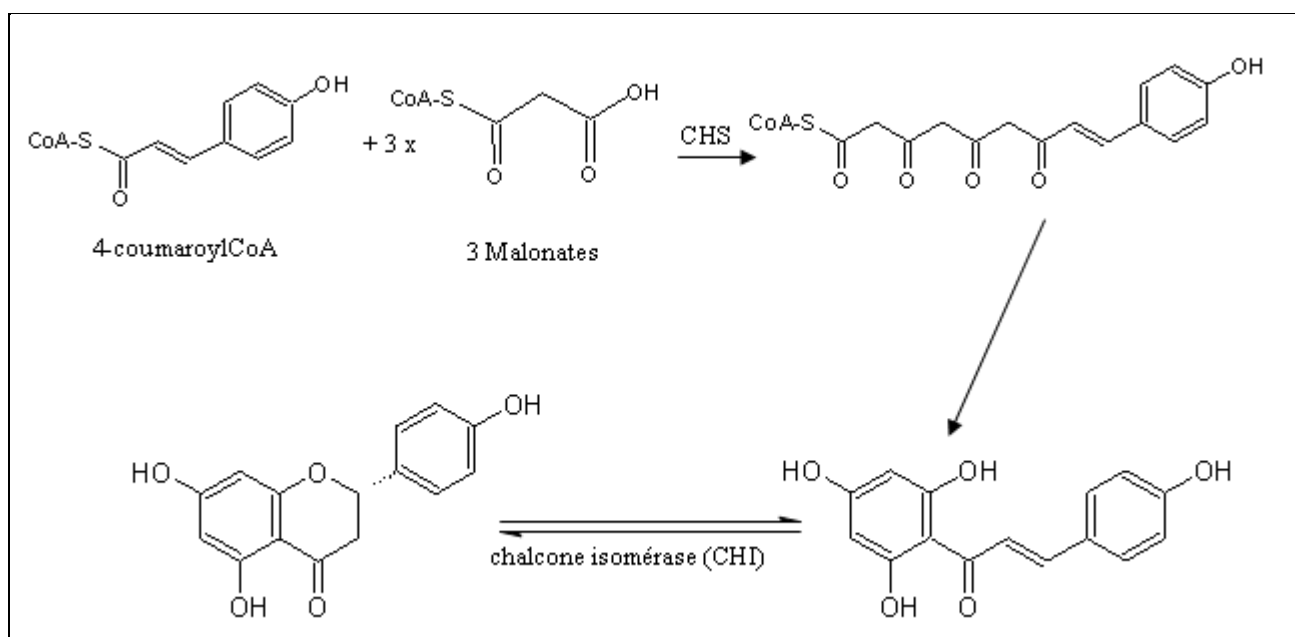


Figure I.10 : Formation du noyau chalcone, point de départ de la biosynthèse des flavonoïdes [25].

Les chalcones peuvent se trouver dans le règne végétal sous forme glycosylées ou non, substituées différemment sur les deux cycles A et B. La chalcone la moins hydroxylée et la plus facile à synthétiser est la 2'-hydroxychalcone. Dans les fruits et légumes on retrouve les chalcones privées de la double liaison, les dihydrochalcones. La phlorétine est la dihydrochalcone la plus courante, elle est présente notamment dans les pommes.

Du fait de leur capacité à interagir avec les différentes enzymes et hormones végétales, les chalcones possèdent des propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes, des fruits et des légumes. Certaines d'entre elles sont synthétisées par les plantes pour jouer le rôle de phytoalexine, un métabolite chargé de lutter contre les infections causées par des champignons ou par des bactéries.

B- Distribution et localisation des chalcones :

Ces dix dernières années, de nombreux travaux ont montré les effets bénéfiques sur la santé des flavonoïdes et plus particulièrement des chalcones [26]. Le **tableau I.3** résume la distribution des chalcones et de leurs dérivés (chalcones glycosilées et dihydrochalcones) dans le règne végétal.

Tableau I.3: Résumé la distribution des chalcones et leurs dérivés dans le règne végétal.

Chalcones	Sources	Références
Isosalipurpurin (4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone)	Pommes, citron	Tomas-Barberan, 2000
Retrochalcone		
Pinostrobin chalcone	<i>Propolisbrazillien</i>	<i>Yong, 2002</i>
2',4'-dihydroxy-6'- méthoxydihydrochalcone	Fruit de la <i>Cedrelopsis grevei</i> (Madagascar)	<i>Koorbanally, 2003</i>
2'-hydroxy-4',6'- diméthoxychalcone		
2'-hydroxy-3,4,5,4',6'- pentaméthoxychalcone	<i>Neoraputia</i> (brézile)	<i>Tomazela, 2000</i>
2'-hydroxy-3,4,5,4',- tétraméthoxy-5',6'-(2'',4''- diméthylpyrano)chalcone		
Naringénine-chalcone	Tomates	<i>Le gall, 2003</i> <i>Arabbi, 2004</i>
Phloridzine	Différentes variétés de pommes et de poires	<i>Vrhovsek, 2004</i> <i>Chinnici, 2004</i>
3-hydroxyphloridzine		
phlorétine-xyloglucoside		
2',4'-dihydrox-3'-(2,6- dihydroxybenzyl)- 6'méthoxychalcone	<i>Desmos chinoise</i> (plante médicinale)	<i>Rahman, 2003</i>
2',4'-dihydroxydihydrochalcone	<i>Muntingia calabura</i> (Pérou)	<i>Bao-Ning, 2003</i>

2'-hydroxy-4,5,4',5',6'-pentaméthoxychalcone	Citron	<i>Barua, 1978</i>
2',4'-dihydroxy-5',6'-diméthoxychalcone	<i>Uvaria dulcis</i>	<i>Chantrapromma, 2000</i>
2',4'-dihydroxy-5',6'-diméthoxydihydrochalcone		
2',4'-dihydroxychalcone 2',4'-dihydroxy-3'-méthoxychalcone	<i>Zuccagnia punctata</i>	<i>Svetaz, 2004</i> <i>De la rocha, 2003</i>
3',5'-dihydroxy-2',4',6'-triméthoxydihydrochalcone	<i>Lindera Lucida</i>	<i>Leong, 1998</i>
2'-O-(6''-Oacetylglucopyranosyl)-4,4',6'-trihydroxydihydrochalcone	<i>loiseleuria procumbens</i>	<i>Cuendet, 2000</i>
2',3,4',6'-tetrahydroxy-4-méthoxy-3',5-di-(3,3-diméthylallyl)-dihydrochalcone	Fruit <i>demetrodorea nigra</i>	<i>Adolfo, 1995</i>
Phlorétine 4,2',4'-trihydroxychalcone	Pommes, citron	<i>Versari, 1997</i>

I .2.2.3. ETUDE CHIMIQUE DES FLAVONOIDES :

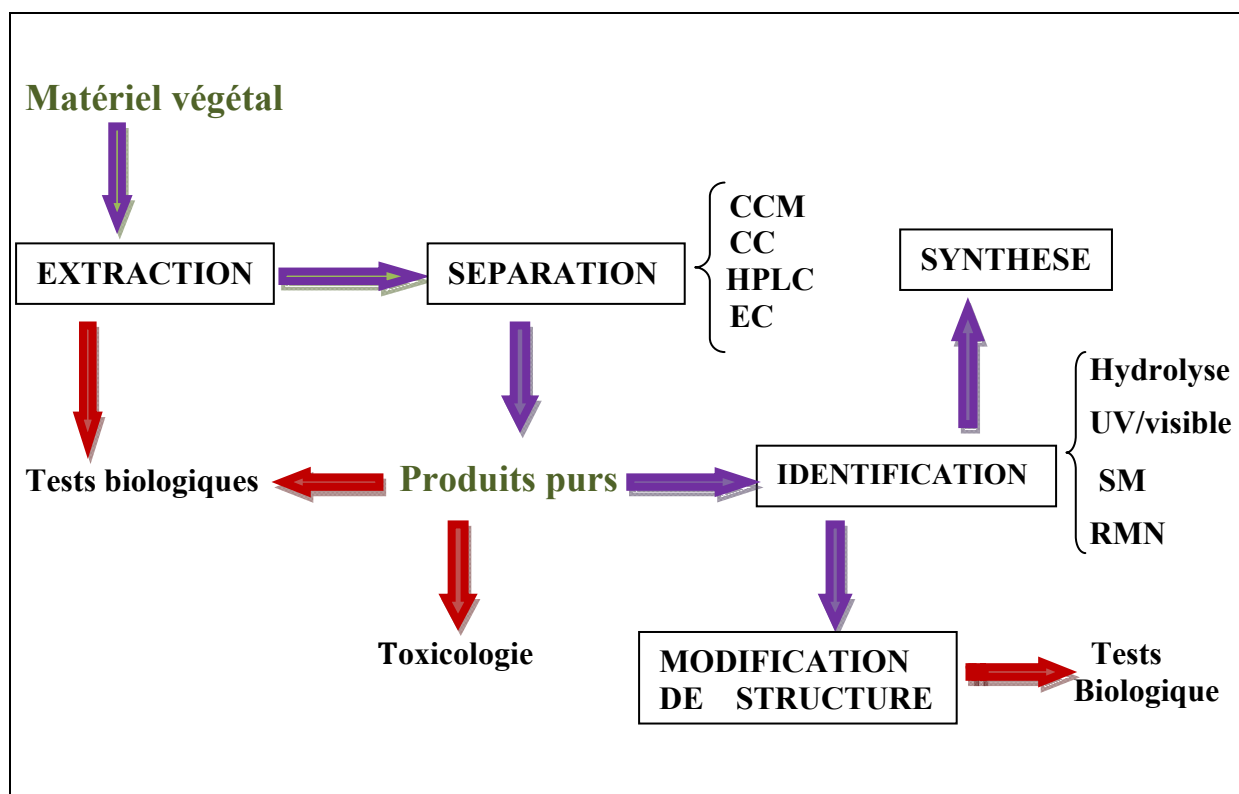


Figure I.11. Schéma récapitulatif des différentes étapes d'extraction, de séparation et d'analyse des composés phénoliques solubles d'un matériel végétal.

1-Extraction :

La présence d'un ou de plusieurs cycles benzénique hydroxylés chez tous les composés phénoliques notamment les flavonoïdes est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir du matériel végétal, les caractériser chimiquement et les doser. Cependant, il faut noter que ces propriétés peuvent s'expliquer différemment selon la complexité de la molécule concernée et le nombre de groupements hydroxyles portés par chacun des cycles benzéniques. Ainsi, bien que le schéma général des différentes étapes d'extraction, et de caractérisation soit valable pour la majorité des composés phénoliques, il devra quelquefois être mieux adapté à leur nature chimique, leur solubilité et leur degré de liaison avec d'autres constituants végétaux.

La plupart des phénols simples présents dans la vacuole peuvent aisément être extraits avec des mélanges méthanol /eau (80/20, v/v) (par macération). Comme sont facilement oxydables, il est recommandé de travailler à une température de 0 à 4°C et d'assurer une protection en ajoutant un agent réducteur (acide ascorbique ou métabisulfite de sodium) au milieu

d'extraction. L'adjonction d'un inhibiteur des glucosidases, enzymes pouvant encore fonctionner en milieu alcoolique ou acétonique, permet par ailleurs d'éviter l'hydrolyse d'hétérosides phénoliques fragiles lors de l'extraction. Après élimination de l'alcool par évaporation sous vide, il est ensuite nécessaire de purifier l'extrait global ainsi obtenu, en éliminant les pigments chlorophylliens et caroténoïdes (extraction à l'éther de pétrole).

Arrivé à ce stade le choix des solvants utilisés pour la suite des extractions est d'une importance capitale, il est fonction du type de flavonoïdes recherchés.

Pour les flavonoïdes à faible polarité (ex: isoflavones, flavanones, flavones méthylés et flavonols) on choisit le chloroforme, le dichlorométhane, l'éther di-éthylique, ou l'acétate d'éthyle.

Les flavonoïdes glycosylés et les aglycones plus polaires sont extraits avec les alcools ou avec un mélange alcool/eau.

Donc en utilisant le solvant convenable aux flavonoïdes recherchés, la plupart de ces derniers vont se retrouver dans ce solvant, qu'il est ensuite aisé d'éliminer sous vide afin de transférer finalement dans le méthanol la fraction correctement purifiée. Cette fraction sera ensuite utilisée pour les analyses qualitatives et quantitatives.

Les étapes d'extraction et de purification indiqués ci-dessus ne conviennent cependant pas aux fractions phénoliques très polaires, par exemple les pigments anthocyaniques qui, après extraction par un mélange méthanol/HCl, ne pourront pas ensuite être purifiés avec l'acétate d'éthyle. L'acidification permet dans ce cas de stabiliser les anthocyaniques sous la forme du cation flavylum, sans être cependant à l'abri d'une certaine dégradation des molécules les plus fragiles. A l'opposé, certains flavonoïdes apolaires, par exemple ceux liés aux stérols ou ceux présents dans les exsudats de bourgeons ou sur les tissus externes foliaires, doivent être extraits avec des solvants apolaires, comme le chloroforme ou l'hexane.

Certains flavanones et chalcones glycosylés sont difficiles à dissoudre dans le méthanol, l'éthanol ou dans le mélange alcool/eau. La solubilité des flavanones dépend du pH de l'eau qui contient la solution.

Flavan-3-ols (catéchines, proanthocyanidines, et les tanins condensés) peuvent souvent être extraits directement avec de l'eau. Toutefois, la composition de l'extrait varie avec le solvant, soit l'eau, le méthanol, l'éthanol, et l'acétone, soit l'acétate d'éthyle. Par exemple il est connu que le méthanol est le meilleur solvant pour les catéchines.

2-Séparation :

A-Séparation par HPLC et par électrophorèse capillaire :

La HPLC est, de très loin, la technique la plus performante et la plus utilisée pour la séparation et le dosage des flavonoïdes ou des composés phénoliques en général comme en témoigne les excellentes séparations déjà obtenues il y a plus de vingt ans [118, 119]. Elle ne demande qu'une faible quantité d'échantillon végétal et permet de combiner en une seule opération rapide et reproductible les analyses qualitatives et quantitatives d'un extrait phénolique complexe, ce qui a permis l'étude de matériel végétal très variés [120]. Les séparations sont basées sur les polarités respectives des phases stationnaires utilisées, du solvant d'élution et des composés phénoliques concernés, en particulier leur degré d'hydroxylation, de glycosylation et de méthylation. A partir de ces principes généraux, deux approches analytiques sont possible : d'une part la chromatographie de composés phénoliques non polaires sur une phase stationnaire de silice avec élution par un solvant apolaire de composition constante (par exemple un mélange heptane-éthanol), d'autre part, ce qui est le plus utilisé dans le monde des composés phénoliques, la fixation de ces composés sur une phase dite inversée (par exemple de la silice sur laquelle on a préalablement greffé des chaînes aliphatiques apolaires) suivie de leur élution par un mélange de solvants (fréquemment eau/acide acétique/acétonitrile ou eau/méthanol) dont on fait varier la composition donc la polarité avec le temps de l'analyse. Les composés élués sont généralement repérés en sortie de colonne par leur absorption en lumière visible pour les anthocyanes (vers 520nm) et en ultraviolet (280,325 ou 360 nm) pour tous les autres phénols; ils apparaissent alors sous forme de pics sur les chromatogrammes. La surface de chacun des pics est proportionnelle à la concentration du composé qui est alors dosé à la longueur choisie pour l'analyse par référence à des composés témoins obtenus commercialement ou à partir d'analyses antérieures. Grâce aux progrès de l'informatique et de la microélectronique, les détecteurs dits à barrettes de diode permettent d'obtenir simultanément des réponses pour toutes les longueurs d'onde du spectre, ce qui conduit à une première étape de caractérisation de chacun des composés séparés en comparant leur spectre d'absorption avec celui de témoins.

A côté de la HPLC, une autre technique de séparation performante des composés phénoliques est l'électrophorèse capillaire (EC) développée depuis une dizaine d'années pour ce type de molécules [121] et dont la sensibilité est environ 10 fois supérieure à celle de la HPLC. La séparation est dans ce cas influencée par de nombreux paramètres dont la taille de

la molécule, le nombre, la position et le pK des groupements hydroxyles, le degré et la nature des glycosylations, le pH et la concentration du tampon d'élution, etc. elle conduit donc à des séparations différentes de celles obtenues par HPLC et trouve de très belles applications dans la séparation de nombreux glycosides des flavonoïdes.

En plus de la qualité des séparations obtenues, un des intérêts majeurs de la séparation des flavonoïdes par HPLC ou EC concerne l'automatisation possible des analyses qui peuvent être couplées en série d'une part avec la détection et le dosage de chacun des composés en UV et d'autre part avec la spectrométrie de masse qui donne des informations sur leur structure chimique. Ces approches peuvent être réalisées en routine pour la séparation des flavonoïdes et de la plupart des autres composés phénoliques.

B-Séparation chromatographique sur papier, couche mince et colonne :

Avant l'introduction de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), les séparations chromatographiques sur papier, sur couches minces ou sur colonnes avait été largement développées pour l'analyse des flavonoïdes. Ces techniques gardent encore un intérêt pour réaliser une première approche qualitative concernant un matériel végétal inconnu. La combinaison de trois paramètres permet en effet de multiples séparations : d'abord la nature des supports chromatographiques (cellulose du papier ou des couches minces, silice, polyamide...), ensuite celle des solvants d'élution (pH, large gamme de polarité depuis l'eau très polaire jusqu'au benzène fortement apolaire) et enfin les propriétés chimiques des flavonoïdes eux-mêmes qui permettent leurs révélations caractéristiques sur les chromatogrammes.

L'un des majeurs problèmes dans la séparation des flavonoïdes (avec les méthodes préparatives) est leur baisse de solubilité dans les solvants employés en chromatographie. De plus, les flavonoïdes deviennent moins solubles lors de leur purification, la diminution de la solubilité dans la phase mobile utilisée pour la séparation chromatographique peut induire une précipitation au fond de la colonne, ce qui va diminuer la résolution, l'écoulement du solvant ou même bloquer la colonne.

D'autres complications peuvent arriver. Par exemple, lors de la L'un des majeurs problèmes dans la séparation des flavonoïdes (avec les méthodes préparatives) est leur baisse de solubilité dans les solvants employés en chromatographie. De séparation des composés

anthocyanique, il est conseillé d'éviter l'acétonitrile et l'acide formique, car l'acétonitrile est difficile à évaporer et il y a un risque de formation d'ester avec l'acide formique.

Il n'y a pas une stratégie d'isolation particulière pour les flavonoïdes, une ou plusieurs étapes sont nécessaires pour leur isolation. Le choix de la méthode dépend de la polarité des composés, et la quantité de l'échantillon disponible.

- La chromatographie sur colonne ouverte conventionnelle est largement utilisée de part sa simplicité, on l'utilise comme étape initiale de séparation. La séparation préparative sur de grandes quantités de flavonoïdes extraits d'une plante est souvent possible.

Les supports utilisés : polyamide, cellulose, gel de silice, Sephadex LH-20, et Sephadex G-10, G-25, et G-50. Sephadex LH-20 est recommandé pour la séparation des proanthocyanidines.

La chromatographie sur colonne ouverte avec certains supports (gel de silice, polyamide) souffre de certains cas d'adsorption irréversible du soluté dans la colonne.

- La chromatographie sur couche mince (CCM) préparative est la méthode de séparation la moins coûteuse, et exige un équipement basique. Elle est normalement employée pour des quantités en milligramme d'échantillon, parfois elle peut être utilisée pour des quantités en gramme dans le cas des mélanges peu complexes.

La CCM préparative en association avec la CC ouverte demeure un moyen direct de purification des produits naturels, toutefois la chromatographie planaire, et la CCM centrifugeuse [122] ont trouvé application dans la séparation des flavonoïdes.

3-Identification:

- La détermination de la structure des flavonoïdes se fait par les méthodes physico-chimiques suivantes :

A-CCM analytique :

La chromatographie sur papier ainsi que l'électrophorèse sur papier ont été les méthodes les plus utilisées pour l'analyse des flavonoïdes, mais à présent la méthode de choix est la CCM. Les avantages de cette technique les plus connus sont : la courte durée de séparation, la possibilité de la soumettre aux réactifs de détection, et la possibilité d'analyser plusieurs échantillons en même temps. La CCM est aussi la technique idéale pour l'analyse préliminaire de l'extrait de la plante avant de passer aux analyses par HPLC.

- Les supports utilisés peuvent être la cellulose le polyamide ou le gel de silice.
- L'élution se fait par différents systèmes de solvants employés spécialement pour l'analyse des flavonoïdes [123].

Pour les flavones acétylés ou hautement méthylés ainsi que les flavonols on utilise des systèmes apolaires tels que chloroforme/méthanol (15:1). Largement distribués les flavonoïdes aglycones, tels que l'apigénine, la luteoline, et la quercétine, peuvent être séparés par le système chloroforme/méthanol (96:4), ou par des systèmes de solvants à polarité similaires. Un système largement appliqué pour les flavonoïdes glycosylés : acétate d'éthyle /acide formique /acide acétique glacial/eau (100:11:11:26).

- Lors de La migration des constituants (des produits) de l'échantillon sur la plaque CCM On peut déterminer pour chacun d'entre eux ce qu'on appelle: le Rapport frontal (R_f).

La valeur du R_f est définie comme suit :

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit après élution}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant après élution}}$$

- Le R_f est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé (organique ou aqueux) sur un support «phase stationnaire» donné (gel de silice, polyamide, cellulose). Notant que la valeur du R_f varie avec le type de squelette flavonique (aglycone ou glycosyle) ainsi que la disposition de ses différents substituants [124, 125, 126], comme le montre le **(tableau I.4)**.

- Le R_f est le même, que le constituant soit pur ou dans un mélange.
- Le R_f ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange.

Tableau I.4 : *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 solvant aqueux.
Méthylation des hydroxyles	R_f augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvant aqueux.
Glycosylation	R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux.

- La détection des flavonoïdes sur plaque CCM est basée sur leur fluorescence sous UV (254nm et 365nm).

La fluorescence dépend de la structure des flavonoïdes (tableau), elle peut être jaune, verte, orange, bleu,... (**Tableau I.5**) comme elle peut être intensifiée ou changée par la pulvérisation de réactifs, par exemple : par la pulvérisation d'une solution de 1% de diphenylboric acide- β -éthylaminoester (diphénylboryloxyéthylamine) dans le méthanol l'intensité de la fluorescence augmente sous la lampe UV de 365nm.

Tableau I.5. : *Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood (365nm) et la structure des flavonoïdes.*

LA FLUORESCENCE	LES STRUCTURES POSSIBLES
Noire violette	5,4'-Dihydroxy flavone ou 3-O-substitué flavonols avec 5-OH, 4'-OH. Quelque flavanones avec OH libre en 5 Chalcones.
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones sans OH libre en 4'
Bleu-verte	Flavanone avec 5-OR.

B- L'Hydrolyse :

Différents types d'hydrolyses (alcaline, acide, ou enzymatique par des estérases ou des β -glucosidases) ont permis d'apporter depuis fort longtemps des indications précieuses sur les liaisons chimiques associant les différentes molécules formant un flavonoïde natif, en particulier entre l'aglycone et la partie glucidique.

- ❖ Ces deux approches sont cependant très insuffisantes pour élucider la structure fine de ces composés et ont fait appel pour cela aux techniques physico-chimiques utilisées classiquement par les chimistes (spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire, spectrométrie Raman.....). Avant d'être caractérisés, les flavonoïdes d'un extrait végétal peuvent être isolés sur une colonne semi-préparative par HPLC ou par d'autres techniques mais, comme cela a été signalé ci-dessus, il est maintenant possible de réaliser des couplages directs entre les séparations par HPLC ou EC et la spectrométrie de masse, ce qui permet de travailler sur de très faibles quantités de matériel végétal tout en diminuant la durée des analyses.

C- Spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse permet d'apporter la preuve de l'identité du flavonoïde préalablement séparés par HPLC, EC, ou autres méthodes en apportant, grâce à la fragmentation de la molécule, des informations sur sa masse moléculaire et sur les principaux groupements chimiques présents. Les techniques d'ionisation chimique ont permis depuis longtemps d'analyser les aglycones des flavonoïdes mais ce sont seulement les nouvelles techniques d'ionisation douce développées depuis quelques années (électro-nébulisation – ESI- et ionisation chimique à pression atmosphérique –APCI-) qui autorisent la génération d'ions de grosses molécules sans fragmentation, permettant maintenant de caractériser les flavonoïdes sous leur forme native [127]. La combinaison de ces différentes approches a ainsi permis de réaliser, pour de nombreuses plantes médicinales, de véritables empreintes chimiques basées sur leur équipement en flavonoïdes et de suivre ces flavonoïdes et leurs métabolites après qu'ils ont été ingérés par l'homme [127].

D-La résonance magnétique nucléaire RMN :

La technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil puissant pour la détermination de nouvelles structures phénoliques inconnues et de très nombreux exemples appartenant à des classes variées et particulièrement celle des flavonoïdes ont été décrits [128]. Signalons seulement que les spectres RMN du proton (^1H) et du carbone (^{13}C) sont généralement obtenus dans des expérimentations séparées, le premier demandant quelques minutes à partir d'une faible quantité du composé préalablement purifié (0,3 mg), le second étant obtenu en plusieurs heures à partir de 1 mg au minimum. En donnant des informations sur l'environnement chimique immédiat de chaque H ou de chaque C d'une molécule, la RMN permet de préciser les liaisons existant entre ces atomes à l'intérieur d'une molécule.

a) RMN monodimensionnelle :

- **RMN du proton (^1H):** Le spectre RMN du proton informe sur les différents types d'hydrogène présents dans la molécule analysée, ainsi que les différents types d'hydrogène présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.
- **RMN carbone (^{13}C):** Cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH_3), secondaires (CH_2), tertiaire (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires.

Les spectres obtenus sont interprétés en s'aidant des bases bibliographiques internationales et permettent de déterminer rapidement la structure de l'aglycone d'un flavonoïde, le nombre de C et le nombre de H liés à chaque C ainsi que le nombre de sucres présents dans la molécule phénolique.

Les (**Tableaux I.6 et I.7**) nous renseignent sur les déplacements chimiques et les constantes de couplages des protons du noyau A et du noyau B des flavonoïdes [129].

Tableau I.6 : Déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A.

Structures du noyau A des flavonoïdes	(H-5)		(H-6)		(H-8)	
	δ , ppm	<i>J</i> , Hz	δ , ppm	<i>J</i> , Hz	δ , ppm	<i>J</i> , Hz
5, 7 - OH			6,0-6,2 d	2,5	6,3-6,5 d	2,5
5-OH, 7OR (R=Gluc.)			6,2-6,4 d	2,5	6,5-6,9 d	2,5
7-OR (R=H, sucre)	8,0 d	9	6,7-7,1 dd	(9,0 ; 2,5)	6,7-7,0 d	2,5
5, 6, 7-OR R=H, sucre 5, 7, 8-OR			6,3 s		6,3 s	

Tableau I.7 : Déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau B.

Structure du noyau B Des flavonoïdes	(H2'-H6')		(H3'-H5')	
	δ , ppm	<i>J</i> , Hz	δ , ppm	<i>J</i> , Hz
Flavone (4'-OR)	7,7-7,9 d	8,5	6,5-7,1 d	8,5
Flavonol (4'-OR)	7,9-8,1 d	8,5	6,5-7,1 d	8,5

b) RMN bidimensionnelles [129]:

Corrélations homonucléaires

- ✓ **COSY** ($^1\text{H} - ^1\text{H}$): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires ^2J et ^3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.
- ✓ **NOESY** ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

Corrélations hétéronucléaires

- ✓ **HSQC** ($^1\text{JH-C}$) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas

d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

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

E-Spectrophotométrie UV-visible :

C'est une technique très importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle permet la localisation des hydroxyles libres et leur position sur le squelette flavonique, par la formation de complexes avec les différents réactifs, et ça se traduit sur le spectre UV-Visible par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorptions par rapport au spectre de référence pris dans le méthanol. Ce dernier est caractérisé par deux bandes d'absorption principales : la bande I et la bande II (figure I.11) [130].

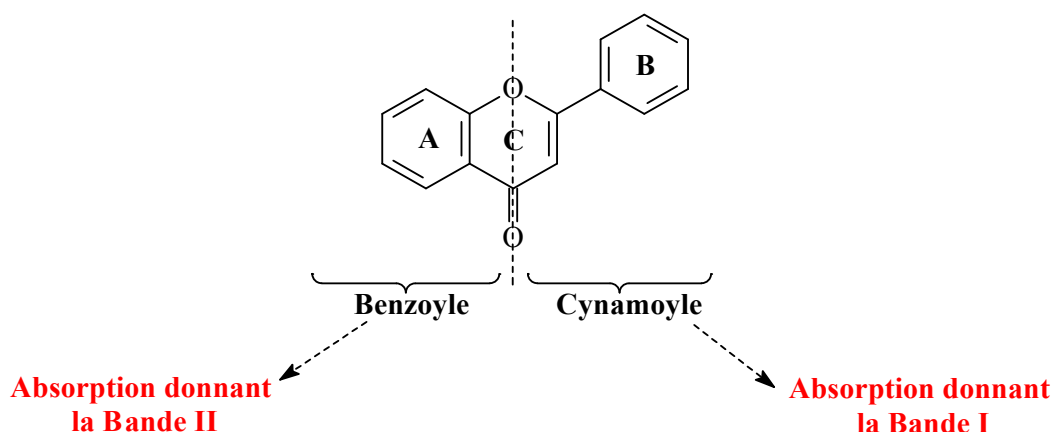
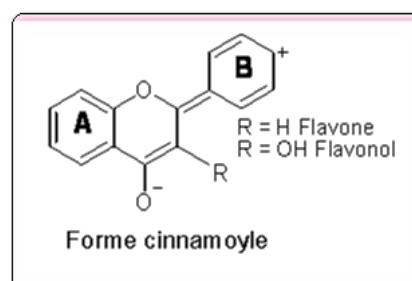


Figure I.11 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

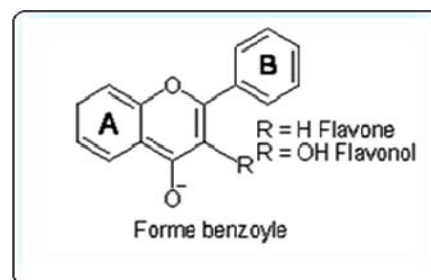
❖ La bande I :

Située entre 304-385 nm, elle est attribuée à l'absorption du noyau B conjugué avec le groupe énone donnant **la forme cinnamoyle**.



❖ **La bande II :**

Située entre 250-280 nm, elle est attribuée à l'absorption du noyau A conjugué avec la fonction cétone donnant la **forme benzoyle** [124].



Le (Tableau I-8) donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes.

Tableau I.8. : Position des bande I et II en fonction du type de flavonoïdes

Type de flavonoïdes	Bande I (nm)	Bande II (nm)
Flavones	310-350	250-280
Flavonols (3-OH libre)	350-385	250-280
Flavonols (3-OH substitué)	330-360	250-280
Isoflavones	310-330	245-275
Flavanones et dihydroflavanols	300-330	275-295
Chalcones	340-390	230-270 faible intensité
Aurones	380-430	230-270 faible intensité
Anthocyanidines et anthocyanines	465-560	270-280

Le maximum d'absorption d'une telle ou telle bande 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 [131].

- **Addition de réactifs (série spectrale UV)**

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que **NaOH**, **NaOAc**, **AlCl₃**, **H₃BO₃** et **HCl**. Ces derniers réagissent avec les groupements hydroxyles par formation de 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.

a)- Addition de NaOH:

NaOH ou (**NaOMe**), une base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II. Cet effet est plus important sur la bande I. Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif, particulièrement pour les flavonols ayant un hydroxyle libre en 4'.

Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de l'intensité lumineuse de la bande I renseigne sur le nombre et la position des hydroxyles libres [132]. L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence d'un OH libre en 7.

Cependant, l'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et / ou 4' et 7.

Dans le cas des isoflavones hydroxylées sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est ortho-dihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [125].

b)- Addition de NaOAc:

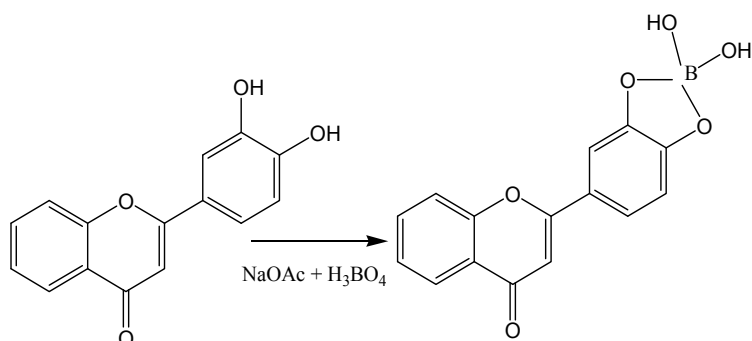
L'acétate de sodium, **NaOAc**, base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soit les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH.

Un faible déplacement bathochrome de la bande II des flavones, et des flavonols traduit la présence d'un hydroxyle libre en 7. Cet effet peut être perturbé par la présence d'autres substituants en 6 ou en 8 [125].

Dans le cas des isoflavones, le **NaOAc** ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7 [124], ceci se traduit par un déplacement bathochrome de la bande II (6-20 nm). Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné [125].

c)- Addition de NaOAc + H₃BO₃ :

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (**H₃BO₃**) est additionné à l'échantillon en présence de **NaOAc**. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système ortho-dihydroxyle sur le cycle B (3', 4') ou sur le cycle A (6, 7 ou 7, 8) suite à la formation des chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande I [125].



d)- Addition de AlCl₃ et AlCl₃+HCl :

La présence du chlorure d'aluminium (**AlCl₃**) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le **MeOH**. Les complexes formés entre **AlCl₃** et les groupes ortho-dihydroxyles des noyaux aromatiques **A** et **B** sont instables et se décomposent en présence de **HCl** [130], par contre, ceux formés entre **AlCl₃** et les hydroxyles **5-OH** ou **3-OH** et la fonction carbonyle sont stables [133, 134]. Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande I. par rapport au spectre après addition de **AlCl₃** et un déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le **MeOH** (**figure I.12**).

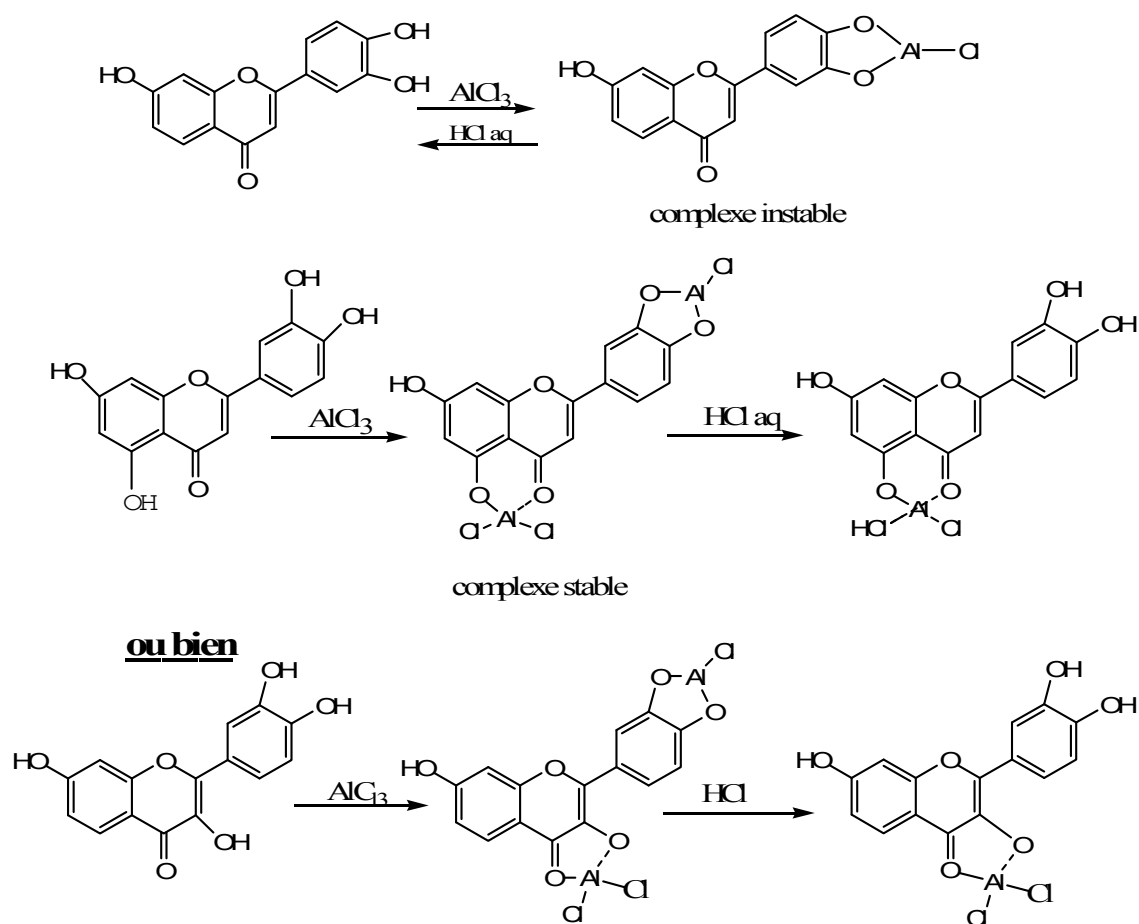


Figure I.12: Formation des différents types de complexes après addition de l' AlCl_3 et en présence de HCl

Le (Tableau I.9) récapitule les principaux déplacements des bandes I et II en présence des réactifs dans le cas des flavones et flavonols.

Tableau I.9 : Les principaux déplacements des bandes I et II après addition des réactifs

<i>Réactifs</i>	<i>Déplacement en nm</i>		<i>Interprétation</i>
	<i>Bande I</i>	<i>Bande II</i>	
MeOH	304-350	250-280	Flavones
	352-385	250-280	Flavonols (3-OH)
	350-380	250-280	Flavonols (3-OR)
NaOH	+44 à 65		4'-OH
	1)- avec stabilité ou augmentation d'intensité		3-OH et 4'-OR
	2)-avec diminution d'intensité		7-OH
	une nouvelle bande entre 320-335		
AlCl ₃ /MeOH	+ 20 à 45		5- OH
	+ 60		3- OH
AlCl ₃ +HCl/AlCl ₃	-20 à -40		Ortho di OH (noyau B)
	-20 à -25		Ortho di OH (noyau A) +ortho di OH (noyau B)
AlCl ₃ +HCl/MeOH	+ 17 à 20		5- OH (avec 6- oxygénation)
	+ 35 à 55		5-OH flavone et 3-OMe flavone
	+ 50 à 60		3- OH avec ou sans 5- OH
NaOAc /MeOH	+ 5 à 20		7- OH
	Déplacement très faible		7- OR
	Diminution d'intensité		6, 7 ; 7, 8 ou 3', 4' di OH
	Avec le temps		
	Le spectre se décompose		5, 6, 7 ; 5, 7, 8 ou 3, 3', 4' – tri OH
	Avec le temps		
NaOAc + H ₃ BO ₃	+ 12 à 36		3', 4' di OH
	+ 5 à 10		6, 7, ou 7, 8 di OH

I.2.2.4 PHARMACOCINETIQUE DES FLAVONOIDES:

Seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être réabsorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire [27]. Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes réabsorbés [28]. La muqueuse intestinale et le rein interviennent accessoirement dans ce métabolisme. Une fois réabsorbés, les flavonoïdes vont influencer plusieurs fonctions biologiques dont la synthèse protéique, la différenciation de la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, apportant des effets bénéfiques dans différentes pathologies chez l'Homme [29, 30, 31].

I.2.2.5 ACTIVITE BIOLOGIQUE :

1- Propriétés antioxydantes et piègeurs de radicaux libres [32, 33, 34, 35, 36].

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$), anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et radicaux peroxy lipidiques, selon la réaction suivante :



Les radicaux libres apparaissent dans plusieurs situations, telles que :

- l'anoxie : qui engendre la production de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$).
- l'inflammation : qui correspond à la production d'anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) par la NADPH oxydase membranaire des leucocytes activés, et, par dismutation, à celle du très réactif radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) [37, 38, 39].
- et l'auto-oxydation des lipides : c'est au cours du stress oxydant que les espèces radicalaires, libres de tout contrôle, vont attaquer des cibles bioactives telles que les protéines, altérant ainsi les récepteurs cellulaires et les enzymes, les acides nucléiques (favorisant la survenue des mutations délétères à l'origine de divers cancers) et les lipides, notamment les particules de LDL de l'intima vasculaire, une phase qui constitue le *primum movens* dans la cascade athérogène.

Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques

(Largués à partir de leurs protéines de fixation ou de transport) qui peuvent renforcer ces effets délétères par la production des radicaux hydroxyyles ($\text{OH}\cdot$) [40, 41].

En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la carcinogénèse. Ils inhibent en plus l'angiogénèse, la prolifération cellulaire et affectent le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales [42].

2- Propriétés inhibitrices d'enzymes.

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase [43, 44, 45, 46, 47], de la phospholipase A2 [48, 49] et des enzymes de l'inflammation : la cyclooxygénase [50, 51] et la lipo-oxygénase [52, 53, 54].

3- Effets protecteurs vasculaires.

Les flavonoïdes agissent sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique « P » [55]. Cette activité intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire normale [56, 57]. Ils sont, de ce fait, utilisés dans certains états pathologiques caractérisés par un défaut affectant la perméabilité vasculaire [58, 59]. Les effets de l'O- β -hydroxyéthyl rutoside (HR) ont été étudiés chez des patients présentant une insuffisance veineuse chronique : un traitement à base de HR a permis de restaurer les paramètres hémorhéologiques altérés. D'autres flavonoïdes sont responsables d'une augmentation de la résistance des capillaires. Cette activité serait en rapport avec les effets de certains flavonoïdes sur les plaquettes, les leucocytes et sur les enzymes intervenant dans la coagulation sanguine [60, 61].

4- Propriétés antihépatotoxiques [62, 63, 64].

Des flavonoïdes issus de *Silybum marianum* (chardon marie) ont été utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle dans le traitement des affections hépatiques. Les principes actifs de l'extrait sont constitués d'un mélange complexe (constitué de composés de type flavolignane et flavanone) appelé silymarine. Testée sur un modèle expérimental animal, la silymarine a montré qu'elle exerce un effet positif sur les hépatocytes intacts et sur les cellules hépatiques endommagées irréversiblement, agissant sur la membrane cellulaire, prévenant l'entrée des substances toxiques, et qu'elle stimule la capacité régénérative des cellules hépatiques après hépatectomie partielle. L'activité hépatoprotectrice de la silybine, principale flavolignane rencontrée dans la silymarine, a été évaluée chez des souris intoxiquées par des doses non thérapeutiques d'acétaminophène. Ce flavonoïde s'est révélé hépatoprotecteur, mais le mécanisme d'action de cette protection n'est pas encore bien élucidé [65]. La quercétine,

issue d'*Artemisia scoparia*, a été décrite [66] comme possédant une activité protectrice vis-à-vis de l'hépatotoxicité du paracétamol chez le rat et la souris [66].

5- Propriétés antiallergiques [67].

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques. Ils agissent par inhibition des enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles : l'AMPc phosphodiesterase et la Ca⁺⁺ ATPase [68, 69, 70, 71]. En outre, la quercétine exerce un puissant effet inhibiteur de la libération d'histamine à partir des mastocytes [72].

6- Activité anti-inflammatoire.

In vitro, plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire [73, 74, 75]. C'est ainsi que la myricétine et la quercétine bloquent l'action des cyclo-oxygénase et lipoxygénase à des concentrations relativement élevées. À faibles concentrations, c'est la lipoxygénase qui est inhibée préférentiellement. Certains travaux suggèrent qu'ils posséderaient une bonne activité anti-inflammatoire sans les effets indésirables de type ulcérogène [76, 77, 78, 79, 74, 75, 80]. L'hespéridine, administrée par voie sous-cutanée (car inactive *per os*), présente une activité anti-inflammatoire significative chez le rat dont l'œdème a été induit aussi bien par la carragénine que par le dextran [81].

7- Activité anti-ulcérogène.

Les flavonoïdes sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes. L'hypolaétine-8- glucose, flavonoïde présent dans diverses espèces du genre *Sideritis*, présente une activité anti-ulcérogène significative [82].

La naringine et la quercétine exercent également une activité anti-ulcérogène mise en évidence chez le rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol. Il a été suggéré que la quercétine exerce ses effets cytoprotecteurs grâce à un complexe impliquant la stimulation de la prostaglandine et l'inhibition de la production de leucotriènes *via* la production de mucus et ses propriétés antioxydantes [67]. Par ailleurs, il a été établi que la quercétine inhibe la croissance d'*Helicobacter pylori* ainsi que la formation d'acide par les cellules pariétales en réponse à une stimulation par l'histamine et l'AMPc dibutyrique [83, 84].

8- Flavonoïdes et NO.

L'activité des flavonoïdes comme piègeurs de radicaux libres étant bien établie, des études récentes suggèrent qu'ils seraient également de puissants piègeurs du radical NO [85].

Celui-ci étant élaboré par plusieurs types de cellules, notamment les cellules endothéliales et les macrophages ; aussi, la libération de NO due à l'activité NO synthase est importante dans le maintien de la dilatation des vaisseaux sanguins [86]. Certains flavonoïdes ayant la propriété d'inhiber la cyclooxygénase, cela pourrait expliquer l'effet de la quercétine dans le blocage de la vasodilatation due à la relaxation exercée par NO sur les cellules musculaires lisses de l'endothélium vasculaire (NO/ EDRF, facteur relaxant dérivant de l'endothélium) [87, 88, 89].

9- Autres effets biologiques.

Les flavonoïdes préviennent la cataracte diabétique par inhibition de l'aldose réductase du cristallin [43, 46]. En effet, la myricétine présente des effets hypoglycémiants et hypotriglycéridémiants chez les animaux diabétiques [90, 91]. L'effet des flavonoïdes sur le système immunitaire est complexe et demeure encore mal élucidé [92]. Certains d'entre eux réduisent l'activation du complément, diminuant de façon générale la réponse inflammatoire [93]. À doses élevées, ils inhibent les fonctions lymphocytaires, mais, à concentrations plus faibles, ils pourraient agir comme immunostimulants chez les sujets immunodéprimés.

L'activité immuno-modulatrice des flavonoïdes dépend, d'une part, de leur capacité à inhiber la formation des eicosanoïdes et de l'histamine et de leur pouvoir piègeur des radicaux libres d'autre part [94, 95, 96]. Des propriétés antibactériennes et antivirales des flavonoïdes vis-à-vis de différentes souches bactériennes ont également été mises en évidence [63, 97, 98, 99, 100, 101, 102]. Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire d'autres virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus [103, 104]. Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire d'autres virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus [103].

10- Alimentation riche en flavonoïdes et prophylaxie des maladies cardio-vasculaires et des cancers.

L'ingestion de flavonoïdes d'origine alimentaire a été associée à une réduction considérable de la mortalité liée aux maladies cardio-vasculaires. En effet, une étude menée aux Pays-Bas (Zulphen Elderly Study) auprès de 805 sujets de sexe masculin a mis en évidence une

corrélation inverse entre la prise de flavonoïdes d'origine alimentaire (thé, oignons, pommes) et les maladies cardio-vasculaires [105]. D'autres études se sont focalisées sur l'impact de la consommation du thé, boisson riche en flavonoïdes, notamment en quercétine (de 10 à 25 mg/l). Ce dernier composé exerce des effets antioxydants, antiagrégants et vasodilatateurs pouvant expliquer ses effets cardio-prophylactiques [106]. En outre, il a été démontré que la consommation de quercétine dans les oignons (0,3 mg/g de masse fraîche) et les pommes (1 mg/g de masse fraîche de la peau de pommes) est inversement corrélée au risque de cancer du poumon [107].

11- Toxicité.

Les résultats d'études portant sur les effets indésirables des flavonoïdes proviennent de travaux effectués *in vitro* [108]. D'autres travaux portant sur des études au long cours ont montré l'absence de carcinogénicité [109, 110]. Contrairement aux propriétés mutagènes potentielles des flavonoïdes rapportées dans des travaux antérieurs [111], plusieurs études récentes montrent que les flavonoïdes, y compris la quercétine, semblent être antimutagènes *in vivo* [112, 72, 113, 114]. Une étude clinique menée par Knekt *et al.*, portant sur 9 959 patients des deux sexes, suivis pendant vingt-quatre ans, a montré l'existence d'une corrélation inverse entre la prise de flavonoïdes (quercétine) et le développement de cancer du poumon. Une des explications de ces données contradictoires réside dans le fait que les flavonoïdes sont toxiques vis-à-vis des cellules cancéreuses mais ne sont pas toxiques ou moins toxiques à l'encontre des cellules normales [107].

I .2.3. CONCLUSION :

Si l'étude des propriétés antioxydantes d'une molécule est assez aisément réalisable en laboratoire, que l'on ait recours à des tests chimiques ou biologiques, il semble en revanche que la détermination d'un réel intérêt clinique (ou de l'absence de celui-ci) soit nettement plus ardue. De nombreuses réponses restent à apporter sur le mécanisme d'action exact de beaucoup de ces produits polyphénoliques, leur intervention se faisant souvent à plusieurs niveaux : activité de capteur de radicaux libres, chélation de métaux pro-oxydants par les groupements hydroxyles, régénération des formes réduites des vitamines E et C (les flavonoïdes furent d'ailleurs par le passé considérés comme une seule et même vitamine, cofacteur de la vitamine C, qui était appelée vitamine P ou C2). De plus, même si la recherche progresse, beaucoup d'incertitudes subsistent quant à la biodisponibilité de nombreux dérivés phénoliques à cause de leur masse moléculaire importante (cas des EHP et, plus encore, des tanins), par exemple [115, 116]. Autre question, elle aussi d'importance : peut-on envisager d'utiliser des composés phénoliques purs pour leurs propriétés antioxydantes en santé humaine ? La solubilité de composés tels que les flavonoïdes (qui ont tendance à cristalliser quand ils sont isolés et deviennent très difficiles à resolubiliser) représente un sérieux obstacle et une synergie semble souvent nécessaire à l'activité [117]. On peut également s'interroger sur la nécessité de privilégier certains composés plus actifs que d'autres. N'est-il pas plus judicieux de bénéficier d'une « gamme » de molécules de propriétés et de distribution dans l'organisme variées ? Enfin, peut-on espérer trouver des produits suffisamment puissants pour empêcher, par exemple, une récurrence d'infarctus du myocarde ou la survenue d'une maladie neurodégénérative chez un sujet à risque n'ayant pas, jusqu'alors, surveillé son alimentation ? Autant d'interrogations qui rendent l'étude des polyphénols notamment des flavonoïdes complexe mais passionnante. Et le jeu semble en valoir la chandelle.

Références Bibliographiques :

- [1] Klaas, C. A., Wagner, G., Laufer, S., Sosa, S., Loggia, R. D., Bomme, U., Pahl, H. L. and Merfort, I. (2002), Studies on the anti-Inflammatory Activity of Phytopharmaceuticals prepared from *Arnica* flowers, *Planta Med.*, **68**, 385-391.
- [2] Qureshi. N., Porter. J. W. (1981) In Biosynthesis of isoprenoid Compounds; Porter. J. W., Spurgeon. S. L. Eds ; Wiley : New York, Vol 1, pp 47-94
- [3] Cram,D. G. and Mahmoud,G. S; *Chimie organique*. (1968) 2^{ème} édition. Quatier-villars. pp 918-930
- [4] Bruneton, J. (1999), Pharmacognosie, 3^e édition, Tec et Doc, Paris, 310, 316, 619,620.
- [5] Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonamone A, et al. (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 113: 71S-88S
- [6]. Ribéreau-Gayon P (1968) Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris
- [7]. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, et al. (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65 (4): 337-53
- [8] Casley-Smith, J. R., R. G. et Piller, N. B. (1993), Treatment of Lymphedema of the Arms and Legs with 5, 6-Benzo- α -pyrone, *New Engl. J. Med.*, 329, 1158-1163.
- [9] Fujioka, T., Furumi, K., Fujii, H., Okabe, H., Mihachi, K., Nakano, Y., Matsunga, H., Katano, M. et Mori, M. (1999), Antiproliferative constituents from umbelliferae plants., V. A., New furanocoumarin and falcariindiol furanocoumarin ether from the root of *Angelica japonica*. *Chem. Pharm. Bull*, **47**,96,100.
- [10] Resch, M., Steigel, A., Chem, Z. L. et Bauer, R. (1998), 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-1 inhibitory active compounds from *Atractylodes lancea*. *J. Nat. Prod.*, **61**, 347-350.
- [11] Yoshikawa, M., Harada, E., Naitoh, Y., Inoue, K., Matsouda, H., Shimoda, H., Yamahara, J. et Murakami, N. (1994), Developpement of bioactive Function in *Hydrangeae dulcis folium*. III. On the antiallergic and antimicrobial Principles of *Hydrangeae dulcis folium* *Chem. Pharm. Bull*, **42**, 2225-2230.

- [12] Kayser, O. et Kolodziej, H. (1997), Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Plelargonium reniforme*. *Planta Med.*, **63**, 509-510.
- [13] Dominick V. Spracklen, Boris Bonn, and Kenneth S. Carsla W. 2008. Boreal forests, aerosols and the impacts on clouds and climate. *Phil. Trans. R. Soc. A.* doi:10.1098/rsta.2008.0201
- [14] Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therap* 96: 67-202
- [15] Ribereau-Gayon, P. (1968), Les composés phénoliques des végétaux.
- [16] (Jovanovic, 1994 ; Van Acker, 1996 ; Rice-Evans, 1996, Cotelle, 1996 ; Cao, 1997 ; Bors, 1997, Cos, 1998 ; Dugas 2000, Pietta, 2000
- [17] (Hertog, 1993 ; Knekt, 1997).
- [18] George S. Clark, « Coumarin », dans *Perfumer & Flavorist*, vol. 20, 1995, p. 23-34
- [19] (Chinnici, 2004 ; Versari, 1997, Harborne, 1994)
- [20] (Rezk, 2002 ; Inamori, 1991 ; Lespagnol, 1971 ; Belofsky, 2004)
- [21]. Birt DF, Hendrich S, Weiqun W (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Therap* 90: 157-77
- [22] (Chosson, 1998 et Tofazzal, 2000)
- [23] Richter, G. (1933). *Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie*, 333
- [24] Bruneton, J. (1933).
Phytochimie et pharmacognosie des plantes médicinales, Techniques et Documentation Lavoisier.
- [25] (Guignard, 2000 ; Moore, 2002 ; Eckermann, 2003).
- [26] (Bronner, 1995; Hollman, 1996; Crozier, 1997)
- [27] Bokkenheuser VD, Shackleton CH, Winter J (1987) Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochem J* 248: 953-6

- [28] Walle T (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 36 (7): 829-37
- [29] Blaut M, Schoefer L, Braune A (2003) Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int J Vitam Nutr Res* 73: 79-87
- [30] Hollman PC, Katan MB (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother* 51 (8): 305-10
- [31] Scalbert A, Morand C, Manach C (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 56: 276-82
- [32] Bors W, Michel C, Stettmaier K (1997) Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors* 6: 399-402
- [33] Cao G, Sofic, E, Prior RL (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22: 749-60
- [34] Korkina LG, Afanas'ev IB (1997) Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol* 38: 151-63
- [35] Miller AL (1996) Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. *Alt Med Rev* 1996 1 (2): 103-11
- [36] Montoro P, Braca A, Pizza C, et al. (2005) Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chem* 92: 349-55
- [37] Burda S, Oleszek W (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* 49: 2774-9
- [38] Catapano AL (1997) Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology* 48: 39-44
- [39] Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 16: 845-50
- [40] Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, et al. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nut* 74 (4): 418-25

- [41] Rice-Evans CA, Miller NJ (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 24: 790-5
- [42] Rice-Evans C (2001) Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 8: 797-807
- [43] Chaudhry PS, Cabrera J, Juliani HR, et al. (1983) Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol* 32 (13): 1995-8
- [44] Fernández M, Caballero J, Morales Helguera A, et al. (2005) Quantitative structure-activity relationship to predict differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. *Bioorg Med Chem* 13 (9): 3269-77
- [45] Nakai N, Fujii Y, Kobashi K, et al. (1985) Aldose reductase inhibitors: flavonoids, alkaloids, acetophenones, benzophenones, and spirohydantoin of chroman. *Arch Biochem Biophys* 239 (2): 491-6
- [46] Shimizu M, Ito T, Terashima S, et al. (1984) Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids. *Phytochemistry* 23 (9): 1885-8
- [47] Varma D, Kinoshita JH (1976) Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids—Their possible role in the prevention of diabetic cataracts. *Biochem Pharmacol* 25 (22): 2505-13
- [48] Gil B, Sanz MJ, Ferrándiz MC, et al. (1994) Accelerated communication: Effects of flavonoids on *Naja Naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice. *Life Sci* 54 (20): PL333-PL338
- [49] Kim HP, Pham HT, Ziboh VA (2001) Flavonoids differentially inhibit guinea pig epidermal cytosolic phospholipase A2. *Prostag, Leukotr Ess Fatty Acids* 65 (5-6): 281-6
- [50] Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therap* 96: 67-202 51 (3): 144-50
- [52] Redrejo-Rodriguez M, Tejeda-Cano A, Pinto MC, et al. (2004) Lipoxygenase inhibition by flavonoids: semiempirical study of the structure– activity relation *J Mol Struct: THEOCHEM* 674 (1-3): 121-4
- [53] Sadik CD, Sies H, Schewe T (2003) Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure–activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol* 65 (5): 773-81

- [54] Yeon SC, Hyon GJ, Kun HS, et al. (2001)
Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem Pharmacol* 62 (9): 1185-91
- [55] Beretz A, Cazenave JP (1991) Old and new natural products as the source of modern antithrombotic drugs. *Planta Med* 57 (7): S68-72
- [56] Shih CM, Lin H, Liang YC, et al. (2004)
Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 496 (1-3): 41-8
- [57] Youdim KA, McDonald J, Kalt W, et al. (2002)
Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *J Nutr Biochem* 13 (5): 282-8
- [58] Folts J D (2002) Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease. *Adv Exp Med Biol* 505: 95-111
- [59] Vitor RF, Mota-Filipe H, Teixeira G (2004)
Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *J Ethnopharmacol* 93 (2-3): 363-70
- [60] Stoclet J C, Chataigneau T, Ndiaye M, et al. (2004)
Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 500 (1-3): 299-313
- [61] Ursini F, Tubaro F, Rong J, et al. (1999) Optimization of nutrition: polyphenols and vascular protection. *Nutr Rev* 57 (8): 241-9
- [62] Gilani A H, Janbaz K H, Shah B H (1997) Quercetin exhibits hepatoprotective activity in rats. *Biochem Soc Trans* 25 (4): S619
- [63] Jassim SA, Naji MA (2003) Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Appl Microbiol* 95 (3): 412-27
- [64] Valenzuela A, Guerra R (1985) Protective effect of the flavonoid silybin dihemisuccinate on the toxicity of phenylhydrazine on rat liver. *FEBS Letters* 181 (2): 291-4

- [65] Magliulo E, Carosi PG, Minoli L, et al. (1973) Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silymarin. *Arzneimittelforschung* 23 (Suppl): 161-7
- [66] Gilani AH, Janbaz KH (1993) Protective effect of *Artemisia scoparia* extract against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Gener Pharmacol: The Vascular System* 24 (6): 1455-8
- [67] Martin MJ, Marhuenda E, Perez-Guerrero C, et al. (1994) Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacology*
- [68] Amella M, Bronner C, Briancon F, et al. (1985) Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and biflavonoids. *Planta Med* 51 (1): 16-20
- [69] Berg PA, Daniel PT (1988) Plant Flavonoids in Biology and Medicine II. *Progress in Clinical and Biological Research*, Cody V, Middleton E, Harborne JB (Eds) 280: 157-171. Liss AR Inc., New York
- [70] Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, et al. (2000) Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J Allerg Clin Immunol* 106 (1): 159-66
- [71] Yamamura S, Ozawa K, Ohtani K, et al. (1998) Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry* 48 (1): 131-6
- [72] Formica JV, Regelson W (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 33: 1061-80
- [73] Delporte C, Backhouse N, Erazo S (2005) Analgesic-antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. *J Ethnopharmacol* 99 (1): 119-24
- [74] Pelzer LE, Guardia T, Juarez AO, et al. (1998) Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Farmacol* 53 (6): 421-4
- [75] Sánchez de Medina F, Vera B, Gálvez J, et al. (2002) Effect of quercetin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci* 70 (26): 3097-108

- [76] Asongalem EA, Foyet HS, Ngogang J, et al. (2004) Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. J Ethnopharmacol 91 (2-3): 301-8
- [77] Cruz T, Gálvez J, Ocete MA, et al. (1998) Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. Life Sci 62 (7): 687-95
- [78] Friesenecker B, Tsai AG, Intaglietta M (1995) Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. Int J Microcirc Clin Exp 15 (Suppl): 17-21
- [79] Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacol Rev 52: 673-751
- [80] Yongmoon H (2005) *Ginkgo* terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans*-caused arthritic inflammation. Int Immunopharmacol 5 (6): 1049-56
- [81] Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, et al. (1994) Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. Farmaco 40 (11): 709-12
- [82] Villar A, Gasco MA, Alcaraz MJ (1987) Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation. J Pharm Pharmacol 39 (7): 502-7
- [83] Beil W, Birkholz C, Sewing KF (1995) Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. Arzneimittelforschung 45 (6): 697-700
- [84] Shin JE, Kim JM, Bae EA, et al. (2005) *In vitro* inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. Planta Med 71 (3): 197-201
- [85] Huk I, Brovkovich V, Nanobash VJ, et al. (1998) Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. Br J Surg 85: 1080-5
- [86] Birt DF, Hendrich S, Weiqun W (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol Therap 90: 157-77

- [87] Andriantsitohaina R (1999) Regulation of vascular tone by plant polyphenols: role of nitric oxide. *Gen Physiol Biophys* 18 (Suppl 1): 3-5
- [88] Duarte J, Jimenez R, O'Valle F, et al. (2002) Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens*
- [89] van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, et al. (1995) Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 755-9
- [90] Ong KC, Khoo HE (1997) Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol.* 29 (2): 121-6
- [91] Ong KC, Khoo HE (2000) Links Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci* 67 (14): 1695-705
- [92] Middleton EJ (1998) Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 439: 175-82
- [93] Berrens L, de la Cuadra B, Gallego MT (1997) Complement inactivation by allergenic plant pollen extracts. *Life Sci* 60 (17): 1497-503
- [94] Damre A S, Gokhale A B, Phadke A S, et al. (2003) Studies on the immunomodulatory activity of flavonoidal fraction of *Tephrosia purpurea*. *Fitoterapia* 74 (3): 257-61
- [95] Kuo YC, Yang LM, Lin LC (2004) Isolation and immunomodulatory effect of flavonoids from *Syzygium samarangense*. *Planta Med* 70 (12): 1237-9
- [96] Wang HB, Yao H, Bao GH, et al. (2004) Flavone glucosides with immunomodulatory activity from the leaves of *Pleioblastus amarus*. *Phytochemistry* 65 (7): 969-74
- [97] Jiang Du, Zhen-Dan He, Ren-Wang Jiang, et al. (2003) Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. *Phytochemistry* 62 (8): 1235-8
- [98] Sokmen M, Angelova M, Krumova E, et al. (2005) *In vitro* antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sci* 76 (25): 2981-93
- [99] Taguri T, Tanaka T, Kouno I (2004) Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol Pharm Bull* 27 (12): 1965-9

[100] Takahashi T, Kokubo R, Sakaino M (2004)

Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*.
Lett Appl Microbiol 39 (1): 60-4

[101] Wei F, Ma SC, Ma LY, et al. (2004) Antiviral flavonoids from the seeds of *Aesculus chinensis*. J Nat Prod 67 (4): 650-3

[102] Yadava RN, Tiwari L (2005) A potential antiviral flavone glycoside from the seeds of *Butea monosperma* O. Kuntze. J Asian Nat Prod Res 7 (2): 185-8

[103] Gonçalves JLS, Leitão SG, Delle Monache F (2001) *In vitro* antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (*Verbenaceae*) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. Phytomedicine 8 (6): 477-80

[104] Serkedjieva J, Ivancheva S (1998) Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. J Ethnopharmacol 64 (1): 59-68

[105] Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, et al. (1993)

Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet 342: 1007-11

[106] Nair S, Gupta R (1996) Dietary antioxidant flavonoids and coronary heart disease. J Assoc Physicians India 44: 699-702

[107] Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, et al. (1997)

Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. Am J Epidemiol 146: 223-30

[108] Starvic B (1984) Mutagenic food flavonoids. Fed Proc 43 (9): 2454-8

[109] Yang CS, Landau, JM, Huang MT, et al. (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Ann Rev Nutr 21: 381-406

[110] Zhu BT, Ezell ET, Liehr JG (2001) Catechol-o-methyl transferase catalysis rapid O-methylation of mutagenic flavonoids.

Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity *in vivo*. J Biol Chem 269: 292-9

- [111] Dunnick JK, Hailey JR (1992) Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundam Appl Toxicol* 19: 423-31
- [112] Duthie SJ, Collins AR, Duthie GG, et al. (1997) Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutat Res* 393 (3): 223-31
- [113] Kato K, Mori H, Fujii M, et al. (1984) Lack of promotive effect of quercetin on methylazoxymethanol acetate carcinogenesis in rats. *J Toxicol Sci* 9: 319-25
- [114] Plakas SM, Lee TC, Wolke RE (1985) Absence of overt toxicity from feeding the flavonol, quercetin
- [115] Lipinski C, Lombardo F, Dominy B, Feeney P (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 23: 3- 25
- [116] Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed.Pharmacother* 56: 276-82
- [117] DeFeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K (2003) *Ginkgo biloba* extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17: 405-17
- [118] Santos-Buelga C., Scalbert A.
Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health, *J. Sci. Food Agric.* 80, 2000, pp. 1094-1117
- [119] Mol J., Grotewold E., KOES R. How genes paint flowers and seeds, *Trends Plant Sci.* 3, 1998, 212-217.
- [120] Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J. *Fruit phenolics*, CRC Press, Boca Raton, 1990,378p.
Tomas-Barberan F.A.
Capillary electrophoresis: a new technique in the analysis of plant secondary metabolites, *phytochem. Anal.* 6, 1995, pp. 177-192.
- [122] Hostettmann, K., Marston, A., and Hostettmann, M., *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural product isolation*, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, 1998.

[123] Markham, K., Isolation techniques for flavonoids, in *The Flavonoids*, Harborne, J.B., Mabry, T.J., and Mabry, H., Eds., Academic Press, New York, **1975**.

[124] Markham, K.R. (**1982**).

Technique of flavonoides identification, Academic press, London.

[125] Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (**1970**).

The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.

[126] Berthillier, A. (**1972**).

La chromatographie et ses applications», Dunod paris.

[127] Kuhnie G. Investigation of flavonoids and their in vivo metabolite forms using tandem mass spectrometry.

In: *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans C., Packer L., eds, Marcel Dekker Dekker, New York, **2003**, pp. 145-163.

[128] Harborne J.B. *plant phenolics. Methods in plant Biochemistry*, Vol 1,

Academic Press, London, **1989**, 552p.

[128] Markham, E. R. et Geiger, H. (**1994**), H^1 NMR Spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In *Flavonoids*, Harborne, J. B.

(**1993**), Chapman and Hall, London.

[129] Gunther, H. (**1994**). *La spectroscopie de RMN*, Masson, Paris

[130] Jurd, L. and Horowitz, R. (**1962**).

Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.

[131] Markham, K.R. and Mabry, T.J. (**1968**). *Phytochemistry.*, **7**, pp. 1197.

[132] Ribereau-Gayou, J.B. (**1968**). *The phenolic compounds of vegetals*, Edition Dunod, Paris.

[133] Horhammer, L. and Hänsel, R. (**1952**). *Arch. Pharm.*, **285**, 438.

[134] Jurd, L. and Geissman, T.A. (**1956**). *J. Org. Chem.*, **21**, 1395.

[135] Gregory M. Polzin, Stephen B. Stanfill, Candace R. Brown, David L.

Ashley, Clifford H. Watson, « Determination of eugenol, anethole, and coumarin in the mainstream cigarette smoke of Indonesian clove cigarettes », dans *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, n° 10, **2007**, p. 1948-1953

[136] Alan W. Archer, « Determination of cinnamaldehyde, coumarin and cinnamyl alcohol in cinnamon and cassia by high-performance liquid chromatography », dans *Journal of Chromatography*, vol. 447, **1988**, p. 272-276

II.1. PLACE DANS LA SYSTEMATIQUE (botanique) :

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure [1] synthétisée dans le **tableau II.1.**

Tableau II.1: *classification botanique de l'espèce étudiée*

Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Astérales
Famille	Compositae
Sous-famille	Tubiflores
Tribu	Cynarées
Genre	<i>Centaurea</i>
Espèces	<i>africana Lamk</i> , variété <i>africana</i> (Bonnet) M.

La famille des composées fait partie des plantes médicinales qui ont acquis une très grande importance, et constitue la plus vaste subdivision du règne végétal.

Cette famille comprend en effet 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces [2]. Cette immensité systématique est disponible par sa répartition à travers tous les continents et se caractérise par son pouvoir d'adaptation aux milieux climatiques et pédologiques les plus divers.

Parmi les 1000 genres de cette famille le genre *Centaurea* qui compte environ 700 espèces et 600 sous-espèces [3]. Il est répandu aussi bien sur le territoire algérien qu'en Europe, le bassin méditerranéen, l'ouest de l'Asie et le continent américain. Ce genre est présent en Algérie en majorité dans l'est et le sud-est dont 7 espèces sont sahariennes [4].

Les centaurées ont été amplement étudiées et restent un objet de plusieurs études et recherches phytochimiques qui ont révélé la présence de flavonoïdes [5], de composés acétyléniques [6], de lactones sesquiterpéniques [7], d'alcaloïdes [8], et de stéroïdes [9].

Les espèces du genre *Centaurea* possèdent plusieurs vertus thérapeutiques notamment des propriétés stimulantes, toniques [10,11], antidiabétiques [12,13], diurétiques [14] et antirhumatismales [15].

II.2. DESCRIPTION DE L'ESPECE :

Les centaurées sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, à feuilles alternes. Comme pour toutes les composées, les fleurs, ou fleurons, sont disposées en capitule, entourées d'un involucre de bractées. Dans le cas des centaurées, les fleurs sont toutes tubulées, celles de la périphérie (souvent stériles) s'ouvrant largement en cinq lobes. Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. L'involucre est composé de bractées inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuses. Leur observation est essentielle pour déterminer les espèces. Les fruits sont des akènes portant une aigrette assez courte, notamment pour les fruits du centre.

➤ *Centaurea africana* Lamk, variété *africana* (Bonnet) M.

C'est une plante vivace, ferme, dressée et puissante 60-150cm, les feuilles grandes et vertes à fleurs jaune (**figure II.1**). Elle est endémique pour l'Algérie et la Tunisie. [1].



Figure II.1 : Photo des feuilles et des fleurs de l'espèce *Centaurea africana*

II.3. TRAVAUX ANTERIEURS :

Centaurea africana est une espèce végétale très peu étudiée. En effet, jusqu'à ce jour, elle n'a fait l'objet que d'une seule étude phytochimique qui a permis d'isoler et d'identifier dix huit produits naturels. **SEGHIRI Ramdane** qui est le premier à étudier cette plante, a identifié pour la première fois un composé qu'il nomma «**Africanine**», ses travaux ont été effectués sur les extraits chloroforme et acétate d'éthyle et ont mené à l'isolement et la détermination structural de :

- huit flavonols (voir **tableau II.2**) dont cinq sous forme d'aglycones parmi lesquels un, original comme produit naturel et trois hétérosides dont un acylé d'originalité absolue.
- trois flavones méthoxylées (voir **tableau II.3**)
- Trois esters phénoliques et un acide phénolique
- Deux stérols dont un glucosylé.
- Deux triterpènes (α et β -amyrine en mélange 36% et 64%).

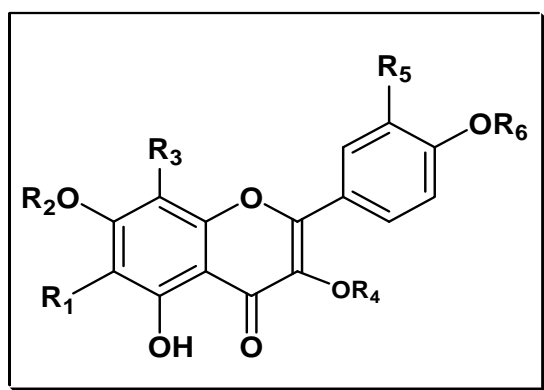


Tableau II.2: Les flavonols isolés de *Centaurea africana*

R1	R2	R3	R4	R5	R6	Composés
OCH ₃	H	H	CH ₃	OH	CH ₃	5,7,3'-trihydroxy 6, 3,4'-trimethoxyflavone (Centaureidine)
OH	CH ₃	OH	CH ₃	OH	CH ₃	5,6,8,3'-tetrahydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone
H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	CH ₃	5,3'-dihydroxy-3,7,8,4' tetraméthoxyflavone ou 3'-hydroxyflindulatine ou 3,7,8,4'-tetramethyl gossypetine
OCH ₃	H	H	CH ₃	OCH ₃	H	5,7,4'-trihydroxy-3,6,3'-trimethoxyflavone (Jaceidine)
H	H	OCH ₃	H	OH	H	8-méthylgossypétine ou corniculatusine
OCH ₃	H	OH	CH ₃	Orha	CH ₃	5,7,8-trihydroxy-3'-O- rhamnosylflavone
OCH ₃	glu	H	CH ₃	OH	CH ₃	7-O-β-D-glucopyranosyl centaureidine
OCH ₃	X	H	CH ₃	OH	CH ₃	7-(6''-sinapyl-O-β-D- glucopyranosyle) centaureidine (AFRICANINE)

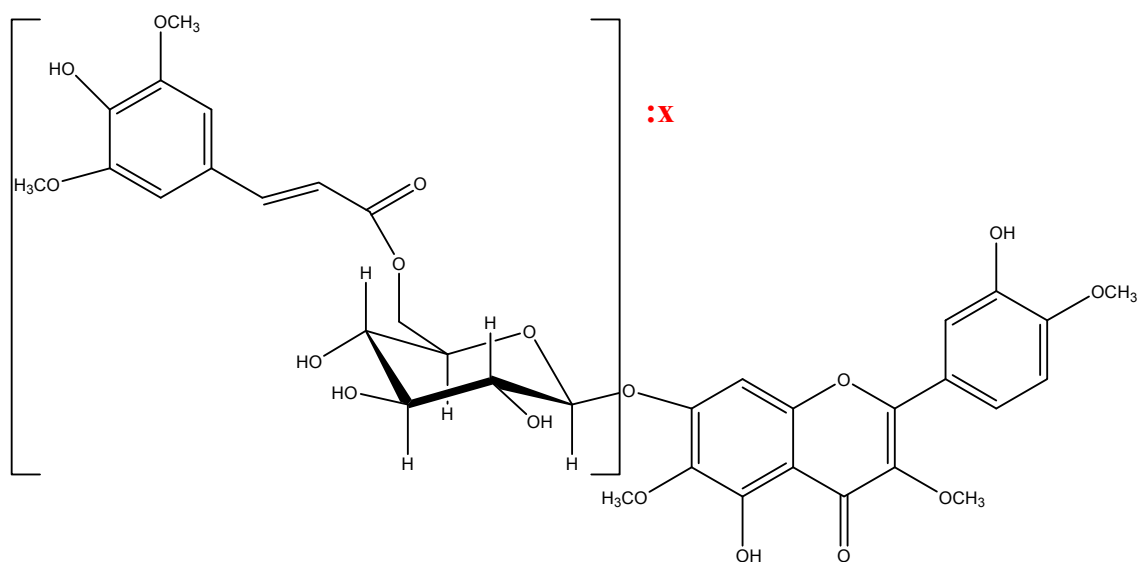


Figure II.2 : AFRICANINE

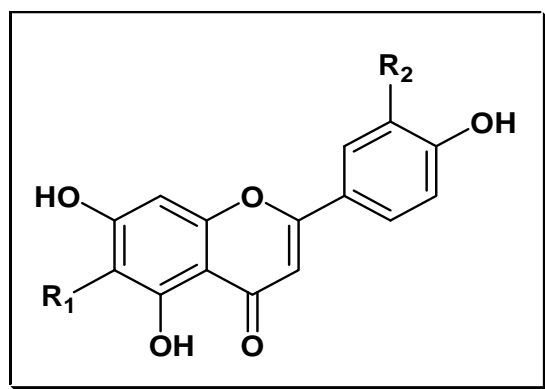


Tableau II.3: les flavones séparés de *Centaurea africana*

R1	R2	Composés
H	OCH ₃	5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone (CHRYSOERIOL)
OCH ₃	H	5,7,4'-dihydroxy-6-methoxyflavone (<u>Hispiduline</u>)
OCH ₃	OH	3',4',5,7-tetrahydroxy-6-methoxyflavone (népétine)

II.4. RECOLTE DE LA MATIERE VEGETALE :

L'espèce *Centaurea africana* a été récoltée durant le mois de juin 1998, des montagnes de la région d'El-kala de Taref.

La détermination botanique de cette espèce a été réalisée par le professeur Kaabache (Département des sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas, Setif).

La plante a été séchée pendant plusieurs jours à l'abri de la lumière directe du soleil, pesée et broyée grossièrement.

II.5. EXTRACTION DE CENTAUREA AFRICANA :

La poudre du matériel végétal (feuilles et fleurs, 1,8 kg) est mise à macérer à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau ; 70/30 ; v/v).

Cette macération est répétée 4 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures. Après concentration à une température n'excédant pas 35°C, l'extrait éthanolique dilué avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière sèche, est additionné d'acétate de plomb $[(CH_3COO)_4Pb]$ pour éliminer la chlorophylle par précipitation. Après filtration, la solution est devenue rouge-brune. Cette dernière a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. La figure II.3 résume les différentes étapes de l'extraction jusqu'à l'obtention des extraits bruts.

Les trois phases organique ainsi obtenus (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre, puis filtrées, concentrés à sec sous pression réduite, pesées et les rendements sont donnés dans le tableau II.4.

Tableau II.4: Rendements des extraits

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement
1800g	Chloroforme	11	0,61%
	Acétate d'éthyle	18	1%
	<i>n</i> -butanol	100	5,6%

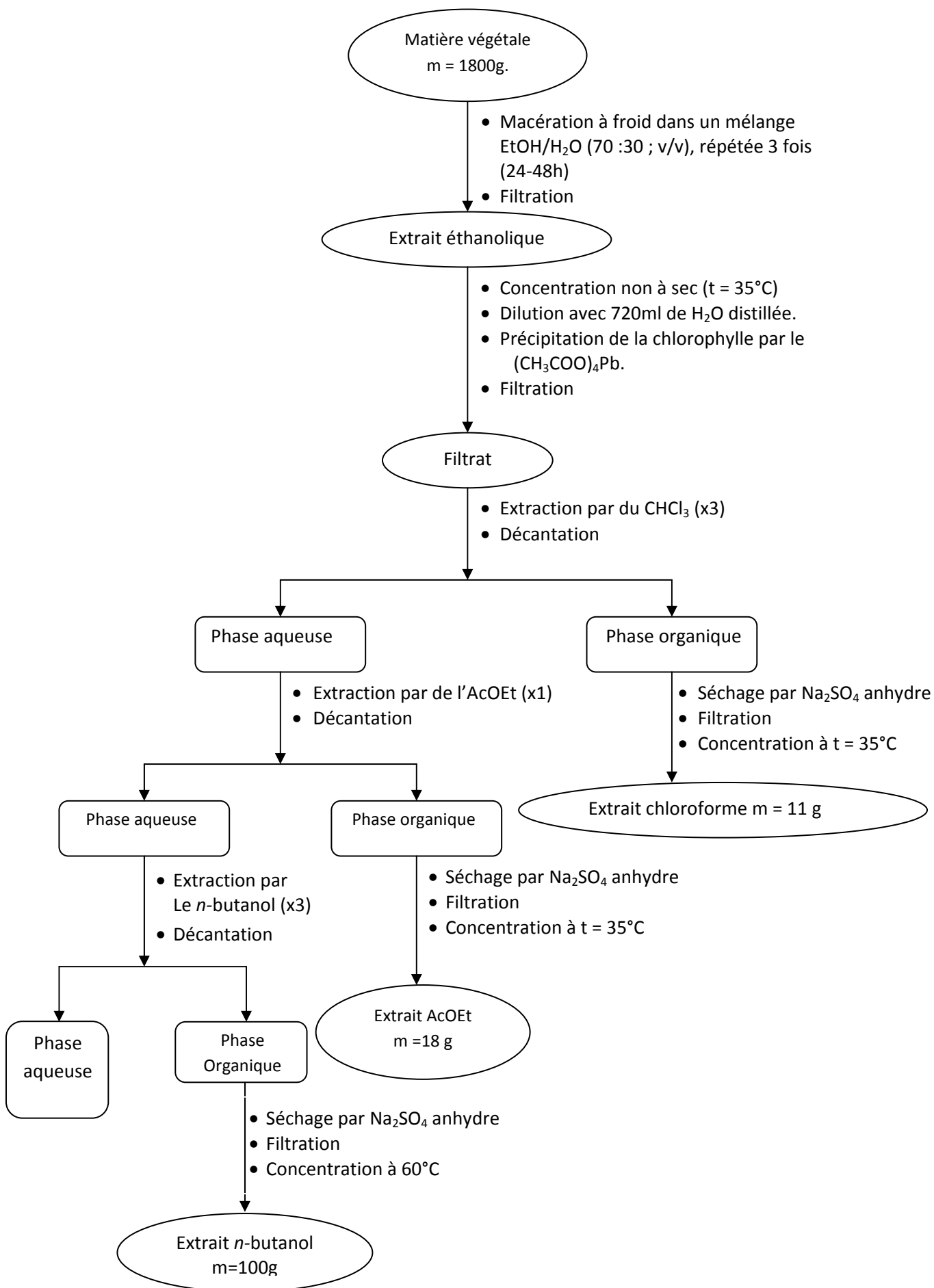


Figure II.3 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de *Centaurea africana*

II-6- TRAVAUX PERSONNELS :

Nos travaux expérimentaux concernent principalement l'étude phytochimique de *C. africana*. Ils consistent à identifier le maximum de composés afin d'élargir et d'approfondir la connaissance phytochimique de cette plante.

L'objectif phytochimique correspond, en effet, à l'isolement et à la détermination structurale des molécules naturelles de *C. africana*. Pour ce faire, nous avons procédé à l'extraction, au fractionnement et à la purification de différents phytoconstituants en utilisant diverses techniques de chromatographie. Les métabolites secondaires isolés sont par la suite analysés et caractérisés par des techniques de spectrométrie de masse (SM), de spectrophotométrie UV-visible, et de spectroscopie (RMN monodimensionnelle, RMN bidimensionnelle homonucléaire et hétéronucléaire).

II.6.1 : Séparation et purification des composants de l'extrait *n*-butanol de *C. africana* :

II.6.1.1. Matériels et méthodes utilisés :

- **L'extrait *n*-butanol de la plante (*C. africana*) : m=18g**

- **Solvant utilisés :**

Chloroforme

Méthanol

Acétone

- **Révéléateur à base d'acides : AcOH 80%**

H₂O 16%

H₂SO₄ 04%

- **Chromatographie analytique sur couche mince (CCM) :**

Pour l'analyse de l'extrait, des fractions et des produits séparés (afin d'orienter notre travail), la silice utilisée comme phase stationnaire est : La Silice 60 F₂₅₄ Merck, 0,1 mm sur support d'aluminium (20 x 20 cm).

- **Chromatographie d'adsorption sur colonne ouverte(CC) :**

Une colonne ouverte (1000×20mm) terminée par une ampoule d'1l, le gel de silice est de granulométrie moyenne : 0,063-0,200 mm (70-230 mesh), Merk H60, réf. 7741.

➤ **Chromatographie préparative sur couche mince (CCM prép.) :**

Les chromatographies préparatives sur couche mince sont effectuées sur des plaques en verre (20 x 20cm) pré-étalées de gel de silice Merk 60F₂₅₄ de 0,25 mm d'épaisseur.

II.6.1.2. Méthodologie générale :

L'extrait *n*-butanol est soumis à des fractionnements successifs par les différentes méthodes chromatographiques conduisant à l'isolement de molécules pures.

La séparation chromatographique a débuté par une recherche sur plaques analytiques, du meilleur système d'élution. Les tests effectués ont montré que la meilleure séparation est obtenue avec le système (CHCl₃/MeOH) dans les proportions 6/1. La plaque CCM test révélée est représentée dans la **figure II.4**.

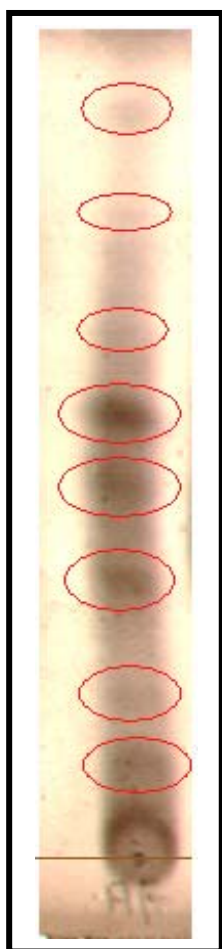


Figure II.4 : *Plaque CCM éluee avec le système (CHCl₃/MeOH : 6/1) puis révélée.*

*a). Fractionnement de l'extrait *n*-butanol :*

On se basant sur les résultats de la chromatographie analytique, on a pu constater que cette plante était très riche en métabolites secondaires de ce fait on a travaillé sur 18 grammes de l'extrait *n*-butanol.

Un premier fractionnement de l'extrait a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur colonne.

L'extrait *n*-butanol dissout dans du méthanol est mélangé à une petite quantité de gel de silice (de la colonne), l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur la colonne de gel de silice, préparée dans le chloroforme. La masse de silice utilisée correspond approximativement à 400g. L'élution a été réalisée par du chloroforme enrichi progressivement en méthanol. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couches minces, qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes adéquats, ont été visualisées à la lumière du jour et sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées et chauffées pendant 3 mn à 100 °C. Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau II.5**.

Tableau II.5: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroforme de *Centaurea africana*

LOTS	FRACTIONS	SYSTEME D'ELLUTION		Poids de la fraction (mg)
		% CHCl ₃	% MeOH	
1	F1	100	0	4,5
2-6	F2	100	0	64,82
7-11	F3	100	0	22,34
12-32	F4	100	0	20,03
33-53	F5	99	1	4,17
54-76	F6	99	1	127,61
77-79	F7	99	1	98,6
80-102	F8	96	4	13,20
103-110	F9	96	4	56,73
111-135	F10	96	4	165,44
136-149	F11	94	6	82,74
150-218	F12	94	6	150,26
219-228	F13	90	10	56,68
229-242	F14	90	10	70,35
243-256	F15	87	13	86,3
257-270	F16	87	13	41,18
271-280	F17	85	15	238,1
281-296	F18	85	15	251,04
297-299	F19	85	15	197,10
300-304	F20	83	17	582,3
305-310	F21	83	17	396,25
311-328	F22	80	20	245,18
329-347	F23	80	20	570,4

348-355	F24	78	22	631,22
356-367	F25	75	25	1210,5
368-381	F26	75	25	1120,1
382-385	F27	75	25	750,32
386-390	F28	70	30	1138,9
391-440	F29	70	30	904,0
441-450	F30	65	35	824,32
451-457	F31	65	35	660,07
458-468	F32	60	40	550,20
469-478	F33	60	40	587,91
479-485	F34	55	45	600,50
486-493	F35	55	45	2040,56
494-524	F36	50	50	2310
525-540	F37	40	60	1453,2

A l'issue de la chromatographie sur colonne, les fractions obtenues sont analysées par CCM dans le but de :

- réunir les fractions qui présentent le même profil
- déterminer un nouveau support chromatographique ainsi qu'un nouveau système de solvant susceptible de mieux séparer les composés.

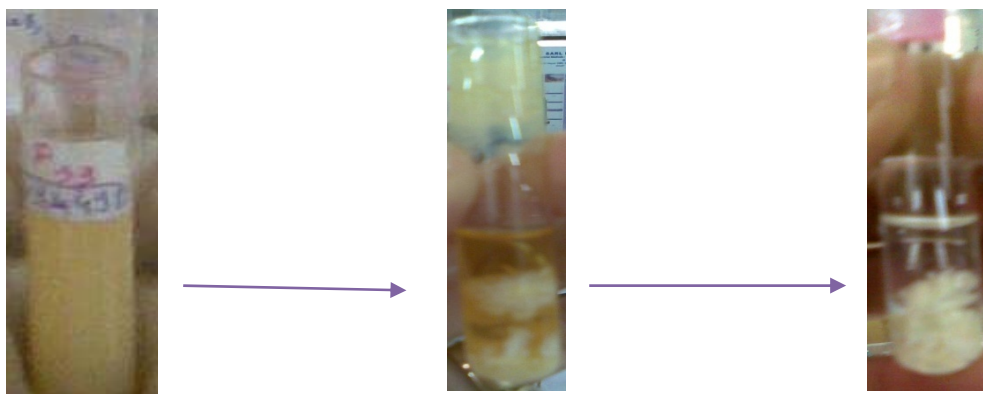
La complexité de l'extrait et la difficulté de certaines séparations, nous obligent à diversifier les systèmes chromatographiques.

6). Etude des fractions F17, F20:

- Petit rappel sur la recristallisation :

La recristallisation est une méthode de purification utilisée dans la plupart des cas pour les composés pouvant se présenter sous forme de cristaux. Elle est utilisée même pour des petites quantités mais n'est pas utilisable avec les huiles et d'autres composés liquides. Le principe de cette technique est basé sur la solubilité des mélanges à séparer. En effet, lorsque l'on veut isoler ou purifier un composé présent dans un mélange par cette technique, la première étape

consiste à trouver le meilleur solvant de recristallisation. On appelle meilleur solvant de recristallisation, le solvant dans lequel le produit à cristalliser est peu soluble à froid et très soluble à chaud alors que les impuretés sont solubles à chaud et à froid. Par chauffage suivi immédiatement de filtration, on élimine une partie des impuretés insolubles à chaud. Le refroidissement permet ensuite au produit de cristalliser. La filtration suivante permet d'éliminer le solvant et la partie des impuretés solubles à froid.



➤ Les fractions F17 et F20 ont été recristallisées de la même façon dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (très peu de chloroforme), cette recristallisation a mené à la formation de cristaux blancs, qui après lavage successif au méthanol, ont donné un produit pur chaque-un.

- F17 —————> Produit pur **AM1** (40mg) dont le R_f est de 0,41 dans le système chloroforme/méthanol (9,5 : 0,5).

Donne une coloration noir violette sous UV (350nm) et jaune après révélation par l'ammoniaque.

- F20 —————> Produit pur **AM2** (60mg) dont le R_f est de 0,33 dans le système chloroforme/méthanol (9,5 : 0,5).

Donne une coloration noir violette sous UV (350nm) et jaune après révélation par l'ammoniaque (sur plaque CCM).



Figure II.5 : *Plaque analytique des produits AM1 et AM2 révélée par l'ammoniaque.*

c). Etude de la fraction F10 :

La plaque analytique de cette fraction donne 4 spots sous UV (350nm) après élution par le système chloroforme/méthanol (9,8 : 0,2), l'un des spots est très concentré facile à séparer et donne une coloration jaune après révélation par l'ammoniaque, c'est à ce dernier que je me suis intéressée.

Cette fraction a subi une séparation sur plaque de gel de silice (plaques préparatives) avec le même système, on obtient un produit pur AM3.

- F10 —————>Produit pur **AM3** (8mg)

Donne une coloration noir violette sous UV (350nm).

d). Etude de la fraction F15 :

La plaque analytique de cette fraction donne 6 spots sous UV (350nm) après élution par le système chloroforme/méthanol (9,5 : 0,5), l'un des spots est facile à séparer.

Cette fraction a subi une séparation sur plaque de gel de silice (plaques préparatives) avec le même système, on obtient un produit pur **AM4**.

- F15 —————>Produit pur **AM4** (15mg):

Donne une coloration jaune verte sous UV à **350nm**.

Pas de coloration jaune après révélation par l'ammoniaque.

e). Etude de la fraction F7 :

La plaque analytique de cette fraction donne 4 spots sous UV (350nm) après élution par le système chloroforme/méthanol (9,8 : 0,2), l'un des spots est facile à séparer.

Cette fraction a subi une séparation sur plaque de gel de silice (plaques préparatives) avec le même système, on obtient un produit pur **AM5**.

- F7 —————▶Produit pur **AM5** (12,6mg):
Donne une coloration bleue sous UV à **350nm**.
Donne une coloration bleue verte sous UV à **254nm**.
Pas de coloration jaune après révélation par l'ammoniaque.

f). Etude de la fraction F6:

La plaque analytique de cette fraction donne 5 spots sous UV (350nm) après élution par le système chloroforme/méthanol (9,8 : 0,2).

Cette fraction a subi une séparation sur plaque de gel de silice (plaques préparatives) avec le même système, on obtient deux produits purs **AM6, AM7**.

- F6 —————▶Produit pur **AM6** (20,2mg):
Donne une coloration bleue sous UV à **350nm** et à **254nm**.
Pas de coloration jaune après révélation par l'ammoniaque.
- ▶Produit pur **AM7** (10mg):
Donne une coloration bleue sous UV à **350nm** et à **254nm**.
Pas de coloration jaune après révélation par l'ammoniaque.

II.6.2.Conclusion :

Les travaux de séparation chromatographiques ont permis l'obtention à l'état pur et natif de sept produits.

Nous n'avons pu obtenir que la structure de deux d'entre eux (par manque de moyens): **AM1, AM2**.

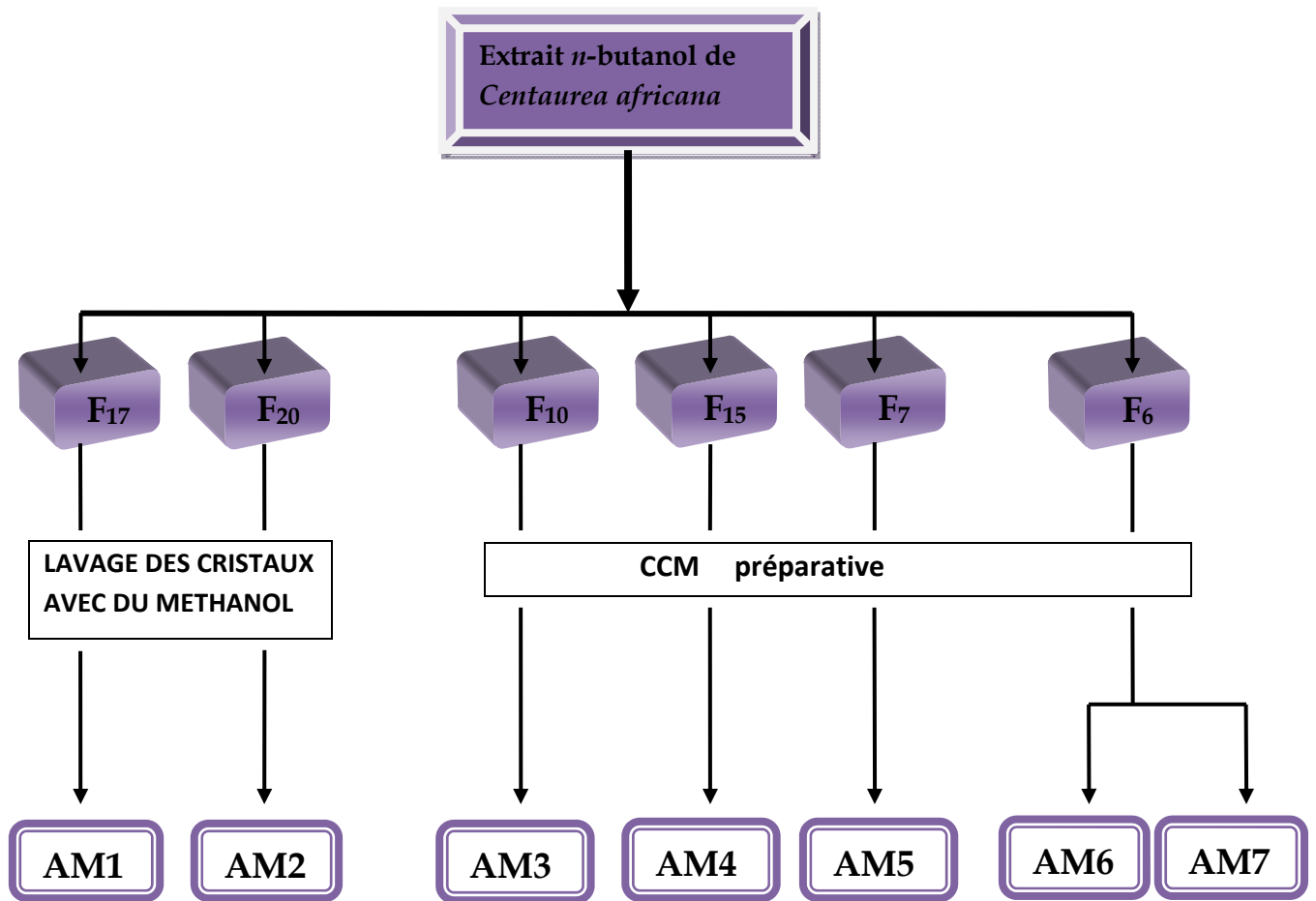


Figure II.6 : Résumé des travaux chromatographiques.

Références Bibliographiques :

- [1]. Quezel, P. and Santa, S. (1963), Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1 C.N.R.S. Paris.
- [2]. Menz, J., Winkelmann, R. K. (1987), Contact dermatitis, **16**, 169.
- [3]. Trease, G. F. and Evans, W. C. (1983), Pharmacognosy, 225, 514, Bailliére, Tindall, London, Philadelphia, Toronto, Mexico City, Rio De Janero, Tokyo, Hong Kong.
- [4]. Quezel, P. et Santa, S. (1963), Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome II, CNRS, Paris.
- [5]. Flamini, G., Bulleri, C., Bulleri, C., Morelli, I. and Manunta, A. (2000), A New Flavonoid Glycoside from *Centaurea horrida*, J. Nat. Prod., **63**, 622-663.
- [6]. Bohlman, F., Burkhardt, T. and Zdero, C. (1973), Naturally Occuring Acetylenes, Academic Press, London, 452.
- [7]. Fortuna, A. M., Riscala, E. C., Catalan, C. A. N., Gedris, T. E. and Herz, W. (2001), Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*, Biochemical Systematics and Ecology, **29**, 967-971.
- [8]. Ahmed, Z. F., Hammoud, F. M., Rizk, A. M. and Ismail, S. L. (1970), Planta Med., **18**, 227-231.
- [9]. Picher, M., Savane, T. and Ampara, T. J. (1984), J. Nat. Prod., **47**, 184-185.
- [10]. Buruk, K., Sokmen, A., Aydin, F. and Murat Erturk, M. (2006), *Fitoterapia*, **77**: 388–391.
- [11]. Skliar, M. I., Toribio, M.S. and Oriani, D.S. (2005), *Fitoterapia*, **76**: 737– 739
- [12]. Font Quer, P. (1995), Plantas Medicinales. El Dioscorides Renovado. Editorial Labor SA; 851.
- [13]. Yayli, N., Ahmet Yas, A., Canan Gulec, C., Usta, A., Kolayly, S., Cos_kunc, E. K. and S_Engui, (2005), *Phytochemistry*, **66**: 1741–1745.
- [14]. Kumarasamy, Y, Middleton, M., Reid, R. G., Nahar, L. and Sarker, S.D. (2003), *Fitoterapia* **74**: 609–612.
- [15]. R. Kulikowski, R. R. and Mascarenhas, J. P. (1978). *Plant Physiol.* **61**, 575-580

III.1 : Identification des produits isolés de la phase n-butanol de

C.africana :

- Pour l'identification et l'élucidation structurale des différents composés isolés on a eu recours aux différentes méthodes spectroscopiques telles que l'UV-Visible, la RMN-¹H, et l'expérience de la RMN 2D (COSY) ainsi qu'à l'hydrolyse acide pour l'identification des sucres.

III.1.1: Elucidation structurale du composé le composé AM1 :

- Le spot de ce composé sur plaque analytique donne une coloration jaune après révélation avec l'ammoniaque, on en déduit que c'est un flavonoïde.
- La fluorescence noire-violette de ce flavonoïde sous lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

➤ Spectroscopie de RMN ¹H :

L'examen du spectre RMN ¹H (spectre n° III.1) ainsi que ces spectres étalés (n° III.1.1 et III.1.2) montre :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 13$ ppm que l'on ne peut attribuer qu'au proton d'un OH en position 5 (OH-5).
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 9,45$ ppm attribuable au proton d'un OH aromatique.
- Une para substitution du noyau B (OR-4') déduite de :

L'existence à $\delta = 7,97$ ppm, d'un doublet ($J = 8,8$ Hz) d'intégration 2H, attribuable aux protons H-2' et H-6' et un autre doublet avec la même constante de couplage et la même intégration 2H à $\delta = 7,06$ ppm, attribuable à H-3' et H-5'.

- Une substitution du noyau A en position 7 par un OR (OR-7) déduite de :

La présence d'un doublet ($J=2,1$) d'intégration 1H à $\delta = 6,82$ ppm, attribuable au proton H-8 et un autre doublet d'intégration 1H avec la même constante de couplage à $\delta = 6,47$ ppm attribuable au proton H-6.

« On peut en déduire que le singulet à $\delta = 9,45$ ppm est celui du proton d'un OH en position 4' (OR-4'=OH-4'), ou en position 7 (OR-7=OH-7) ça reste à confirmer par l'examen de la série spectrale UV ».

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,72$ ppm attribuable au proton H-3.

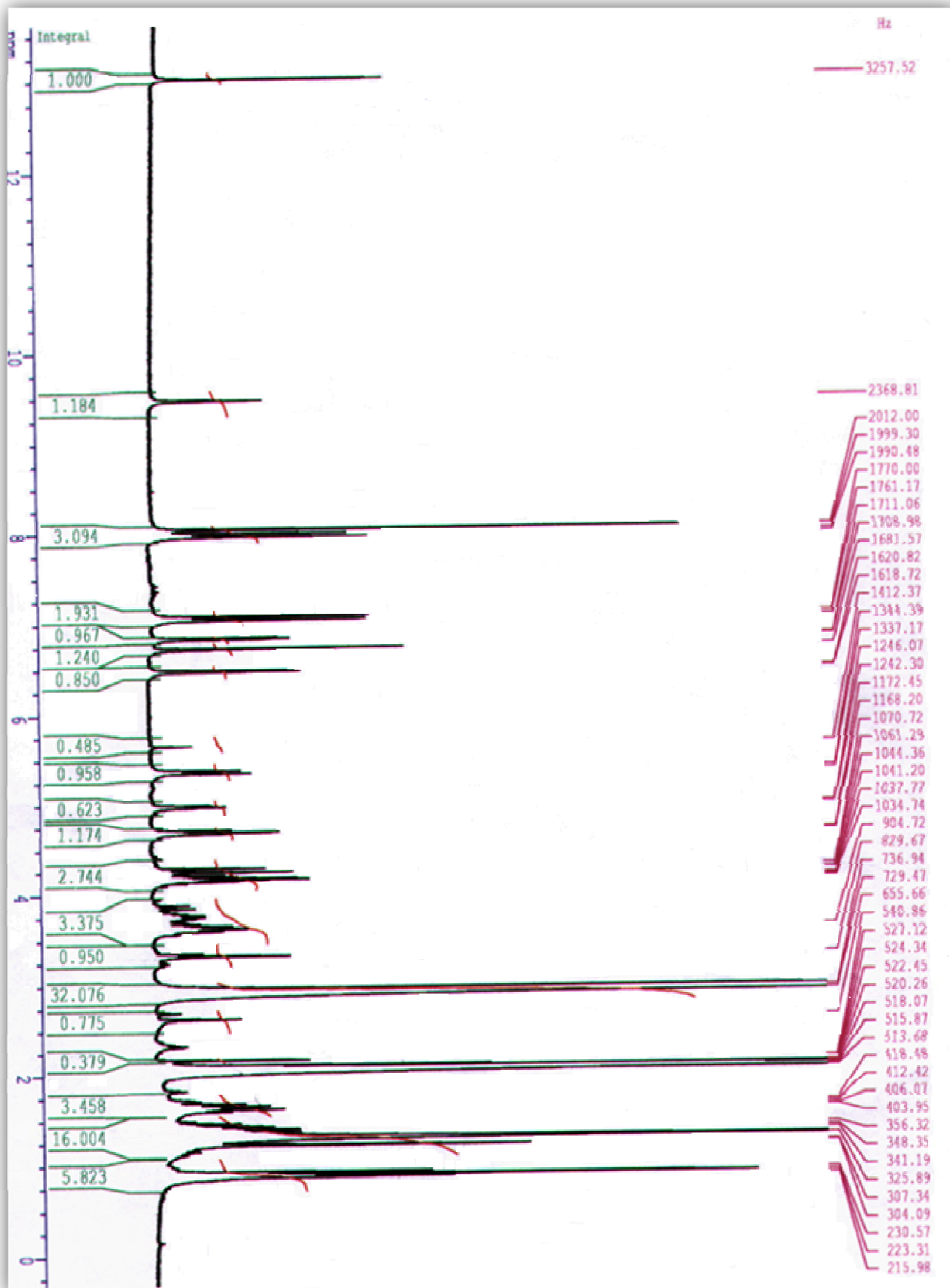
- Présence à $\delta = 5,37$ ppm d'un doublet ($J = 7,2$) d'intégration 1H, caractéristique d'un proton anomérique identifiant une liaison O-sucre, ce sucre est probablement un Glucose ou un Galactose vu la valeur de la constante de couplage.

- Un ensemble de multiplets dans l'intervalle [3,25-5] ppm attribuable par conséquent aux protons du sucre.

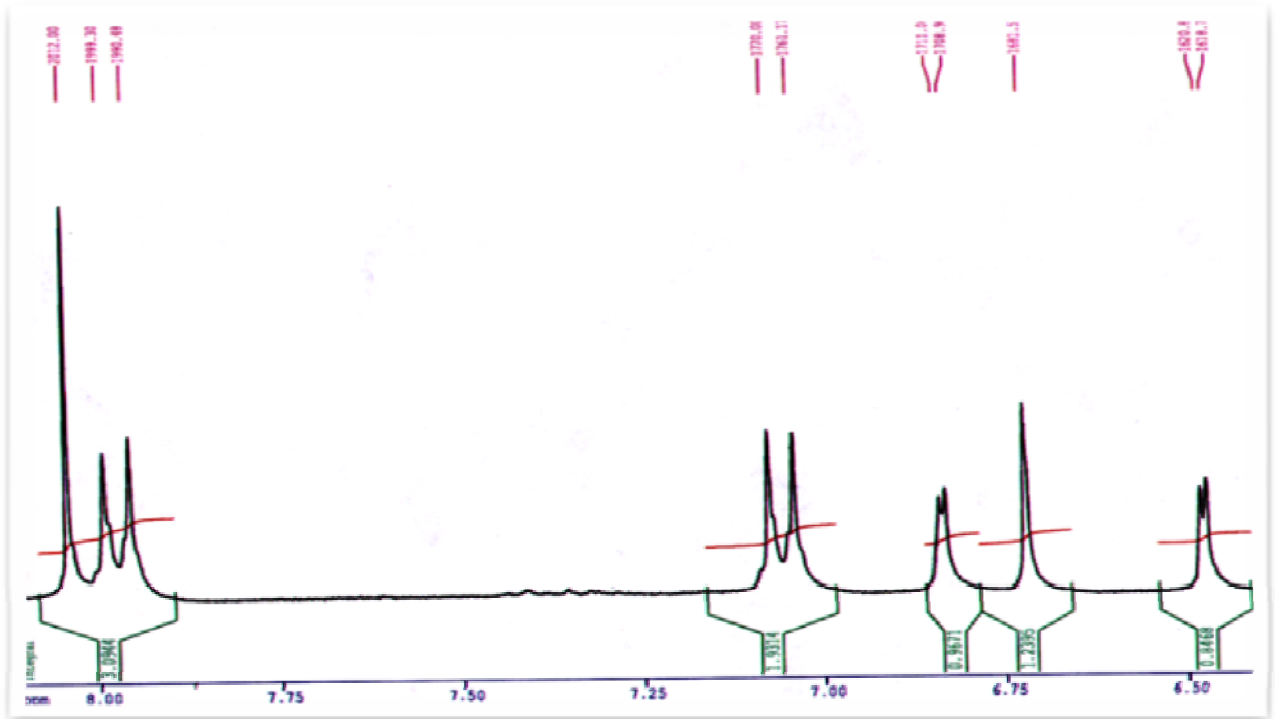
Ces données spectroscopiques sont rassemblées dans le **tableau n° III.1**.

Tableau n° III.1 : Les résultats de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz ; acétone)

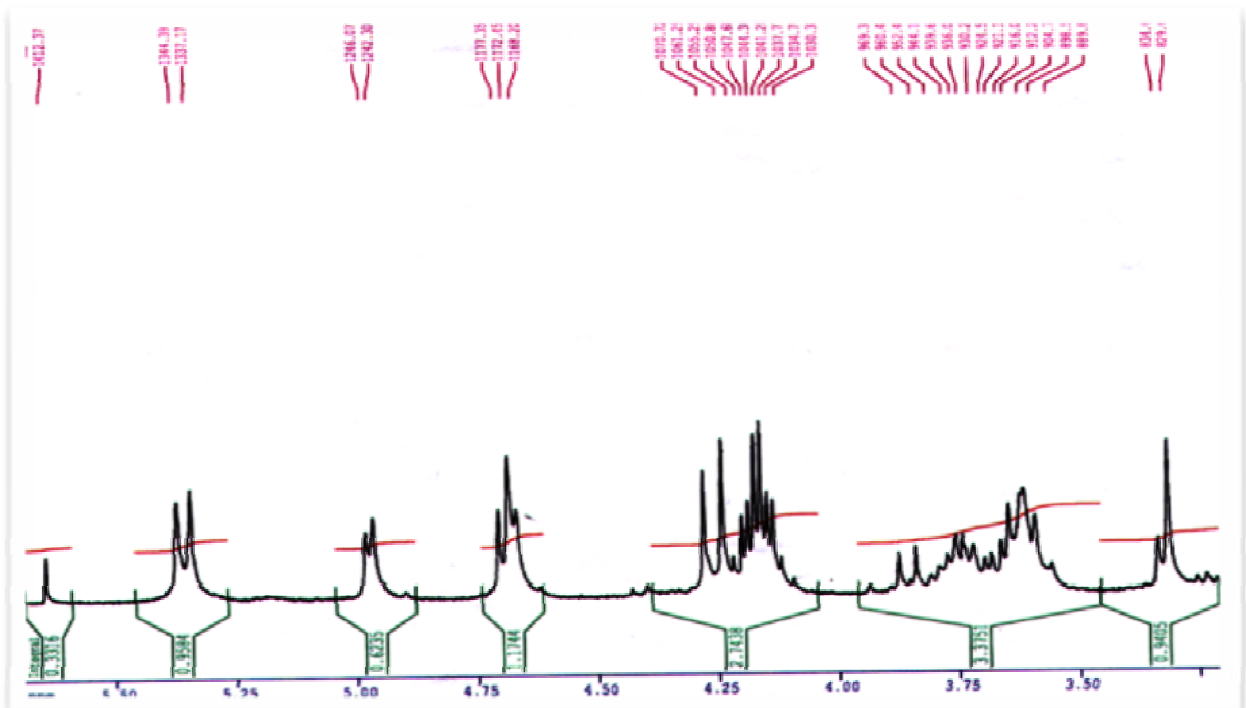
DEPLACEMENT CHIMIQUE Δ (PPM)	INTEGRATION	MULTIPLICITE (JHZ)	ATTRIBUTION
13	1H	<i>s</i>	OH-5
9,45	1H	<i>s</i>	OH
7,97	2H	<i>d</i> (8,8)	H-2'/H-6'
7,06	2H	<i>d</i> (8,8)	H-3'/H-5'
6,82	1H	<i>d</i> (2,1)	H-8
6,72	1H	<i>s</i>	H-3
6,47	1H	<i>d</i> (2,1)	H-6
5,37	1H	<i>d</i> (7,2)	H-1'' (O-sucre)



Spectre n° III.1 : spectre RMN ^1H (250 MHz, Acétone- d_6 , δ ppm) du composé AM1.



Spectre n° III.1.1 : Spectre RMN ^1H étalé de 6,3 à 8,25 ppm du composé AM1



Ces données mènent à la structure partielle suivante :

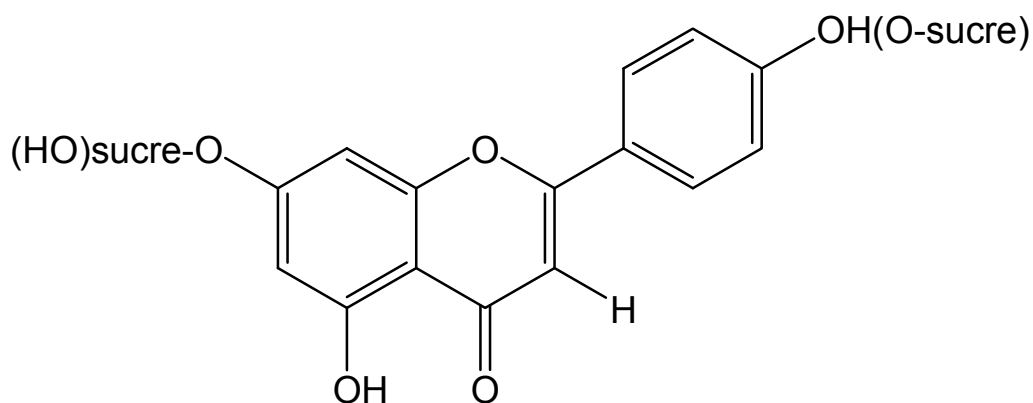


Figure III.1 : Structure partielle du composé AM1

❖ Identification du sucre :

Pour cela on a eu recours à l'hydrolyse acide de l'hétéroside, ensuite on a analysé la phase aqueuse c'est-à-dire le sucre (après extraction) sur une plaque analytique, ces étapes sont expliquées dans ce qui suit.

Hydrolyse acide : On ajoute 2ml d'HCl (2N) à l'hétéroside après l'avoir dilué dans du méthanol, ensuite on réchauffe la solution obtenue dans un bain-marie bouillant (100°C) pendant 120 à 160 minutes.

Extraction : la solution subit des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther éthylique, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol, les extraits obtenus sont par la suite analysés.

Préparation de la phase aqueuse (contenant le sucre) : cette phase est évaporée à sec sous pression réduite, reprise par de l'eau et évaporée à nouveau. On répète plusieurs fois cette opération jusqu'à disparition totale de la réaction acide. Le résidu ainsi obtenu est lavé au méthanol, avant d'être dissout dans l'eau pour analyse.

Préparation de la plaque analytique : on vaporise la plaque de silicagel merck 60F₂₅₄ avec une solution de NaH₂PO₄ (0,2M). On la laisse sécher à l'aire quelques minutes avant de l'activer à 100°C pendant 1 heure.

Analyse : le système d'élution utilisé : Acétone/eau (90/10). On fait deux migrations successives intercalées de séchage à l'aire pendant 1 heure. La révélation se fait par pulvérisation de la plaque au réactif de malonate d'aniline (acide malonique [1g], aniline

[1 cm³], acide phosphorique [3 cm³], éthanol [100 cm³]). Les plaques pulvérisées sont ensuite séchées 5 minutes à 100°C. Les taches apparaissent brunes dans le visible et jaunes en UV.

Le **tableau III.2** montre les valeurs des R_f de sucres témoins

Tableau n° III.2 : R_f des sucres témoins

Les sucres témoins	R _f
(L) Rhamnose	0,88
D (+) -xylose	0,79
L (+) -arabinose	0,66
B-D (+) glucose	0,53
D (+) -galactose	0,33

La plaque analytique est représentée ci-dessous

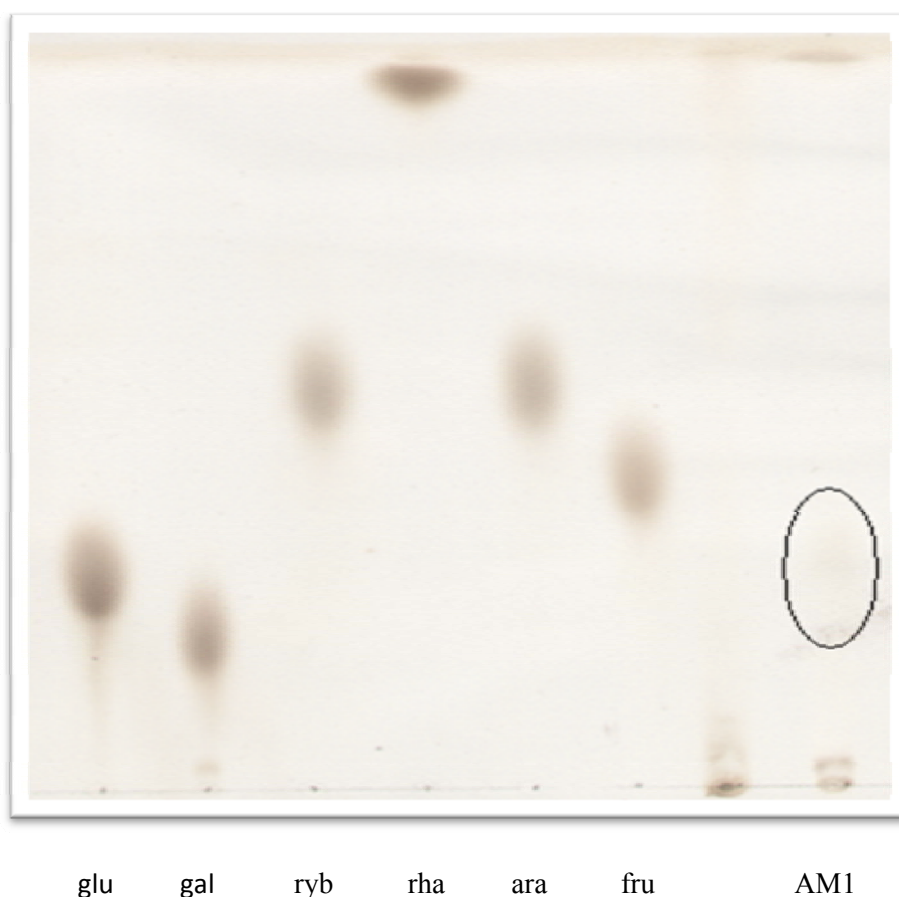
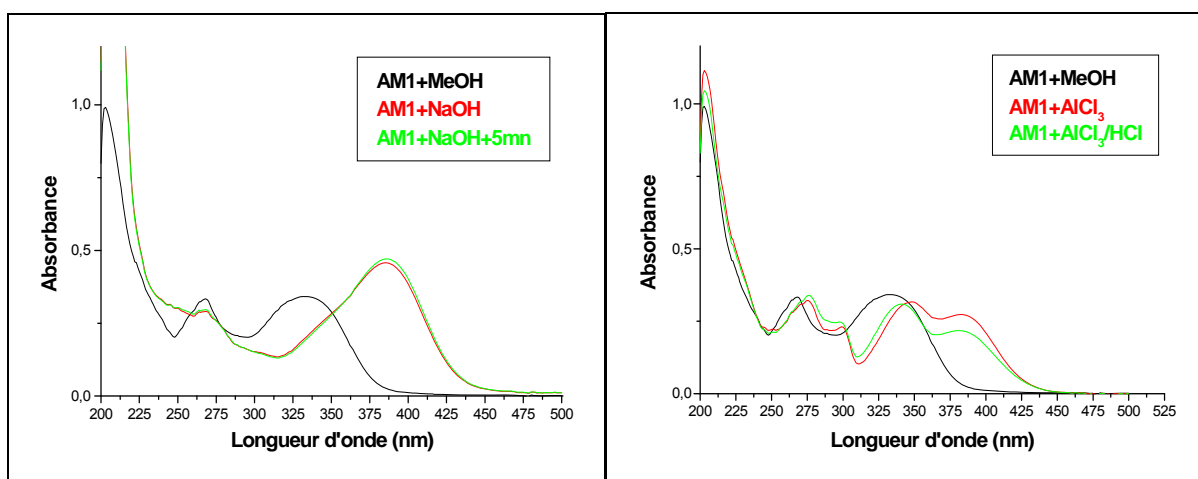
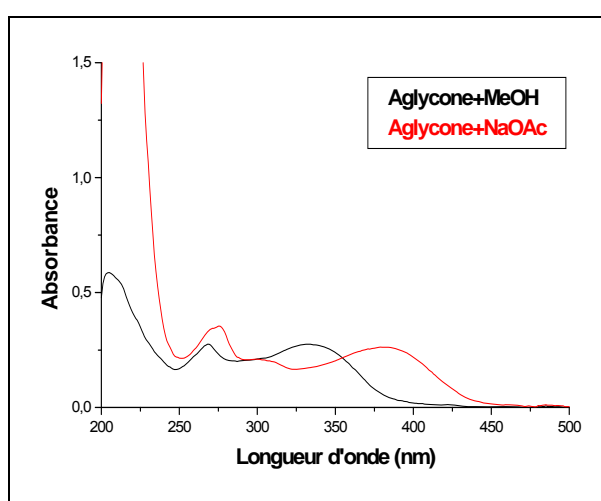
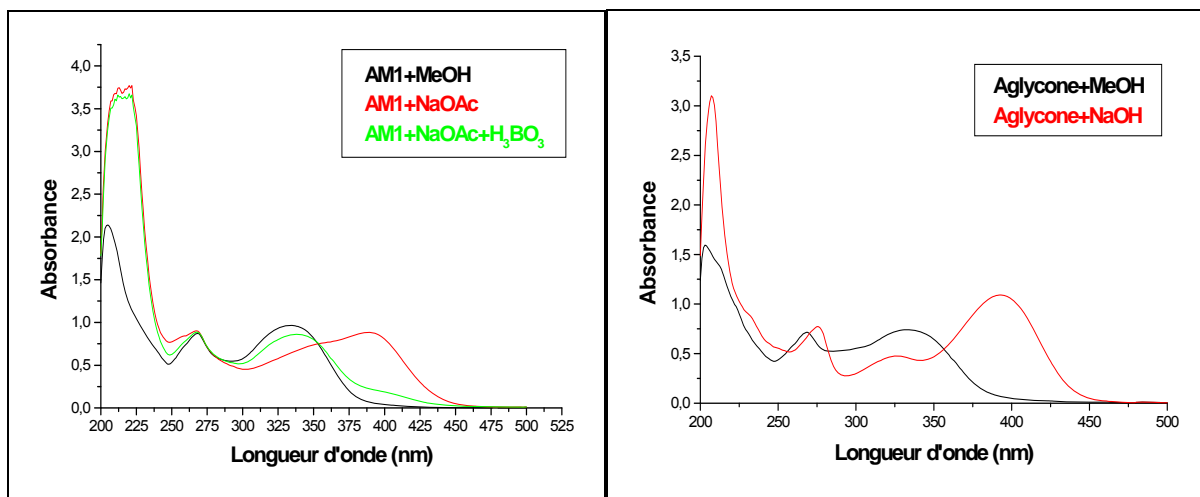


Figure III.2 : Co-chromatographie avec des échantillons authentiques de sucres, de la phase aqueuse après hydrolyse acide du composé AM1.

➤ **L'examen de la série spectrale UV (spectre n° III.2) :**

- Le spectre d'absorption ultraviolette enregistré dans le méthanol donnant la valeur de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I à 333 nm, oriente vers la structure d'une flavone.
- L'ajout de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +52$ nm) avec augmentation de l'intensité sans apparition de nouvelle bande à δ [320-350] ce qui révèle la présence d'un OH libre en position C-4'.
- L'addition du réactif AlCl_3/H^+ , conduit à l'apparition d'un épaulement dans la bande I à 380 nm, et révèle un 5-OH libre.
- L'ajout de NaOAc, ne provoque aucun déplacement de la bande II, ce qui révèle la présence d'un OR en C-7.
- L'ajout de NaOAc à l'aglycone (phase organique obtenue après l'extraction) provoque un déplacement de la bande II ($\Delta\lambda_{II} = +7$ nm) ce qui confirme la présence d'un OR en C-7.
- L'ajout de NaOH à l'aglycone, conduit à l'apparition d'une nouvelle bande à $\delta=325\text{nm}$ ce qui confirme encore plus la présence d'un OR en C-7.





Série spectrale UV du composé AM1

Tableau n° III. 3 : Résultats de la série spectrale UV-Visible.

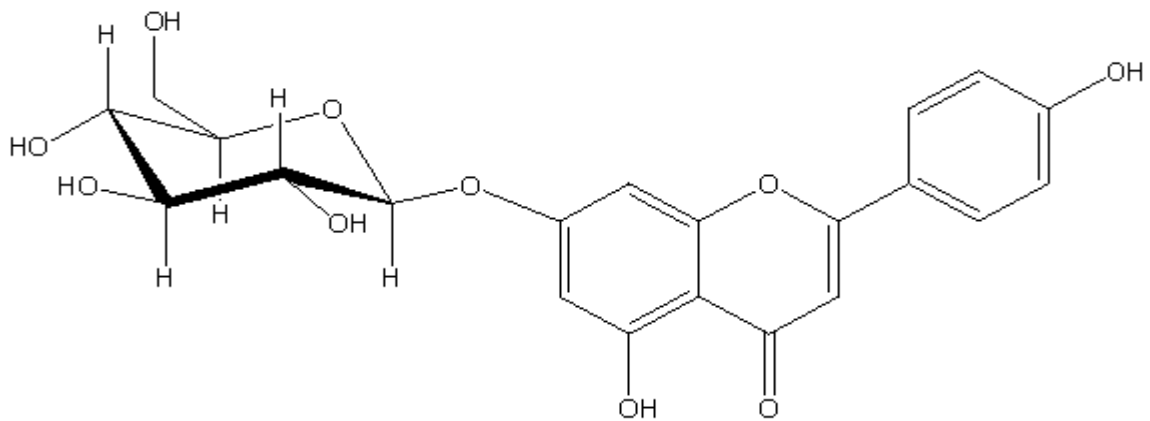
Réactif	Bande I (nm)	Bande II (nm)
Eluant (MeOH)	333	268
+ NaOH	285	268
+ NaOAc	389	268
+ AlCl ₃	349,381 ép	275,299 ép
+ AlCl ₃ /HCl	342,381 ép	276,299 ép

Partie aglycone		
+ NaOH	Nouvelle bande à 325 nm	
+ NaOAc	379	275

Conclusion :

L'ajout de la base faible à l'hétéroside n'induit pas de déplacement bathochrome de la bande II, ce qui signifie que c'est le groupe hydroxyle en position 7 qui est glycosylé. Dans le même spectre, le déplacement bathochrome de la bande I de 55 nm montre que le groupe hydroxyle en 4' est libre. De même l'apparition d'un épaulement dans la bande I à 381 nm, observé avec le réactif AlCl_3/H^+ , révèle un 5-OH libre. Le composé **AM1** est donc **l'apigénine 7-O-glucoside**, dont la présence a été relevée dans quelques espèces du genre *Potamogeton* (Les et al., 1990 ; Roberts et al., 1986), dont *P. crispus* , *P. perfoliatus* , *P. pectinatus* et *P. lucens*.

Structure finale :



Apigénine7-O glucoside

III.1.2 III.1.1: Elucidation structurale du composé le composé AM2 :

- Le spot de ce composé sur plaque analytique donne lui aussi une coloration jaune après révélation avec l'ammoniaque, on en déduit que c'est un flavonoïde.
- La fluorescence noire-violette de ce flavonoïde sous lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

➤ Spectroscopie de RMN ¹H :

L'examen du spectre RMN ¹H (spectre n° III.2) ainsi que ces spectres étalés (n° III.2.1 et III.2.2) montre :

- Une para substitution du noyau B (OR-4') déduite de :

L'existence à $\delta = 7,81$ ppm, d'un doublet ($J = 8,7$ Hz) d'intégration 2H, attribuable aux protons H-2' et H-6' et un autre doublet avec la même constante de couplage et la même intégration 2H à $\delta = 6,89$ ppm, attribuable à H-3' et H-5'.

- Une substitution du noyau A en position 7 par un OR (OR-7) déduite de :

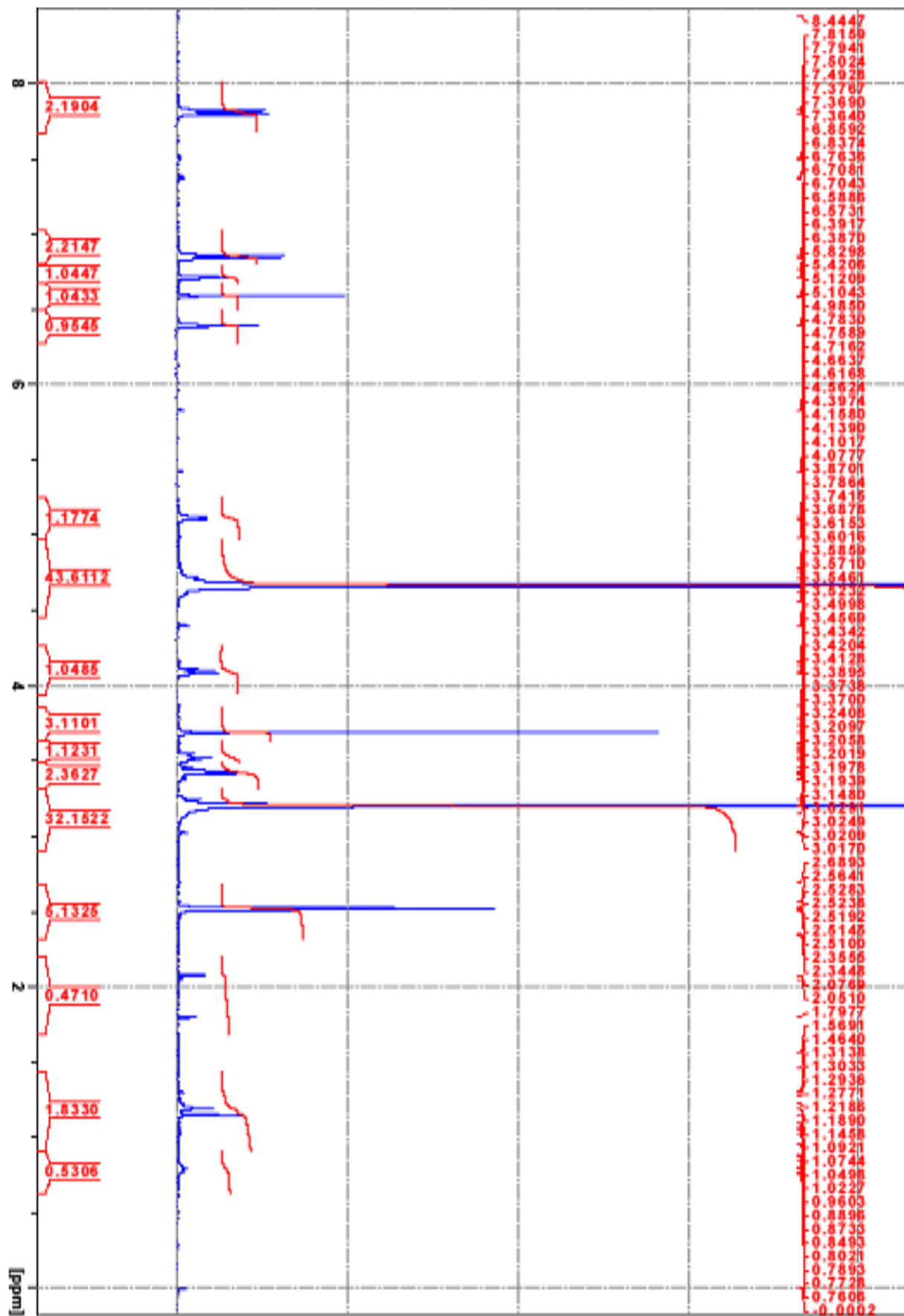
La présence d'un doublet ($J=1,9$) d'intégration 1H à $\delta = 6,76$ ppm, attribuable au proton H-8 et un autre doublet d'intégration 1H avec la même constante de couplage à $\delta = 6,38$ ppm attribuable au proton H-6.

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,57$ ppm attribuable au proton H-3.
- Présence à $\delta = 5,12$ ppm d'un doublet ($J=6,6$) d'intégration 1H, caractéristique à un proton anomérique identifiant une liaison O-sucre, vu la valeur de la constante de couplage le sucre peut être un glucose ou un galactose pas de CH₂ du mannose.
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,68$ ppm attribuable aux protons d'un O-CH₃.
- Un ensemble de multiplets dans l'intervalle [3,30-4,20] ppm attribuable par conséquent aux protons du sucre.
- Un singulet d'intégration 5H à $\delta = 2,52$ ppm attribuable aux protons des OH du sucre.

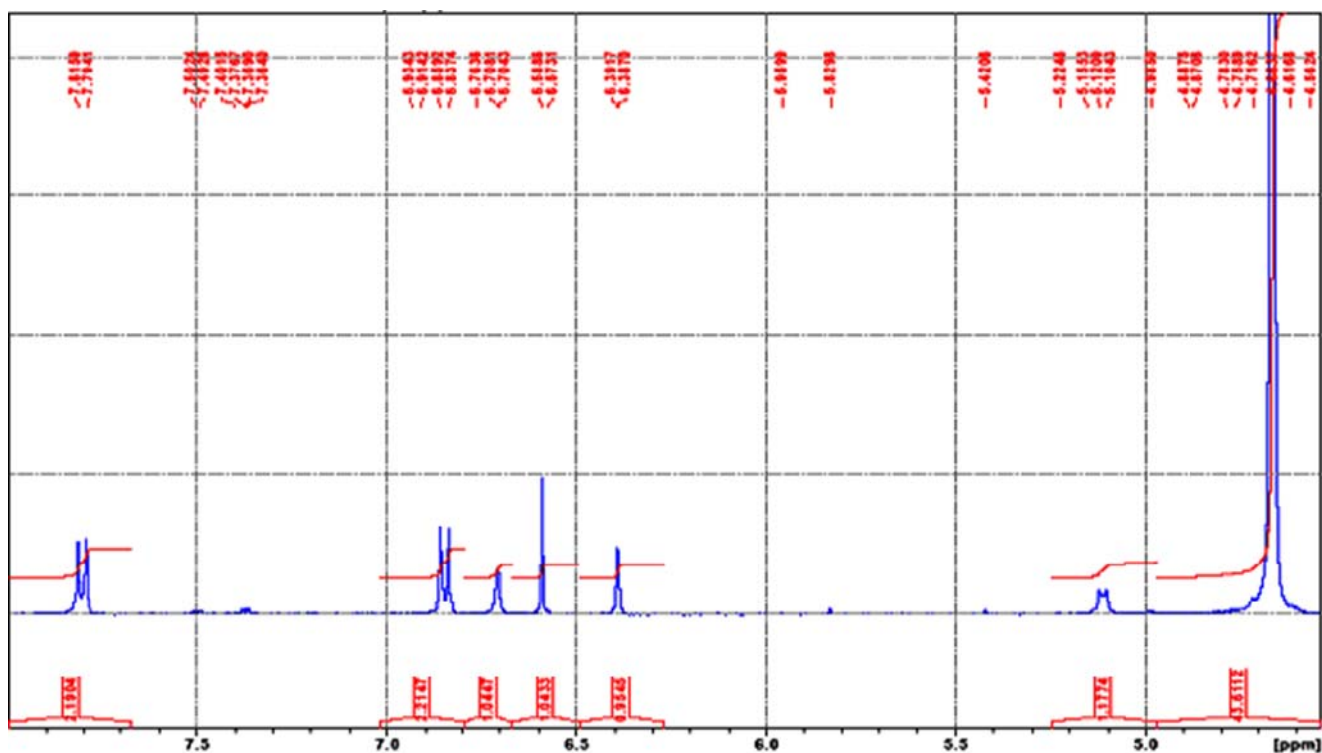
Ces données spectroscopiques sont rassemblées dans le tableau n° III.3.

Tableau n° III.4: Les résultats de la spectroscopie RMN ^1H (400 MHz ; acétone)

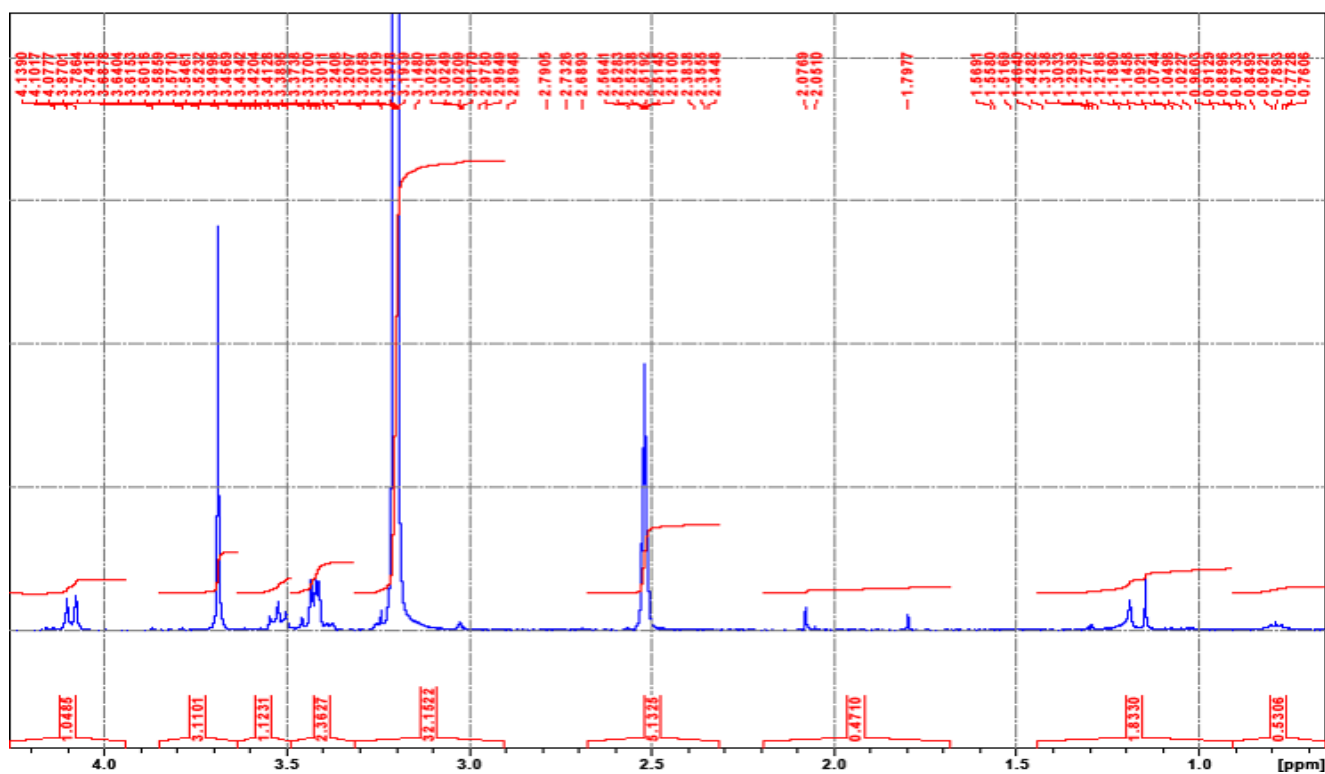
DEPLACEMENT CHIMIQUE Δ (PPM)	INTEGRATION	MULTIPLICITE (JHZ)	ATTRIBUTION
7,81	2H	<i>d</i> (8,7)	H-2'/H-6'
6,89	2H	<i>d</i> (8,7)	H-3'/H-5'
6,76	1H	<i>d</i> (1,9)	H-8
6,57	1H	<i>s</i>	H-3
6,38	1H	<i>d</i> (1,9)	H-6
5,12	1H	<i>d</i> (6,6)	H-1'' (O-Sucre)
3,68	3H	<i>s</i>	O-CH ₃
2,52	5H	<i>s</i>	5 OH (Sucre)



Spectre n° III.2 : spectre RMN ^1H (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé AM2.

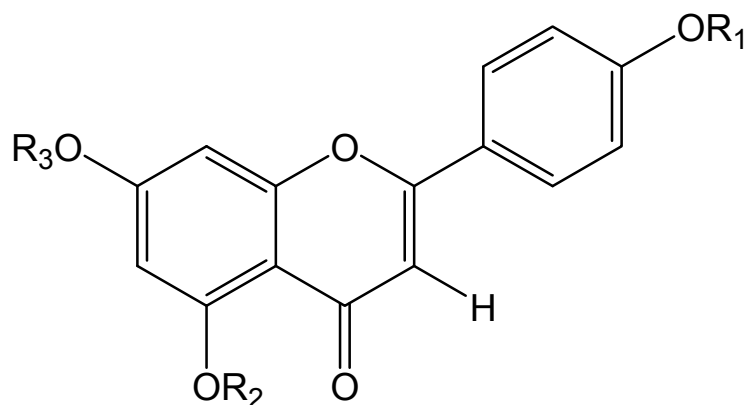


Spectre n° III.2.1 : Spectre RMN ¹H étalé de 4,5 à 8 ppm du composé AM2.



Spectre n° III.2.2 : Spectre RMN ¹H étalé de 0 à 4,3 ppm du composé AM2.

Ces données mènent à la structure partielle suivante :

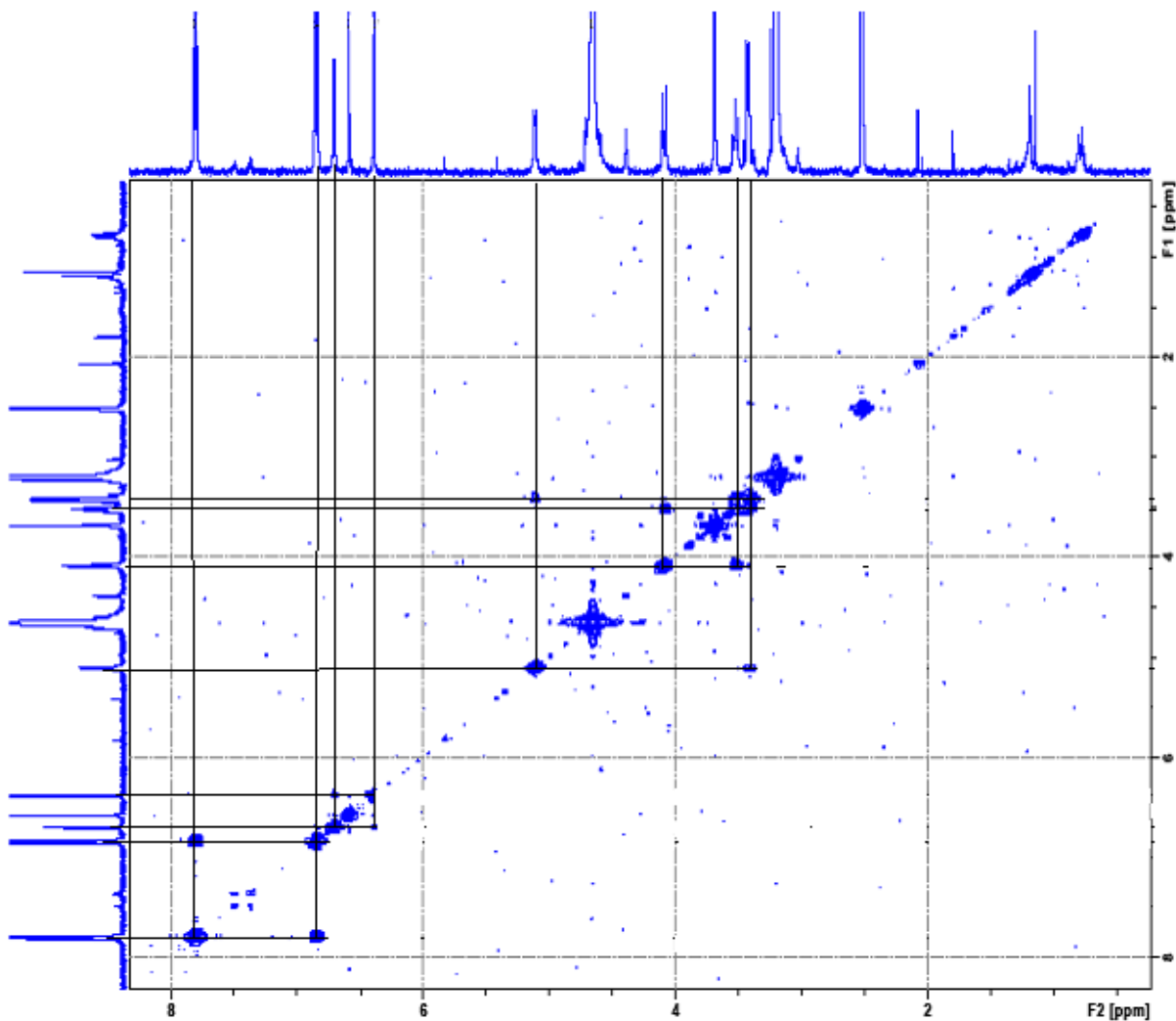


$(R_1, R_2, R_3) = (H, OH, O\text{-sucre})$

L'examen du **spectre RMN 2D, COSY** (spectre n° III.2.3) montre :

- Une tache de corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 7,81$ ppm et $\delta = 6,89$ ppm confirmant le couplage ortho de H-2', H-6' avec H-3', H-5', ainsi que leur attribution et donc la para substitution du noyau B.
- Une tache de corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 6,7$ ppm et $\delta = 6,38$ ppm confirmant le couplage méta de H-6 avec H-8 ainsi que leur attribution et donc une substitution du noyau A en 5 et 7.
- Une tache de corrélation entre le noyau du doublet à $\delta = 5,12$ ppm (H anomérique) et le noyau du multiplet à $\delta = 3,31$ ppm, qui ne peut être que le H-2'', ce dernier donne une autre tache de corrélation avec le noyau du triplet ($J = 9,2$ Hz) à $\delta = 3,52$ ppm, qui ne peut être que le H-3'' (couplage axial-axial avec le H-2'' et le H-4'')

On en conclue que notre sucre est un glucose.

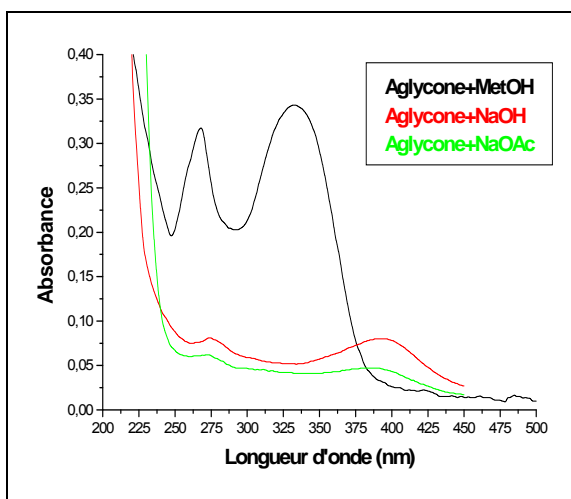
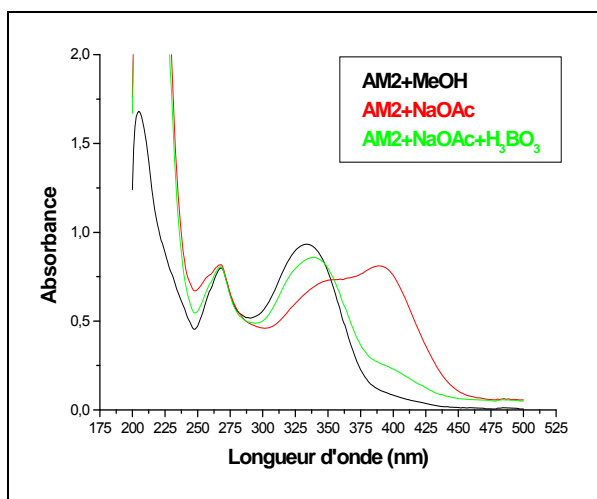
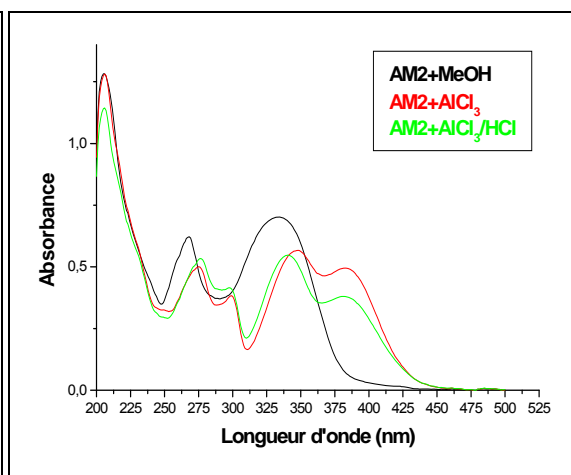
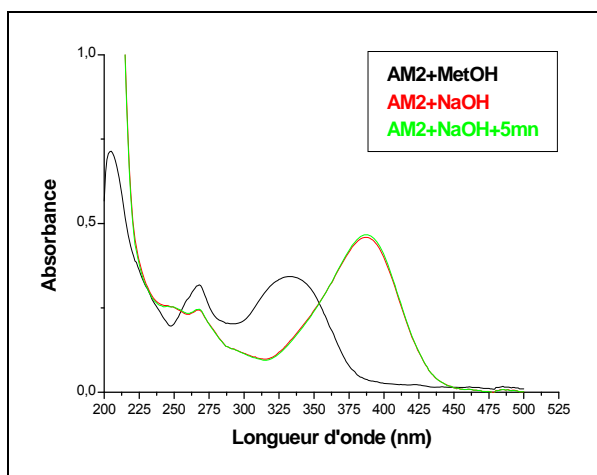


Spectre n° III.2.3 : Spectre COSY ($^1\text{H}^1\text{H}$) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé AM2.

➤ **L'examen de la série spectrale UV (spectre n° III.2) :**

- Le spectre d'absorption ultraviolette enregistré dans le méthanol donnant la valeur de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I à 333 nm, oriente vers la structure d'une flavone.
- L'ajout de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_1 = + 55$ nm) avec augmentation de l'intensité ce qui révèle la présence d'un OH libre en position C-4'.
- Le fait que le spectre enregistré dans $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ soit identique à celui enregistré dans AlCl_3 impose l'absence de système ortho-dihydroxylé sur le cycle A.

- L'ajout de NaOAc, ne provoque aucun déplacement de la bande II, ce qui révèle la présence d'un OR sur C-7.
- L'ajout de NaOAc à l'aglycone (phase organique obtenue après hydrolyse acide et extraction) provoque un déplacement de la bande II ($\Delta\lambda_{II} = +7$ nm) ce qui confirme la présence d'un OR en C-7.



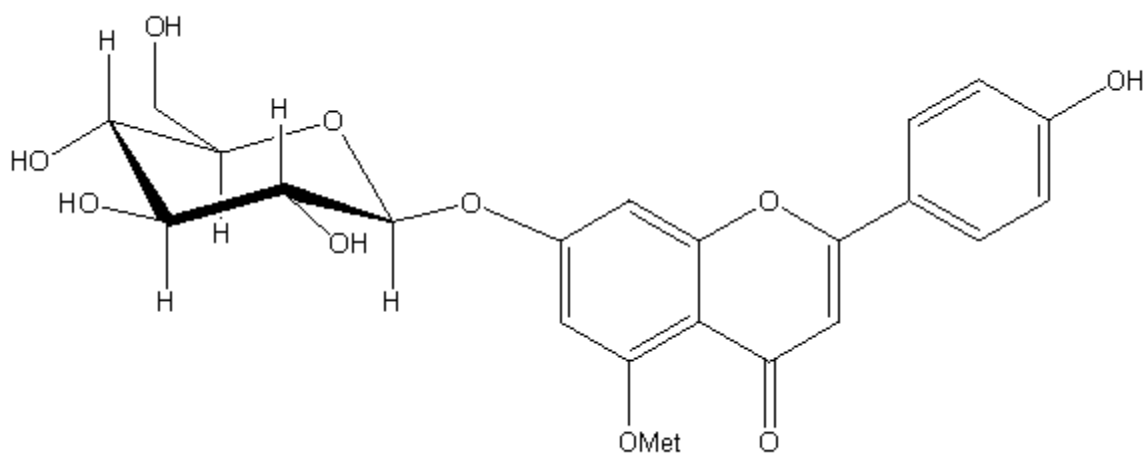
Série spectrale UV du composé AM2

Tableau n° III.5 : Résultats de la série spectrale UV-Visible.

Réactif	Bande I (nm)	Bande II (nm)
Eluant (MeOH)	333	268
+ NaOH	288	268
+ NaOAc	389	268
+ AlCl ₃	348,382 ép	275,297 ép
+ AlCl ₃ /HCl	340,382 ép	276,297 ép

Partie aglycone		
+ NaOH	Nouvelle bande à 325 nm	
+ NaOAc	379	275

Structure finale :



5-méthoxy apigénine 7-O glucoside

Conclusion Générale

Ce travail à caractère phytochimique et structural portant sur l'investigation de la phase *n*-butanol de l'extrait hydroéthanolique des parties aériennes de *Centaurea africana* (Bonnet) M. (Compositae) effectué en complément d'une étude réalisée dans notre laboratoire a permis l'isolement et l'établissement des structures de deux composés.

Il s'agit de deux flavone glycosylés:

- **Apigénine 7-O-glucoside.**
- **5-methoxy apigénine 7-O-glucoside**

Les structures ont été établies par la combinaison des données de la RMN ¹H et sa séquence bidimensionnelle COSY (¹H-¹H), ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible.

L'utilisation de l'hydrolyse acide pour le premier flavonoïde a été nécessaire.

Résumé

Le but principal de notre travail concerne l'étude phytochimique de *C. africana* appartenant à la flore algérienne. Il consiste à identifier le maximum de composés afin d'élargir et d'approfondir la connaissance phytochimique de cette plante.

Notre choix pour cette espèce est justifié par le fait qu'elle soit endémique d'une part et d'autre part parce qu'elle est très riche en métabolites secondaires notamment les composés phénoliques présentant diverses activités biologiques.

L'objectif phytochimique correspond, en effet, à l'isolement et à la détermination structurale des molécules naturelles de *C. africana*. Pour ce faire, nous avons procédé à la séparation et à la purification des différents phytoconstituants de l'extrait *n*-butanol (obtenu après extraction) par différentes méthodes chromatographiques, notamment la chromatographie sur colonne de gel de silice et sur plaques préparatives de gel de silice ce qui a permis d'isoler **7 produits**, leurs structures ont été déterminées par la combinaison de méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN ^1H et sa séquence bidimensionnelle COSY (^1H - ^1H).

L'étude phytochimique menée sur *C. africana* a permis l'obtention de 7 produits purs. Parmi lesquels nous avons établi à l'heure actuelle la structure de 2 d'entre eux. Il s'agit de :

- **Apigénine 7-*O*-glucoside.**
- **5-méthoxy apigénine 7-*O*-glucoside.**

Les résultats obtenus confirment que *Centaurea africana* est très riche en composés phénoliques notamment les flavonoïdes dont de nombreuses publications scientifiques soulignent des propriétés biologiques remarquables.

ملخص

هدفنا الرئيسي هو الدراسة الفيتوكيميائية لـ *C. africana* والذي يتمثل في تحديد أكبر عدد من المركبات لتوسيع وتعميق المعرفة الفيتوكيميائية لهذه النبتة.

اختيارنا لهذه النبتة يرجع الى محليتها من جهة و من جهة اخرى الى غناها بمنتجات الايض الثانوى المعروفة بنشاطاتها البيولوجية المتعددة.

الغرض الفيتوكيميائى يتمثل فى عزل و تحديد البنية الكيميائية للمركبات الطبيعية لهذا الغرض قمنا بفصل و تنقية بعض المركبات الطبيعية للمستخلص *n-butanol* باستعمال مختلف التقنيات الكروماتوغرافية.

و هذا ما سمح بعزل 7 مركبات التى تم تحديد بنياتها باستعمال تقنيات التحليل المعروفة بما فيها مطيافية الرنين المغنطيسى ومطيافية الاشعة فوق البنفسجية.

سمحت الدراسة الفيتوكيميائية لـ

C. africana

بعزل 7 مركبات نقية تم الحصول على بنية إثنان منها:

- **Apigénine 7-O-glucoside.**
- **5-méthoxy apigénine 7-O-glucoside**

النتائج المتحصل عليها تؤكد ان *C. africana* جد غنية بالمركبات الفينولية خصوصا الفلافونويدات التى تمتلك خصائص بيولوجية معتبرة تمت الاشارة اليها في العديد من المنشورات العلمية.

Summary

The main purpose of our work concerns mainly the phytochemical study of *C. africana* belonging to the Algerian flora in which consist to identify the maximum of compounds to widen and to deepen the phytochemical knowledge of this plant.

Our choice for this species is justified by the fact that it is endemic in one hand and on the other hand because it is very rich in secondary métabolites which known by their biological activities.

The phytochemical objective corresponds, indeed, to the isolation and the elucidation of structural molecules of *C. africana*.

We proceeded to the separation and to the purification of the various phytoconstituants of n-butanol extract using various chromatographic methods in particular the column chromatography of silica gel and préparative thin layer chromatography of silica gel in which allowed us the insulation of 7 compounds their structures were determined by the combination of spectral methods (UV-visible, spectrophotométrie, RMN ¹H and its bidimensionnelle sequence COSY (1H-1H)).

The study phytochimic led on *C. africana* allowed the obtaining of 7 pure products among them 2 flavones glycosyds:

- **Apigenine 7-O-glucoside.**
- **5-methoxy apigenine 7-O-glucoside.**

The obtained results emphasis that *Centaurea africana* is very rich in phenolic compounds in particular the flavonoïdes, in which numerous scientific publications underlined the remarkable biological properties.

