

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE CONSTANTINE I
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N°d'ordre :.....

N°Série :.....

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de Magister
en Chimie Organique

Option : Chimie structurale-Synthèse organique et Substances Naturelles

**Recherche et détermination structurale de métabolites
secondaires de *Matricaria Chamomilla* (Asteraceae)
Etude de la phase *n*- butanol.**

Par :
M^{elle}. ACHOUB Hanane

Sous la direction de :
Dr. ZAITER Lahcene

<u>Devant le jury :</u>			
M ^{me}	F. BENAYACHE	Pr. Université Constantine I	Président
M ^r	L. ZAITER	MC. Université Constantine I	Rapporteur
M ^r	S. BENAYACHE	Pr. Université Constantine I	Examineur
M ^r	A. BENTAMENE	Pr. Université Constantine I	Examineur
M ^r	M. BOUHEROUM	MC. Université Constantine I	Examineur

Soutenu le :.../.../2013

Dédicace

A mes chers parents pour leurs dévouements, leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements et sans qui ne je serais pas là aujourd'hui. Que ce travail soit, pour eux, un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse.

A mes chères sœurs Samira et Kamilia.

A mes chers frères Ahmed, Ibrahim et Bourhane.

A ma promotion du magister : Halima, Wasssila, Nassima Naima, Ferial, Sabrina, Tamer, Abbas, Karim, Mohamed et Chafeaai .

A tous mes amis et collègues : Narimene, Khawla, Sara, Widad, Hanane, Samia, Tarek

A tout ma famille de proche au loin.

Remerciements

Avant tout, je remercie mon DIEU tout puissant, qui m'a donné, la volonté, le courage et la patience et qui a guidé mes pas vers le droit chemin durant mes années d'études.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Phytochimie et Analyses Physico_chimiques et Biologiques, Département de Chimie, Université Mentouri – Constantine, sous la direction de Madame F. Benayache, Professeur à l'université Mentouri de Constantine, que je tiens à remercier pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour ses conseils précieux, ses efforts, ses compétences scientifiques et pour son soutien, qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier mon encadreur, le docteur Zaiter Lahcene pour avoir dirigé ce travail avec compétence et professionnalisme, pour tous les conseils précieux qu'il m'a prodigués.

Je remercie sincèrement Monsieur le professeur Mr Samir Benayache ; professeur à l'université Mentouri Constantine, pour son aide et ses conseils aussi pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse également mes remerciements à Mr Ali Bentamene professeur à l'université Mentouri Constantine ,pour avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime mes vifs remerciements à Mr Mohamed Bouheroum Maître de conférence à l'Université Metouri- Constantine, pour le grand honneur qu'il me font en acceptant de faire partie de mon jury de thèse.

J'adresse mes remerciements à Mr R. Seghiri, Mme R. Mekkiou, Mme O. Boumaza et Mr M. Kerkatou pour leurs aides et leurs conseils.

Je remercie vivement monsieur la professeur P. MOSSET de l'Ecole Nationale de Chimie de Rennes pour l'enregistrement des spectres RMN et SM.

Merci également à toutes les personnes avec qui j'ai partagé paillasse, matériel, conseils techniques et/ou discussions pendant la durée de ce travail particulièrement : Hanane, Halima, Khawla, Nassima, Sara, Laila, Samia, Chahra, Tamer, Tarek

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce que la réalisation de ce travail se soit déroulée dans les meilleures conditions.

Toute ma gratitude va enfin à mes parents pour leur soutien tout au long de mes études et durant cette thèse.

Abréviations :

AcOEt : Acétate d'éthyle

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CD₃OD : Méthanol deutéré

DMSO-*d*6 : diméthylsulfoxyde deutéré

Da : Dalton (unité de masse moléculaire)

d : Doublet

dd : Doublet de doublets

DPPH : 1-1 Diphényl 2- Picril Hydrazine

DEPT: Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer

D₂O : Eau deutériée

: Déplacement chimique

Glu: Glucose

***J*(Hz)** : Constante de couplage exprimée en Hertz

HCl : Acide chlorhydrique

H₃BO₃ : Acide borique

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence

HMBC : Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity

COSY : Correlated Spectroscopy

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

m : Multiplet

m/z : Masse / Charge électrique

MeOH : méthanol

NaOAc : Acétate de sodium

NaOH : Hydroxyle de sodium

ppm : partie par million

Rf : rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMN ¹³C: résonance magnétique nucléaire du carbone 13

RMN ¹H : résonance magnétique nucléaire du proton

S : Singulet

TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay

UV : Ultra violet

SOMMAIRE

Introduction	1
Références.....	3

Chapitre I : Rappel Bibliographique

I.1. La famille des Astéracées.....	4
I. 1. 1. Généralités	4
I. 1. 2. Distribution	4
I. 1. 3. Systématique	4
I. 1. 4. Caractéristiques morphologiques des Astéracées	5
I.2. L'espèce <i>Matricaria Chamomilla</i>	6
I.2.1. Classification botanique.....	6
I.2.2. Description de l'espèce.....	7
I.3. Utilisations.....	8
I.4. Etudes chimiques antérieures.....	8
I.4.1. Les flavonoïdes	9
I.5.2. les coumarines	14
I. 4.3 les sesquiterpènes	15
I. 4.4 les huiles essentielles	19
Références	22

Chapitre II : Les flavonoïdes

II.1. Introduction.....	25
II.2. Structure chimique et classification des flavonoïdes	25
II.2.1. Flavones et Flavonols.....	26
II.2.2. Flavanones et Dihydroflavonols.....	26
II.2.3. Flavan-3-ols, Flavan-3,4-diols et Anthocyanidols.....	27
II.2.4. Chalcones et Aurones.....	28

II.2.5. Isoflavones.....	29
II. 3. Biosynthèse des flavonoïdes	29
II.4. Substitution du squelette flavonique.....	33
II.4.1- L'hydroxylation.....	34
II.4.2- La méthylation.....	34
II.4.3- La <i>O</i> -glycosylation.....	34
II.4.4- La <i>C</i> -glycosylation	35
II.5. Distribution et localisation dans les plantes et le règne végétal.....	35
II.6. Rôle des flavonoïdes dans les plantes.....	36
II.7. Quelques activités pharmacologiques des flavonoïdes.....	37
II.7.1. L'activité antioxydante des flavonoïdes	37
II.7.1.1. Inhibition d'enzymes ou chélation des éléments traces impliqués dans la formation des radicaux.....	37
II.7.1.2. Piégeage des radicaux.....	38
II.7. 2. L'activité antimicrobienne des flavonoïdes.....	45
II.7.3. Effets antiallergiques.....	46
II.7.4. Effets anti-inflammatoires.....	46
II.7.5. Effets antiulcéreux.....	46
II.7.6. Effets anticancéreux.....	47
II.7.7. Autres effets biologiques.....	47
II.8. L'étude chimique des flavonoïdes.....	47
II.8.1. Extraction.....	47
II.8.2. Séparation et purification.....	48
II.9. Analyse structurale des flavonoïdes.....	49
II.9.1. La fluorescence sous lumière de Wood.....	49
II.9.2. Facteur de retardement et comportement chromatographique.....	50
II.9.3. La spectrophotométrie UV-Visibl.....	50

II.9.4. La Spectrométrie de masse.....	56
II.9.5. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N).....	56
Références.....	58

Chapitre III : Travaux personnels

III.1. Récolte de la matière végétale.....	62
III.2. Extraction de la matière végétale.....	62
III.3. Séparation chromatographique de l'extrait n-butanol	65
III.3.1. Séparation chromatographique sur colonne.....	65
III.3.2. Séparation et purification des fractions.....	67
Conclusion	70

Chapitre IV: Interprétation des résultats

IV.1. Détermination structurale du composé AH1.....	72
IV.1.1. Fluorescence.....	72
IV.1.2. La spectrophotométrie UV.....	72
IV.1.3. La spectrométrie de masse.....	76
IV.1.4. Spectrométrie RMN	77
IV.1.5. Hydrolyse acide	92
IV.2. Détermination structurale du composé AH5	93
IV.2.1. Fluorescence	93
IV.2.2. Spectrométrie RMN	93
IV.2.3. Hydrolyse acide.....	106
IV.3. Activité antioxydante.....	107
IV.3.1.Principe	107

IV.3.2. Protocole expérimental	108
IV.3.3.Résultat de l'activité antioxydante testée par la méthode du DPPH	108
Conclusion	110
Références	111
Conclusion générale	112

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité. Bien qu'une grande partie du XXème siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs *via* le screening de sources naturelles a conduit à la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines [1].

L'utilisation des plantes médicinales comme source de remède pour se soigner ou prévenir des maladies est originaire des millénaires jusqu'à la récente civilisation chinoise, Indienne et du Proche-Orient. Elle est devenue certainement un art [2]. L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents [3].

Selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S), la médecine traditionnelle se définit comme l'ensemble de toutes les connaissances pratiques explicables ou non pour diagnostiquer ou éliminer un déséquilibre physique, mental en s'appuyant exclusivement sur l'expérience vécue et l'observation, transmises de génération en génération (oralement ou par écrit) [4]. Par ailleurs, selon l'OMS, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui constituent 90% de la médecine traditionnelle. En 2004, près de 75% de la population africaine a eu recours aux plantes pour se soigner et n'a pas accès aux médicaments dits modernes.

Sachant qu'une plante peut contenir plusieurs milliers de substances différentes, on peut se rendre compte de la richesse naturelle du règne végétal. Dans le contexte socioéconomique

Introduction

des pays en voie de développement, l'étude des plantes peut aboutir à l'obtention de réponses thérapeutiques adéquates à de faible prix, joignant à une efficacité scientifique prouvée, une acceptabilité culturelle optimale.

La valorisation scientifique de la médecine traditionnelle doit conduire notamment à la mise au point de médicaments à base de plantes. Aujourd'hui, il a été estimé que les principes actifs provenant des végétaux représentent 25% des médicaments prescrits soit un total de 120 composés d'origine naturel provenant de 90 plantes différentes [5].

L'Algérie possède une richesse floristique considérable. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques [6]. Ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts, est peu exploré du point de vue chimique et pharmacologique, et constitue à notre avis, un axe non négligeable de la recherche scientifique, plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles.

Les travaux de recherche dénotent largement que la famille des Asteraceae est la plus vaste du règne végétal et elle est constituée de plusieurs genres. Parmi, les genres qui composent cette famille, on peut citer les genres *Artemisia*, *Cotula*, *Chrysanthemum*, *Atractylis*, *Asteriscus*, *Pulicaria*, *Scorzonera*, *Launaea*, *Centaurea* et *Matricaria* [6]. Ce dernier a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques et pharmacologiques.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance de l'espèce *Matricaria chamomilla* en fixant comme principal objectif, l'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires notamment les flavonoïdes.

Les principales parties de ce travail constituant quatre chapitres, sont traitées comme suit :

- Le premier chapitre sera consacré à une présentation botanique de la famille des Asteraceae et de l'espèce *Matricaria chamomilla*. Elle se poursuit également par les travaux de chimie antérieurs relatifs du genre *Matricaria*.
 - Le deuxième chapitre sera consacré à l'étude bibliographique des flavonoïdes.
 - Le troisième chapitre sera réservé à la description du protocole expérimental.
 - Le quatrième chapitre sera consacré à l'interprétation des résultats obtenus.
- Enfin une conclusion générale.

Références

- [1] A. Gurib-Fakim,(2006), *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.
- [2] H. Hamburger, K. Hostettmann, (1991), *Phytochemistry*, 30(12), 3874.
- [3] K. Hostettmann, O. Potterat, J. L. Wolfender, (1998), *Chimia*, 52, 10-17.
- [4] J. E. Adjanohoun, L. Aké assi, J. J. Floret, S. Guinko, M. Koumaré, A. Ahyi, J. Raynal, (1979), *Médecine traditionnelle et Pharmacopée Contribution aux études ethnobotaniques et florestiques au Mali ACCT*, Paris, 291.
- [5] O. Potterat, (1997). Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Current organic chemistry*, 1, 415-440.
- [6] P. Quezel, S. Santa, (1963), *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome I, C.N.R.S. Paris.

Chapitre I

Rappel Bibliographique

I. 1. La famille des Astéracées:

I. 1. 1. Généralités :

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur.

La famille Asteraceae est la plus vaste du groupe des dicotylédones. Plusieurs plantes de cette famille sont cultivées pour leur valeur alimentaire (le tournesol, le topinambour, la laitue, la chicorée, la camomille, *etc.*) ou comme plantes décoratives (les dahlias, les asters, les rudbeckies, les gaillardes, *etc.*).

En effet, il a été rapporté que les fleurs et les feuilles de ces plantes possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antiviraux et anti-inflammatoires [1]. De ce fait, de nombreuses espèces de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle [2].

Les principes amers (sesquiterpènes lactones), les corps insaturés, les flavonoïdes, les coumarines, les polyphénols, les terpènes..., principaux constituants chimiques des Astéracées expliquent la diversité de leurs activités pharmacologiques [2].

I. 1. 2. Distribution :

La famille des Astéracées est la plus étendue du monde végétal, avec environ 25000 espèces réparties en 1300 genres, dispersées sur toute la Terre [3].

Cette famille est la plus vaste du groupe des dicotylédones. On y retrouve un grand nombre d'espèces très communes dans les champs et les villes. Ce sont des plantes herbacées pour la plupart. Mais, il existe de rares espèces arborescentes qui peuplent principalement les régions tropicales de la planète (Genres: *Olearia*, *Cassinia*, *Baccharis*, *Senecio*, par exemple).

I. 1. 3. Systématique :

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta (Plantes vasculaires)
Embranchement	Phanerogamae (Phanérogames)
Sous-embranchement	Magnoliophytina (Angiospermes)
Classe	Magnoliopsida (Dicotyledones)
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae (Compositae)

I. 1. 4. Caractéristiques morphologiques des Astéracées :

Les astéracées ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les uns à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collecte est appelée un involucre.

La fleur des astéracées est très particulière: les étamines sont soudées par leurs anthères déhiscentes vers l'intérieur. Sous les stigmates sont situés des «brosses à pollen». La croissance rapide du style permet un brossage du pollen et sa récupération. Une fois que le stigmate a traversé le tube formé par les anthères, les stigmates se déplient et exposent leur face gluante au pollen. Il faut penser qu'à ce moment-là, du nectar est sécrété.

Les fleurs des astéracées, appelées aussi fleurons, se présentent sous deux formes:

- Des languettes, ou ligules, dans lesquelles, les équivalents de pétales sont soudés, généralement par cinq, parfois par trois, reconnaissable seulement aux deux dents de la languette, et ou un pétale prédomine.

- Des tubes terminés par des lèvres, imperceptibles ou s'ouvrant plus ou moins largement en cinq lobes.

Dans le premier cas on parle de fleurons ligulés, dans le second, de fleurons tubulés [4].

Les Astéracées sont caractérisées par l'inflorescence en capitule. Un capitule comprend un réceptacle commun, plat le plus souvent, sur lequel sont insérées de la base au sommet, en ordre spiralé : d'abord des bractées stériles vertes (parfois écailleuses, à crochets ou épineuses) formant un involucre, ensuite des petites bractées fertiles non vertes ou paillettes, axillant chacune une fleur. L'ensemble forme une fleur composée, ce qui justifie l'emploi du mot "Composées" pour désigner cette famille [5,6]. Suivant le type de fleur composant le capitule, on distingue trois types de capitules:

- Liguliflores dont les capitules sont uniquement composés de ligules (languettes comme les pissenlits, chicorées, etc.);
- Tubuliflores dont les capitules sont uniquement composés de tubules (petits tubes comme chez les chardons) ;
- Radiées : en faisant la synthèse des deux types de fleurons on obtient les radiées dont le capitule est composé de ligules imitant les pétales à la périphérie et de tubules imitant les étamines et le pistil au centre [7,8].

Les fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée *Pappus* qui favorise la dispersion des grains par le vent [9].

I.2. L'espèce *Matricaria chamomilla* :

I.2.1. Classification botanique:

Embranchement	Angiospermae
Classe	Dicotyledoneae
Ordre	Asterales
Famille	Compositae
Sous-famille	Tubuliflorae
Tribu	Inuleae
Genre	Matricaria
Espèce	<i>Matricaria chamomilla</i>

I.2.2. Description de l'espèce:

C'est une plante herbacée annuelle de 10 à 40 cm de hauteur, glabre et odorante. Sa tige unique dressée, et très rameuse, avec des feuilles vertes, alternes, profondément divisées, à division sans sillon, sans pointes piquantes. Ses fleurs libres en capitule, c'est à dire serrées les unes contre les autres, sans pédoncules et placée sur l'extrémité d'une tige entourée d'une collerette de bractées (involucre) simulant un calice ; capitule de 1,5 à 2,5 mm, ayant des fleurs de deux couleurs différentes, les fleurs du milieu en tube cylindrique (tubuleuses) jaunes à cinq lobes, les fleurs du pourtour en languette blanche (ligulées) souvent réfléchies ; radiées tous sont insérées sur un réceptacle conique. Les fruits sont des akènes [10,11].

On peut la trouver dans plusieurs régions, en Europe, Asie Afrique, Amérique du Nord et du Sud. Elle pousse dans les prairies, les champs et au bord des chemins.

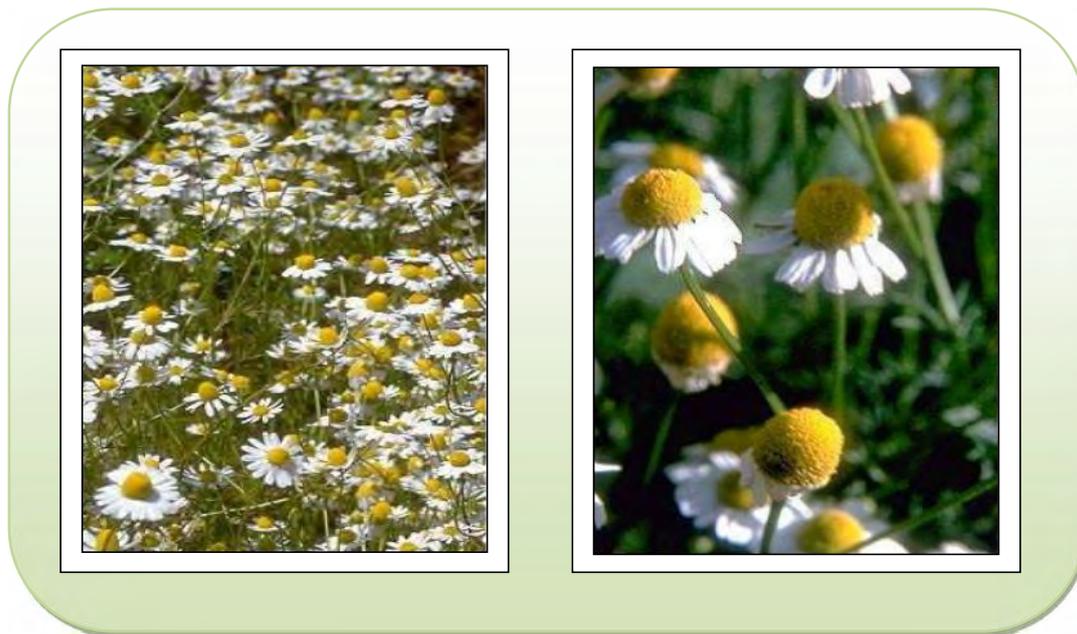


Figure I.1. *Matricaria chamomilla*

I.3. Utilisations :

C'est une plante médicinale populaire anciennement utilisée comme remède. Pendant des siècles, des extraits de cette plante ont été utilisés par les guérisseurs pour soigner les blessures, les ulcères, l'eczéma, les névralgies, les douleurs rhumatismales, la varicelle, la fièvre [12,13]. En tisane, elle soigne les spasmes, les problèmes digestifs, les brûlures d'estomac, les ballonnements et les spasmes intestinaux [14,15]. Elle permet de traiter les troubles du sommeil, la nervosité, les douleurs menstruelles et les contractions utérines [16,17].

Des récentes études phytochimiques sur cette plante ont montré que la majorité des effets démontrés de la *Camomille* peut être attribuée à la forte teneur de terpènes et les flavonoïdes trouvés dans cette plante [13]. Ces composés sont biologiquement actifs et possèdent des propriétés anti-oxydantes, antibactériennes, antifongiques, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antipyrétiques et antispasmodiques [13,18].

I.4. Etudes chimiques antérieures :

Une large variété de produits naturels caractérise les espèces du genre *Matricaria*, ainsi les Plus rencontrés sont les flavonoïdes, les sesquiterpènes lactones, les coumarines et les huiles essentielles.

Voici quelques exemples de molécules des principales classes de métabolites secondaires dans le genre *Matricaria*.

I.4.1. Les flavonoïdes :

Les composés flavoniques sont des substances naturelles très répandues dans la famille de astéracée [19] ou beaucoup de travaux ont été réalisés chez le genre *Matricaria*. On trouve essentiellement des flavonoïdes glycosylés comme l'apigénine 7-O-glucoside et la lutéoline 7-O-glucoside [20].

les flavonoïdes isolés du genre *matricaria* sont regroupés dans le tableau I.1.

Tableau I.1 : Flavonoïdes isolés du genre *Matricaria*.

Espèce	Les flavonoïdes isolés	Les structures	Réf
<i>M.chamomilla</i>	Apigénine 7-O-glucoside	<u>1</u>	[21 ,22]
	lutéoline 7-O-glucoside	<u>2</u>	
	Patulitine	<u>3</u>	
	Quercémétrine	<u>4</u>	
	5,4'-dihydroxy-3,6,7,3'-tetramethoxyflavone	<u>5</u>	[23]
	Apigénine 7-acetylglucoside	<u>6</u>	[24]
	Apigénine	<u>7</u>	[25]
	Lutéoline	<u>8</u>	
	Quercétine	<u>9</u>	
	Apigénine 7-O-glucoside (2'',6''-Diacétate)	<u>10</u>	[26]
	Apigénine 7-acetylglucoside	<u>11</u>	[27]
	Kaempférol 3-O-glucoside	<u>12</u>	[28]

<i>M.flos</i>	Jacéidine	<u>13</u>	[29]
	Chrysosephenol D	<u>14</u>	
	Eupatolitine	<u>15</u>	
	Spinacétine	<u>16</u>	
	Auxilarine	<u>17</u>	
	Eupatiline	<u>18</u>	
<i>M.indora</i>	Lutéoline 7-O-glucoside	<u>2</u>	[30]
<i>M.matricaro de</i>	Quercémétrine	<u>4</u>	[31]
<i>M.ricutita</i>	Quercetagetine	<u>19</u>	[32]
	Lutéoline 7-O-glucoside	<u>2</u>	
	Apigénine 7-O-glucoside	<u>1</u>	
	Hypéroside	<u>20</u>	
	Rutine	<u>21</u>	
	Apigénine 7-O-glucoside (6''-malonyl)	<u>22</u>	[33,34]
	Apigénine 7-O-glucoside (4''-acetyl-6''-malonyl)	<u>23</u>	
	Apigénine 7-O-glucoside (4''-acetyl)	<u>24</u>	
	Apigénine 7-O-glucoside (6''-caffeoyle)	<u>25</u>	
	Apigénine 7-O-glucoside (2'',3''-diacetyl)	<u>26</u>	
Apigénine 7-O-glucoside (3'',4''-diacetyl)	<u>27</u>		

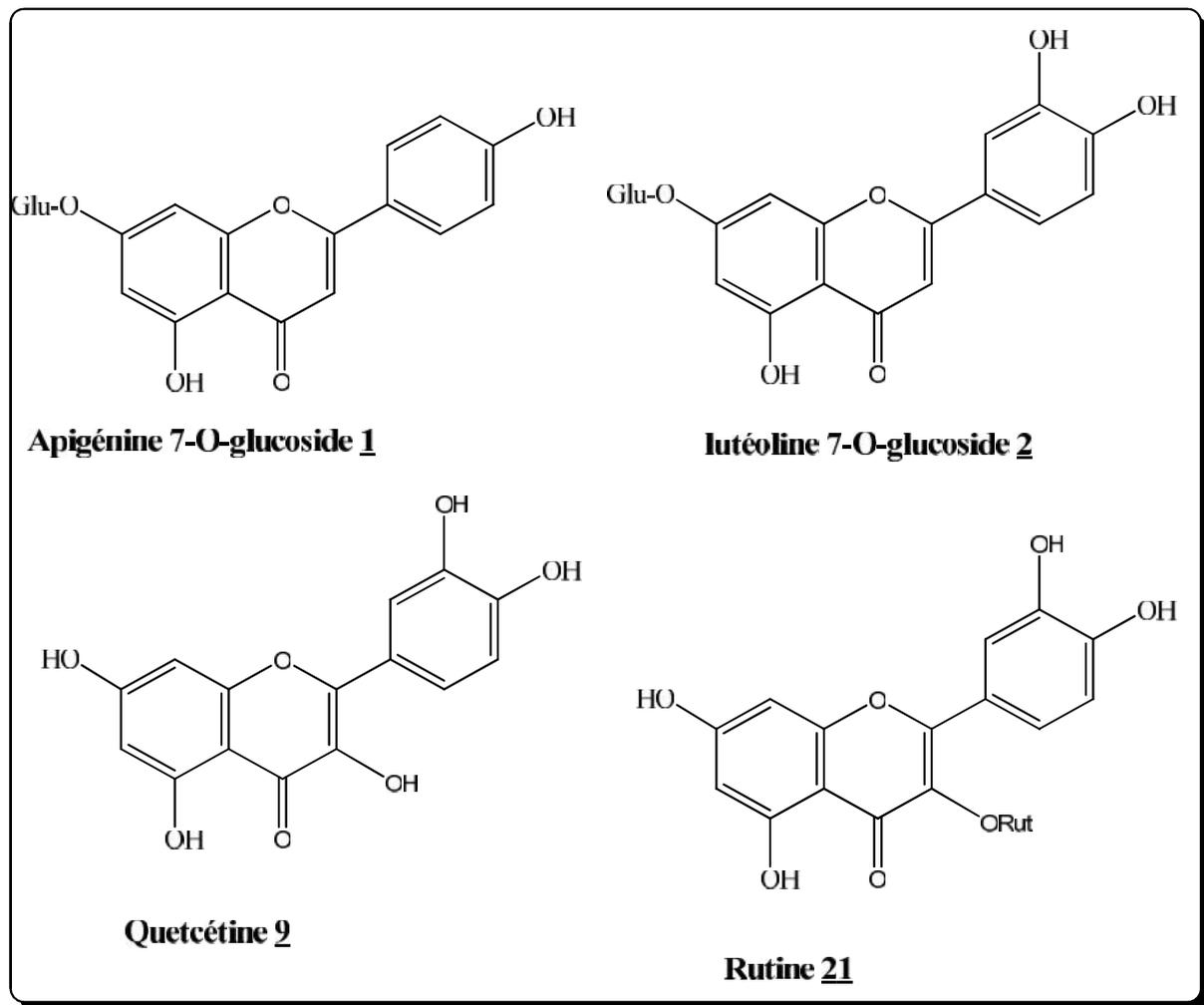
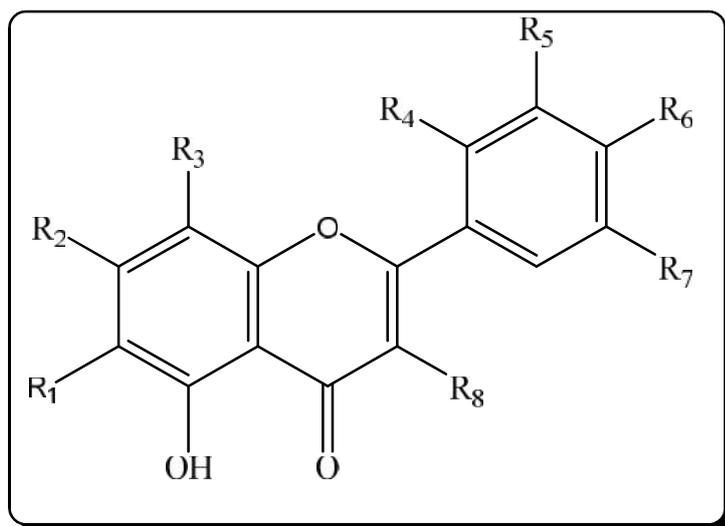
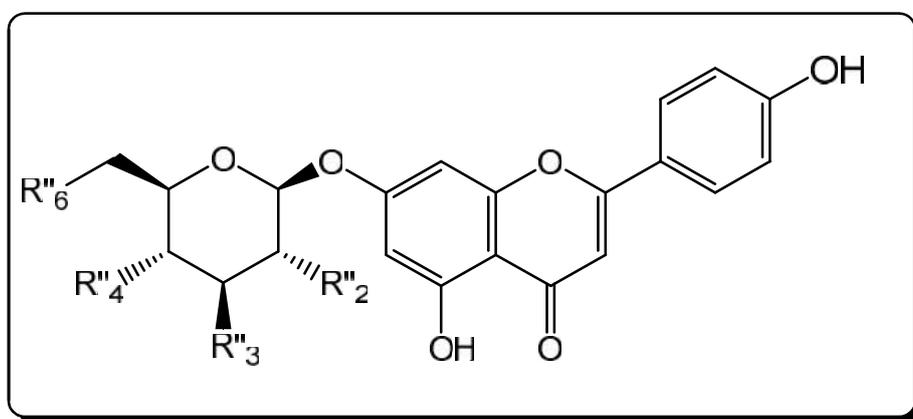


Figure I. 2: Structures chimiques des flavonoïdes isolés de quelques espèces du genre *Matricaria*.



structures	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
<u>3</u>	OCH 3	OH	H	H	OH	OH	H	OH
<u>4</u>	H	Glu	H	H		OH	OH	OH
<u>5</u>	OCH 3	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH	H	OCH ₃
<u>7</u>	H	OH	H	H	H	OH	H	H
<u>8</u>	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
<u>10</u>	H	O-Glu (2'',6'' diacétate)	H	H	H	OH	H	H
<u>11</u>	H	O-Glu (acetyl)	H	H	H	OH	H	H
<u>12</u>	H	OH	H	H	H	OH	H	O-Glu
<u>13</u>	OCH 3	OH	H	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃
<u>14</u>	OCH 3	OCH ₃	H	H	OH	OH	H	OCH ₃
<u>15</u>	OCH 3	OCH ₃	OH	OH	OH	H	H	H

<u>16</u>	OH	OCH3	OH	OCH3	H	H	H	H
<u>17</u>	OCH 3	OH	H	H	OH	OH	H	OCH3
<u>18</u>	OCH 3	OH	OH	H	H	H	OH	H
<u>19</u>	OH	H	H	H	OH	OH	H	O-Glu
<u>20</u>	OH	H	H	H	H	OH	H	O-Glu (4''- acetyl)



structures	R'' ₂	R'' ₃	R'' ₄	R'' ₆
<u>22</u>	OH	OH	OH	Malonyle
<u>23</u>	OH	OH	Acetyle	Malonyle
<u>24</u>	OH	OH	Acetyle	OH
<u>25</u>	OH	OH	OH	Caffeoyle
<u>26</u>	Acetyle	Acetyle	OH	OH
<u>27</u>	OH	Acetyle	Acetyle	OH

Figure I. 3: Structures chimiques des flavonoïdes isolés de quelques espèces du genre *Matricaria*.

I.4.2. les coumarines :

Les coumarines, et spécialement les furanocoumarines constituent un groupe de composés naturels ayant une large gamme d'activités biologiques. Ils possèdent des propriétés phototoxique, antibiotique, spasmolytique, antifongique et anticancéreuse [35].

Les composés coumariniques rencontrés chez le genre *Matricaria* sont le plus souvent des composés simples comme c'est le cas de l'herniarine et l'umbelliférone [36].

Les coumarines isolées du genre *Matricaria* sont rassemblés dans le tableau I-2.

Tableau I-2 : Les coumarines isolées de quelques espèces du genre *Matricaria*.

Espèce	Les coumarines isolées	Les structures	Réf
<i>M.chamomilla</i>	Umbelliférone	<u>26</u>	[37] [38,39]
	Herniarine	<u>27</u>	
	Scoparone	<u>28</u>	
	Scopolatine	<u>29</u>	
	coumarine	<u>30</u>	[22]
	Scopolétine	<u>31</u>	
	Fraxidine	<u>32</u>	
<i>M.ricutita</i>	coumarine	<u>30</u>	[40,41]
	Umbelliférone	<u>26</u>	
	Herniarine	<u>28</u>	
	Scopolétine	<u>31</u>	
	Isoscolétine	<u>33</u>	
	Esculétine	<u>34</u>	

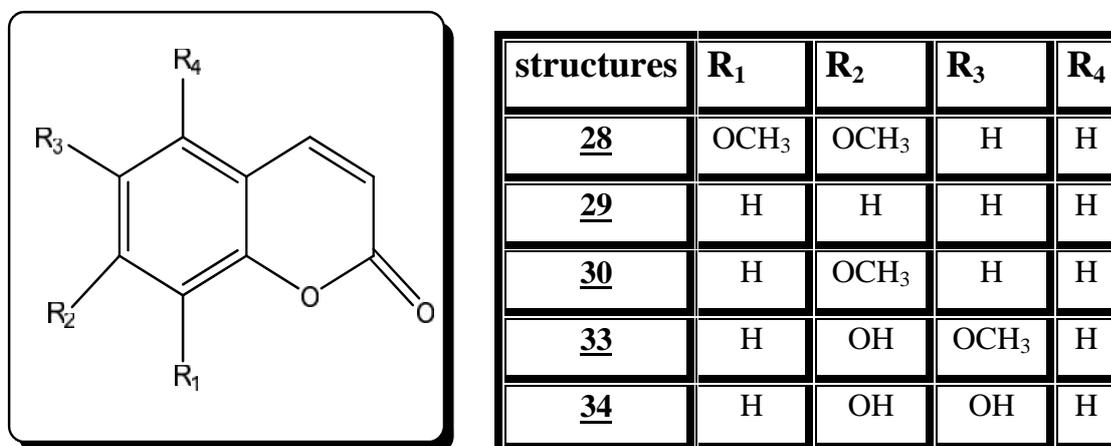
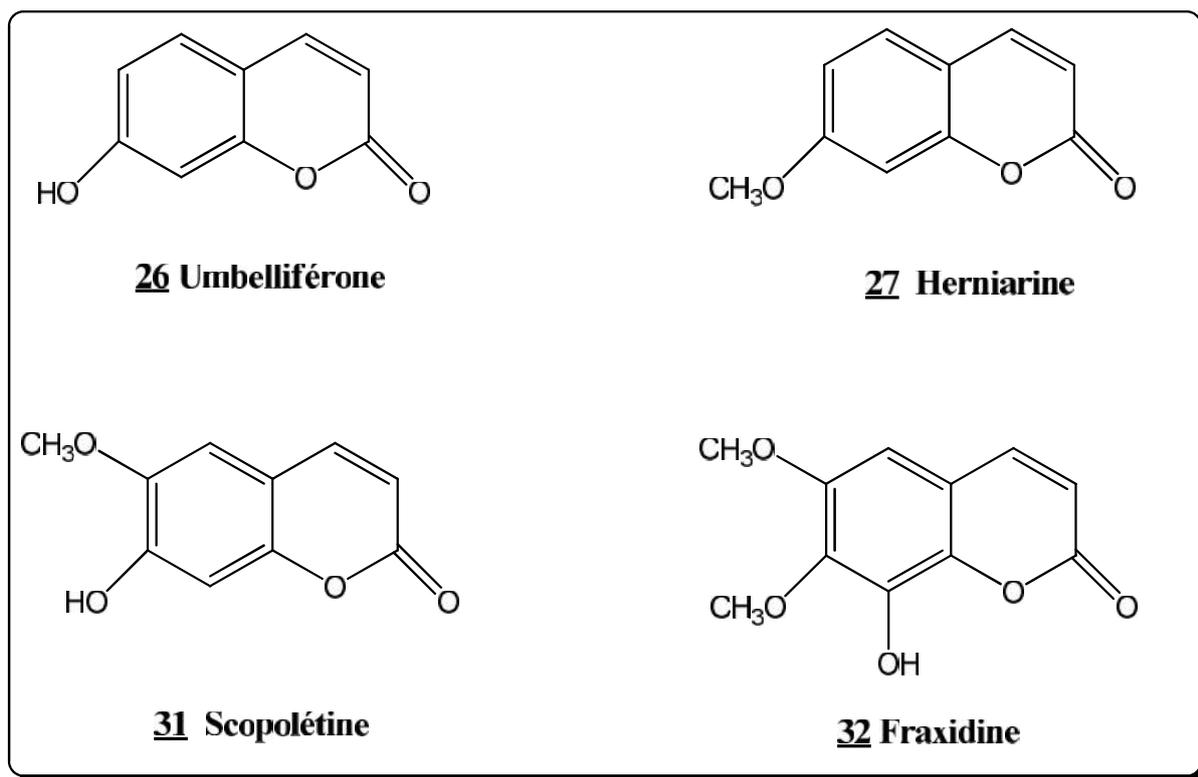


Figure I. 4: Structures chimiques des coumarines isolées de quelques espèces du genre *Matricaria*.

I. 4.3 les sesquiterpènes :

Les lactones sesquiterpéniques constituent un groupe de produits naturels très importants dans la famille des Astéracées ayant une large variété d'activités biologiques. Ils possèdent des propriétés ; neurotoxiques [42], anti-inflammatoires [43], anti-leucémiques [44], antifongiques [45], anti-tumoraux [46].

Les sesquiterpènes lactones présents dans le genre *Matricaria* sont des guaianolides tels que : matricine **35** [47,48], matricarine **36** [44,50], globicine **37** [51] et zuubergenine **38** [52].

Une étude phytochimique a été réalisée sur l'extrait chloroforme de l'espèce *Matricaria Chamomilla* dans notre laboratoire a permis d'isoler et d'identifier trois lactones sesquiterpéniques dont une est originale appelée matricolone **39**, et les deux autres sont nouvelles pour le genre *Matricaria*, 2α - hydroxyl arborescine **40**, dihydroridentine **41**, et un stérol, stigmastérol **42** [53].

Ahmed et al, ont particulièrement étudié l'espèce *M.chamomilla* a permis d'isoler le β -sitostérol **43**, le β -sitostérol glucoside **44**, et l'acide oleanolique **45** [54].

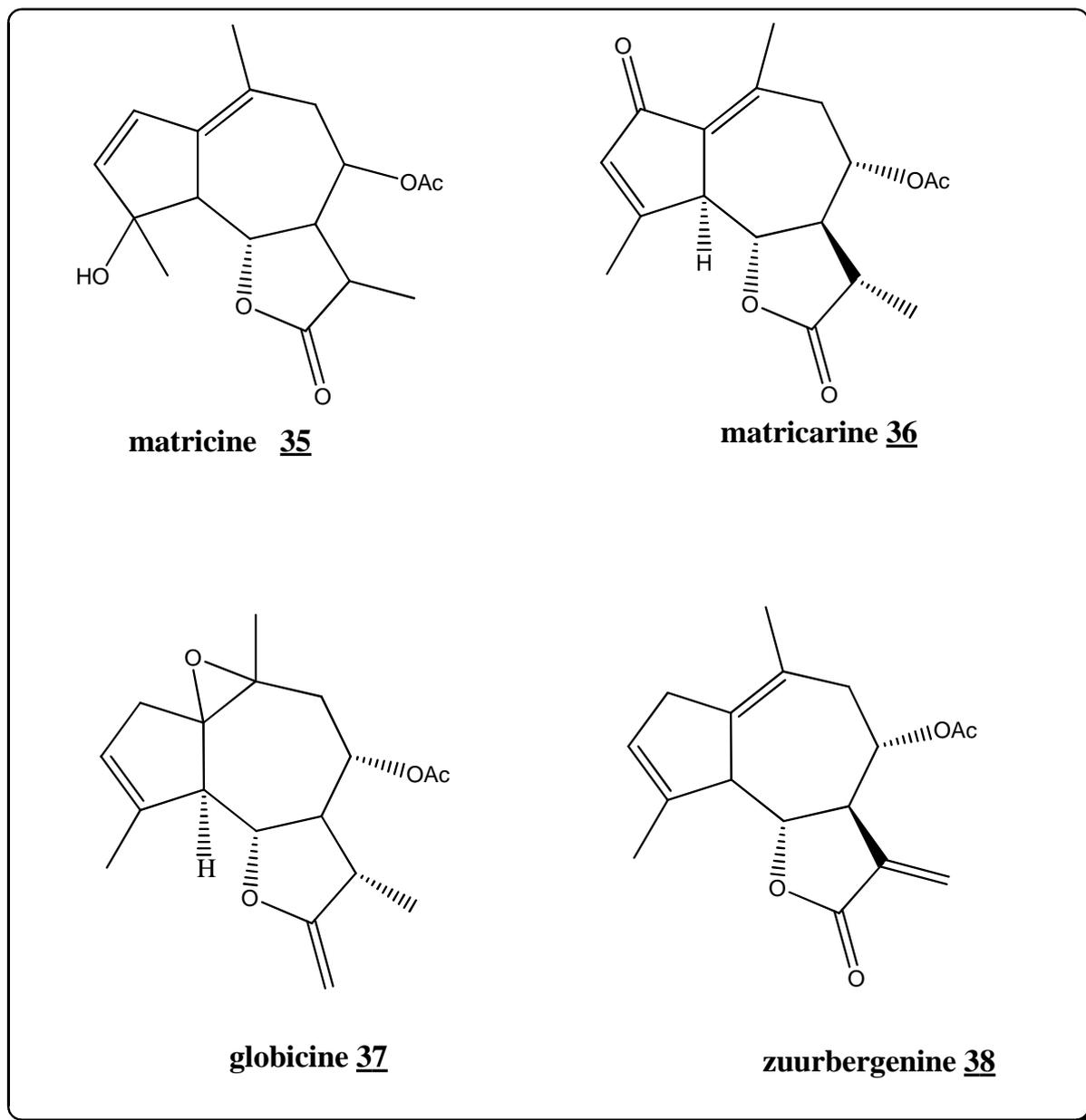


Figure I. 5: Structures chimiques des sesquiterpènes isolées de quelques espèces du genre *Matricaria*.

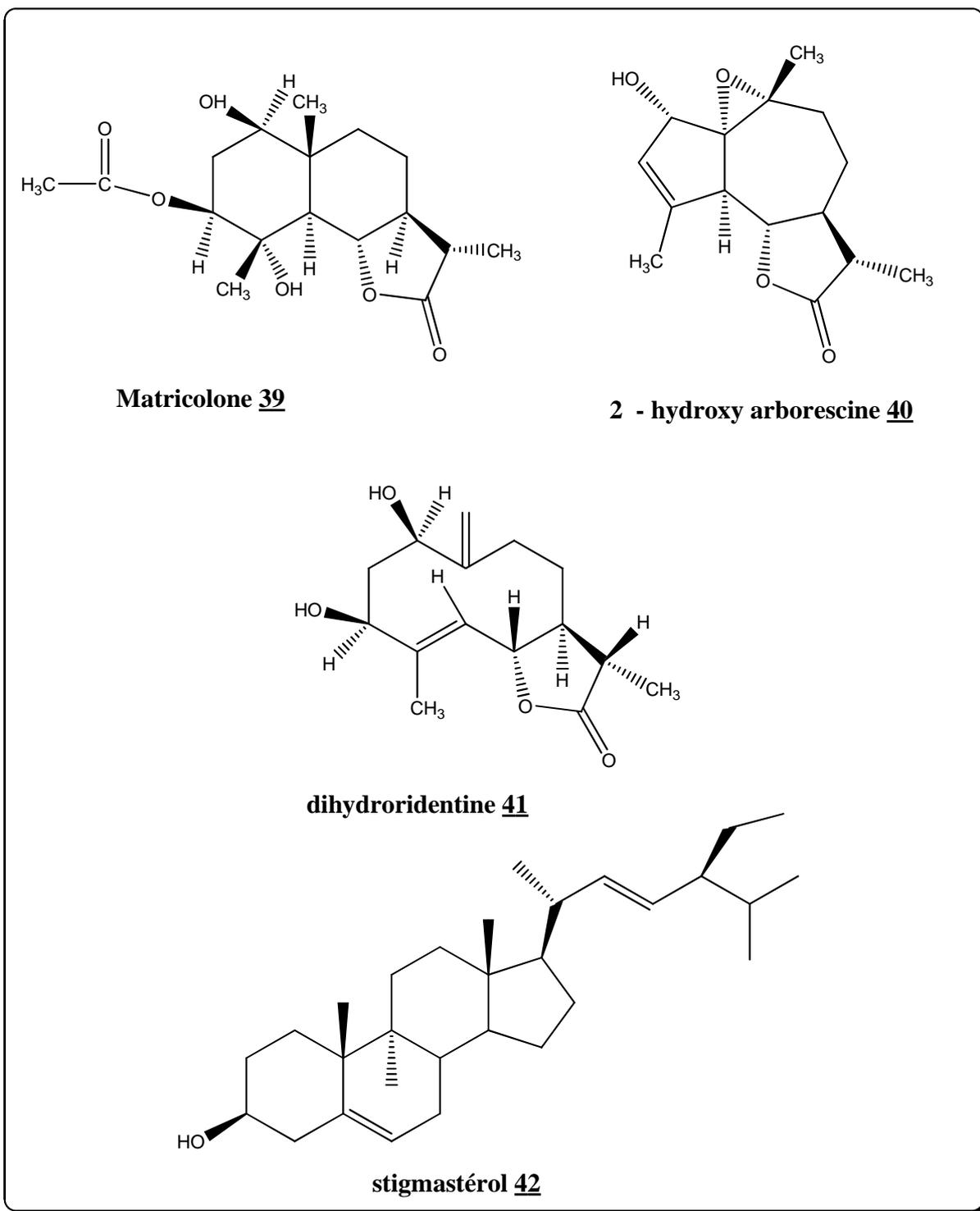


Figure I. 6: Structures chimiques des sesquiterpènes isolées de quelques espèces du genre *Matricaria*.

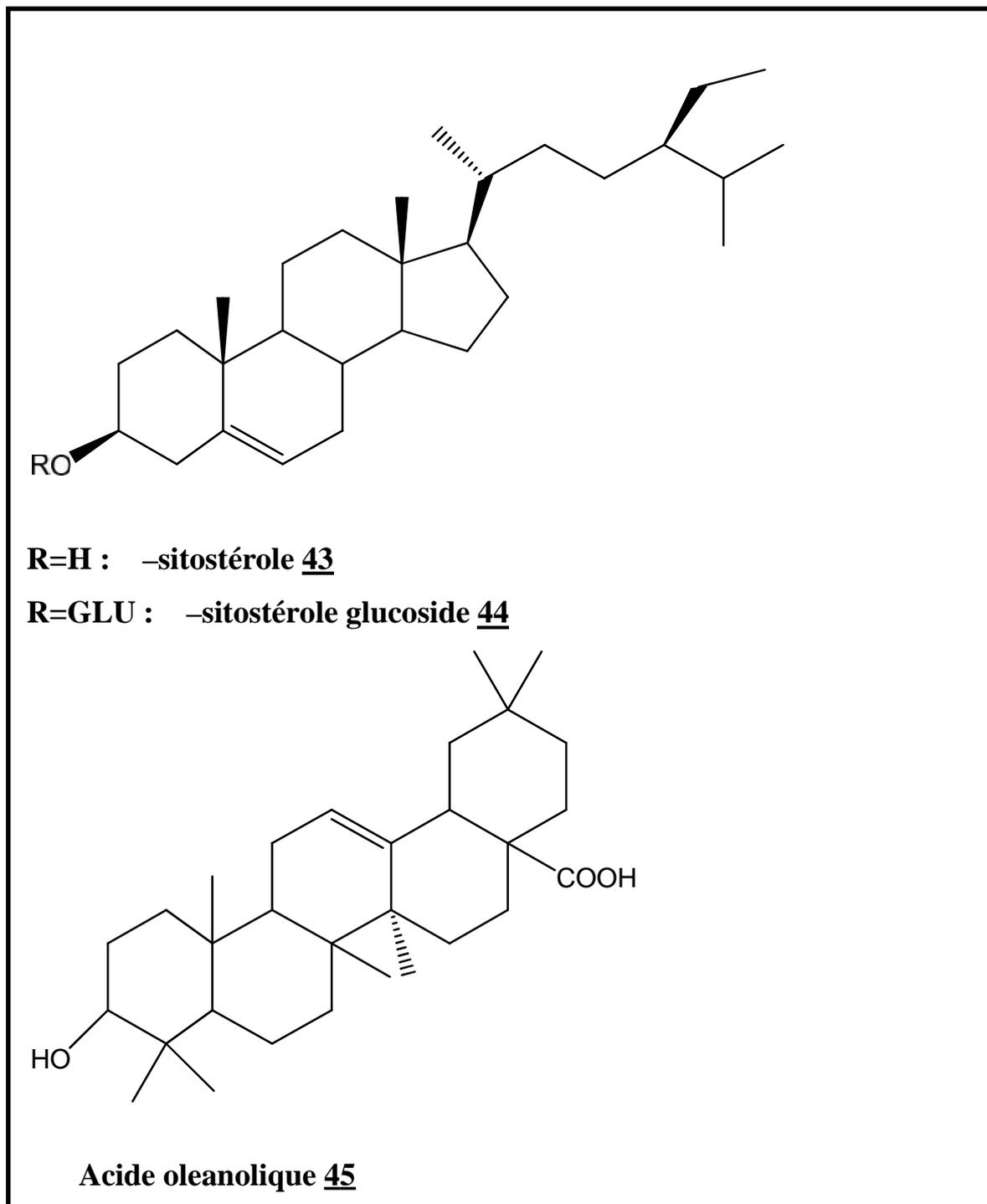


Figure I. 7: Structures chimiques des sesquiterpènes isolées de quelques espèces du genre *Matricaria*.

I. 4.4 les huiles essentielles :

L'étude bibliographique sur les huiles essentielles de *M.chamomilla* à montrée la présence des constituants majoritaires comme -bisabolol 46 et -bisabolol oxide A 47 [55].

Avec le développement des techniques analytiques comme la GC/MS, des études phytochimiques réalisés par Szoke et al [56], Sashidhara et al [57], et Tolouee et al [58] sur l'huile de *M.chamomilla*, révèlent la présence des composés terpéniques tels que : (Z, Z)-farnesole 48, (E)- β -farnesene 49, -cubebene 50, matricine 35 et chamazulène 51.

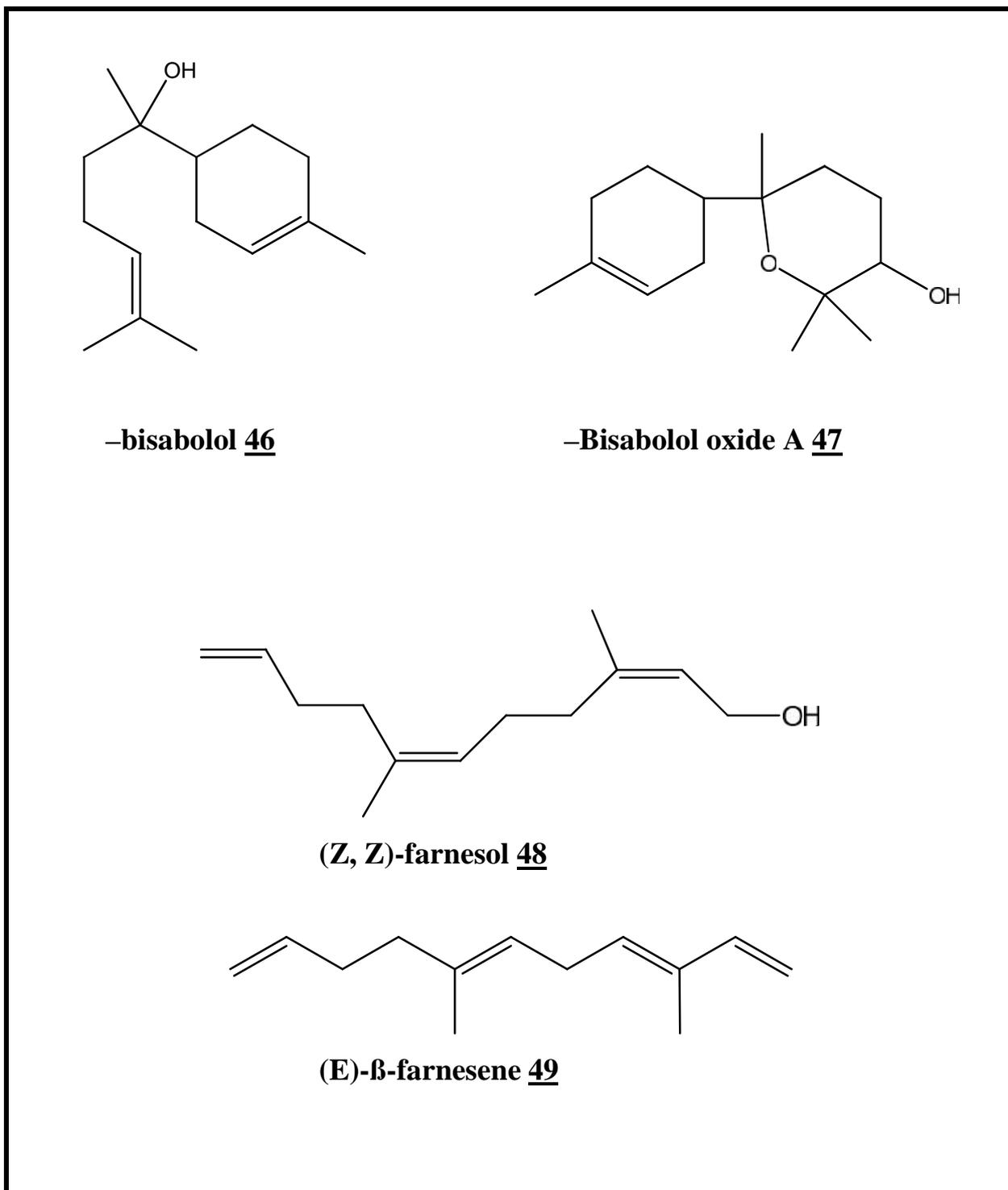


Figure I. 8: Structures chimiques des huiles essentielles isolées de quelques espèces du genre *Matricaria*.

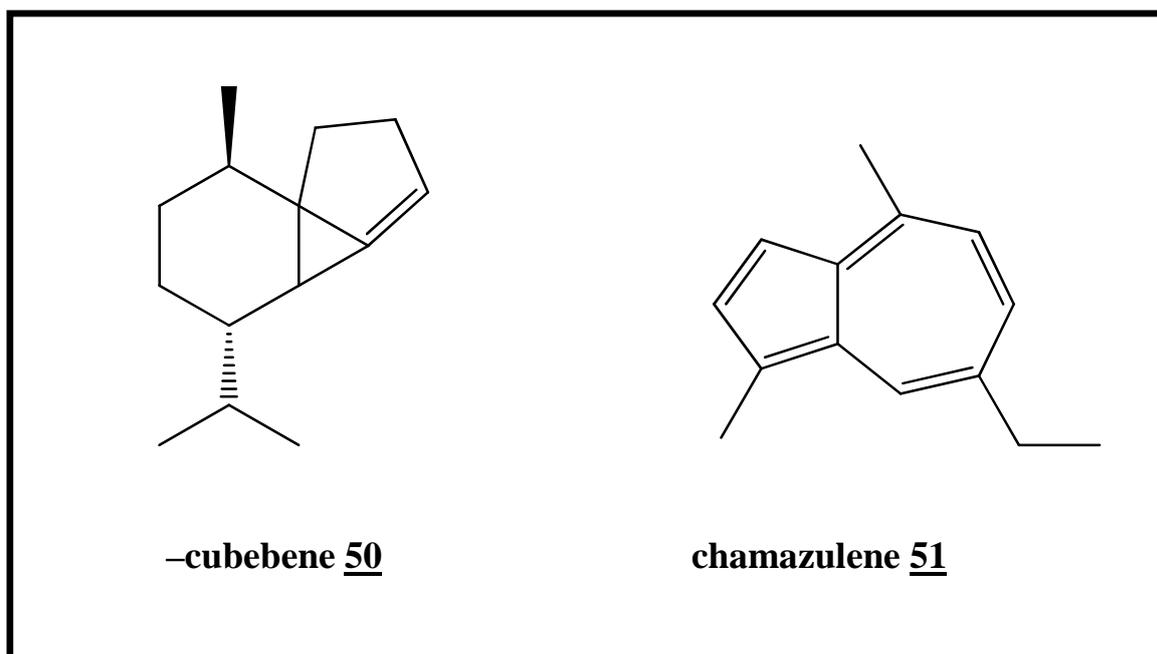
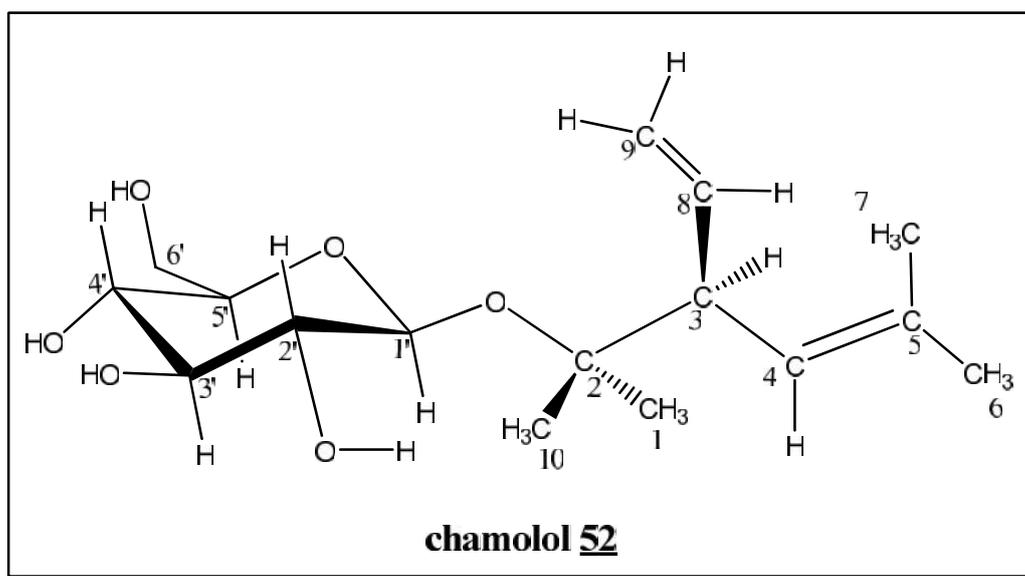


Figure I. 9: Structures chimiques des huiles essentielles isolées de quelques espèces du genre *Matricaria*.

I.4.5. Les autres constituants:

- 🌈 Des composés divers : des amides, polysaccharides, hydrocarbures, triglycérides et des acides gras [59, 60, 61].
- 🌈 l'étude phytochimique qui a été réalisée sur l'extrait chloroforme de l'espèce *Matricaria Chamomilla* dans notre laboratoire a permis d'isoler aussi un produit monoterpéniques acyclique glucosylé pour la première fois: chamolol 52 [53].



Références

- [1] H.Matsuda, T. Morikawa, I.Toguchida, S.Harima, M.Yoshikawa, (2002), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50: 972.
- [2] A.Sarembaud, B.Poitevin, (1996), *Médicament à usage homéopathique*, Ed. Masson, 256 p., Paris.
- [3] K.Bremer, (1994), *Asteraceae, Cladistics and Classification*. (Timber Press), 752 p, Portland, Oregon.
- [4] T.M.Barkely, L.Brouillet, J.L.Strother, (2006), *Flora of north America Asteraceae*. 19, 3-69.
- [5] F.Dupont, et J.PGuignard, (2007), *Botanique systématique moléculaire*. 14ème édition, 248.
- [6] B. Boullard, (1997), *Dictionnaire: Plantes et champignons*, 202.
- [7] R.E.Spichiger, V.V. Savolainen, M.Figeat, et D.Jeanmonod, (2004), *Botanique Systématique des plantes à fleurs* .3ème édition, 348-349.
- [8] J.M.Florin, (2008), *les astéracées, une famille solaire*. *Biodynamis*, N° 64.
- [9] G.Usher, (1966), *A dictionary of botany, including terms used in biochemistry, soil science, and statistics*. Constable & Co Ltd, London.
- [10] C.Weiss, (1966), *Tetrahedron*. 22(1), 145-156.
- [11] E.Sawicki, C.R. Ángel, (1967). *Analytica Chimica Acta*, 38, 315-320.
- [12] D.L.McKay, J.B.Blumberg, (2006), *Phytother. Res*, 20, 519-530.
- [13] J.K.Srivastava, S.J.Gupta, (2007), *Agric. Food Chem*, 55, 9470-9478.
- [14] S.Daragland, H.Senoo, K.Wake, K. Holte, R.Blomhoff, (2003), *J.Nutr.*, 133, 1286.
- [15] J.Subiza, M.Alonso, M. Minojosa, R. Gareia, M.Jerz, E.Subiza, (1990), *Ann. Allerg.*, 65 (2), 132.
- [16] H.Schilder, (1973), *Planta med.*, 23, 132.
- [17] V. Švehliková, M. Repcák, (2000), *plant Biol.*, 2, 403
- [18] H.Niederhofer, (2009), *Phytomedicine*, 16, 284-286.
- [19] J.B.Harbone, (1977), *Biol.Chem.Comp*, 1,359.
- [20] J.Bruneton, (1993), *Pharmacognosie, Phytochimie des plantes medicinales*, Thechnique et documentation,Lavoisier,Paris 268.
- [21] W.Poethke, P.Bulin, (1969), *Pham Zantalh*, 108(11), 747.
- [22] C.D.Iverson, S.Zahid, A.H.Choquafi, A.Ata, R. Samarasekera, (2010), *Phytochemistry Letters* 3,207-211.

- [23] R.Haensel, H.Rimpler, K.Walther, (1966), *Naturwissenschaften*, 53(1) ,19.
- [24] C.Redaeli, L.Formontini, E.Santaniello, (1980), *Phytochemistry*, 19(5) ,986.
- [25] R.kunde, O.Issac, (1979), *Planta med*, 37(2) ,130.
- [26] C.Redaeli, L.Formentini, E.Santamillo, (1982), *Phytochemistry* ,21(7) ,1830.
- [27] C.Redaeli, L.Formentini, E.Santamillo, (1981), *Planta med*, 42(3) ,292.
- [28] A.H.Merichi, Y.Korkmaz, (1992), *Acta Pharm .Tur*, 34(3) ,73.
- [29] J.Exner, J.Reichling, T.C.H.Col, H.Becker, (1981), *Planta med*, 41(2) ,200.
- [30] A.G.Suganda, M.Amoros, B.Foconnier, L.Girre, (1984), *Planta med*, *Phyther*, 18(4) ,225.
- [31] I.Mathe, E.Tvinac, (1992), *Acta Pharm*, 32-48.
- [32] P.Peneva, S.Ivancheva, L.Terzieva, (1989), *Rast Nouki*, 26(6) ,33.
- [33] V.Švehlíková, R.N.Bennett, F.A.Mellon, P.W.Needs, S. Piacente, P.A Kroon, Y. Bao, (2004), *phytochemistry*, 65, 2323-2332.
- [34] V.Švehlíková, M. Repečak, (2006), *Biochem.Syst.Ecol.*, 34, 654.
- [35] B.Hagmar, (1969), *Pathol. Europ.*, 4, 283.
- [36] B.Tosi, C.Romagnoli, A.E.Menziani, A.Bruni, (1995), *I.J.Pharm*, 33(2) ,144.
- [37] W.Poethke, P.Bulin, (1969), *Pham Zentralh*, 108(11) ,147.
- [38] C.Redaeli, L.Formentini, E.Santamillo, (1981), *J.Chromato*, 209(1) ,112.
- [39] A.H.Merichi, (1990), *Int.J.Cru.Dr.Res*, 28(12) ,147.
- [40] B.E.Hethelyi, K.Korany, B.Smandi, P.J.Domakas, (2002), *Olaj.Szopen.Kozmetika*, 51(6) ,47.
- [41] M.Repeak, A.Eliasova, A.Ruscancinova, (1998), *Pharmazi*, 53(4) ,279.
- [42] M. Roblès, M.Aregullin, J.West, E. Rodriguez, (1995), *Planta Medica* ,61 ,199-203.
- [43] J.Y.Cho, U.K.Baik, J.H.Jung, M. Park, (2000), *European Journal of Pharmacology*, 398 ,399-407.
- [44] R. Kasai, T.Shingu, R.Y. Wu, I.H.Hal, K.H.Lee, (1982), *Natural Products* 45(3), 317-320.
- [45] H.Scaltse, D.Lazari, C.Panagouleas, E.Geogiadou, B.Garcia, M.Sokovic, (2000), *Phytochemistry* 55(8), 903-908.
- [46] A.K. Picman, (1986), *Biochemical Systematics and Ecology*, 14, 255-281.
- [47] Ronald Berezney, (1980), *Cell Biology International Reports*, 4(2), 167-173.
- [48] A.Giovanni, G.Pierluigi, (1982), *Phytochemistry*, 21(10), 2555-2557.
- [49] E.HWhite,S. Eguchi, J.N. Marx, (1969), *Tetrahedron*, 25(10), 2099-2115.
- [50] F.Bohlmann, C. Zdero, (1978), *Phytochemistry*, 17(9), 1595-1599.

- [51] R.B.Bates, V. Procházka, Z. C kan, (1963), *Tetrahedron Letters*, 4(14), 877-880.
- [52] F.Bohlmann, C. Zdero, (1977). *Phytochemistry*, 16(1),136-137.
- [53] L.Zaiter, M. Bouheroum, S.Benayache, F.Benayache, F. Leon, I.Brouard, J.Quintana, F.Estevez,J.Bermejo, (2007),*Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 533-538.
- [54] A.Ahmad, L.N Misra, (1997), *Pharm. Biol*, 35, 121-125.
- [55] G.P.P.Kamatou, A.M.J.Viljoen, (2010), *Am. Oil. Chem. Soc.* , 81, 1-7.
- [56] E. Szoke, E.Maday, E.Tyihak, I.N Kuzovkina, E. Lembaekovicks, (2004), *J.Chromatog .B*, 800,231-238.
- [57] K.VSashidhara, R.S Verma, P.Ram, (2006), *Flavour Fragr. J*, 21, 274-276.
- [58] M.Tolouee, S.Alinezhad, R. Saberi, A.Eslamifar, S.J. Zad, K. Jaimand, J.Taeb, M.B.Rezaee, M.Kawachi, M.Chams-Ghahffarokhi, M.Razaghi-Abyaneh, (2010), *Int. J. Food Microbiol*, 141,127-133.
- [59] H.Greger, O. Hofer, (1984), *Phytochemistry*, 23(5), 1174.
- [60] S.Kocurik, L. Granits, (1979), *Farm. Obz*, 48(3), 111.
- [61] K.Stransky , M. Striebl ,K. Ubik ,J. Kohoutova ,(1981), *Anstrichum*, 83(9), 347.

Chapitre II

Les flavonoïdes

II.1. Introduction :

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [1].

Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires [2], et jouent un rôle important dans la protection des plantes [3].

Les flavonoïdes se trouvent également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant ces composés sont utilisés en médecine traditionnelle à travers le monde entier [4].

II.2. Structure chimique et classification des flavonoïdes :

Flavonoïde, est un terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 atomes de carbone qui, à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C₆-C₃-C₆). Ce dernier est situé entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C. Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et le cycle B de 2' à 6' (figure II.1) [5].

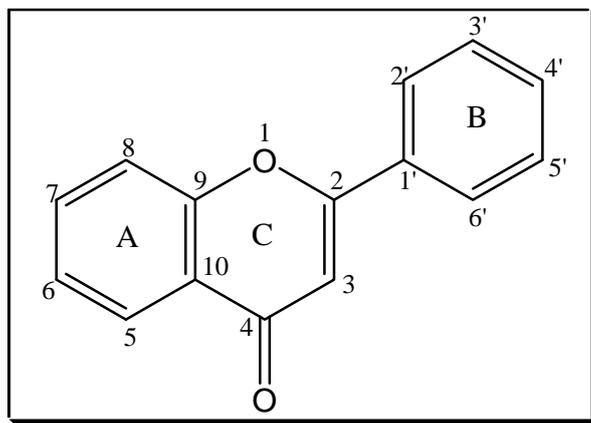


Figure II.1: squelette de base des flavonoïdes

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les chalcones, les aurones et les anthocyanes.

II.2.1. Flavones et Flavonols:

Ces molécules représentent la majorité des flavonoïdes connus. Le cycle A est, dans plus de 90% des cas, substitué par deux hydroxyles phénoliques en C₅ et en C₇. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables: hydroxyles libres ou étherifiés en C-7 et/ou en C-8, méthylation en C-7 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone carbone avec un sucre. D'autre part, dans plus de 80% des cas, le cycle B est substitué en C-4' ou disubstitué en C-3' et C-4', et moins fréquemment trisubstitué en 3', 4', 5'; ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles (OH) ou méthoxyles (OCH₃), les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées.

En plus, les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3.

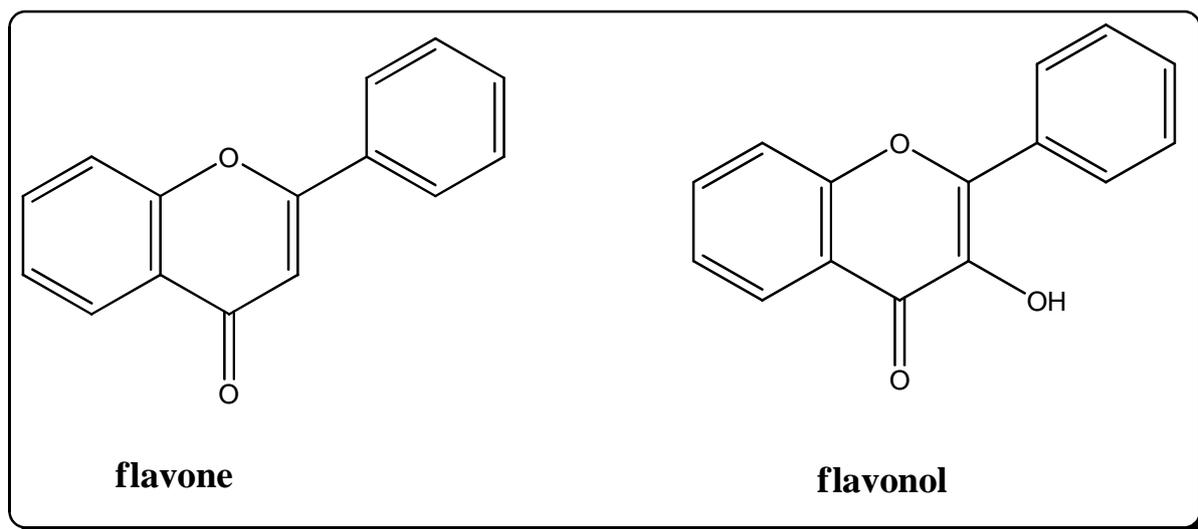


Figure II.2 : structures de base des flavones et flavonols.

II-2. 2. Flavanones et Dihydroflavonols:

Les flavanones et les dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison C₂-C₃ et par la présence de centres d'asymétrie (Figure II-3). Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Cette classe de flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé rassemblant les flavones et flavonols.

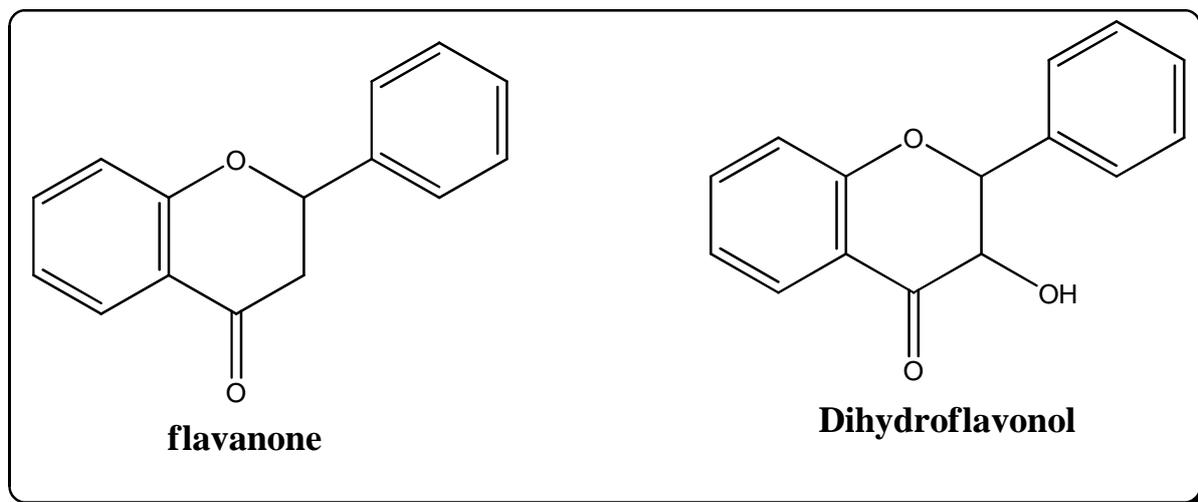


Figure II.3 : structures de base des flavanones et dihydroflavonols.

II.2.3. Flavan-3-ols, Flavan-3,4-diols et Anthocyanidols:

A la différence des flavonoïdes décrits ci-dessus, ces trois groupes de molécules sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C-4. Cette position peut être libre (cas des flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (cas des flavan-3,4-diols)

- Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont à l'origine des polymères flavaniques appelés proanthocyanidols ou tanins condensés
- Les anthocyanidols les plus fréquents sont le pélargonidol et le cyanidol. Les anthocyanosides sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le pélargonidol-3-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoside ou kérafcyanine.

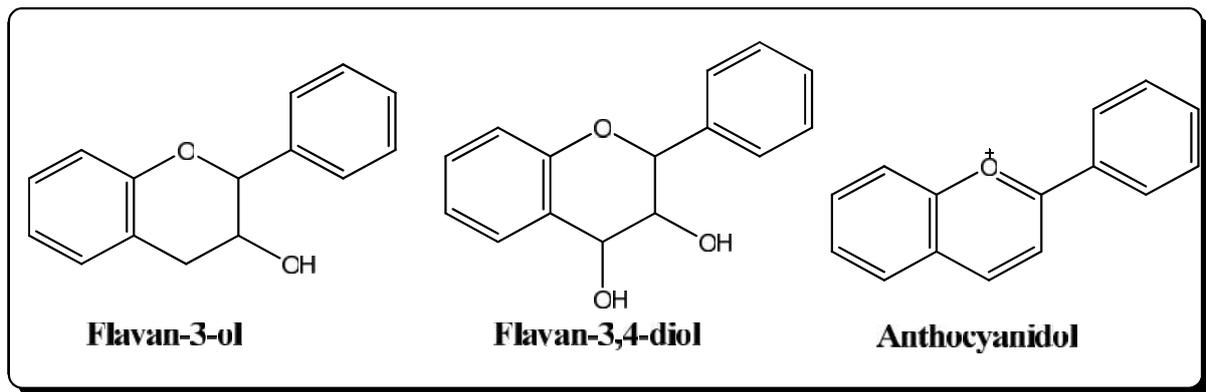


Figure II.4 : structures de base des flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols.

II.2.4. Chalcones et Aurones:

Les chalcones sont différentes des autres types de flavonoïdes cités ci-dessus. De par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique, insaturée, comme le montre la (Figure II.5). Le noyau B est fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes.

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidènegoumaranone. Sachant que, pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes décrits précédemment (Figure II.5).

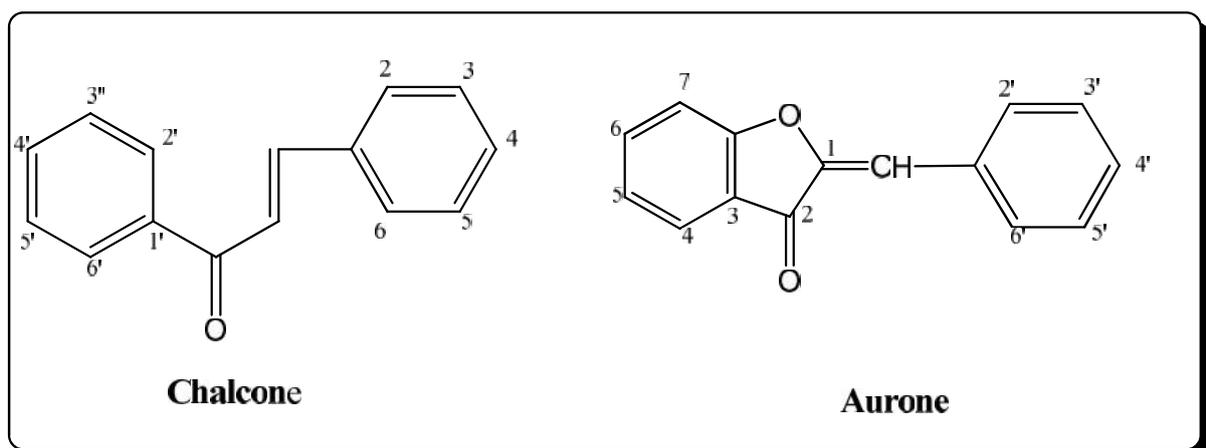


Figure II.5 : structures de base des chalcones et aurones.

II.2.5. Isoflavones :

Les isoflavones sont considérées comme des dérivés des flavones, elles ont le squelette du 3-phénylchromane comme la Génisteine 5, 7, 4'-trisubstitués. Les substituants sont des groupements OH [6]. Les isoflavonoïdes représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoïdes. Ils ont une distribution très limitée dans le royaume des plantes et ils sont restreints à la sous-famille Papilionoideae des légumineuses [7].

La (figure II.6) illustre les principales classe des isoflavonoïdes.

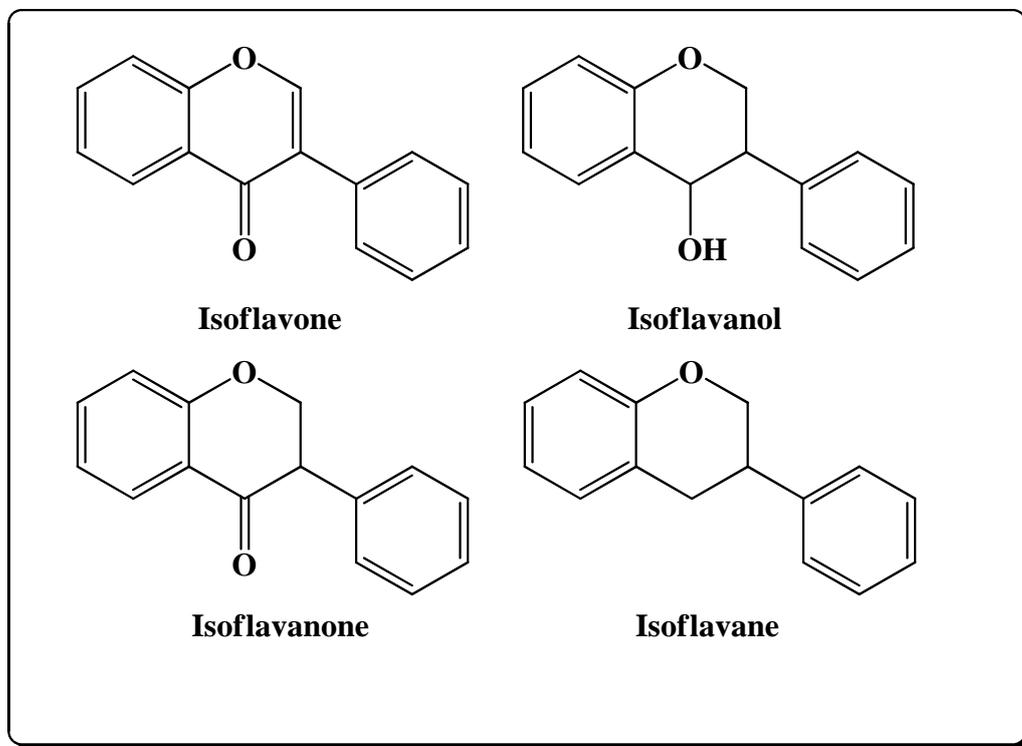


Figure II.6 : les différents types des isoflavones.

II. 3. Biosynthèse des flavonoïdes :

Dérivant d'une origine biosynthétique commune, les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonylcoenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA.

a. La voie de l'acide shikimique :

Les travaux de Davis ont montré le rôle de l'acide shikimique dans la formation du noyau B et l'élément central C-3 à partir du glucose [8]. Le chemin général de la formation de l'acide coumarique est représenté sur la figure II-7.

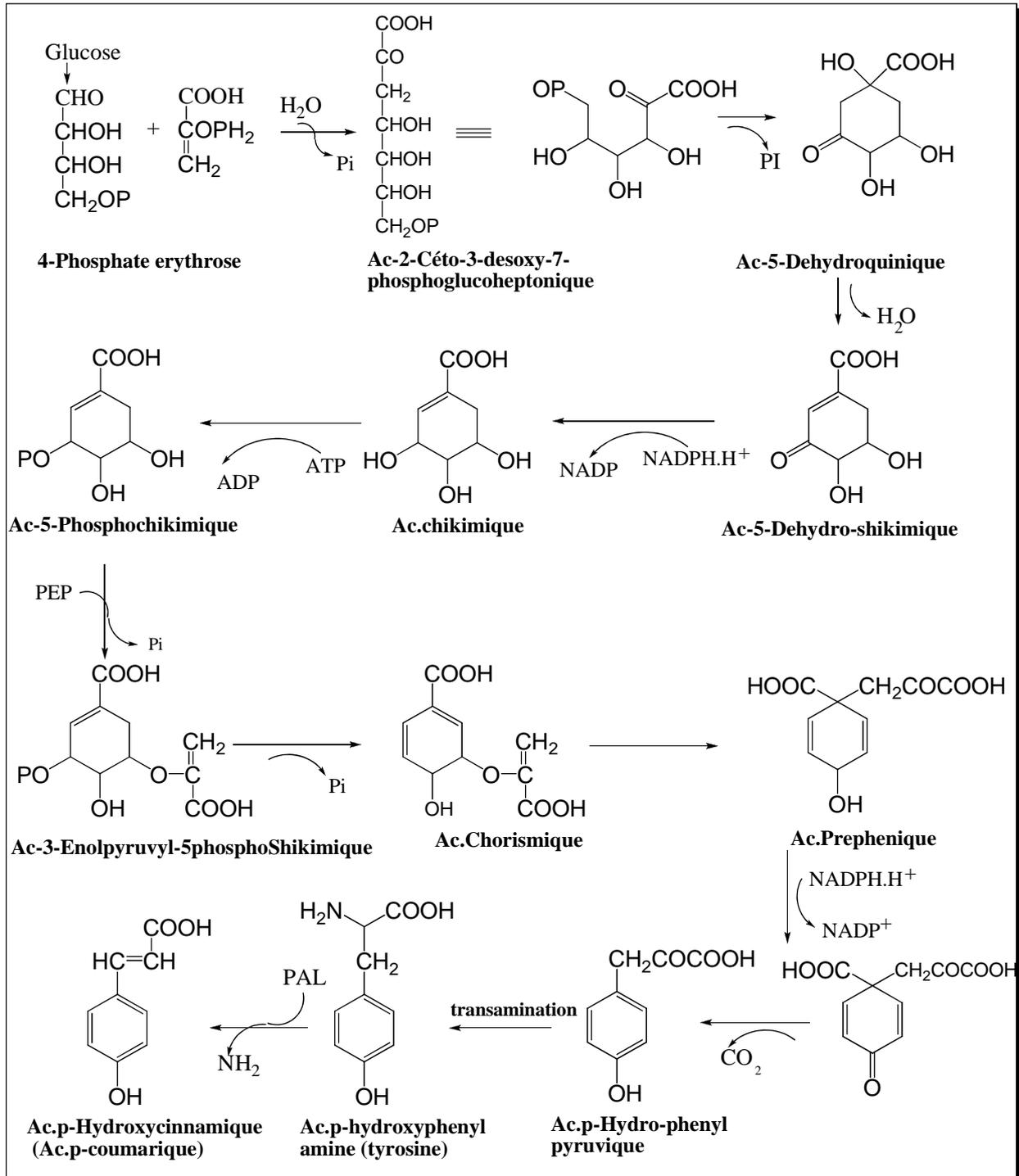


Figure II-7 : Chemin de formation de l'acide p-coumarique.

b. La voie malonate :

A travers cette voie s'effectue la cyclisation de la chaîne poly-cétonique obtenue par condensation répétée d'unités acétates, et catalysée par l'acétyl-CoA.

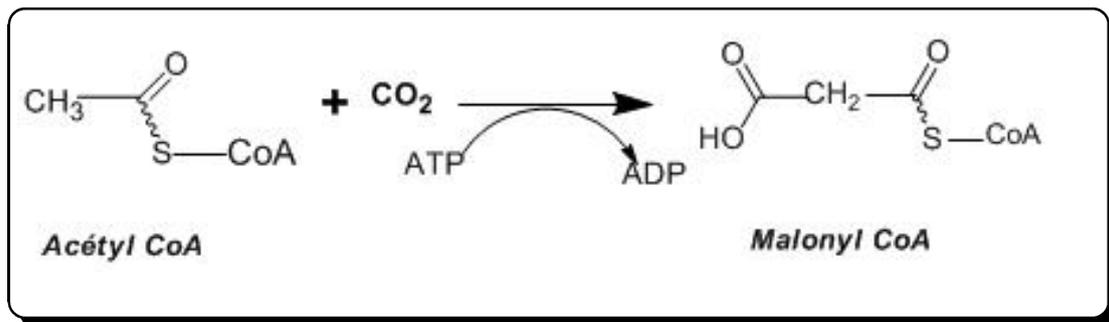


Figure II-8 : La formation du Malonyl CoA à partir du Acétyl CoA.

Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyls-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase) [9].

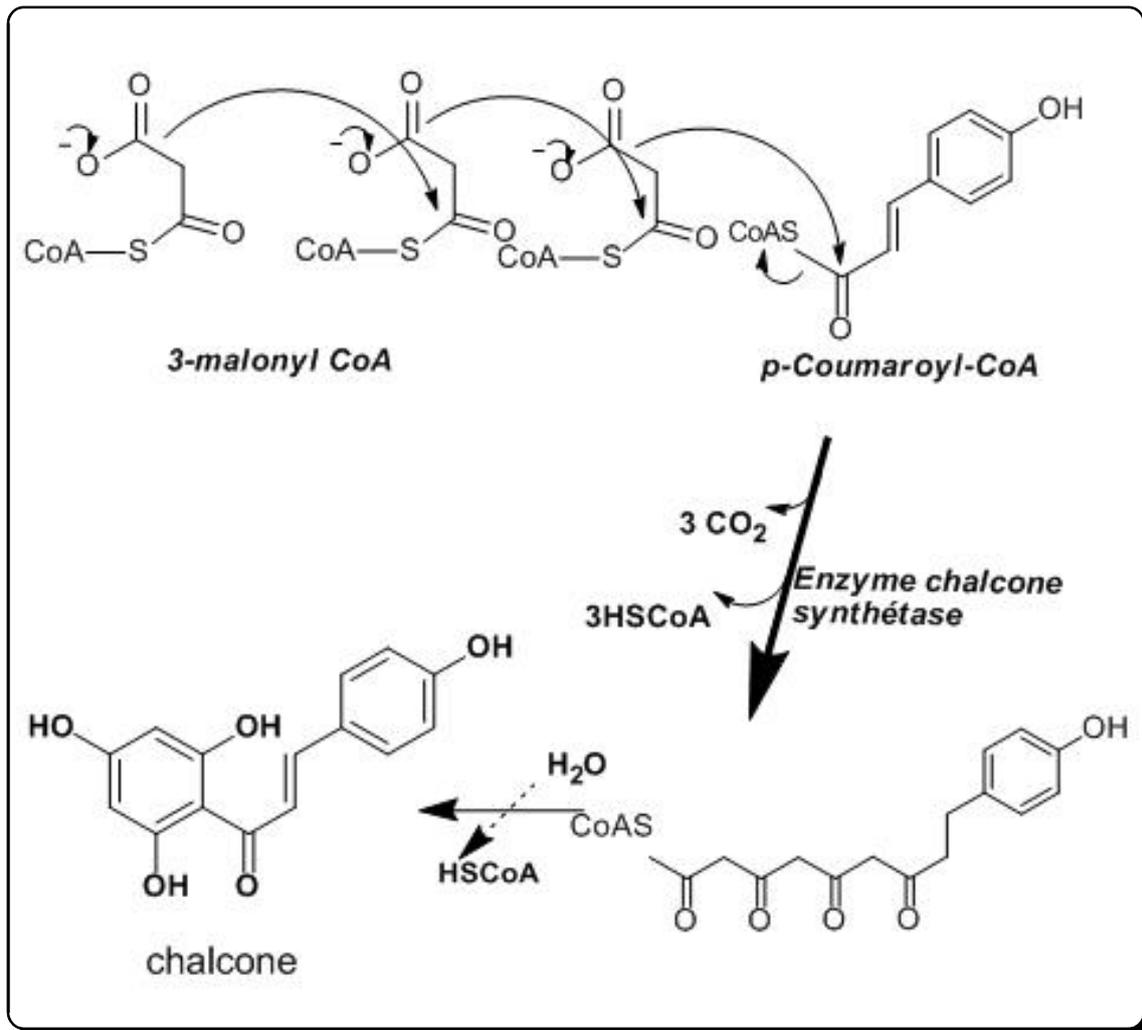


Figure II-9 : La condensation des trois malonyl-CoA avec p-coumaroyl-CoA.

c.la biosynthèse des squelettes falavoniques à partir de la chalcone :

D'après Grisébach [10].

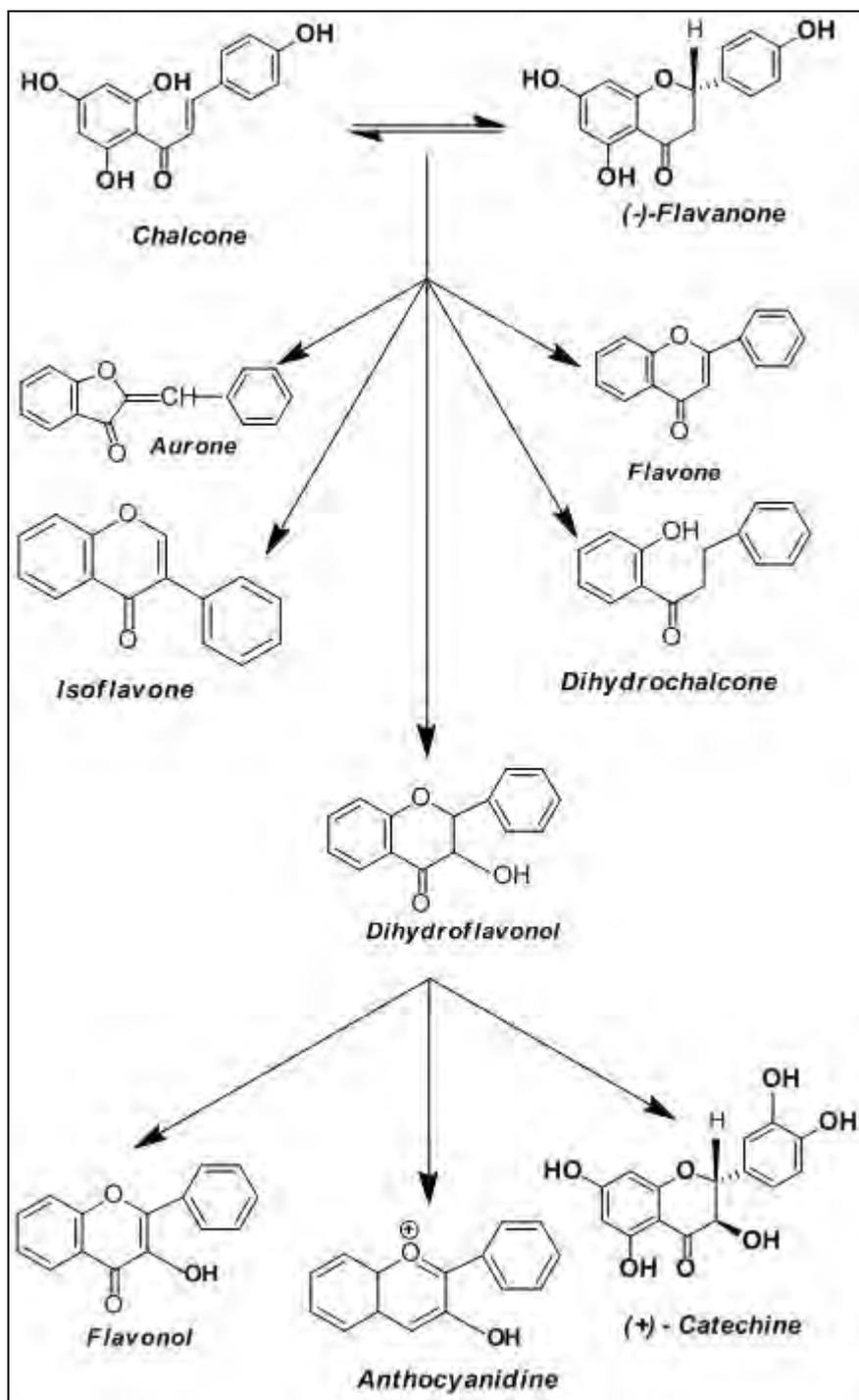


Figure 10: La biosynthèse des squelettes flavoniques à partir de la chalcone.

II.4. Substitution du squelette flavonique:

Les substitutions du squelette flavonique sont très diversifiées, elles peuvent être des hydroxylations, des méthylation et des glycosylations. Les composés de chaque sous

groupe se distinguent par le nombre, la position et la nature du substituant sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire [11].

II.4.1- L'hydroxylation:

En général, pour les flavones et les flavonols, et selon les réactions de biogenèse, les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone [69].

L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la fermeture de l'hétérocycle C, c'est-à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3', 4', 5') se fera par le biais des enzymes hydroxylases [12- 13].

Les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylés [14].

II.4.2- La méthylation :

La méthylation par l'intermédiaire d'une jonction C-C se fait uniquement en C-6 et ou en C-8 par contre la fixation du groupement méthyle pour former un groupement méthoxyle, se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (O-méthyltransferase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la S-adenosyl-méthionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone [12, 15].

Cette réaction de méthylation peut se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7, 8), sur le noyau B (carbones 2', 3', 4', 5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones et flavonols [12].

II.4.3- La O-glycosylation :

Elle s'effectue entre un hydroxyle du squelette flavonique et un hydroxyle alcoolique du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose). La O-glycosylation se fait en présence de l'enzyme Glucosyltransferase et un donneur de sucre comme UDP-Glu (Uridine diphosphate glucose).

D'une manière générale, l'hydroxyle de la position 7 constitue le site préférentiel de la glycosylation dans le cas des flavones alors que dans le cas des flavonols c'est l'hydroxyle de la position 3 comme le montre la figure II-11 [16].

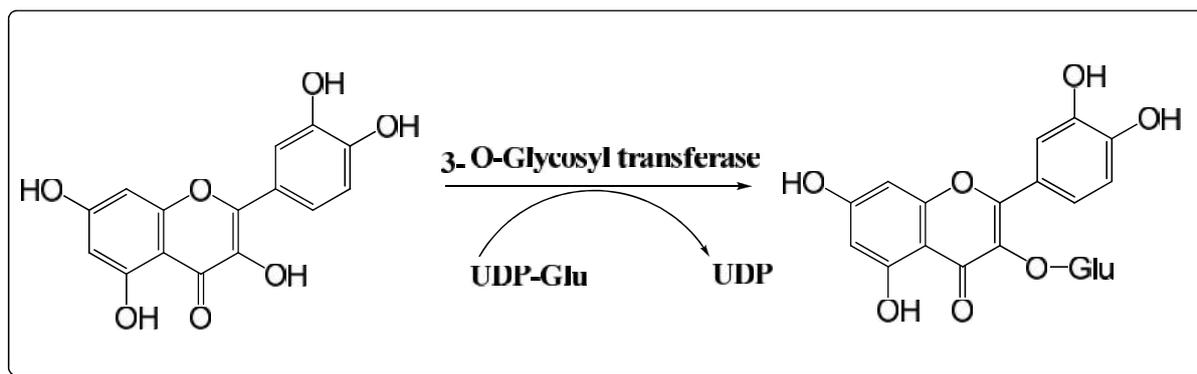


Figure II.11: Glycosylation de la quercétine.

II.4.4- La C-glycosylation :

Les flavonoïdes C-glycosylés ne sont pas rares, on y trouve plus de 350 hétérosides [5]. Dans ce type de composés, le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide [17].

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

II.5. Distribution et localisation des flavonoïdes dans les plantes et le règne végétal:

Seules les plantes a, de rares exceptions prés, ont la capacité de biosynthétiser les flavonoïdes, ces derniers peuvent être présents dans toutes les parties de la plante, ils sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles permettant ainsi leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, dans l'épiderme et le mésophylle des feuilles, dans les parenchymes des tiges et racines [5]. Seule les génines sont présentes dans les exsudats farineux de certaines plantes, dans les cuticules des feuilles, écorces et bourgeons ou sous forme de cristaux dans les cellules de certaines Cactacées et plantes de régions arides [18]. Il est à noter que les flavanones et flavones sont souvent présentes dans la même plante, flavones et flavonols ne se trouvent généralement pas ensemble, pas plus que flavanols et anthocyanes [19].

La présence de composés flavonoïdiques a été rapportée chez les Bryophytes, les Ptéridophytes, les Gymnospermes et chez les Angiospermes [20]. Cette distribution quasiubiquitaire dans les plantes, alliée à leur relative stabilité, leur relative facilité

d'identification et la forte tendance des plantes taxonomiquement proches à produire les mêmes types de flavonoïdes, ont fait des flavonoïdes des marqueurs chimiotaxonomiques de choix pour la classification végétale [21-22].

Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones [23-24]. Le Tableau II.1 regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes dans quelques plantes alimentaires.

Tableau II.1: Sources alimentaires des flavonoïdes.

Flavonoïdes	Aliments
<i>Flavanones</i> Naringénine	Fruits du genre citrus
<i>Flavones</i> Chrysin Apigénine Lutéoline	Peau des fruits Persil, thym, romarin, céleri Persil, céleri
<i>Flavonol</i> Kaempférol Quercétine Myricétine	Radis, brocoli, thé noir Oignon, pomme, olive, vin rouge, tomate Canneberge, vin rouge
<i>Flavan-3-ols</i> Epicatechine Catéchine	Thé vert, thé noir Thé vert, thé noir

II.6. Rôle des flavonoïdes dans les plantes :

Les flavonoïdes sont les pigments colorés des fleurs. De ce fait, ils jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes (attraction et rôle dans la pollinisation entomophile et la dispersion des graines). Ils sont aussi impliqués dans les interactions plantes-microorganismes : dans les pathogènes comme dans les symbioses (nodules des légumineuses) et agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponse à certains stress tels que les radiations ultraviolettes. Ce sont également des inhibiteurs d'enzymes, des agents chélatants des métaux nocifs aux plantes. Certains flavonoïdes permettent de protéger les plantes génératrices de saveurs contre les herbivores [25].

De plus, les flavonoïdes sont impliqués dans la photosensibilisation et les transferts d'énergie, la morphogénèse et la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes [26-27].

II.7. Quelques activités pharmacologiques des flavonoïdes :

II.7.1. L'activité antioxydante des flavonoïdes :

La propriété fondamentale des flavonoïdes est leur caractère antioxydant. A ce titre, ils agissent à plusieurs niveaux :

II.7.1.1. Inhibition d'enzymes ou chélation des éléments traces impliqués dans la formation de radicaux :

Les flavonoïdes inhibent la xanthine oxydase, source biologique importante du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ils sont également connus pour inhiber d'autres enzymes impliquées dans la génération de ROS telles que les cyclooxygénases, les lipooxygénases, ou les monooxygénases microsomiales [27].

Le radical superoxyde réagit avec le peroxyde d'hydrogène en présence de fer pour donner par dismutation des radicaux hydroxyles encore plus toxiques (OH^{\cdot}). C'est cette réaction, appelée réaction de Fenton, catalysée par le fer, qui est inhibée par certains flavonoïdes tels que la quercétine [28].

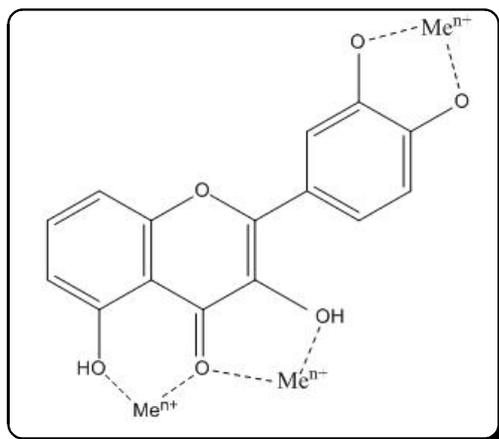


Figure II.12 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) [29].

II.8.2.2. Piégeage des radicaux :

En raison de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes peuvent réduire les radicaux libres très oxydés comme les superoxydes, les radicaux peroxydes ou les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène [27].

L'activité des flavonoïdes à piéger les radicaux dépend essentiellement de leur structure.

a). Comparaison de l'activité antioxydante des différents 3, 5, 7, 3', 4' - pentahydroxy phénols :

Les molécules de la (Figure II.13) représentent trois flavonoïdes avec 5 groupes hydroxyles aux mêmes positions : la quercétine, un flavonol ; la catéchine, un flavan-3-ol; et la cyanidine, un anthocyane. L'activité de la quercétine (4,72 mM) est deux fois plus élevée que celle de la catéchine (2,4 mM). Ceci est dû au fait que la quercétine possède une double liaison C2-C3 et une fonction 4-oxo. La cyanidine avec une structure conjuguée, a approximativement la même activité antioxydante que celle de la quercétine. Ces résultats démontrent l'importance de la présence d'un cycle C insaturé, qui permet la délocalisation des électrons [30].

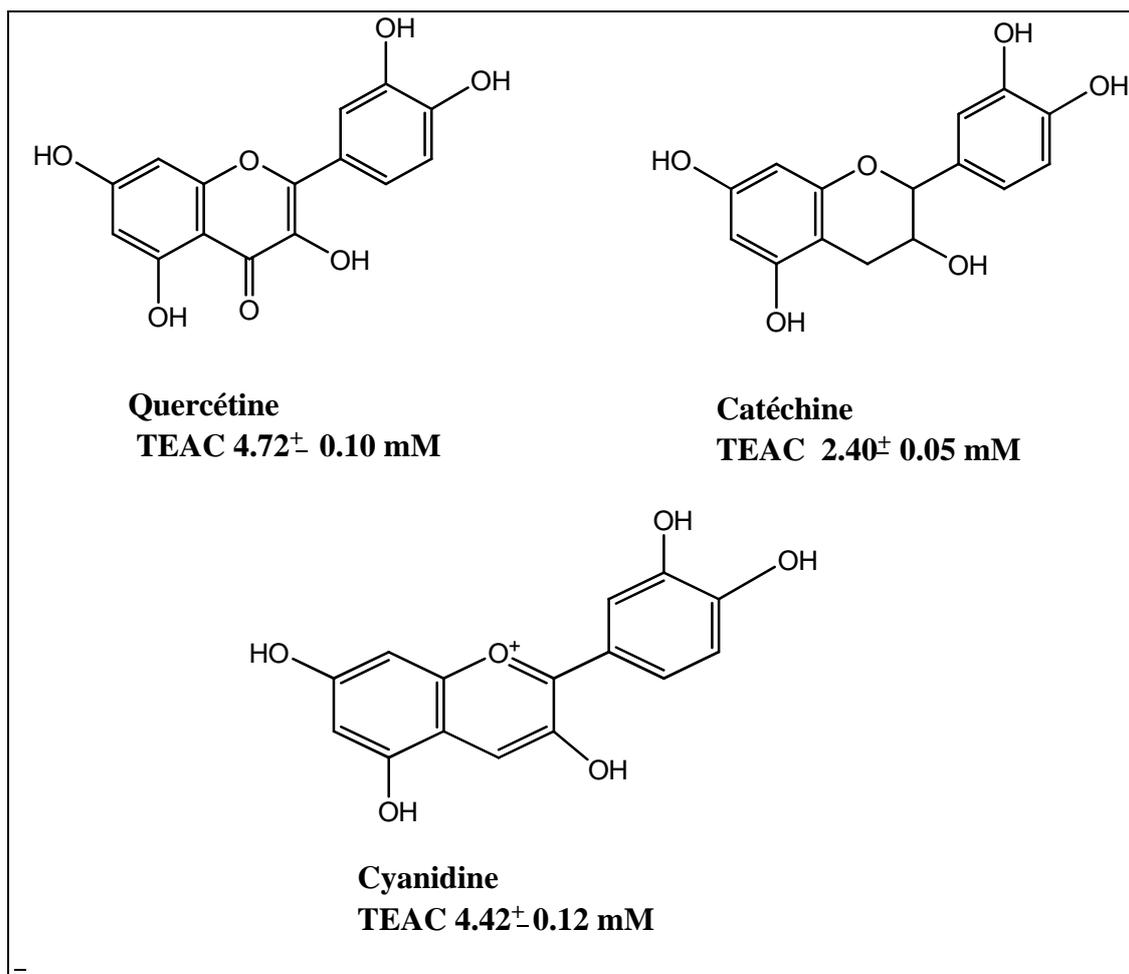


Figure II. 13 : Comparaison de l'activité antioxydante des différents 3, 5,7, 3', 4'-pentahydroxy phénols.

b). Importance de la structure ortho-diphénolique du cycle B :

La morine avec deux groupements hydroxyles en méta et le kaempférol avec un seul groupement hydroxyle sont moins actifs que la quercétine (deux groupements hydroxyle en ortho) (Figure II.14). Ces résultats démontrent l'importance de la structure ortho-diphénolique du cycle B. La présence d'un troisième groupe OH sur le cycle B (myricétine) diminue légèrement l'activité antioxydante [30].

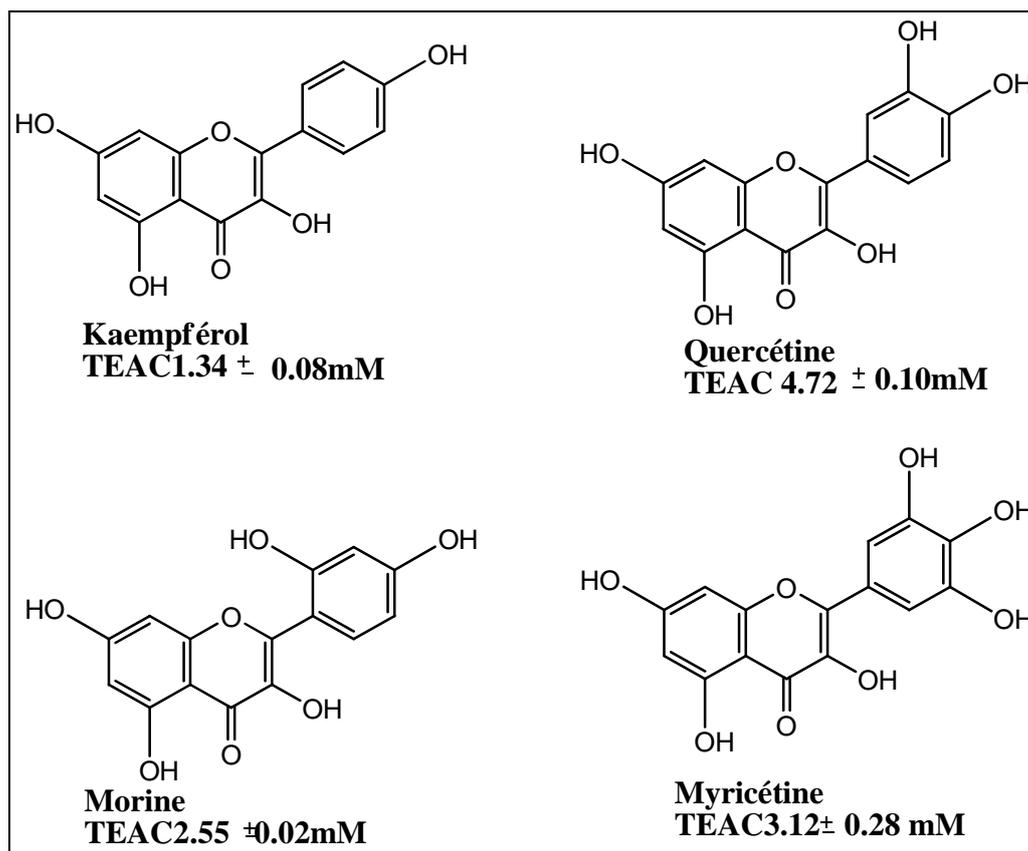


Figure II. 14 : Valeurs montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavonols.

Pour les flavones, un cycle B dihydroxylé en ortho est aussi important pour l'activité antioxydante (Figure II-15). En effet, les deux flavones, apigénine (4' -OH) et chrysin (sans groupement OH sur le cycle B) ont presque la même valeur de TEAC (Figure II.15) [30].

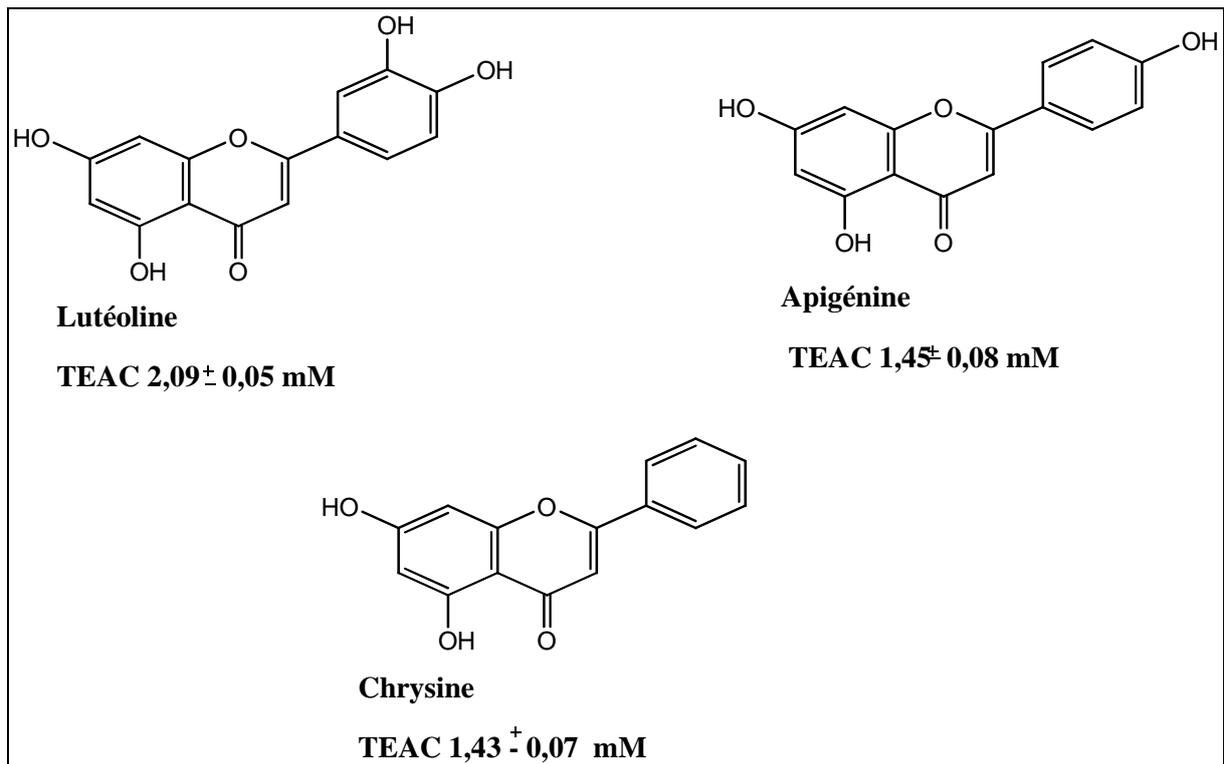


Figure II.15: Valeurs montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavones.

c). Le rôle du groupe 3-OH sur le cycle C et la double liaison C2-C3 :

La glycosylation du groupement 3-OH de la quercétine (cas de la rutine) ou sa suppression (cas de la lutéoline) diminue l'activité antioxydante à 2,4 mM et 2,1 mM respectivement (Figure II.16). Ceci démontre l'importance du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 adjacente à la fonction 4-oxo.

L'importance de la double liaison est confirmée en comparant l'activité de la quercétine avec celle de la taxifoline. En effet, cette dernière, sans double liaison (dihydroflavonol), est deux fois moins active que son analogue flavonol, la quercétine [30].

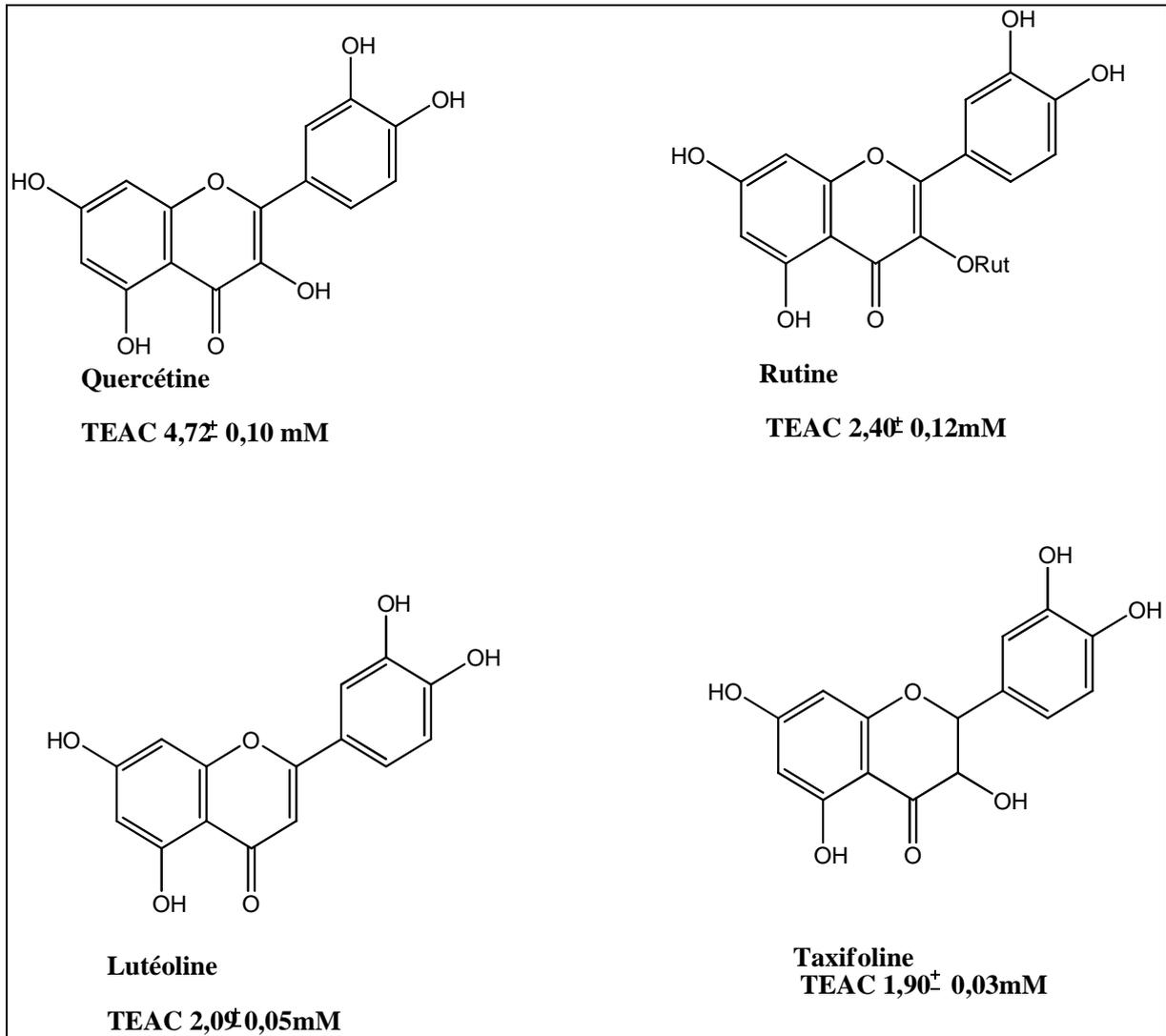


Figure II.16: Valeurs indiquant l'importance du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 .

d). L'effet de la glycosylation sur l'activité des flavones et flavanones :

La comparaison de la naringénine avec le naringoside (Figure II.17) montre que la glycosylation du groupe 7-OH diminue largement l'activité. Des effets similaires sont observés quand l'hespérétine est comparée avec son rutinoside (hespéridine) et la lutéoline avec son 3',7-diglucosides (Figure II.17) [30].

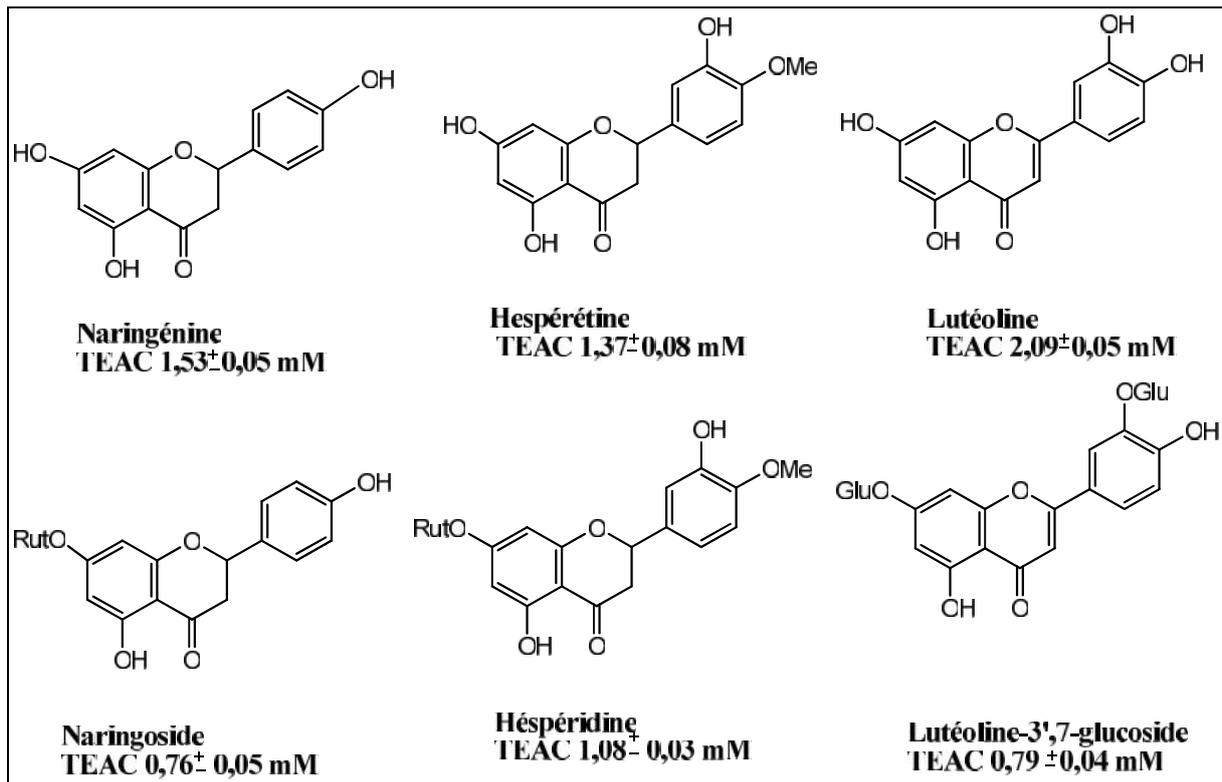


Figure II.17 : Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavones et flavanones.

e).Anthocyanidols :

Le cyanidol, un équivalent de la quercétine, est le composé le plus actif de ce type de flavonoïdes (Figure II-18). L'élimination du groupe 3' -OH (pélargonidol) diminue le potentiel antioxydant comme c'est le cas pour le kaempférol en comparaison avec la quercétine. L'insertion d'un groupe méthoxyse en position 3' du cycle B (péonidol) augmente légèrement l'activité mais celle-ci reste toujours moins importante qu'avec un groupement catéchol (cycle B di-orthophénolique).

Le cyanidol, le delphinidol et le malvidol ont tous la même activité, ce qui montre qu'un cycle B trisubstitué ne semble pas être très important pour l'activité antioxydante des anthocyanidols (Figure II.18) [30].

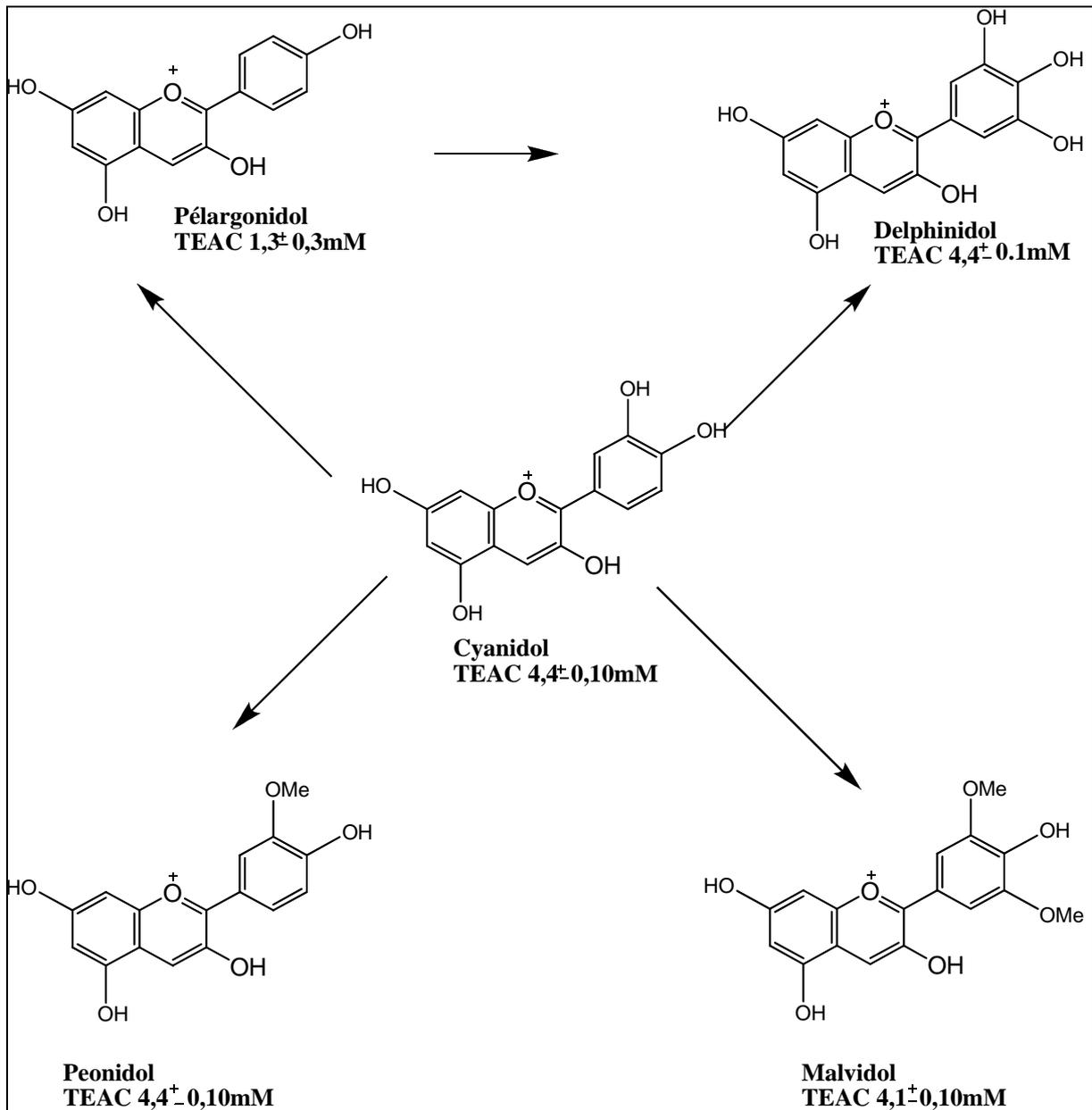


Figure II.18 : Effet de la substitution du cycle B sur l'activité antioxydante des anthocyanidols.

En analysant tous ces résultats concernant la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres, la communauté scientifique a pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants:

1- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupe catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.

2- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo. 3- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (Figure II.19).

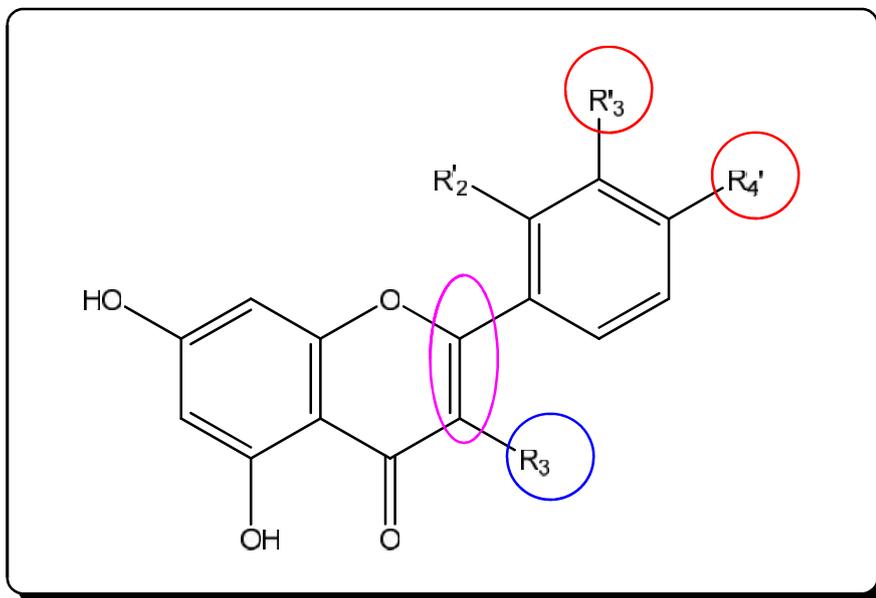


Figure II.19 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.

II.7. 2. L'activité antimicrobienne des flavonoïdes :

Il est connu que les flavonoïdes sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne [31], il est logique par conséquent, qu'ils soient des substances antimicrobiennes efficaces *in vitro* contre les microorganismes [32,33].

Il a été montré que les composés flavoniques les moins polaires, c'est-à-dire les moins substitués par des groupes OH sur le noyau B, sont les plus actifs vis-à-vis des microorganismes [34], cela est renforcé par la découverte que la méthylation des flavonoïdes augmente l'activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* [35].

Dans le cas du méthicilline-résistant *S. aureus*, les chaînes aliphatiques latérales dans les flavones (dans la position 6 ou 8), rendent la molécule plus lipophile et augmentent son activité antimicrobienne comparé aux flavones non substituées [36]. Il a été montré avec la bactérie cariogénique (*Actinomyces viscosus* et *A. naeslundii*, several *Streptococci*) que la présence des groupes hydroxyles sur les noyaux A et B essentiellement (5-OH), plus une substitution aliphatique sur le noyau A, détermine l'activité antibactérienne des flavones [37]. Cependant, il a aussi été constaté que les flavonoïdes lipophiles (méthoxylés) n'étaient pas de bons agents protecteurs contre les microorganismes [38], cela est confirmé par le fait que les

dérivés glycosylés de la quercétine et de la quercétagetine ont montré des activités antimicrobiennes considérables contre les microorganismes pathogéniques [39,40].

La présence des groupes hydroxyles libre dans les positions 3, 3', 4' et 5' est indispensable pour l'activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Proteus vulgaris* [41], cela est supporté par le résultat de Puupponen-Pimiä et al. (2001), dans lequel ils ont testé l'activité antibactérienne de la myricétine contre la *Lactobacilli* et *E. coli* [42].

II.7.3. Effets anti-allergiques :

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca^{2+} -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca^{2+} -dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme [26].

II.7.4. Effets anti-inflammatoires :

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. R. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes [43]. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée.

En outre, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase.

II.7.5. Effets anti-ulcèreux :

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe

impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres, et également l'inhibition de la production de leucotriènes [26].

D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés antiulcéreuses de la quercétine, naringénine, rutine et kaempférol, et la production du PAF (Platelet Activating Factor) qui est un agent ulcérogène potentiel [44]. En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes.

II.7.6. Effets anti-cancéreux :

Présente pratiquement dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale [45]. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde d'inactiver le t-PA (tissue-type plasminogen activator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones [46].

La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir: la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes et la réduction des radicaux libres [26]. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène [47] et inhibe l'activité de la collagénase [48].

II.7.7. Autres effets biologiques :

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase [49]. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques [50-51].

Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires [52- 53].

Les effets anti-viraux des flavonoïdes ont été également démontrés [54].

II.8. L'étude chimique des flavonoïdes :

II.8.1- Extraction :

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes [5, 55]. L'une de ces méthodes est adoptée par notre laboratoire, les étapes essentielles sont :

- Macération répétée du matériel végétal dans une solution hydroalcoolique (méthanol ou éthanol).
- Extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante.
- Les solvants les plus utilisés sont : le dichlorométhane ou le chloroforme qui permettent l'extraction des aglycones méthoxylés et hydroxylés, l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés, et en dernier le *n*-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type C-glycosyle.
- Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec et pesés pour un éventuel traitement.

II.8.2- Séparation et purification :

La séparation des composés phénoliques est fondée essentiellement sur les différentes techniques chromatographiques telles que :

a-La chromatographie liquide sur colonne (CC) :

Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le gel de silice, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités de mélanges importantes et complexes [56].

b- La chromatographie préparative sur papier (CP) :

Basée sur l'utilisation d'une surface plane de cellulose considérée comme support maintenant par imprégnation une phase stationnaire liquide, les systèmes de solvants les plus utilisés dans cette technique sont [57] :

- L'acide acétique 15 et 30 % constituant des systèmes aqueux.
- Le *n*-butanol / Acide acétique/ Eau (BAW) 4 /1/ 5 constituant un système organique.

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

Cette méthode est très simple et très rapide, elle est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification. Elle se sert de diverses phases stationnaires et de systèmes d'éluants solvants appropriés.

La purification ultime des composés phénoliques isolés se fait généralement sur une colonne de Sephadex LH20 en utilisant du méthanol pur comme éluant.

II.9. Analyse structurale des flavonoïdes :

L'identification des structures flavoniques est basée essentiellement sur les différentes techniques spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) avec ses différents expériences (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, etc...), la spectrométrie de masse (SM) avec différents types d'ionisation : impact électronique (IE), ionisation chimique (IC) et bombardement avec des atomes accélérés (FAB) ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible qui reste la méthode de choix pour ce type de composés [57-58]. Cette dernière donne des indications importantes sur la nature du flavonoïde et son mode de substitution. Toutefois, la fluorescence sous lumière UV et les valeurs de leur R_f dans différents systèmes de solvants donnent des informations utiles.

II.9.1. La fluorescence sous lumière de Wood :

L'absorption des substances flavoniques sous lumière de Wood à la longueur d'onde de 365 nm donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique. Le tableau II-2 montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [57].

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

<i>La fluorescence</i>	<i>Les structures possibles</i>
Violette noire	Flavones avec 5, 6,7 ou 5,7, 8 trihydroxy flavone Flavonol avec 3-OR. Chalcones.
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

II.9.2. Facteur de retardement et comportement chromatographique :

Ce facteur symbolisé par R_f est défini comme étant le rapport de la distance entre la tâche du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part.

La valeur du R_f varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la forme du produit lui-même (aglycone ou glycosyle), ainsi que de la disposition des différents substituants sur le squelette flavonique [56-57,59]. Le tableau suivant montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du R_f .

Tableau II.3 : La relation entre le R_f et la structure flavonique.

<i>Structure flavonique</i>	<i>R_f</i>
<i>Augmentation des groupes hydroxyles</i>	R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvant aqueux
<i>Glycosylation</i>	R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux.
<i>Méthylation des groupes hydroxyles</i>	R_f augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvant aqueux.
<i>Acylation</i>	R_f augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes aqueux

II.9.3. La spectrophotométrie UV-Visible :

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques, elle est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales [60] (voir figure II-20).

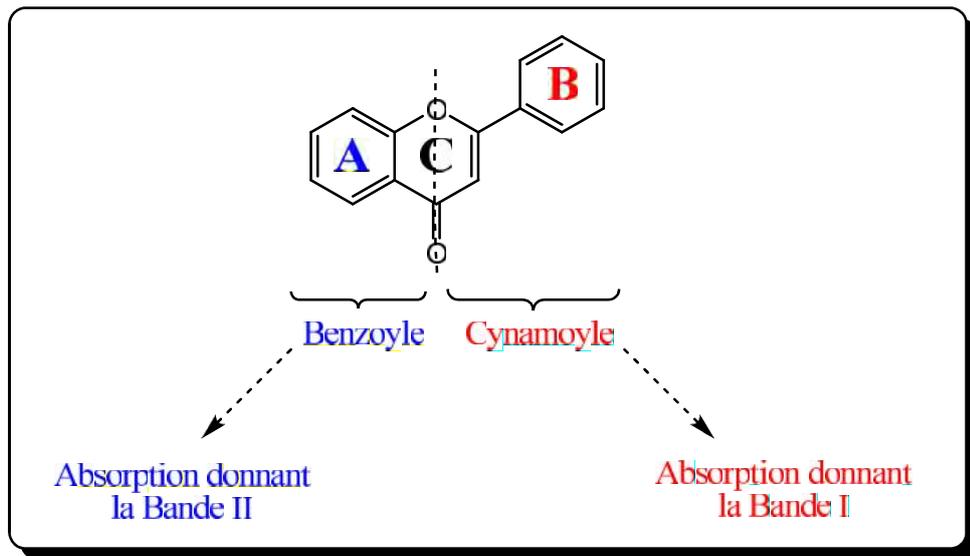


Figure II.20: Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.

- **Bande I** : présentant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2-C3) et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.
- **Bande II** : présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoyl qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [56].

Le tableau II.3 donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes.

Tableau II-4 : Relation entre les squelettes des flavonoïdes et la position des bande I et II.

<i>Type de flavonoïdes</i>	<i>Bande I (nm)</i>	<i>Bande II (nm)</i>
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 ou méthoxyles sur le squelette flavonique.

L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacé le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosyles fait déplacé ce maximum vers des longueurs d'onde plus faibles [61].

II.9.4. a- 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.

II.9.4. a-1- Spectre en présence de NaOH :

NaOH, 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 [56]. 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.

II.9.4. a-2- Spectre en présence 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 [57].

II.9.4. a-3- Spectre en présence 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 orthodihydroxyle 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 [57].

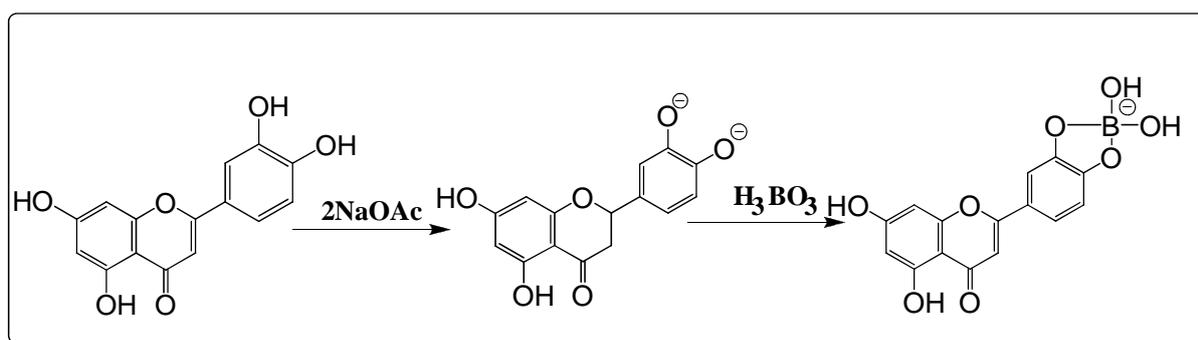


Figure II.21: formation de complexe en présence de H₃BO₃ et NaOAc.

II.9.4. a-4- Spectre en présence d'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 AlCl_3 et les groupes ortho dihydroxyles des noyaux aromatiques **A** et **B** sont instables et se décomposent en présence de HCl [59], par contre, ceux formés entre AlCl_3 et les hydroxyles **5-OH** ou **3-OH** et la fonction carbonyle sont stables [62-63]. Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande I par rapport au spectre après addition d' AlCl_3 et un déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le MeOH .

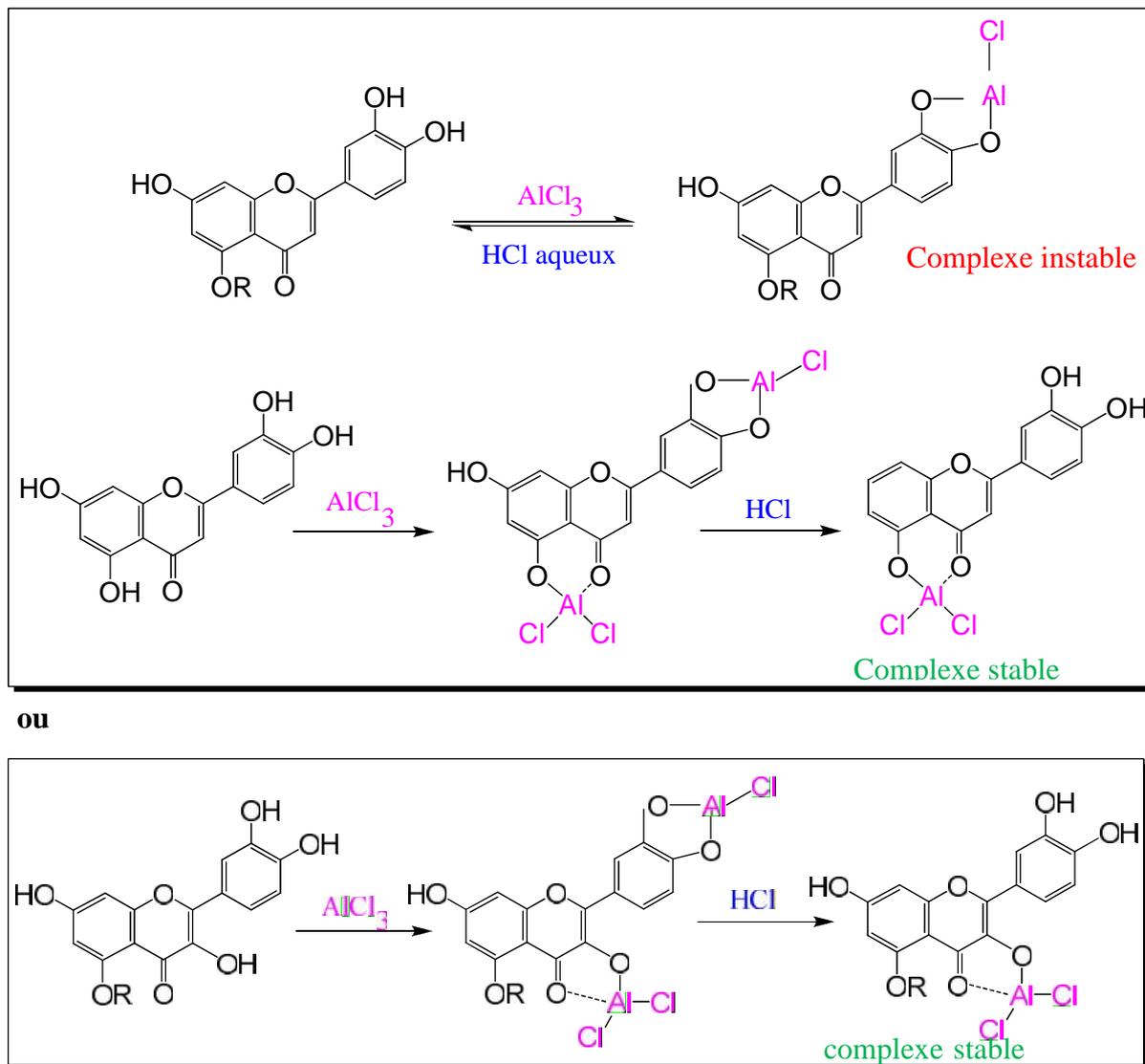


Figure II.16: Formation des différents types de complexes après addition d' AlCl_3 et en présence de HCl

Le tableau II.4 donne les informations obtenues des spectres en présence de réactifs [56, 64, 65].

Tableau II.4 : Informations obtenues des séries spectrales UV-Vis.

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

II.9.4. b- L'hydrolyse acide des hétérosides :

Cette manipulation concerne dans un premier temps les flavonoïdes *O*-glycosylés, elle renseigne sur la nature du sucre qui peut être étudié une fois détaché ainsi que celle de l'aglycone. L'identification du sucre se fait par co-chromatographie avec des solutions authentiques.

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

II.9.5. La Spectrométrie de masse :

Cette technique permet la détermination du pic moléculaire des aglycones qui donne globalement le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles [66- 67]

Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements utiles, notamment sur les structures ou les noyaux A et B sont substitués [68]. Cette technique connaît un véritable succès dans ce domaine avec le développement de divers mode d'ionisation permettant l'analyse des structures glycosylés à l'état natif tels que la FAB, et l'électro-spray.

De nos jours, la spectrométrie de masse trouve diverses applications grâce au couplage avec les techniques chromatographiques. Ces techniques de couplage permettent des analyses très rapide et très rigoureuses.

II.9.6. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N) :

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire trouve un grand emploi pour la détermination des structures flavoniques [69]. Cette méthode renferme plusieurs techniques :

- **La RMN du proton (RMN ^1H)** : c'est une méthode précise et efficace, elle est couramment utilisée et permet entre autre :
 - La localisation des protons de la molécule [70].
 - De déterminer le nombre, la nature et la position des sucres [71,72].
 - D'identifier les liaisons *C*-sucre et *O*-sucre.
 - D'identifier les substituants acylés et leur sites d'acylation.
 - L'identification des substituants oxygénés.

Les tableaux II.5 et II.6 contiennent quelques déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A et du noyau B [73].

Tableau II.5: Les déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau A.

Protons du noyau A Nature du flavonoïde	(H-5) δ , ppm <i>J</i> , Hz	(H-6) δ , ppm <i>J</i> , Hz	(H-8) 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, 7-OR (R=Gluc.)		6,2-6,4 d 2,5	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 II.5 : Les déplacements chimiques et constantes de couplage des protons du noyau B.

Protons du noyau B Nature du flavonoïde	(H2'-H6') , ppm <i>J</i> , Hz	(H3'-H5') , 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

- **La RMN du carbone (RMN ¹³C) :** donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telles que [56, 74] :
 - le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement.
 - la connaissance de type des liaisons –C et / ou –O sucres.

Références

- [1] B. H. Havasteen, (2002), *Pharmacol. herap*, 96, 67-202.
- [2] I. Erlund, (2004), *Nut. Res*, 24, 851-74.
- [3] J. Bruneton, (1993), *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*, 2^{ème} Ed. Lavoisier, Paris
- [4] G. Delporte, N. Mascolo, A. A. Izzo, et al. (1999), *Life. Scien.*, 65(4), 337-53.
- [5] J. Bruneton, (1999), *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, 3^{ème} Ed. Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- [6] J.B. Harborne, (1967). «Comparative Biochemistry of the Flavonoids», Edition Academic Press Inc London, 37-129.
- [7] J.B. Harborne, (1988), *The Flavonoids*, Chapman et Hall, 125-204.
- [8] B .D.Davis, (1955), *Advenced in Enzymology*. 16, 227.
- [9] E.Haslam, (1993), *Shikimic acid, Metabolism and metabolites*, Edition John wiley.
- [10] H. GRISEBAH, (1965), *chemistry and biochemistry of plant pigments*, T. W. GOODWIN, Academic Press, New-York.
- [11] J. B. Harborne, (1988), *In plant pigments*, Ed. T. W. Goodwin, Academic Press. London, pp. 299-343.
- [12] W. Heller, G. Forkmann, (1988), *in the flavonoids advances in research since 1980*. Ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, London, 399-425.
- [13] V. Deluca, R. K. Ibrahim, (1985), *Arch. Biochem. Biophysics*, 606.
- [14] M. Iinuma, M. Mizuno, (1989), *Phytochemistry*, 28, 681.
- [15] J. Ebel, K. Hahlbrock, (1982), *In the flavonoids advances in research*, Ed. J. B. Harborne and T. J. Mbar, Chapman and Hall, London, pp.641-659.
- [16] J.B. Harbone, C.A. Williams, (1988), *In the flavonoids advances in research since 1986*. Ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall. Ltd. p.303.
- [17] J. Chopin, (1966), *Actualité de phytochimie fondamentale*, II^{ème} série, Ed. Masson, Paris, 119.
- [18] T. Iwashina, (2000), *Journal of Plant Research*, 113(3), 287-299.
- [19] H. M. Merken, G. R. Beecher, (2000), *J. Agric. Food. Chem*, 48(3), 577-599.
- [20] K. R. Markham, (1988), *Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance*. *In the Flavonoids: Advances in research since 1980*, Ed. J. B. Harborne Chapman and Hall, London. pp 427-468.

- [21] G. A. Cooper-Driver, M. Bhattacharya, (1998), *Phytochemistry*, 49(5), 1165-1174.
- [22] R. J. Grayer, M. W. Chase, M. S. J. Simmonds, (1999), *Biochem. System. Ecol*, 27(4), 369-393.
- [23] W. E. Bronner, G. R. Beecher, (1995), *J. Chromato. A* 705, 247-256.
- [24] A. Crozier, E. Jensen, M.E.J. Lean et al, (1997), *J. Chromato.*, 761, 315-321.
- [25] J.B Harborne, (1979), *Flavonoid pigments*, in *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*, Rosenthal, G.A. and Janzen, D.H., Eds., Academic Press, New York.
- [26] G. Di Carlo, N. Mascolo, A.A. Izzo et al, (1999), *Life. Scien.*, 65(4), 337-353.
- [27] P. Pietta, (2000), *J. Nat. Prod*, 63(7), 1035-1042.
- [28] F. Cuyckens, M. Claeys, (2004), *J. Mass. Spec.*, 39(4), 1-15.
- [29] S. A. B. E. Van Acker, D. J. Van den Berg, M. N. J. L. Tromp et al, (1996), *Free Rad. Biol. Med.*, 20, 331-342.
- [30] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, (1996), *Free Rad. Biol. Med.*, 20, 933-956.
- [31] R. A. Dixon, P. M. Dey and C. J. LAMB, (1983), *Phytoalexins: Enzymology and molecular biology*, 55, 1.
- [32] M. M. Cowan, (1999), *Plant products as antimicrobial agents*, *Clin. Microbiol*, 12 (4), 564.
- [33] M. C. Recio, J. L. Rios and A. Villar, (1989), *A review of some antimicrobial Compounds isolated from medicinal plants reported in the literature*, 3 (4), 117.
- [34] S. Chabot, R. Bel-Rhliid, R. Chenevert and Y. Piché, (1992), *ypthal growth promotion in *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, Gigaspora margarita Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditins*, 122 (3), 461.
- [35] J. C. Ibewuiké, F. O. Ogungbamlla, A. O. Ogundaini, I. N. Okeke, (1997), *Anti inflammatory and antibacterial activities of C- méthylflavonoid from Piliostigma thonningii*, 11 (4) ,281.
- [36] H. Tsuchiya, M. Sato, T. Miyazaki, S. Fujiwara, S. Tanigaki, M. Ohyama, T. Tanaka and M. Iinuma, (1996), *J. Ethnopharmacol*, 50(1), 27.
- [37] M. Sato, S. Fujiwara, H. Tsuchiya, T. Fujii, M. Iinuma, H, (1996), *J. Ethnopharmacol*, 54(2.3), 171.

- [38] L. Mendoza, M. Wilkens, and A. Urzua (1997), *J. Ethnopharmacol*, 58(2), 85.
- [39] S. K. Waage, and P. A. Hedin, (1985), *Phytochemistry* 24(2), 243.
- [40] M. L. Tereschuk, M. V. Q. Riera, G. R. Castro and L. R. Abdala, (1997), *J. Ethnopharmacol*, 56(3), 227
- [41] A. Mori, C. Nishino, N. Enoki and S. Tawata, (1987), *Phytochemistry*, 26(8), 223.
- [42] R. Puupponen-Pmiä, L. Nohynek, C. Meier, M. Kähkönen, M. Heinonen, A. Hopia and K. M. Oksman-Caldentey, (2001), *J. Appl. Microbiol*, 90(4), 994.
- [43] R. Landolfi, R. L. Mower, (1984), *Biochem. Pharmacol.*, 33, 1525-1530.
- [44] A. A. Izzo, (1996), *J. Pharm. Pharmacol*, 48, 1103-11.
- [45] M. Bracke, B. Vyncke, G. Opdenakker et al, (1991), *Clin. Exp. Metastasis*, 9, 13-25.
- [46] L. M. Larocca, M. Giustacchini, N. Maggiano et al. (1994), *J. Urol.*, 152, 1029-1033.
- [47] A. Scutt, S. Meghji, J. P. Canniff et al., (1987), *Experientia*. 43, 391-393.
- [48] M. Makimura, M. Hirasawa, K. Kobayashi et al., (1993), *J. Periodontol.*, 64, 630-636.
- [49] P. S. Chaudhry, J. Cabrera, H. R. Juliani et al., (1983), *Biochem. Pharmacol.*, 32, 1995.
- [50] *Gen.* (1997), *Pharmacol.*, 29, 121-126.
- [51] K. C. Ong, H. E. Khoo, (2000), *Life. Scien.*, 67, 1695-1705
- [52] M. G. Hertog, E. J. Feskens, P.C. Hollman et al., (1993), *Lancet*, 342, 1007-1011.
- [53] L. Yochum, et al., (1999), *Amer. J. Epid.*, 149, 10.
- [54] S. C. Chu, Y. S. Hsieh, J.Y. Lin, (1992), *J. Nat. Prod.*, 55, 179-183.
- [55] J. B. Ribereau-Gayou, (1968), *The phenolic compounds of vegetals*, Ed. Dundo, Paris.
- [56] K. R. Markham, (1982), *Technique of flavonoids identification*, Academic press, London.
- [57] T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, (1970), *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.
- [58] J. B. Harborne, (1966), In *Comparative Phytochemistry*, Ed. T. W. Goodwin, Academic Press London.
- [59] A. Berthillier, (1972), *La chromatographie et ses applications*, Dunod Paris.
- [60] L. Jurd, R. Horowitz, (1962), pergamon press, Oxford, 107-2055.
- [61] K. R. Markham, T. J. Mabry, (1968), *Phytochemistry*, 7, 1197.
- [62] L. Horhammer, R. Hänsel, (1952), *Arch. Pharm.*, 285, 438.

- [63] L. Jurd, T. A. Geissman, (1956), *J. Org. Chem.*, 21, 1395.
- [64] K. R. Markham, (1989), *Method in plant biochemistry*, 1, 197-235, Academic Press. London.
- [65] L. Jurd. and Horowitz, R. (1962), Spectral properties of flavonoid compounds, in *The chemistry of flavonoid compounds*, edited by T.A. Geissman, Pergamon Press, New York, 107-155.
- [66] H. Audier, (1966), *Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse*.
- [67] J. G. Nielsen, J. Moller, (1970), *Acta. Chem. Scand*, 24, 2665.
- [68] H. Combier, (1968), *Thèse de doctorat*, Université de Lyon.
- [69] K. R. Markham, H. Geiger, (1993), *The Flavonoids Advances in research since 1986*, Ed. J. B. HARBORNE, Chapman & Hall, London.
- [70] H. Combier, (1968), *Thèse de doctorat*, Université de Lyon.
- [71] K.R. Markham, (1989), Flavones, flavonols and their glycosides, in "Methods in plant biochemistry", (P.P. Dey and J.B. Harborne), 197-232. Academic press.
- [72] K.A. Pawan, (1992), *Phytochemistry*, 10, 3307-3330.
- [73] E.R. Markham, 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.
- [74] K. R. Markham, (1976), *Tetrahedron*, 32, 2607-2612.

Chapitre III

Travaux personnels

III.1. Récolte de la matière végétale:

La plante a été récoltée au mois de juin 2009, de la région de El-kala. L'espèce a été séchée dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires les parties aériennes broyées (feuilles et fleurs) sont pesées (m=2 kg).

III.2. Extraction de la matière végétale:

Le matériel végétal est mis à macérer dans un mélange hydroalcoolique (Methanol/Eau ; 70 : 30 ; v/v) pendant 48 heures à température ambiante. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température modérée (environ 35 °C). La macération est répétée 4 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 48 heures.

Les quatre extraits hydroalcooliques récupérés sont réunis et concentrés. A la solution obtenue, on ajoute de l'eau distillée (à raison de 400 ml d'eau distillée pour 1kg de matière sèche). La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette dernière permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable, etc....

Après filtration on obtient une solution aqueuse. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, puis le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Les quatre phases organiques ainsi obtenues sont concentrées à sec sous pression réduite, pesées et les rendements sont donnés dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Rendements des extraits.

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
2000g	Ether de pétrole	1.1	0.055
	Chloroforme	7	0.35
	Acétate d'éthyle	12	0.6
	<i>n</i> -butanol	32	1.6

Le protocole d'extraction est résumé dans l'organigramme présenté dans le schéma III.1 montrant les différentes étapes du processus d'extraction.

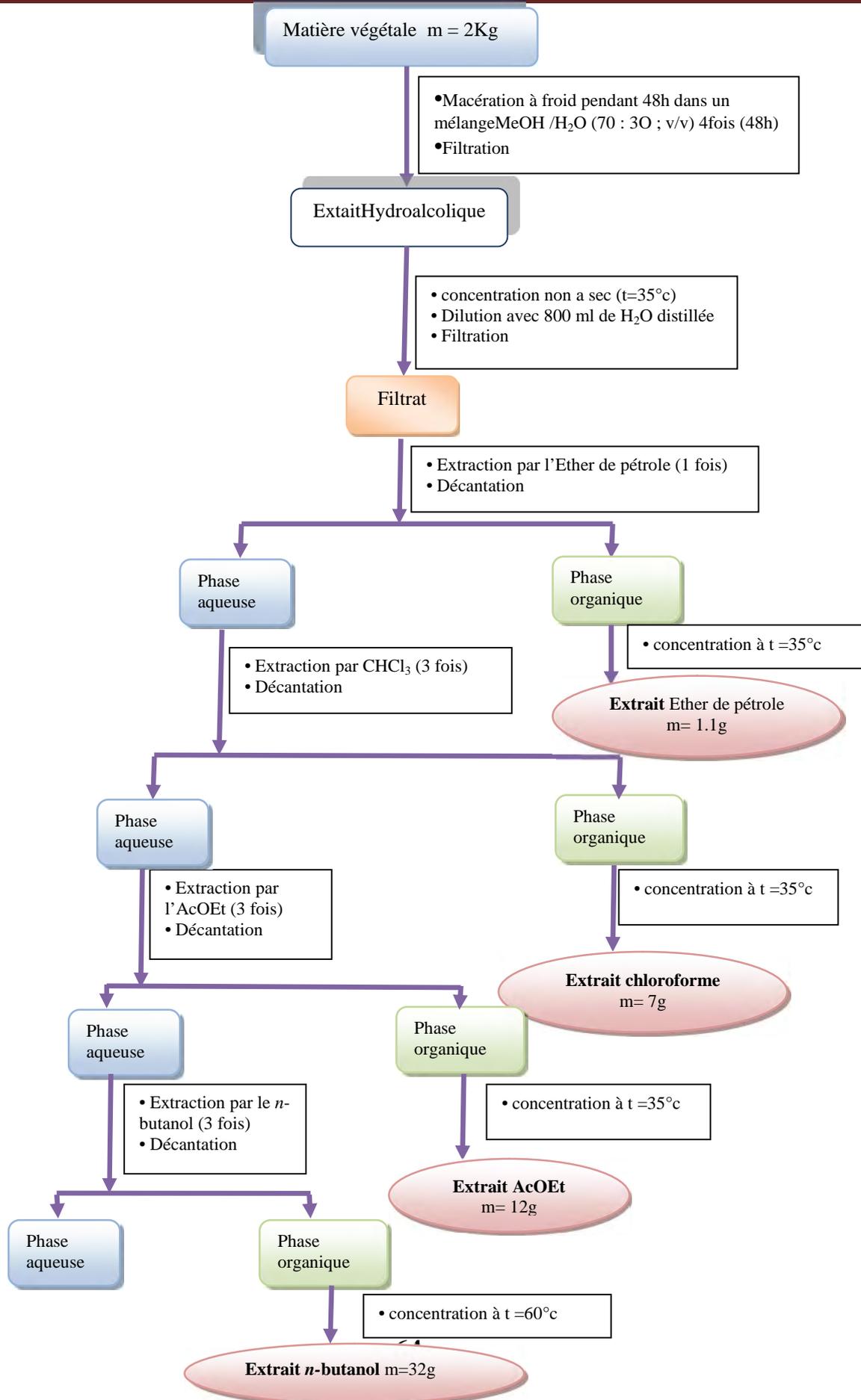


Schéma III-1: Protocole d'extraction de *Matricaria chamomilla*

III.3. Séparation chromatographique de l'extrait *n*-butanol :

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium, la meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ dans les proportions (8.8:1.2).



Figure III.1 : Plaque CCM de l'extrait *n*-butanol éluée dans le système $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (8.8:1.2).

III.3.1. Séparation chromatographique sur colonne :

Une masse d'environ 14g d'extrait *n*-butanol dissout dans du méthanol est mélangée 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 dichlorométhane. L'élution a été réalisée par du dichlorométhane avec un graduant de méthanol en commençant par le dichlorométhane pur et en terminant par le méthanol pur avec un fractionnement tous les 100 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière de (254 et 365 nm) puis révélées avec

l'anysaldéhyde et chauffées pendant trois minutes à 100°C. La progression de cette colonne est donnée dans le tableau III.2.

Tableau III.2: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol.

<i>Pots</i>	<i>Fractions</i>	Système d'élution		Le poids de la fraction (mg)
		<i>CH₂Cl₂</i> %	<i>CH₃OH</i> %	
1-12	F1	100	0	16
13-53	F2	100	0	29
54-85	F3	99	1	32
86-101	F4	98	2	18
102-119	F5	97	3	289
120-175		95	5	
175-190		93	7	
191-207	F6	90	10	103
208-215	F7			189
216-229	F8			140
230-251	F9	88	12	160
252-272	F10	86	14	374
273-310	F11			482
311-336	F12	84	16	1366
337-350		82	18	
351-398	F13	80	20	1022
399-433	F14	75	25	875
434-453	F15	70	30	1256
454-488		65	35	

489-521	F16	60	40	452
522-538	F17	55	45	834
539-555	F18	50	50	390
556-580	F19	45	55	374
581-596	F20			362
597-610	F21	40	60	341
611-628	F22	35	65	470
629-657	F23	30	70	587
658-697	F24	20	80	362
698-714	F25			309
715-732	F27	10	90	364
732-778	F28	0	100	1930

Les fractions obtenues sont analysées par des plaques CCM pour le but de :

- rassembler les fractions qui présentent les mêmes taches.
- chercher un nouveau support chromatographique ainsi qu'un nouveau système de solvant susceptible de mieux séparer les composés.

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

Parmi les 28 fractions obtenues, on a procédé à la séparation des fractions, F10, F14, F20.

III.3.2. Séparation et purification des fractions :

➤ La fraction F10 :

Cette fraction de masse 374mg, contient un produit majoritaire qui a précipité dans le mélange ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$). Ce précipité a été lavé au méthanol pour donner le composé F10-1 sous forme de poudre jaune ($m=45\text{mg}$). Par ailleurs, ce précipité jaunâtre est dissout dans le DMSO, testé sur une plaque analytique de gel de silice, élué avec le système AcOEt/MeOH/H₂O (8 : 1 : 1), donne un spot unique de fluorescence noir violette à 365 nm.

- F10 \longrightarrow Produit pur AH1 (45mg).

➤ **La fraction F14 :**

Après l'analyse de la fraction F14 par chromatographique sur couche mince, la meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant (AcOEt/HCOOH/H₂O) dans les proportions (8 :1 :1).

Une masse de 875 mg de cette fraction a été séparée sur colonne de gel de silice, L'élution à été réalisée par le système isocratique (AcOEt/HCOOH/H₂O) (8 :1 :1) avec un fractionnement tous les 25ml. Le suivi des différentes sous fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 sur support aluminium. Ces sous fractions sont regroupée selon la similitude de leur profil chromatographique sur couche mince. La progression de cette colonne est donnée dans le tableau III.3

Tableau III.3: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction F14.

<i>Pots</i>	<i>Sous Fractions</i>	<i>Le poids de sous fraction (mg)</i>
1-5	F'1	6
6-17	F'2	15
18-25	F'3	37
26-35	F'4	85
36-42	F'5	74
43-56	F'6	103
57-70	F'7	112
71-82	F'8	66
83-97	F'9	48
98-113	F'10	93
114-120	F'11	66
121-132	F'12	78

➤ **La sous fraction F'5:**

La fraction F'5 de masse 74mg a subi une séparation sur plaque préparatives, en utilisant comme système d'éluion : (AcOEt/MeOH/H₂O) (8 :1 :1), les résultats obtenus sont reportés sur le tableau III.4.

Tableau III.4 : Résultat de séparation de la sous fraction F'5.

<i>SOUS FRACTION</i>	<i>REMARQUES</i>
F'5-1	produit pur de fluorescence noir -violette sous 365 nm (m=4mg)
F'5-2	Produit de fluorescence noire sous 254 nm (m=3mg)
F'5-3	produit pur de fluorescence jaune sous 365 nm (m=3mg)
F'5-4	mélange

- F'5 → Produit pur F'5-1(AH2).
- F'5 → Produit pur F'5-2(AH3).
- F'5 → Produit pur F'5-3(AH4).

➤ **La sous fraction F'10:**

La plaque analytique de cette fraction donne 4 spots sous UV (365 nm), après éluion par le système (AcOEt/MeOH/H₂O) (8 :1 :1), l'un des spots est très concentré facile à séparer et donne une coloration noir violette sous UV (365nm) et jaune après révélation par l'ammoniaque.

Cette fraction a subi une séparation sur plaque de gel de silice (plaques préparatives) avec le même système, on obtient un produit pur (11mg).

- F'10 → Produit pur AH5.

➤ **La fraction F20 :**

La plaque analytique de cette fraction donne 4 spots sous UV (365 nm), après élution par le système (AcOEt/MeOH/H₂O) (6 : 1 : 1).

Cette fraction de masse 362mg a subi une séparation sur plaques préparatives avec le même système, les sous fractions obtenues sont rassemblées dans le tableau III.5

Tableau III.5: Résultat de séparation de la fraction F20.

<i>SOUS FRACTION</i>	<i>REMARQUES</i>
F20-1	produit pur de fluorescence bleue sous 365 nm (7mg)
F20-2	produit pur de fluorescence noir- violette sous 365 nm (8mg)
F20-3	Mélange de deux produits

- F20 —————> Produit pur F20-1 (AH6).
- F20 —————> Produit pur F20-2 (AH7).

Conclusion :

Les travaux de séparation chromatographique ont permis l'obtention de sept produits à l'état pur et natif dont trois (F'5-1, F'5-2, F'5-3) sont en très faible quantité.

Alors, nous avons soumis à l'étude structural de deux produits.

La figure III -2 résume les travaux chromatographiques effectués sur colonnes et plaques préparatives sur couches minces de gel de silice.

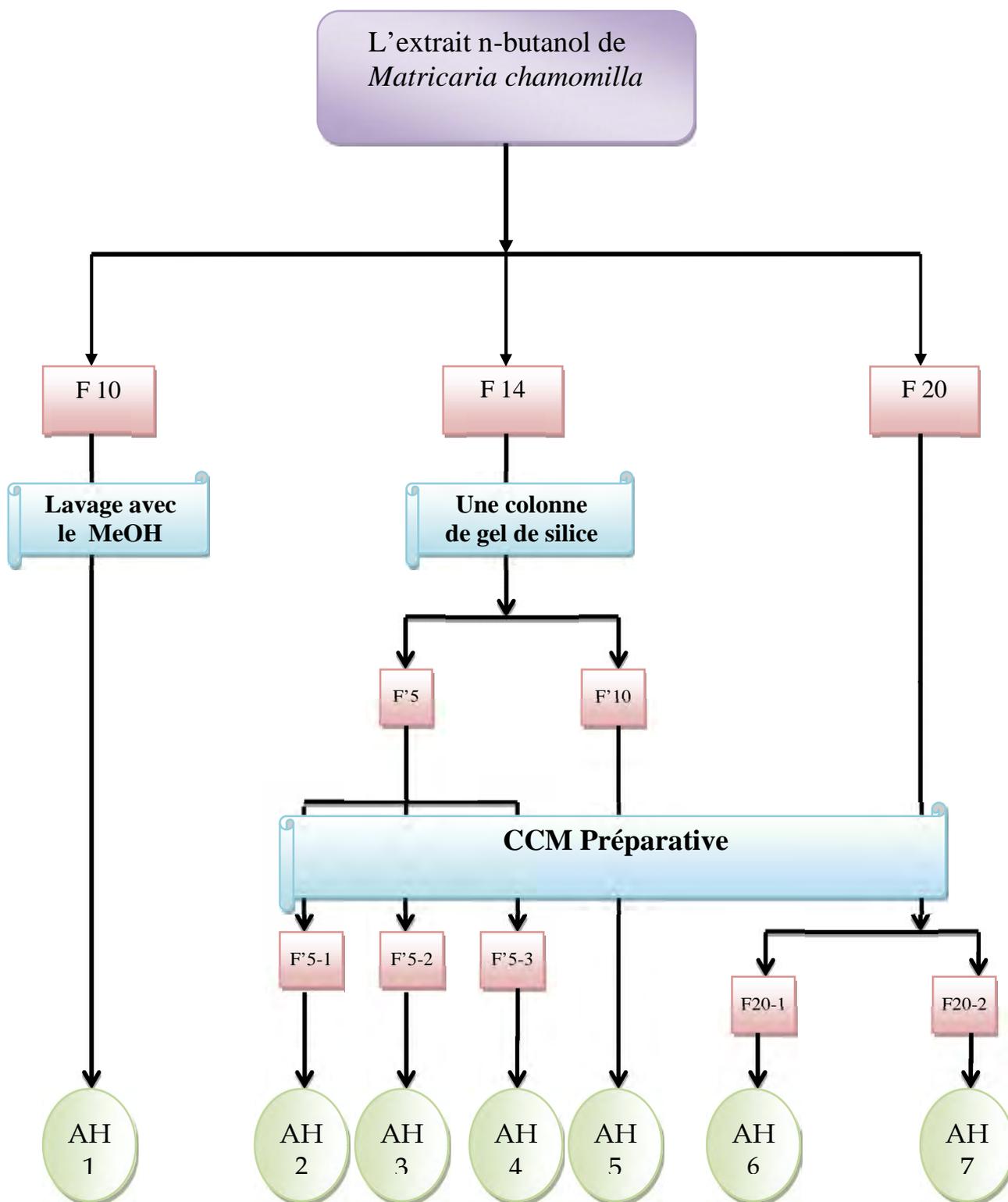


Figure -2 : Résumé des travaux chromatographiques

Chapitre VI

Interprétation des résultats

IV.1. Détermination structurale du composé AH1 :

IV.1.1. Fluorescence :

Le composé AH1 se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le DMSO. Ce composé de fluorescence noir -violette sous la lumière de Wood (365 nm) réagit avec le réactif NH_3 en affichant une coloration jaune laissant envisager une structure de type Flavone ou un flavonol substitué en 3.

IV.1.2. La spectrophotométrie UV:

L'étude de la série spectrale UV (spectre IV.1) donne les indications suivantes:

- ❖ Le spectre enregistré dans le méthanol montre deux bandes d'absorption, une bande II à 269 nm et une bande I à 349 nm orientant vers une structure flavonique de type Flavone ou un flavonol substitué en 3.
- ❖ Le déplacement bathochrome de la bande I ($\lambda = +53$ nm) avec augmentation de son intensité provoqué par l'addition de NaOH laisse supposer la présence d'un OH libre en 4'.
- ❖ L'absence de déplacement bathochrome de la bande II en comparant le spectre enregistré dans le MeOH et le spectre enregistré après ajout de la base faible (NaOAc) montre la présence d'un groupe OR en 7. Cette supposition est confirmée par l'absence d'une nouvelle bande dans le spectre enregistré dans MeOH+NaOH comparativement à celui enregistré dans le MeOH.
- ❖ Le déplacement bathochrome de la bande I ($\lambda = +26$ nm) noté en comparant les spectres CH_3OH et $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ révèle également la présence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B.
- ❖ L'addition des réactifs $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ donne un déplacement bathochrome de la bande I ($\lambda = +39$ nm) par rapport au spectre enregistré dans CH_3OH , indique la présence d'un groupement hydroxyle libre en position 5. Le déplacement hypsochrome de la bande I ($\lambda = -30$ nm) en comparant le spectre enregistré dans $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ et celui enregistré dans le AlCl_3 confirme la présence d'un système ortho dihydroxyle sur le cycle B.

Les résultats relatifs à cette série spectrale UV sont rassemblés dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1: Données de la série spectrale UV du composé **AH1**.

RÉACTIFS	BANDE I	AUTRES BANDES	BANDE II	COMMENTAIRES
MeOH	349	/	269	Flavone
+ NaOH	402	/	263	OH libre en 4'
+AlCl ₃	420	/	272	OH libre en 5 ortho di-OH sur le
+ALCL ₃ +HCL	390	356	272	cycle B
+NaOAc	405	/	269	OR en 7
+NaOAc+H ₃ BO ₃	375	/	269	ortho di-OH sur le cycle B
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

Selon les résultats de la série spectrale UV, la structure partielle proposée pour le composé **AH1** est reportée dans la figure la IV.1.

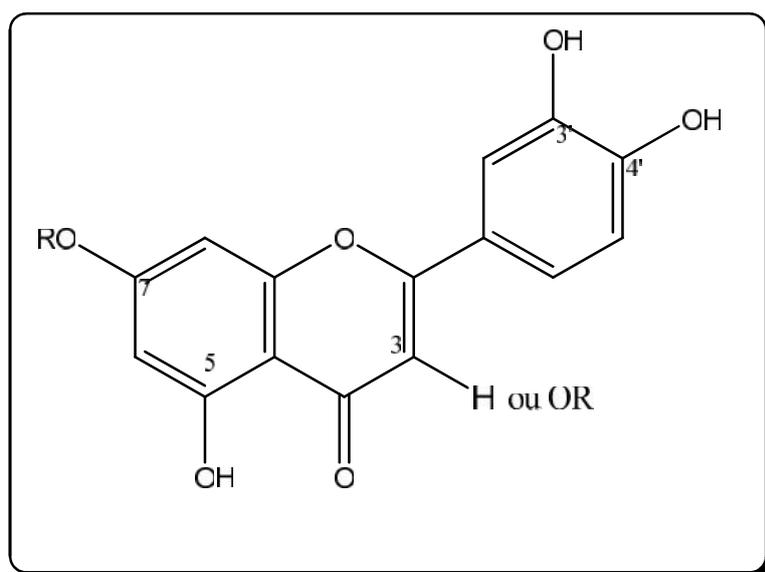
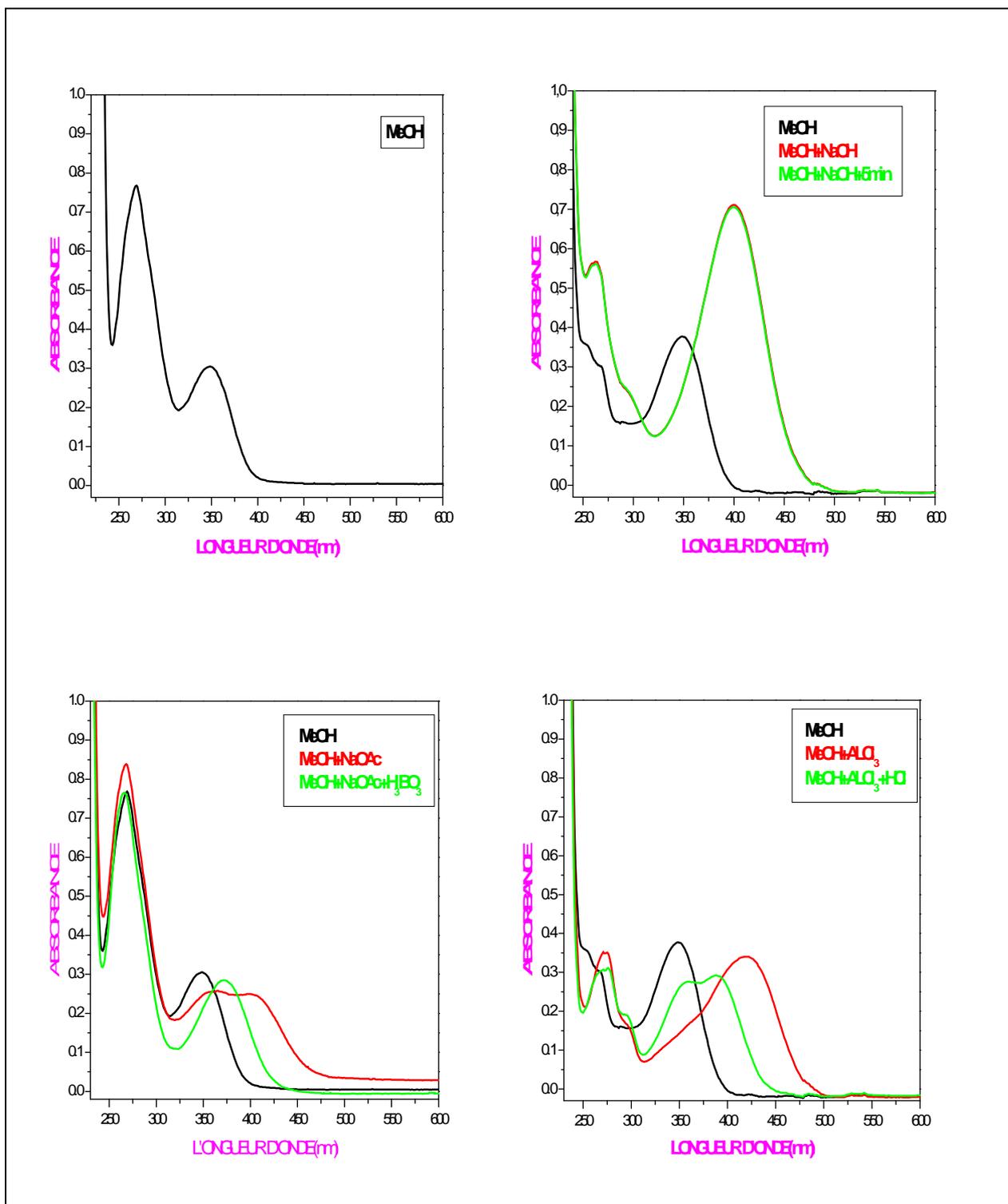


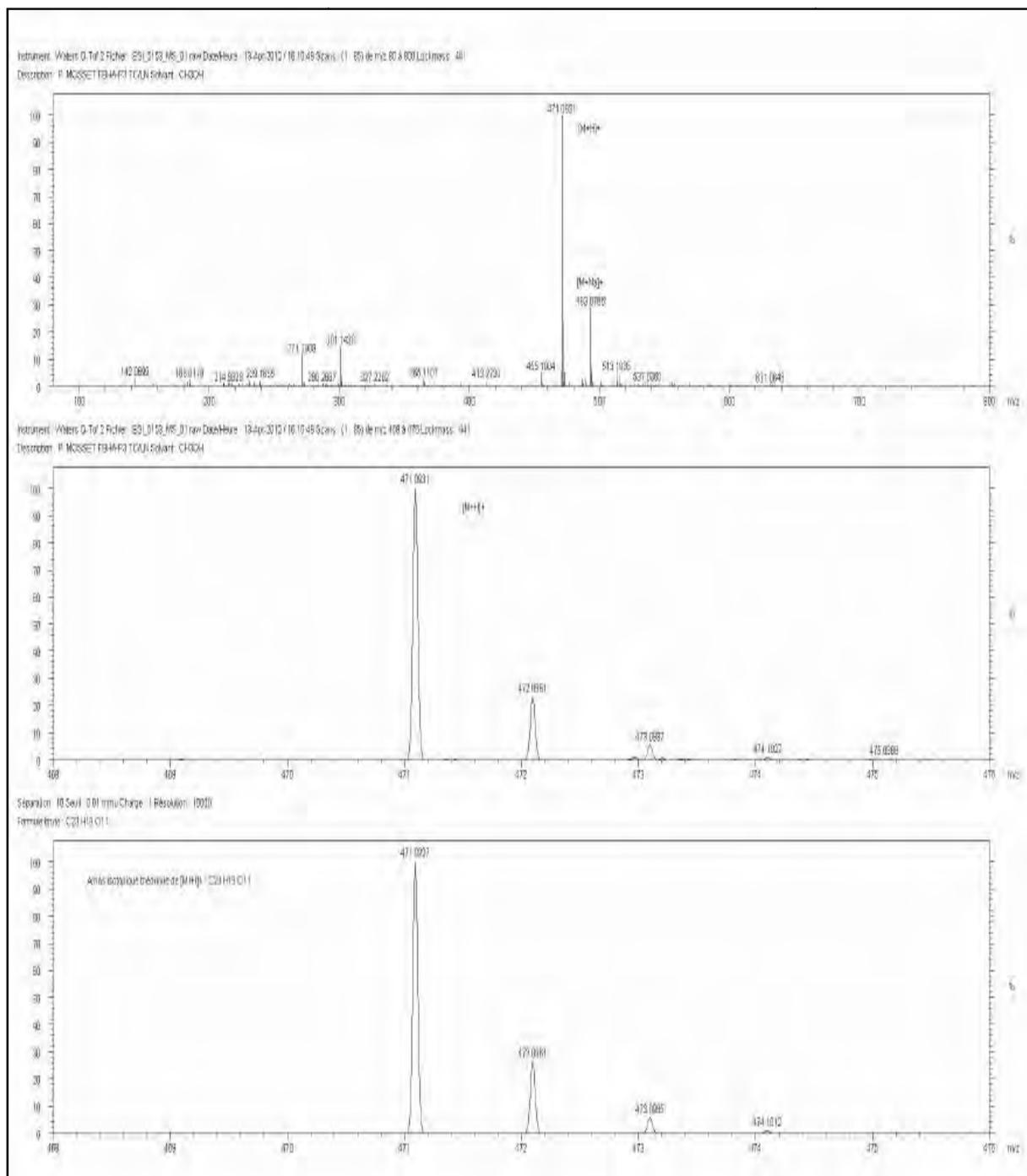
Figure IV.1: structure partielle du composé AH1.



Spectre IV.1: La série spectrale UV du composé AH1.

IV.1.3. La spectrométrie de masse :

Le spectre de masse (SMHR) en mode d'ionisation électrospray positif obtenu pour le produit **AH1**, donne un pic quasimoléculaire $[M+Na]^+$ de masse exacte $m/z=471.09274$ (calculée pour $C_{21}H_{20}O_{11}Na = 471.0903$) permettant ainsi de déduire une formule brute de $C_{21}H_{20}O_{11}$ pour cette molécule et une masse de 448 Da avec 12 insaturations.



Spectre IV.2: Spectre SMHR ESI positif du composé AH1.

IV.1.4. Spectroscopie RMN :

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV.3) ainsi que ses spectres étalés (spectre n° IV.4, IV.5 et IV.6) montre la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone qu'on peut identifier par:

- ❖ Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,77$ ppm attribuable à H-3.
- ❖ Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,83$ ppm, le second à $\delta = 6,47$ ppm avec une constante de couplage $J = 2,2$ Hz (couplage méta) attribuables à H-8 et H-6 respectivement, indiquant ainsi une substitution des carbones 5 et 7.
- ❖ Concernant la position 5, le signal d'intégration 1H à $\delta = 12,99$ ppm attribuable à un OH formant une chélation avec le carbonyle confirme que cette position est hydroxylée.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H ($J = 2,2$ Hz), indicateur d'un couplage méta à $\delta = 7,42$ ppm attribuable à H-2'.
- ❖ Un doublet dédoublé ($J = 8,3$ Hz ; $J = 2,2$ Hz), indicateur d'un couplage ortho et d'un couplage méta à $\delta = 7,48$ ppm attribuable à H-6'.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,92$ ppm ($J = 8,3$ Hz), indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5'.

La présence de ces trois derniers signaux est en faveur d'un cycle B substitué en positions 3' et 4' confirmant ainsi la présence de système dihydroxyle sur le cycle B.

- ❖ Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 5,1$ ppm ($J = 7,3$ Hz), attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène. D'après la valeur de la constante de couplage ($J = 7,3$ Hz), cette entité peut être un glucosyle ou un galactosyle avec une configuration β entre le sucre et la génine.
- ❖ Un ensemble de multiplets dans l'intervalle 3.2- 3.7 ppm attribuable par conséquent aux autres protons du sucre.

L'ensemble des données relatives à la RMN ^1H de ce composé est reproduit dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2: Données de la spectrométrie RMN ^1H (400MHz) du composé AH1.

DEPLACEMENT CHIMIQUE (PPM)	INTÉGRATION	MULTIPLICITÉ J(HZ)	ATTRIBUTION
12.99	1-H	s	OH en 5
7.48	1-H	d d (8.3et2.2)	H-6'
7.42	1-H	d (2.2)	H-2'
6.92	1-H	d (8.3)	H-5'
6.83	1-H	d (2.2)	H-8
6.77	1-H	s	H-3
6.47	1-H	d (2.2)	H-6
5.1	1-H	d (7.3)	H-1''
3.2-3.7	5H	m	Protons substituant sucre

L'ensemble de ces données montre que la structure partielle du composé AH1 est de type lutéoline substitué en 7 par un sucre (voir figure IV.2).

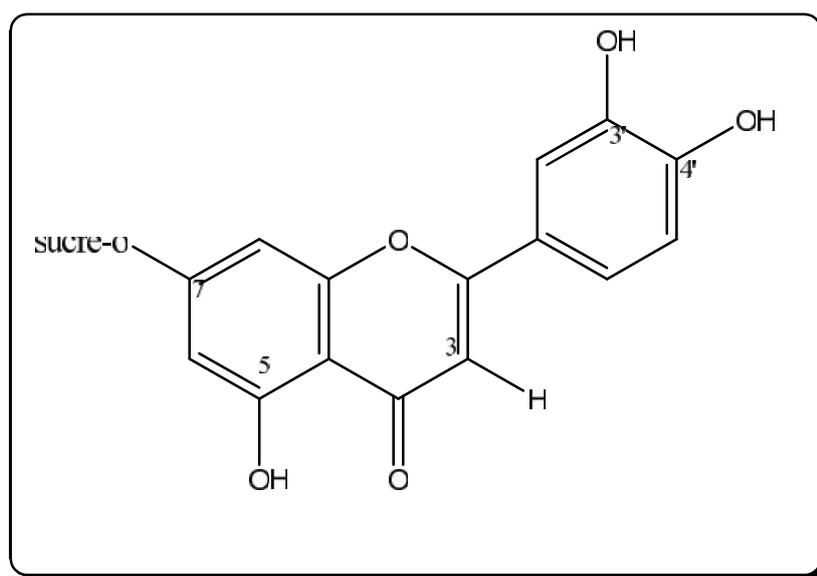
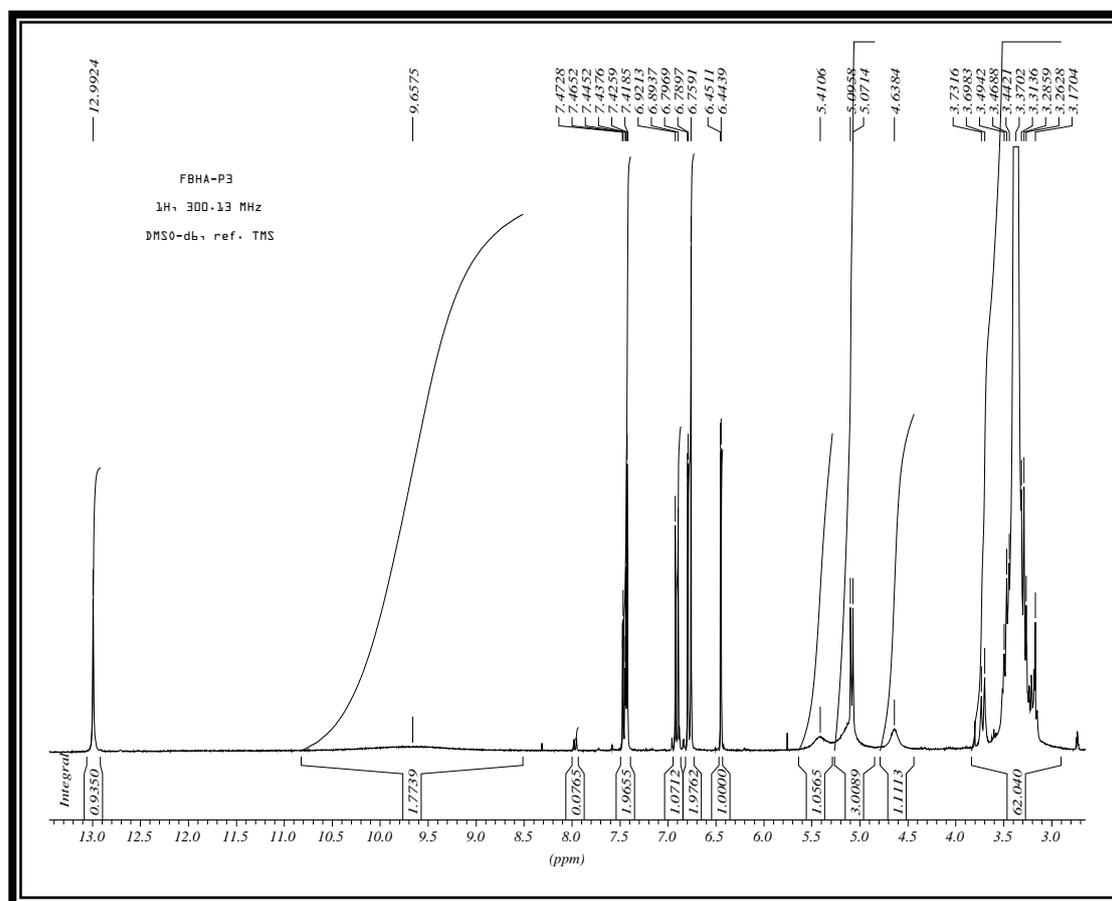


Figure IV.2: structure partielle du composé AH1.

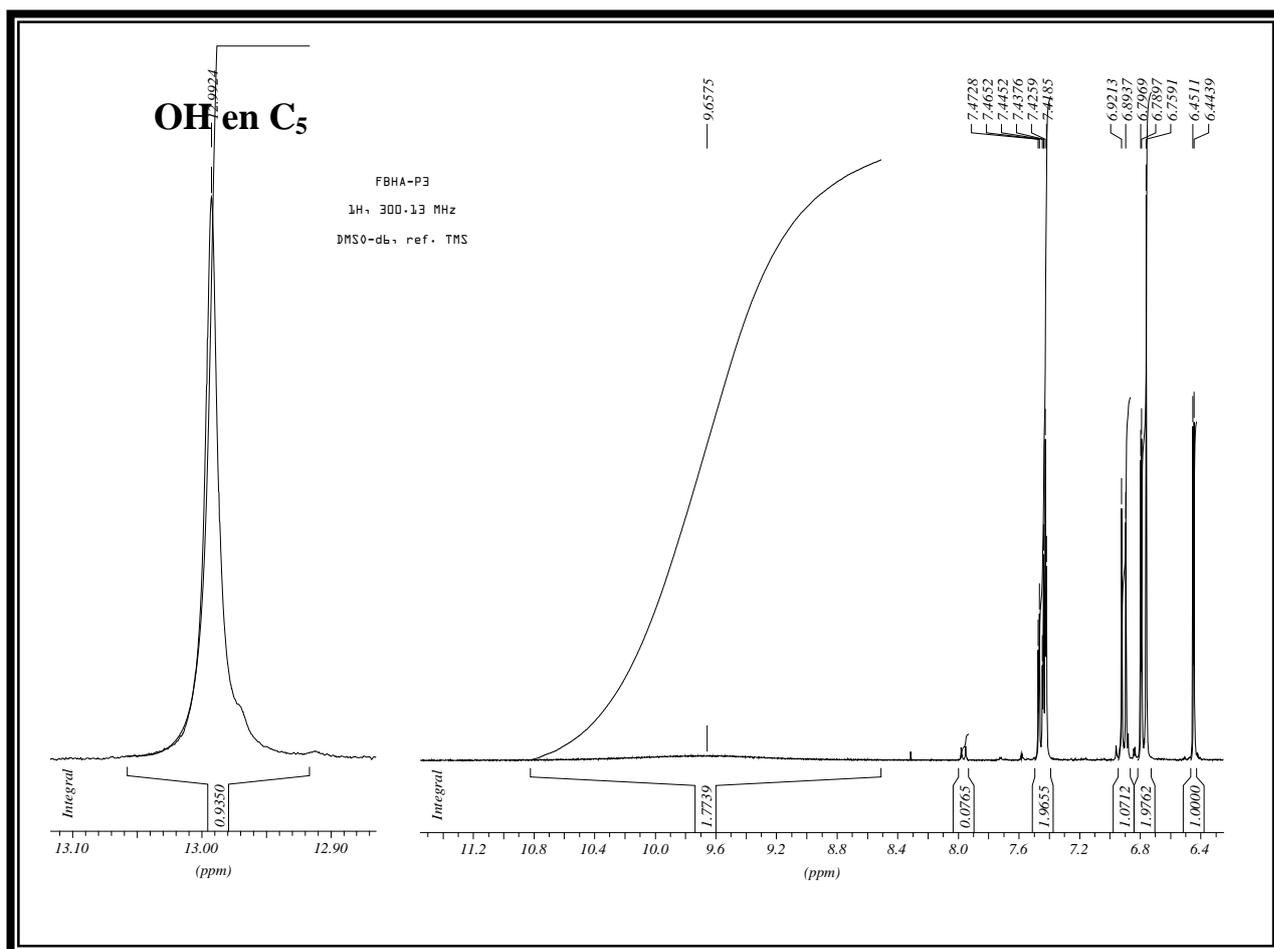
Après addition de 3 gouttes d'eau lourde (D_2O) et homogénéisation soignée, le pic de l'eau à 3,37 ppm s'est déplacé pour donner un pic de DOH à 3,755 ppm. Ceci a permis de dégager les protons qui étaient cachés par le pic de l'eau (spectre n° IV.7).

- ❖ Un triplet à $\delta = 3.2$ ppm d'intégration 1H attribuable à H4'' ($J=9.0Hz$)
- ❖ Deux triplet qui se chevauchent d'intégration 2H à $\delta = 3.32$ ppm correspondant aux H2'' et H3'' ($J=9.0Hz$; $J=9.0Hz$).
- ❖ Un multiplet d'intégration 2H à $\delta = 3.49$ ppm correspondant aux HQU SE 5'' et H6''b.

D'après les valeurs des constantes de couplage de ces noyaux (9.0Hz) sont caractéristiques de couplages de type axiale-axiale. Par conséquent le proton H-4'' admet une orientation axiale. Cette observation oriente vers la présence d'un sucre de type glucose.

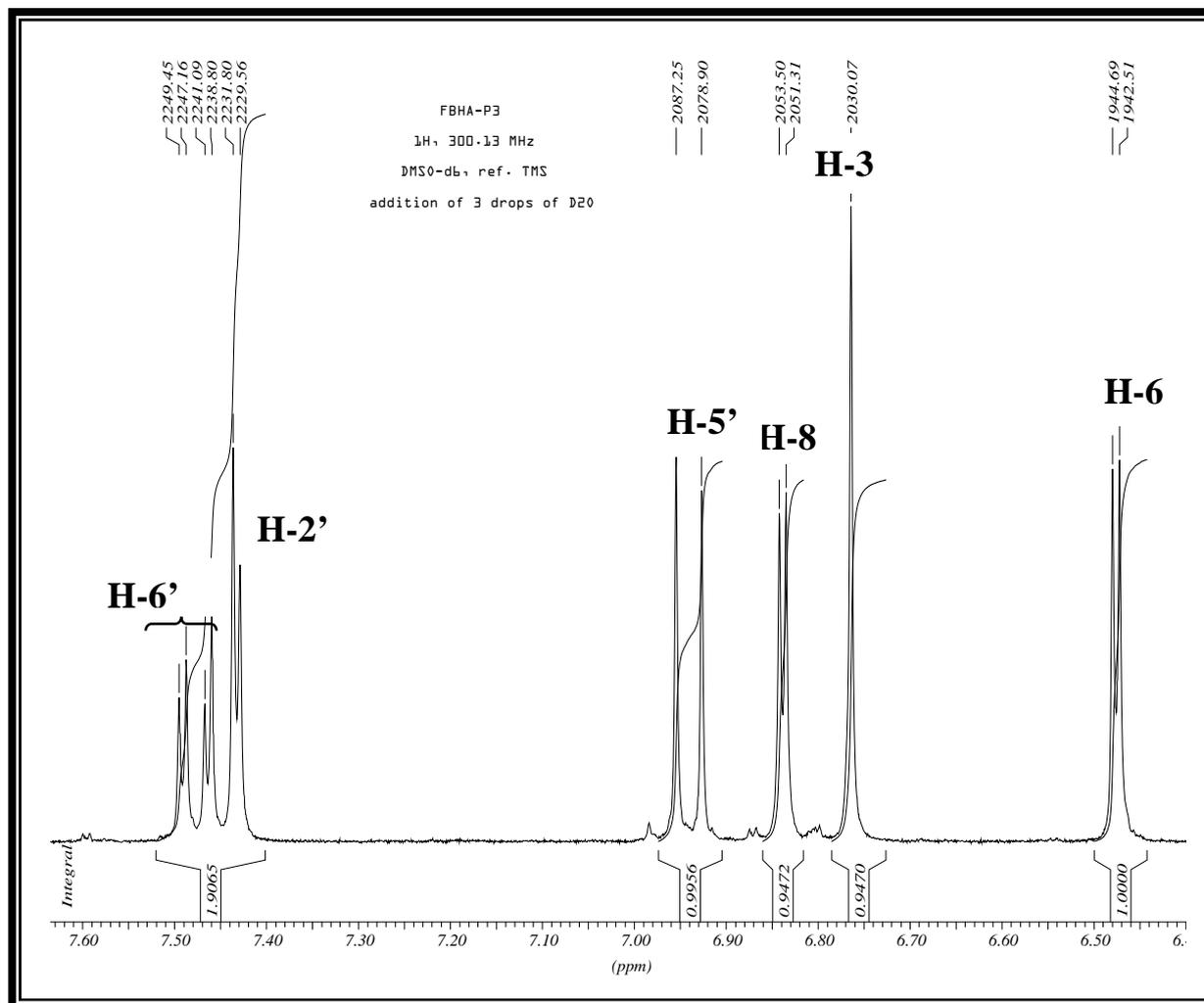


Spectre IV.3: Spectre de RMN 1H (400 MHz) du composé AH1 dans DMSO- d_6

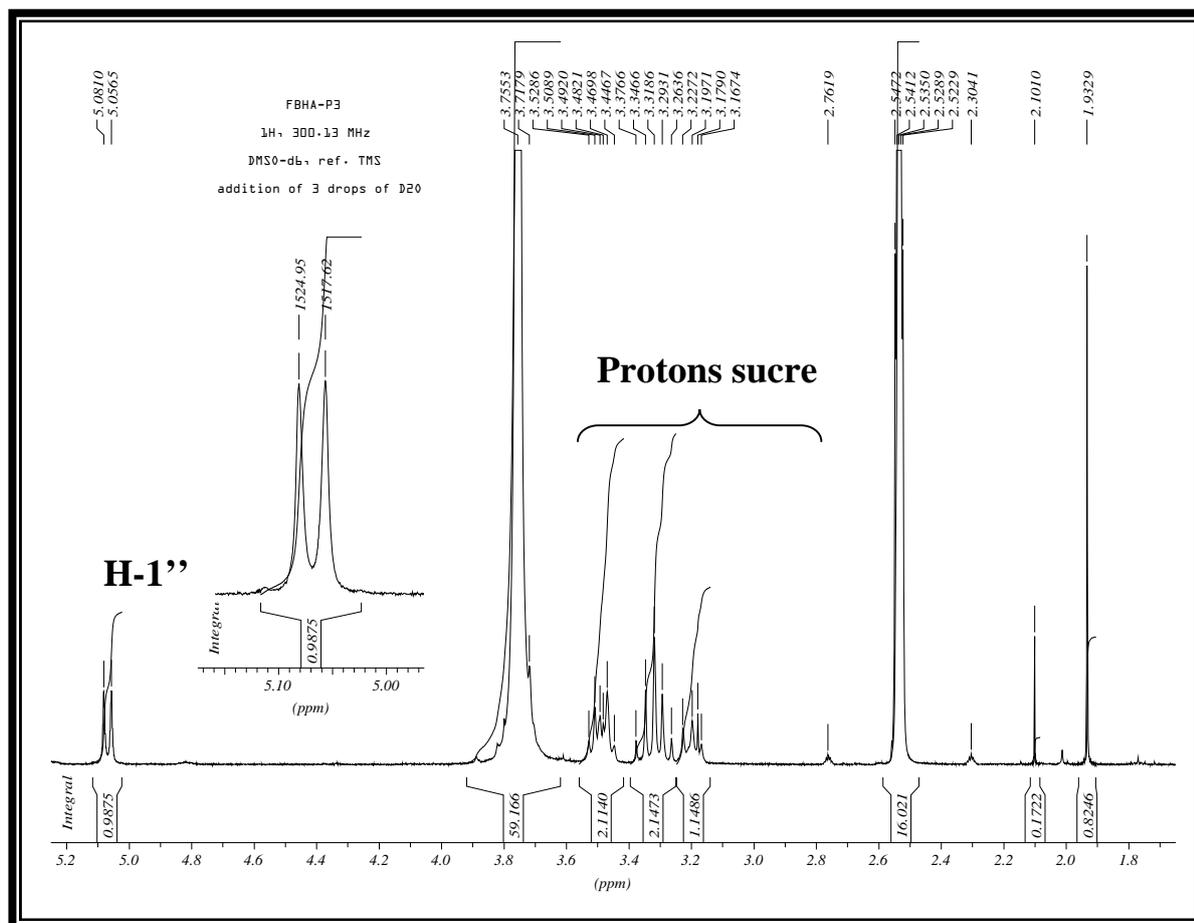


Spectre IV.4: Spectre de RMN ¹H (400 MHz) du composé AH1 dans DMSO-d₆

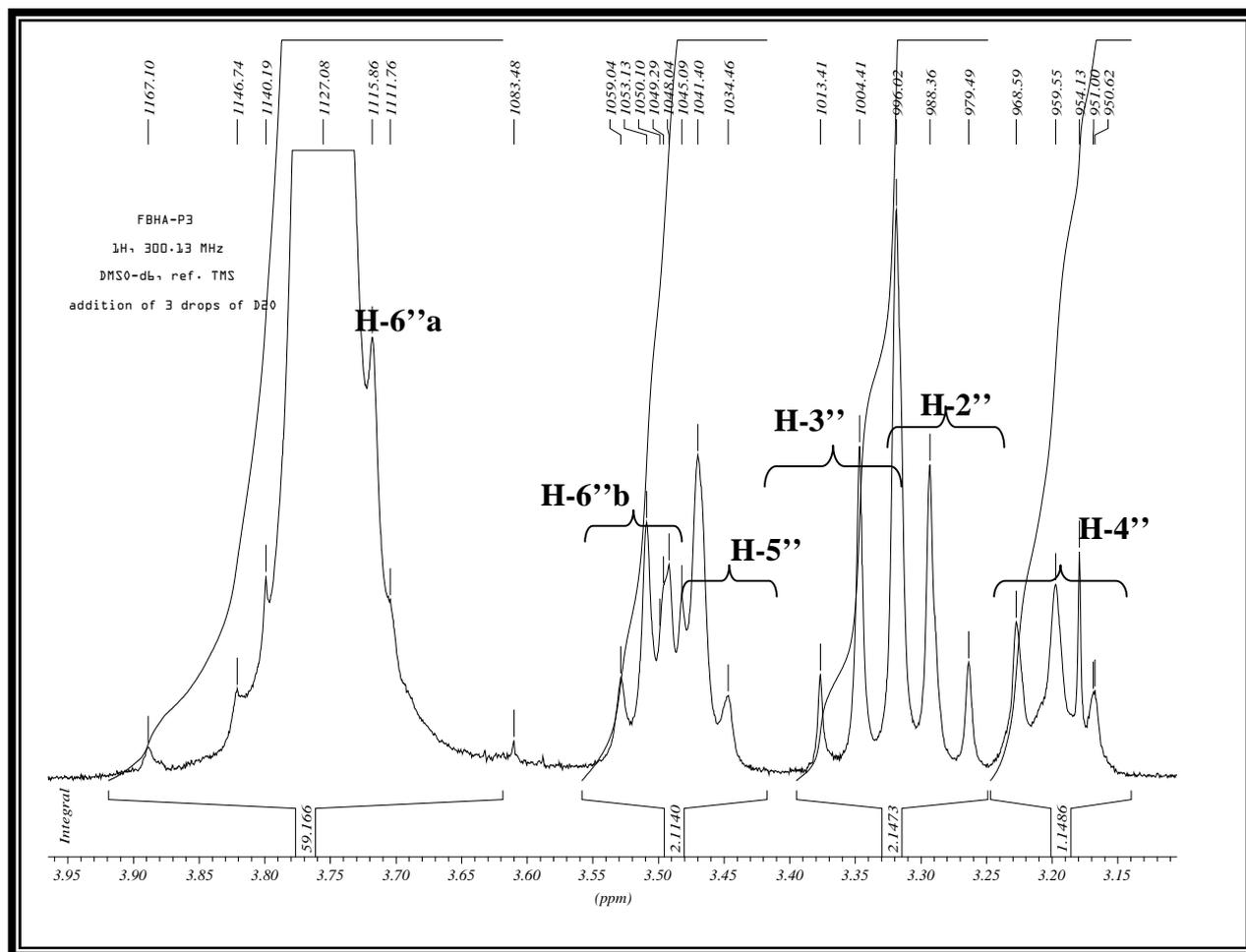
(Etalement).



Spectre IV.5: Spectre de RMN ^1H (400 MHz) du composé **AH1** dans DMSO- d_6 étalé (6.50 à 7.50 ppm).



Spectre IV.6: Spectre de RMN ^1H (400 MHz) du composé **AH1** dans DMSO-d₆ étalé (1.8 à 5.2 ppm).

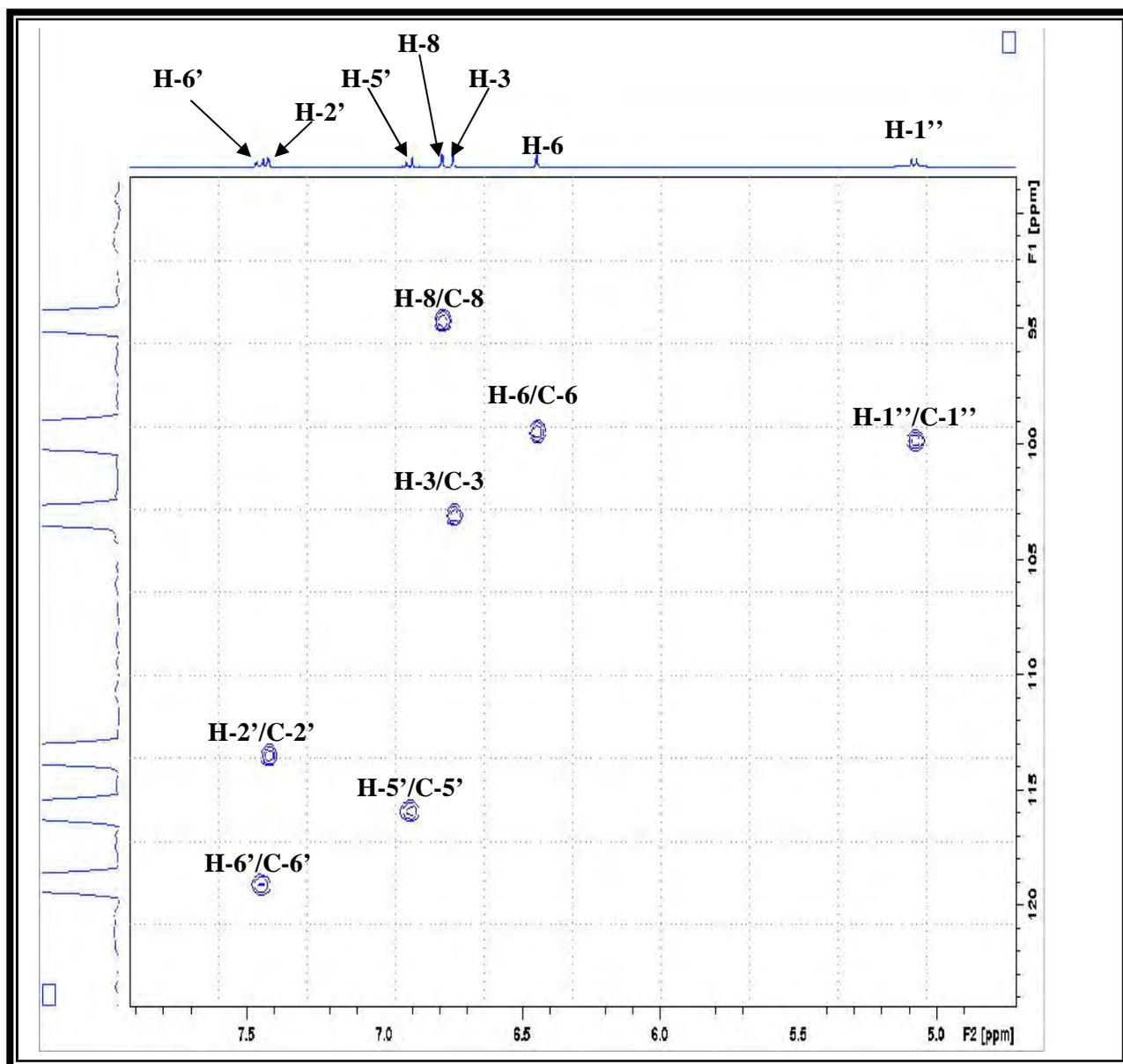


Spectre IV.7: Spectre de RMN ^1H (400 MHz) du composé **AH1** dans DMSO- d_6 étalé (3.15 à 3.95 ppm).

L'examen du spectre HSQC (spectre n° IV.8 et IV.9) permet d'observer les couplages entre les carbones et les protons directement liés entre eux ainsi :

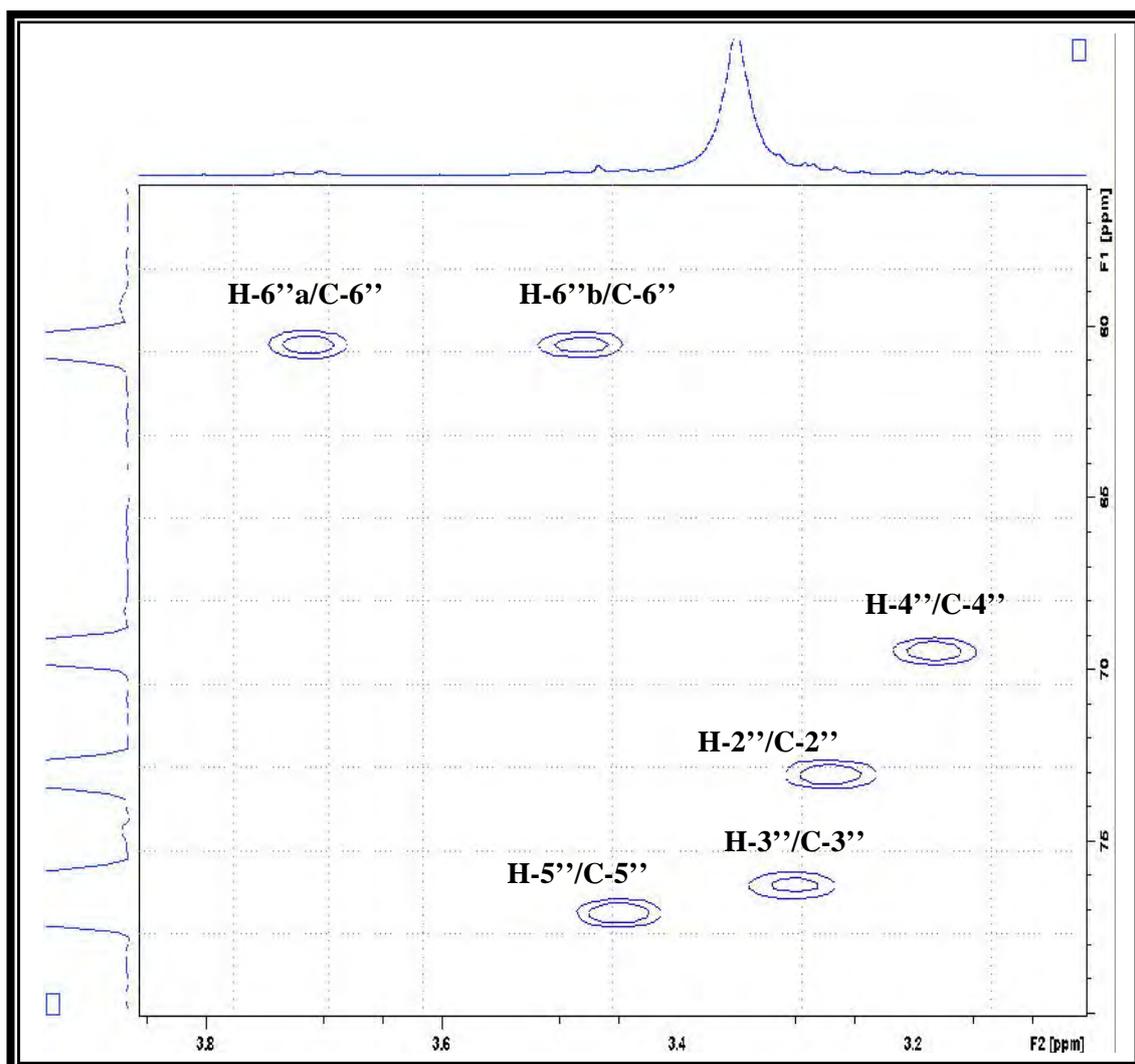
- Le H-6' permet l'attribution du C-6' à $\delta = 119.06$ ppm.
- Le H-2' permet l'attribution du C-2' à $\delta = 113.45$ ppm.
- Le H-5' permet l'attribution du C-5' à $\delta = 115.87$ ppm.
- Le H-8 permet l'attribution du C-8 à $\delta = 94.62$ ppm.
- Le H-3 permet l'attribution du C-3 à $\delta = 103.06$ ppm.
- Le H-6 permet l'attribution du C-6 à $\delta = 99.43$ ppm.

Le même spectre indique les déplacements chimiques des carbones osidiques C-6'' à $\delta = 60.52$ ppm, C-4'' à $\delta = 69.45$ ppm, C-2'' à $\delta = 73.01$ ppm, C-3'' à $\delta = 76.28$ ppm, C-5'' à $\delta = 77.05$ ppm et le carbone anomérique C-1'' à $\delta = 99.97$ ppm.



Spectre IV.8: Spectre HSQC (400 MHz) du composé **AH1** dans DMSO-d₆

(Etalement).



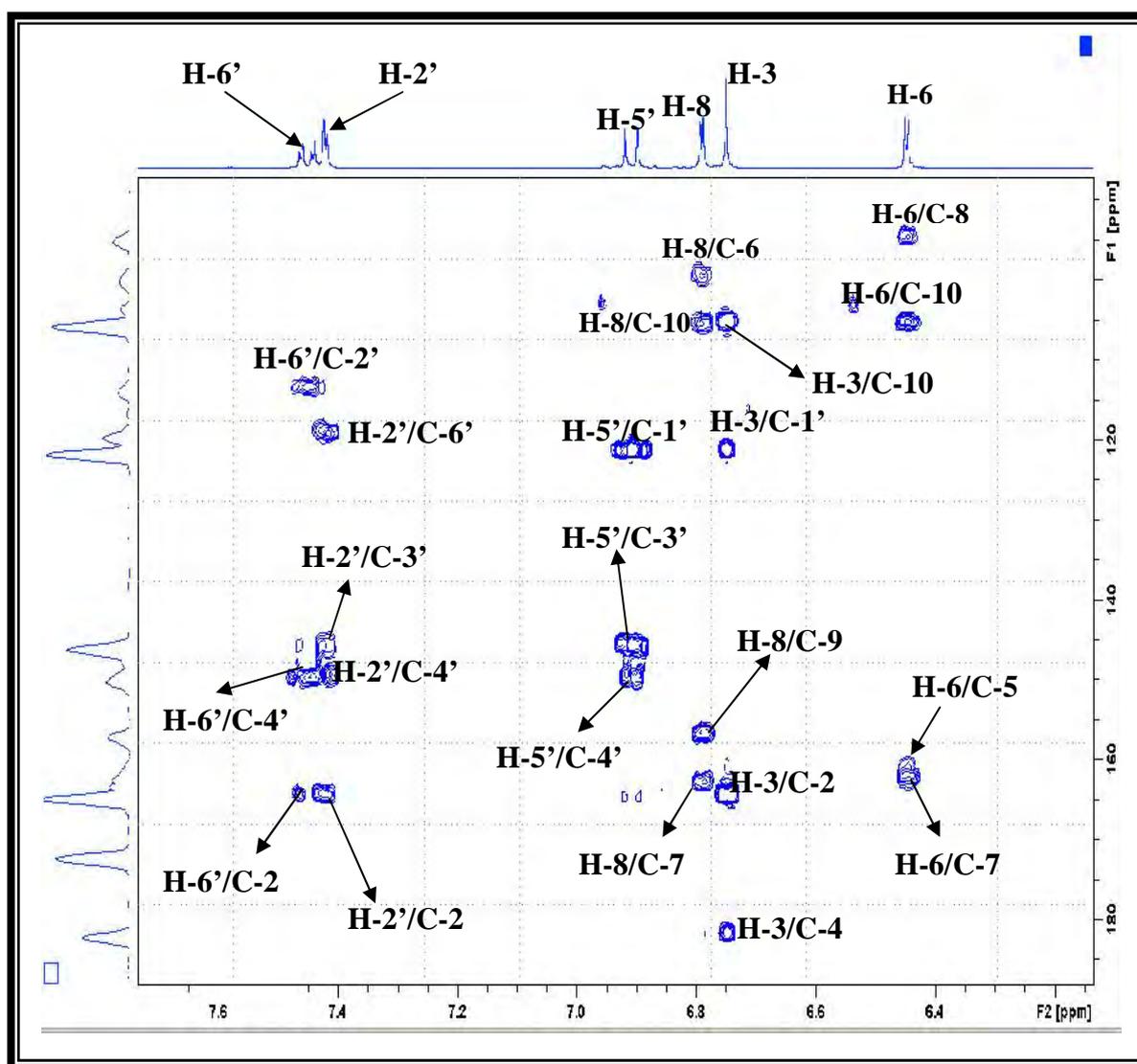
Spectre IV.9: Spectre HSQC (400 MHz) du composé **AH1** dans DMSO- d_6
(Etalement).

Le spectre de l'expérience HMBC (spectre n° IV.10 et n° IV.11) de ce produit a également permis l'attribution des autres carbones quaternaires notamment :

- C-2 à = 162,84 ppm grâce à sa corrélation avec H-2', H-6' et H-3.
- C-4 à = 181,78 ppm grâce à sa corrélation avec H-3.
- C-5 à = 161,03 ppm grâce à sa corrélation avec H-6.
- C-7 à = 164,37 ppm grâce à sa corrélation avec H-6 et H-8.
- C-9 à = 156,84 ppm grâce à sa corrélation avec H-8.
- C-4' à = 149,83 ppm grâce à sa corrélation avec H-5' et H-2', H-6'.
- C-1' à = 121,27 ppm grâce à sa corrélation avec H-5' et H-3.

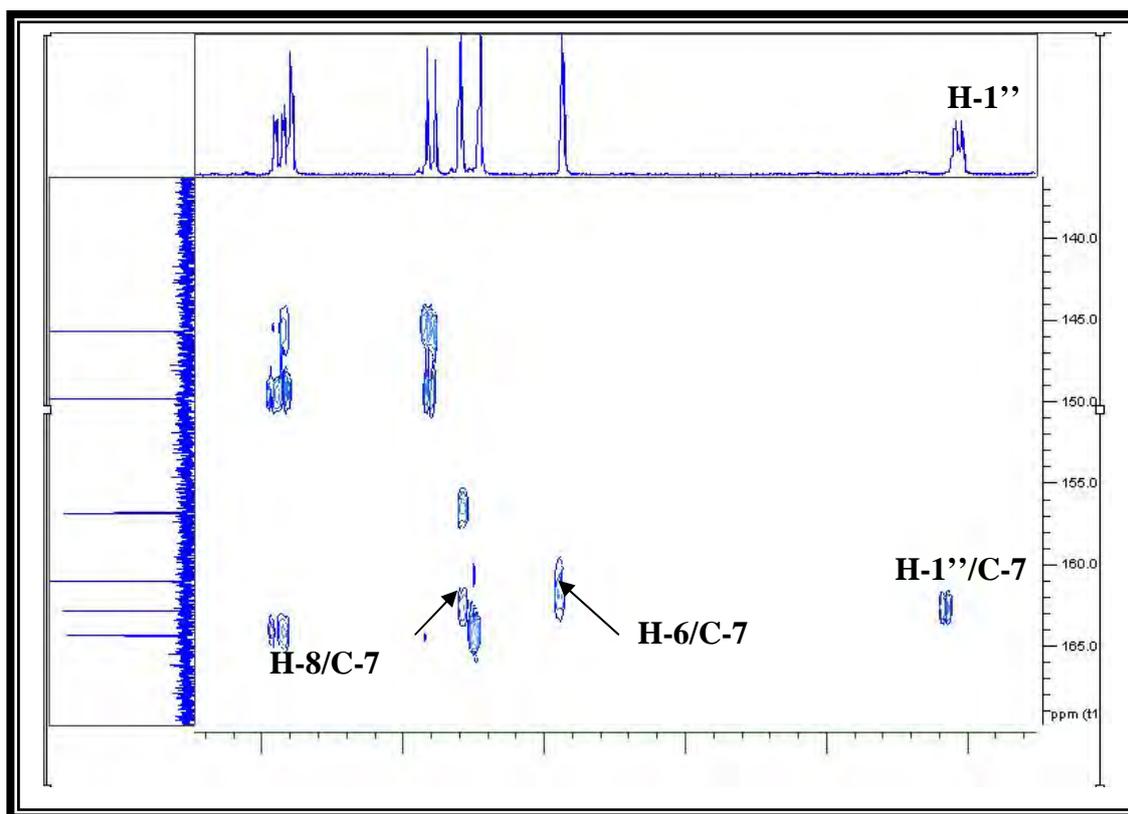
- C-10 à $\delta = 105,23$ ppm grâce à sa corrélation avec H-6, H-8 et H-3.

Toujours sur le spectre de l'expérience HMBC, le proton anomérique du glucose montre une tache de corrélation nette avec le carbone C-7. La présence de cette corrélation entre le C-7 et le proton anomérique, indique de l'entité sucre est placée en C-7.



Spectre IV.10: Spectre HMBC (400 MHz) du composé AH1 dans DMSO- d_6

(Étalement).



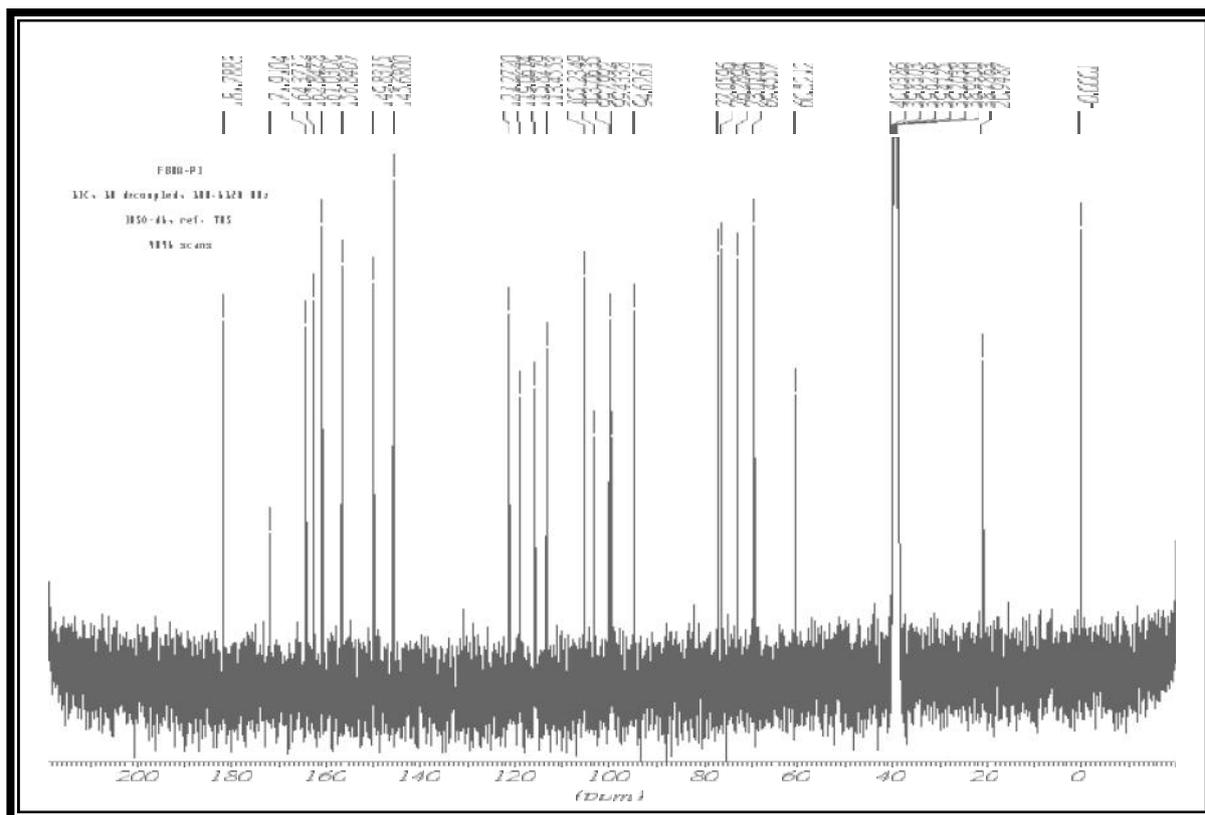
Spectre IV.11: Spectre HMBC (400 MHz) du composé **AH1** dans DMSO-d₆
(Etallement).

Le spectre de RMN ¹³C (spectre n° IV.12) du composé AH1 présente vingt et un signaux distincts dont quinze correspondent aux signaux d'un flavonoïde, et les six signaux restant sur le spectre appartiennent au sucre.

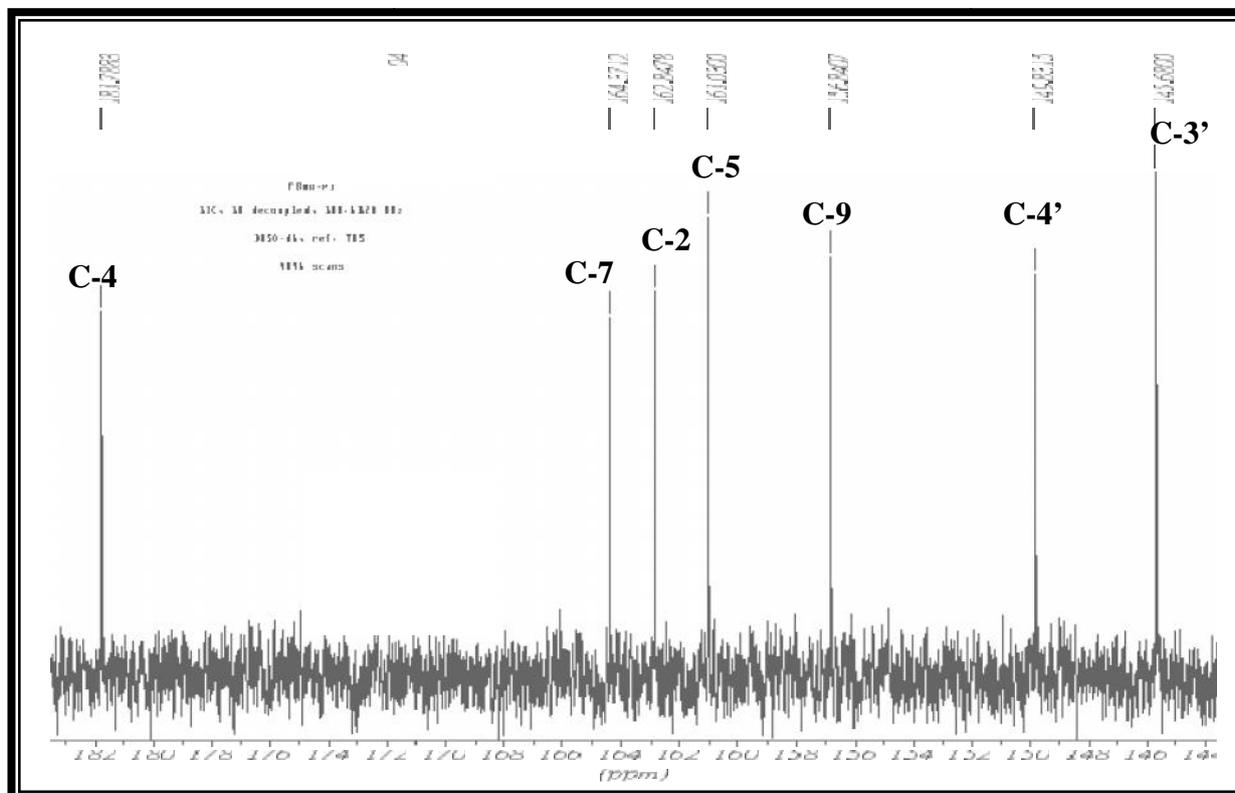
Les déplacements chimiques en RMN ¹³C et les attributions des signaux sont présentés dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3: Données de la spectrométrie RMN ^{13}C du composé AH1.

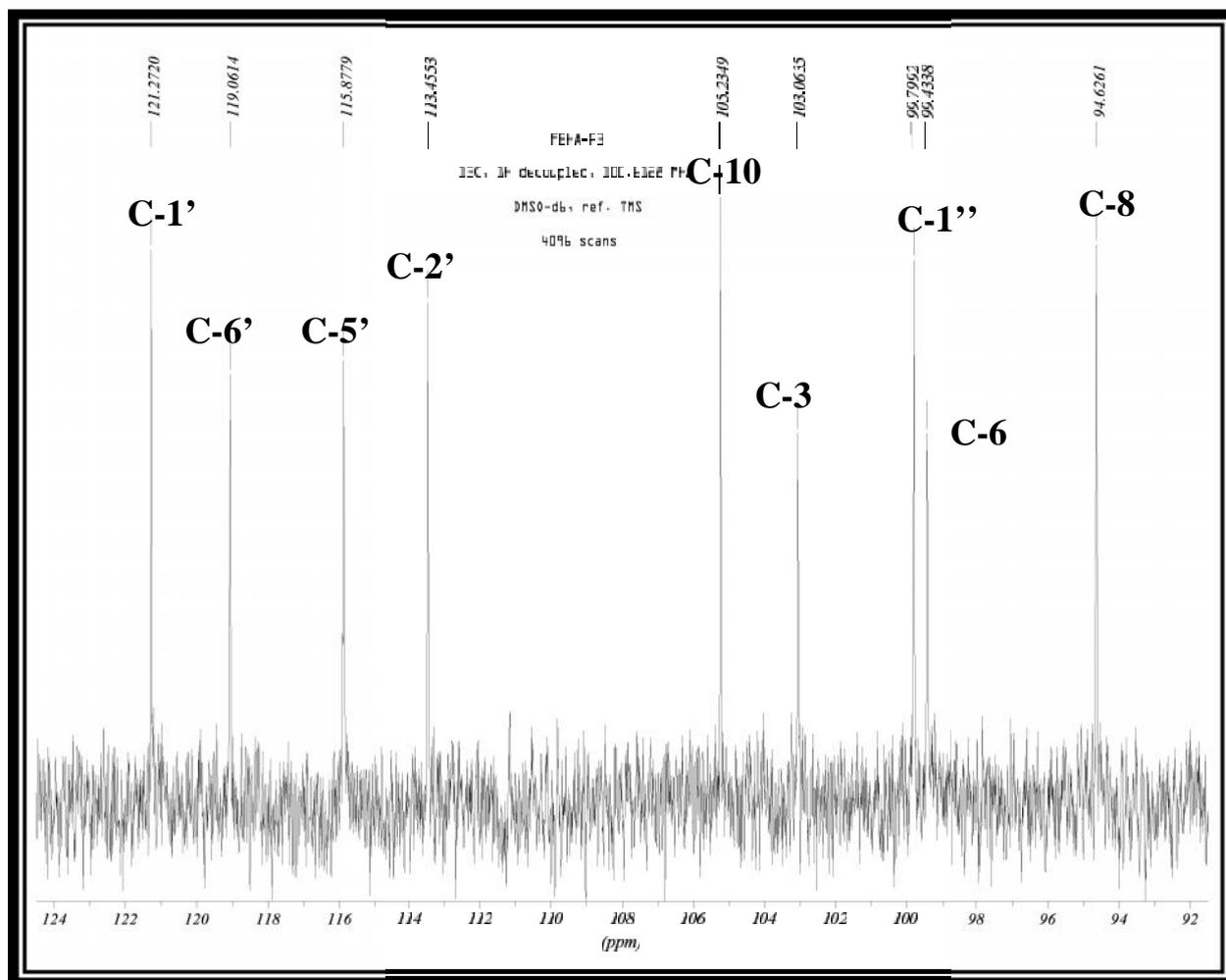
interprétation	δ (ppm)
2	162.84
3	103.06
4	181.78
5	161.03
6	99.43
7	164.37
8	94.62
9	156.84
10	105.23
1'	121.27
2'	113.45
3'	145.86
4'	149.83
5'	115.87
6'	119.06
1''	99.97
2''	73.01
3''	76.28
4''	69.45
5''	77.05
6''	60.52



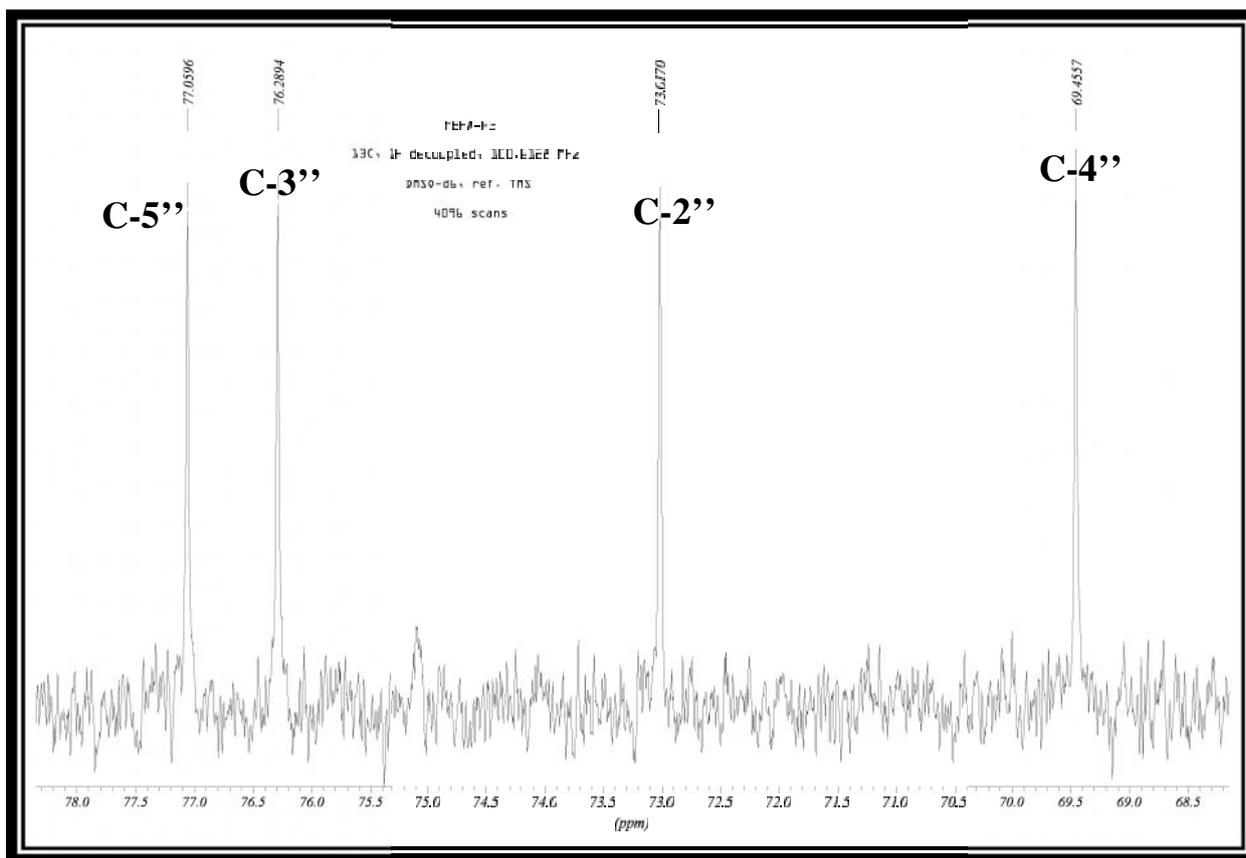
Spectre VI.12: Spectre de RMN ^{13}C du composé **AH1** dans DMSO-d₆.



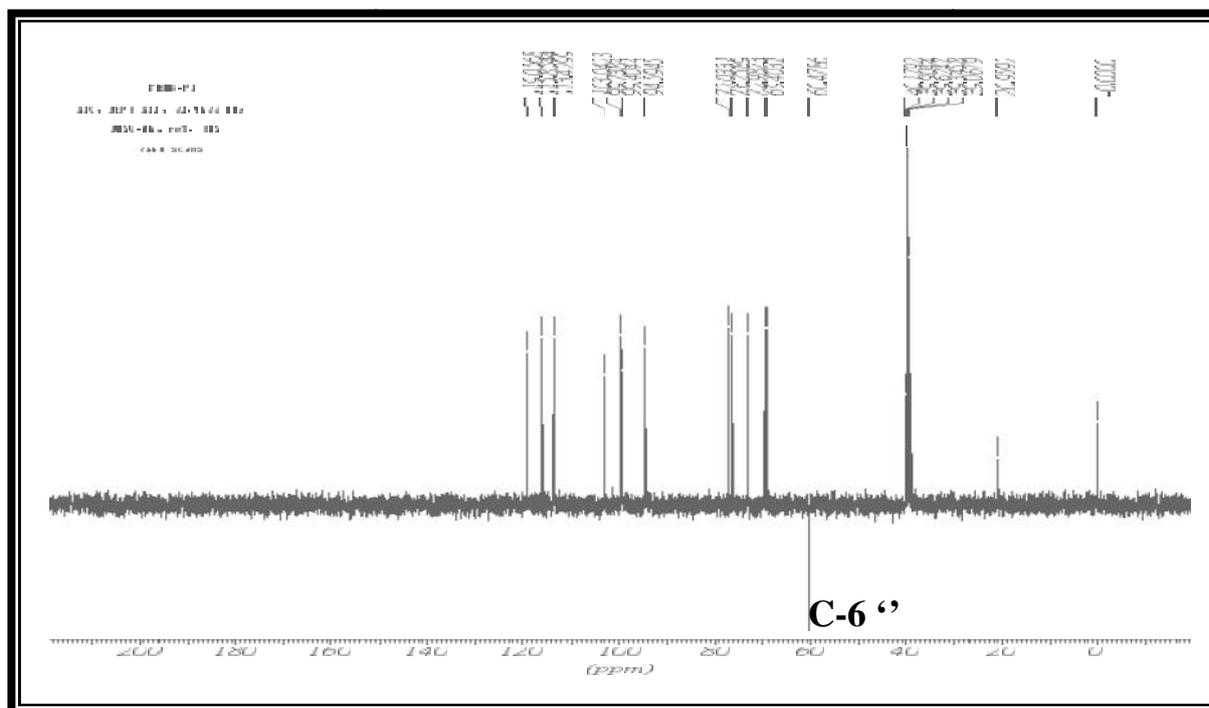
Spectre VI.13: Spectre de RMN ^{13}C étalé (144 à 182) du composé **AH1** dans DMSO-d₆.



Spectre VI.14: Spectre de RMN ^{13}C étalé (92à 124ppm) du composé **AH1** dans DMSO-d6.



Spectre VI.15: Spectre de RMN ^{13}C étalé (68 à 78 ppm) du composé AH1 dans DMSO-d6.



Spectre VI.16: DEPT 135 du composé AH1 dans DMSO-d6.

IV.1.5. Hydrolyse acide :

Pour confirmer la nature du sucre, on a eu recours à l'hydrolyse acide de ce composé. Après concentration des phases organiques et aqueuses, nous avons procédé d'une part à une Co-chromatographie sur plaque analytique recouverte de terre siliceuse F254 et éluee par le système Acétone-eau (9/1) de la phase aqueuse en présence d'échantillons authentiques des sucres, il est apparu que le sucre est le glucose. La figure IV.3, montre le résultat de cette étape:

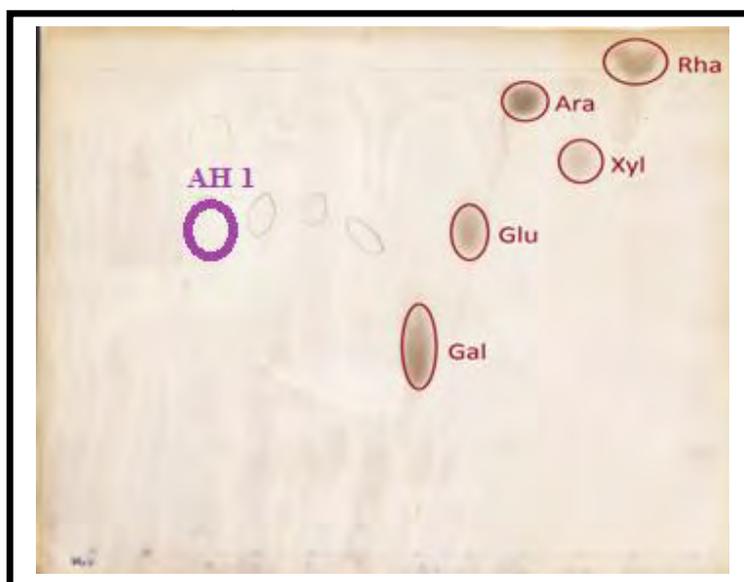


Figure IV.3: Hydrolyse acide du produit AH1

La structure du composé **AH1** (figure IV.4) a donc pu être établie comme étant le 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone-7-O- β -D-glucoside, généralement appelé lutéoline-7-O- β -glucoside.

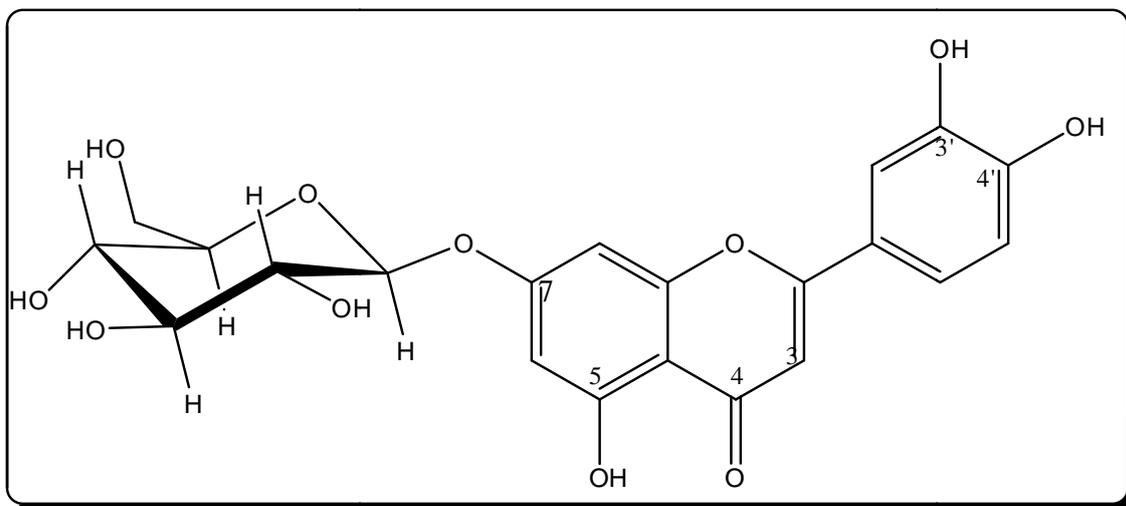


Figure IV.4: Structure du composé AH1, Lutéoline-7-O- β -glucoside.

IV.2. Détermination structurale du composé AH5 :

IV.2.1. Fluorescence :

La fluorescence sous la lumière UV (365nm) de ce composé est noir-violette, indiquant une structure de type flavone ou flavonol substitué en position 3.

IV.2.2. Spectroscopie RMN :

L'examen du spectre de RMN ^1H (Spectre n°17) et ses étalements (Spectre n°18, n°19) montre la présence de :

- ❖ un doublet de doublets à $\delta = 7,44$ ppm ($J = 8,8 ; 2,0$ Hz) partiellement recouvert par un singulet large à $\delta = 7,42$ ppm le tout d'intégration 2H attribuables à H-6' et H-2' respectivement.
- ❖ un signal à $\delta = 7,30$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un doublet ($J = 8,8$ Hz) (couplage ortho) attribuable à H-5'.

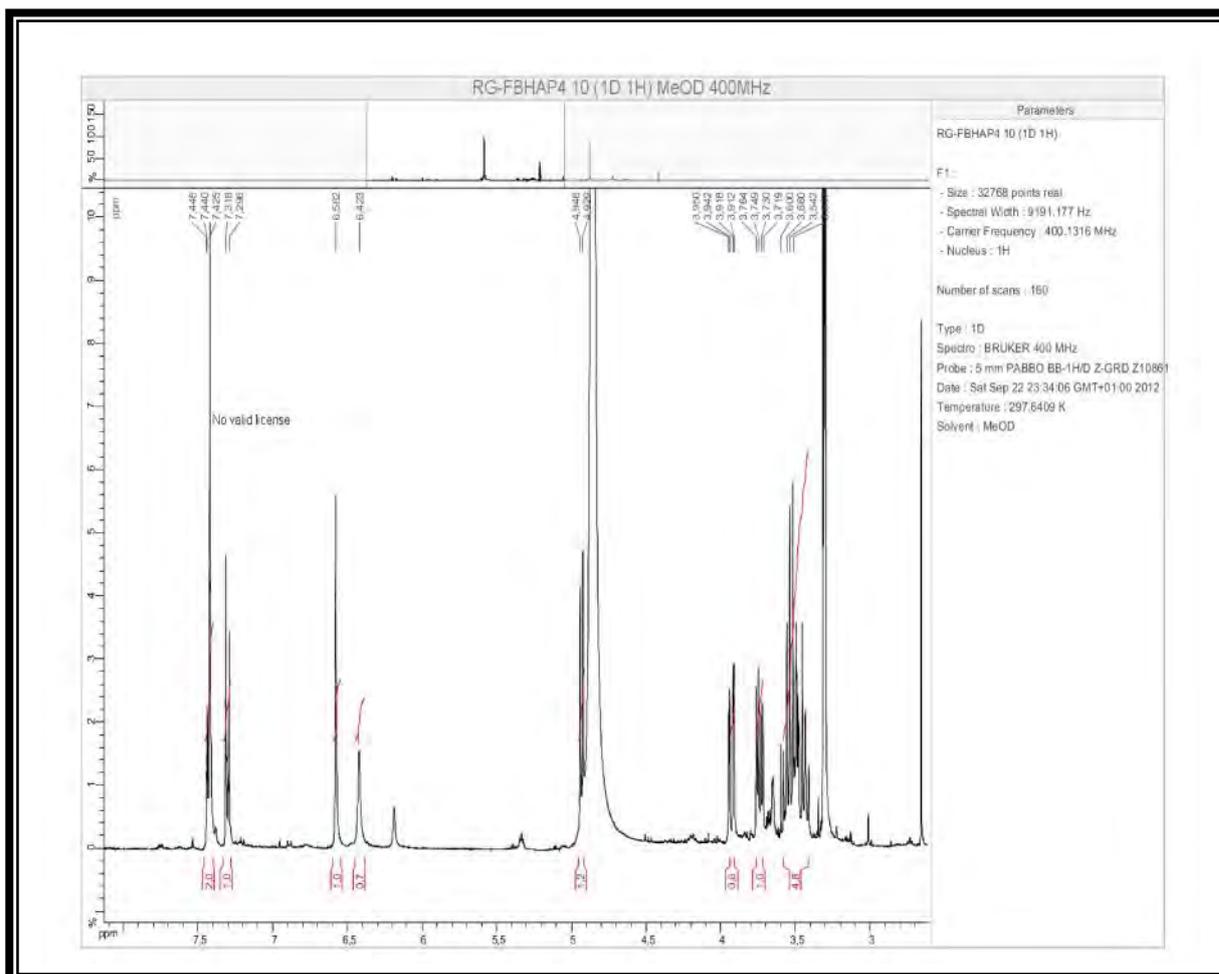
Ces observations orientent vers un noyau B substitué en positions 4' et 3'.

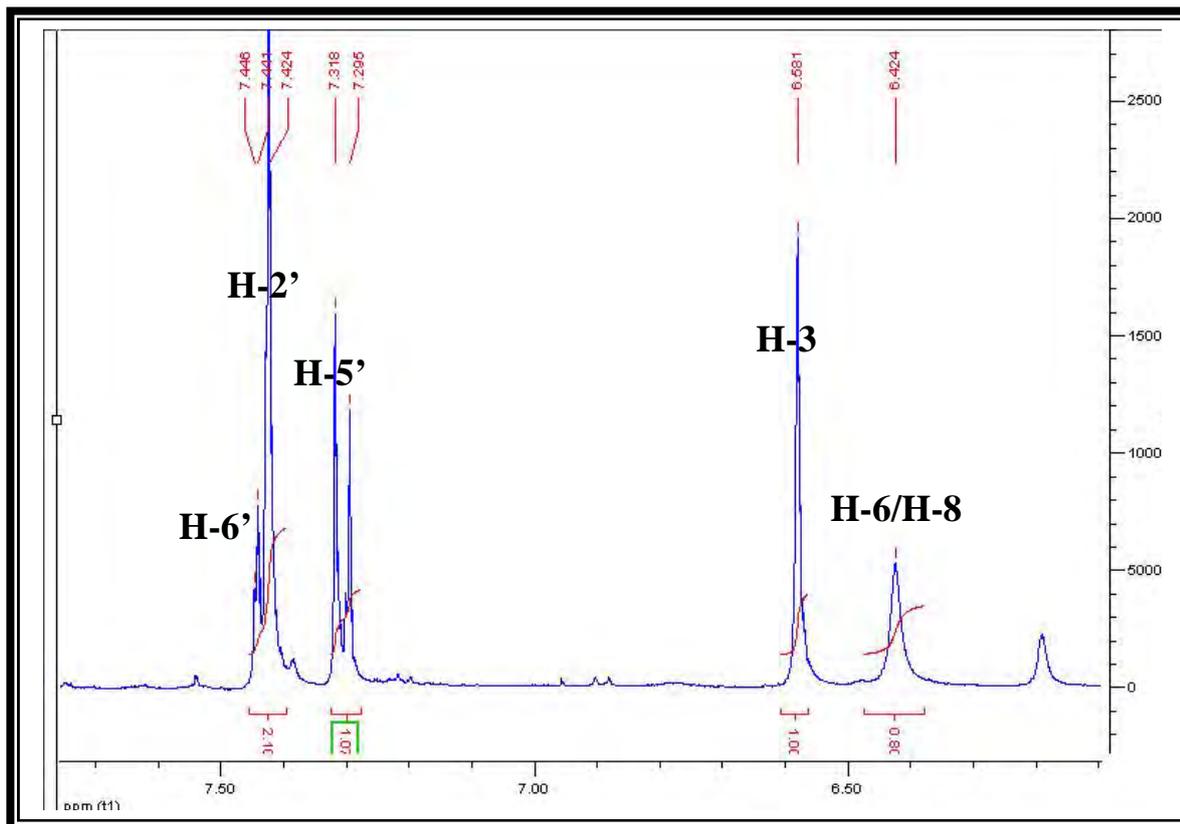
- ❖ un signal à $\delta = 6,58$ ppm, d'intégration 1H sous forme d'un singulet attribuable à H3, ce qui oriente vers la structure d'une flavone.
- ❖ Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,42$ ppm attribuable à H-6/H-8.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 4,95$ ppm ($J = 7,6$ Hz), attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène. D'après la valeur de la constante de couplage, cette entité peut être un glucosyle ou un galactosyle avec une configuration β entre le sucre et la génine.
- ❖ Un ensemble de multiplets dans l'intervalle 3,4- 3,95 ppm attribuable par conséquent aux autres protons du sucre.

L'ensemble des données relatives à la RMN ^1H de ce composé est reproduit dans le tableau IV.4.

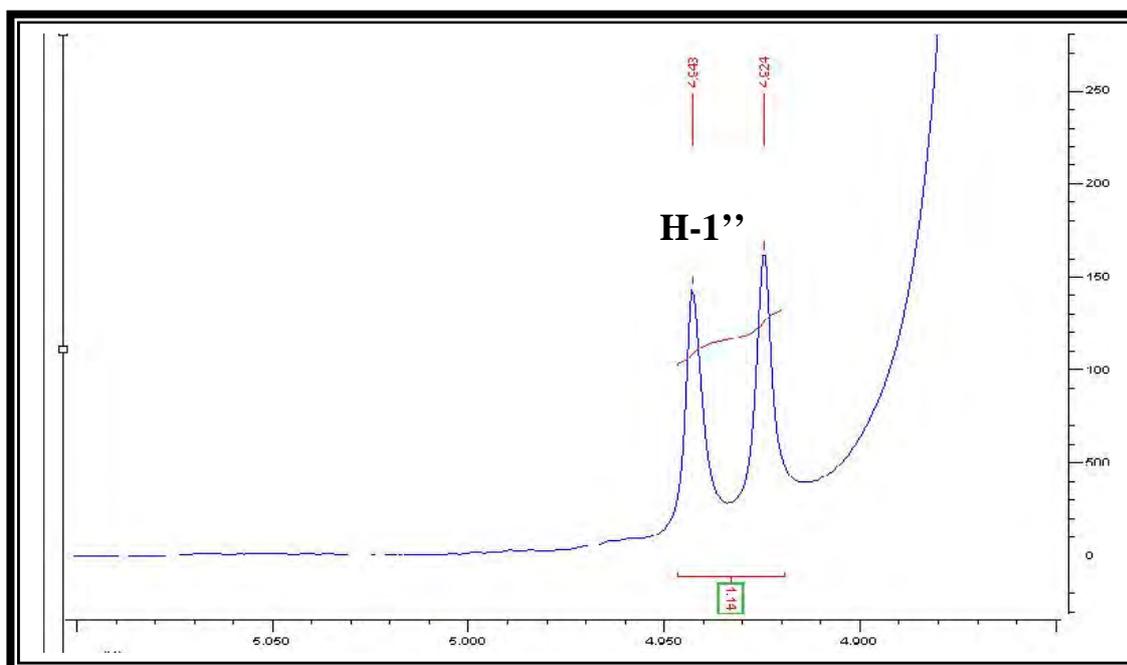
Tableau IV.4: Données de la spectrométrie RMN ^1H (400MHz) du composé AH5.

DEPLACEMENT CHIMIQUE (PPM)	INTÉGRATION	MULTIPLICITÉ $J(\text{HZ})$	ATTRIBUTION
7.44	1-H	d d (8.8et2.0)	H-6'
7.42	1-H	sl	H-2'
7.30	1-H	d (8.8)	H-5'
6.58	1-H	s	H-3
6.42	1-H	s	H-6/H-8
4.95	1-H	d (7.6)	H-1''
3.4-3.95	5H	m	Protons substituant sucre

Spectre IV.17: Spectre de RMN ^1H (400 MHz) du composé AH5 dans CD_3OD .



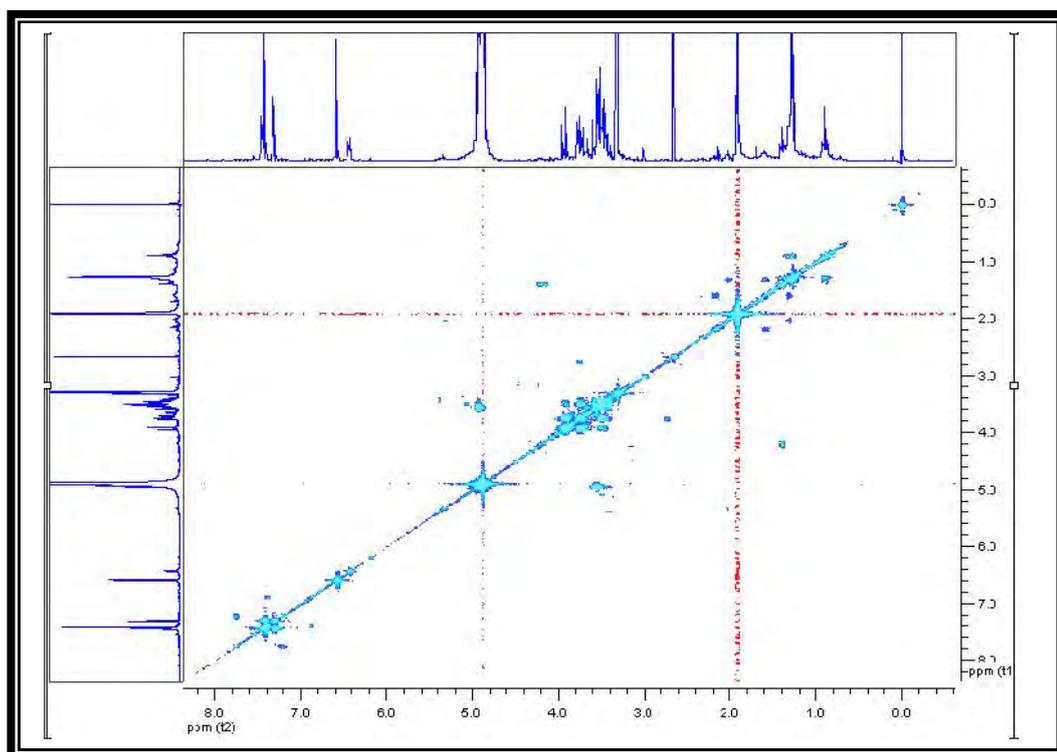
Spectre IV.18: Spectre de RMN ^1H (400 MHz) du composé **AH5** dans CD_3OD (Etalement).



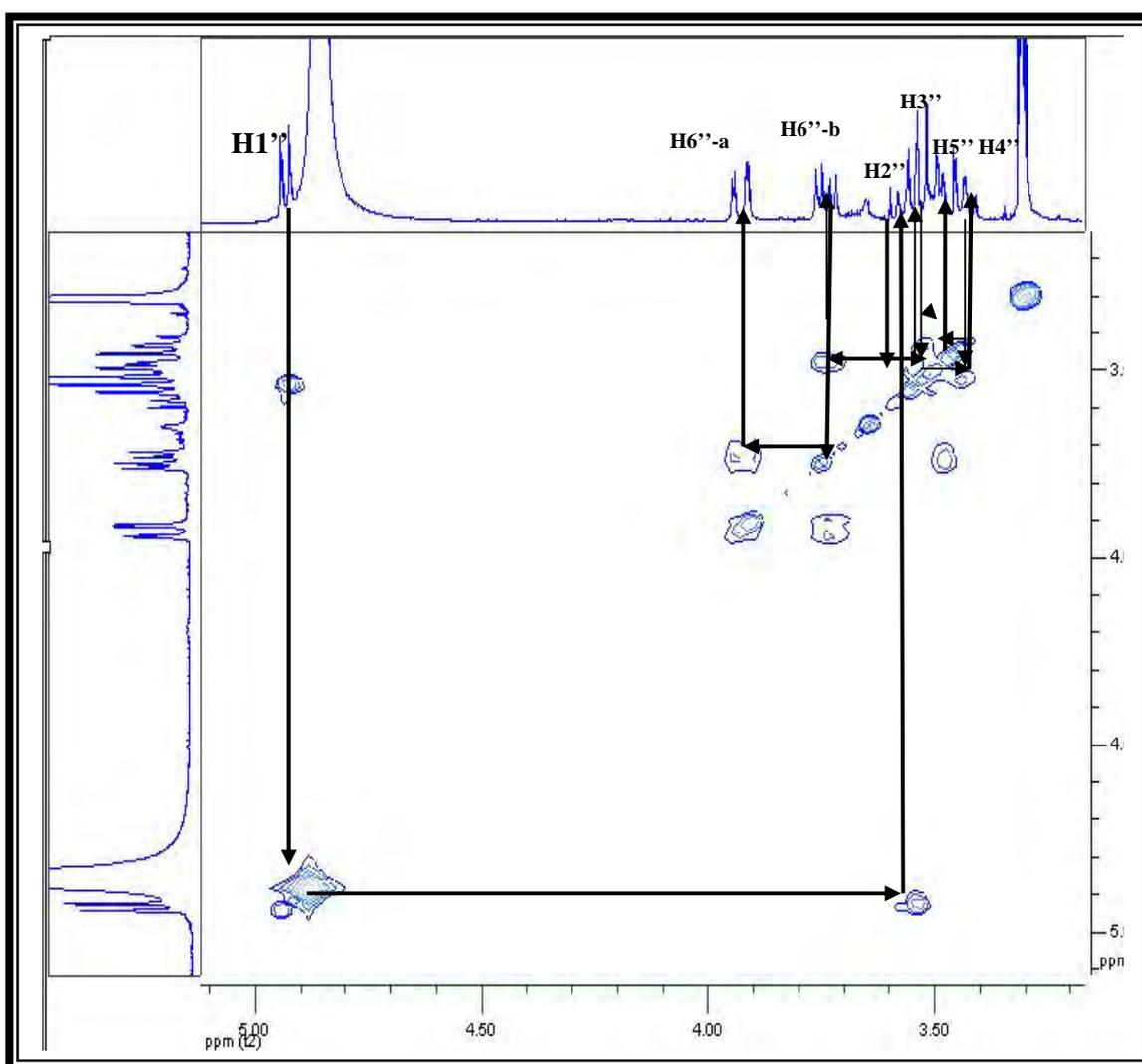
Spectre IV.19: Spectre de RMN ^1H (400 MHz) du composé **AH5** dans CD_3OD (Etalement).

L'examen du spectre COSY (^1H - ^1H) enregistré dans CD_3OD et ses étalements (spectre n° IV.20 et n° IV.21) permet en effet de mettre en évidence:

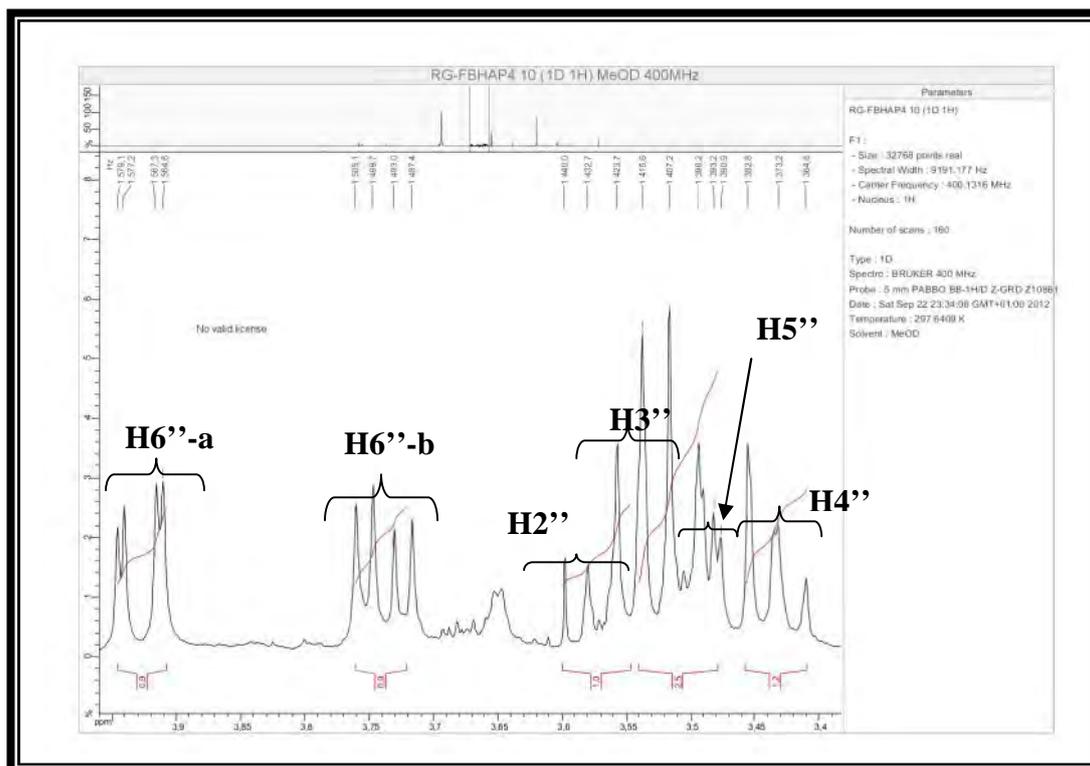
- ❖ la localisation du H-2'' à $\approx 3,57$ ppm sous forme d'un triplet grâce à sa corrélation avec le proton anomérique H-1''.
- ❖ La localisation de H-2'' permet d'attribuer H-3'' au signal sous forme d'un triplet à $\approx 3,52$ ppm.
- ❖ Ce dernier noyau permet par sa corrélation l'attribution de H-4'' à $\approx 3,43$ ppm.
Ce signal apparaissant sous forme d'un triplet ($J = 9,0$ Hz) suppose une orientation axiale pour ce proton. Cette donnée est par conséquent en faveur d'une entité sucre de type glucose.
- ❖ L'attribution de H-4'' permet à son tour de localiser H-5'' sous forme d'un multiplet à $\approx 3,48$ ppm.
- ❖ Ce dernier noyau (H-5'') mène à l'attribution de H-6''b à $\approx 3,75$ ppm sous forme de doublet de doublets ($J = 11,9 ; 5,6$ Hz) et à H-6''a (dd) ($J = 11,8 ; 2,5$ Hz) à $\approx 3,92$ ppm.



Spectre IV.20: Spectre de COSY(^1H - ^1H) du composé AH5 dans CD_3OD .



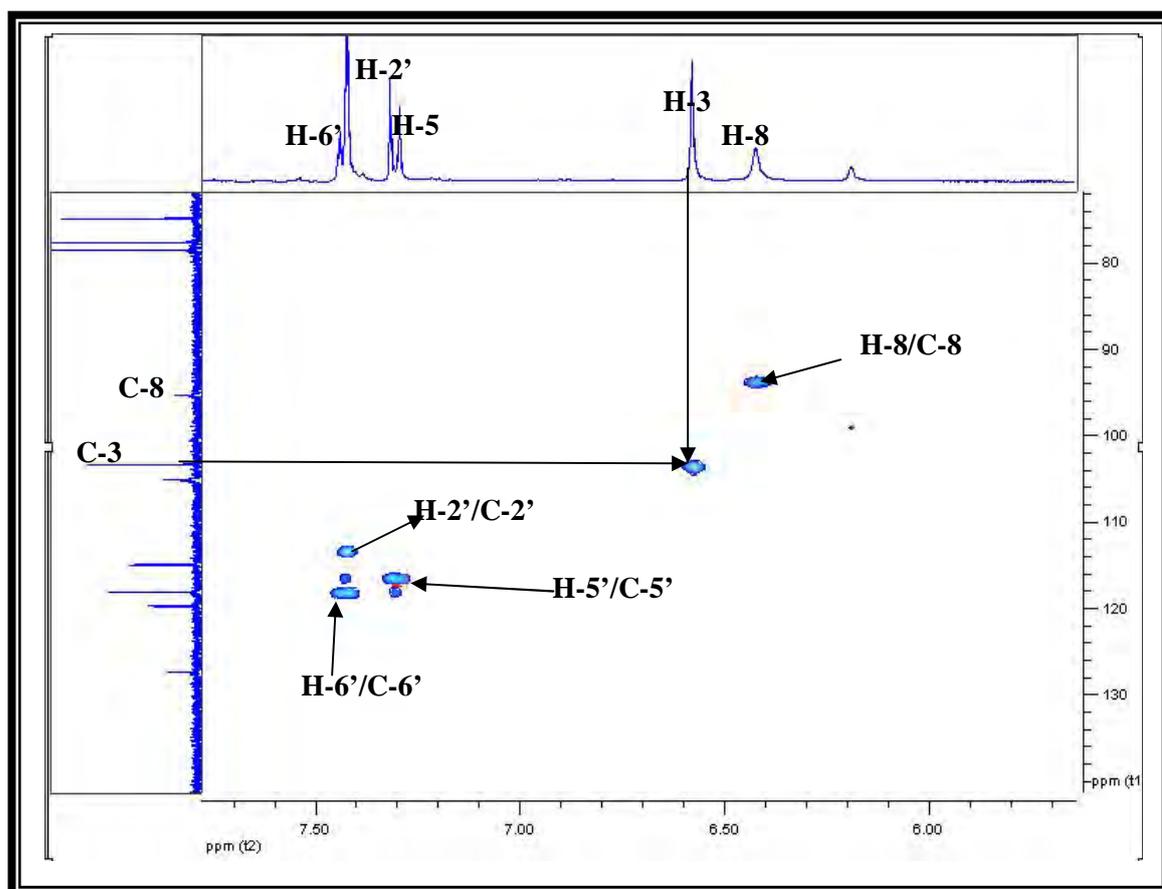
Spectre IV.21: Spectre de COSY(^1H - ^1H) du composé **AH5** dans CD_3OD (étalment) .



Spectre IV.22: Spectre de RMN ^1H (400 MHz) du composé **AH5** dans CD_3OD (Etalement).

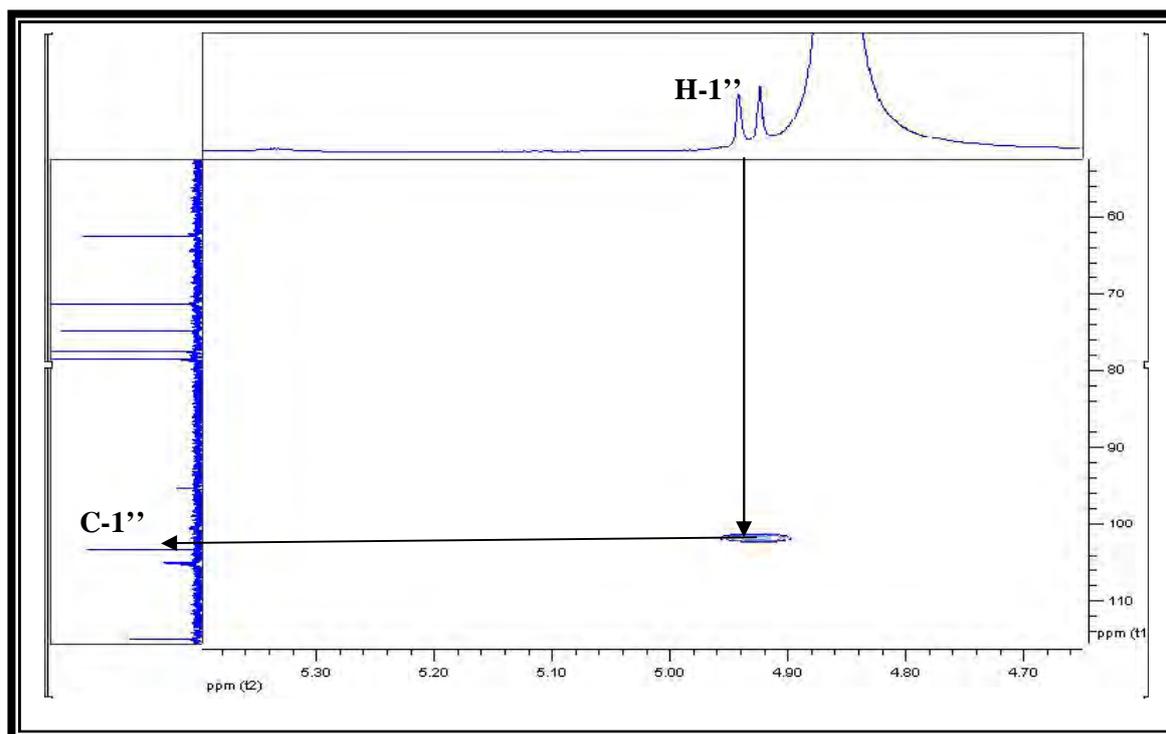
L'examen du spectre HSQC (spectre n° IV.23, IV.24 et n° IV.25) permet d'effectuer les attributions suivantes :

- Une tache de corrélation entre H-6' et un atome de carbone qui ne peut être que C-6' à = 119,73 ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2' et un atome de carbone qui ne peut être que C-2' à = 114,94 ppm.
- Le H-5' permet l'attribution du C-5' à = 118.08 ppm.
- Le H-3 permet l'attribution du C-5' à = 105.07 ppm.
- Une tache de corrélation avec H-6 ou H-8 permet l'attribution de C-6 ou C-8 à = 95,30 ppm, d'après cette valeur du déplacement chimique ce proton ne peut être qu'en C-8 (Sur la base des données de la littérature [1,2]).
- Le même spectre indique les déplacements chimiques des carbones osidiques C-6'' à = 62.48 ppm, C-4'' à = 71.36 ppm, C-2'' à = 74.82 ppm, C-3'' à = 77.58 ppm, C-5'' à = 78.51 ppm et le carbone anomérique C-1'' à = 103.31 ppm.

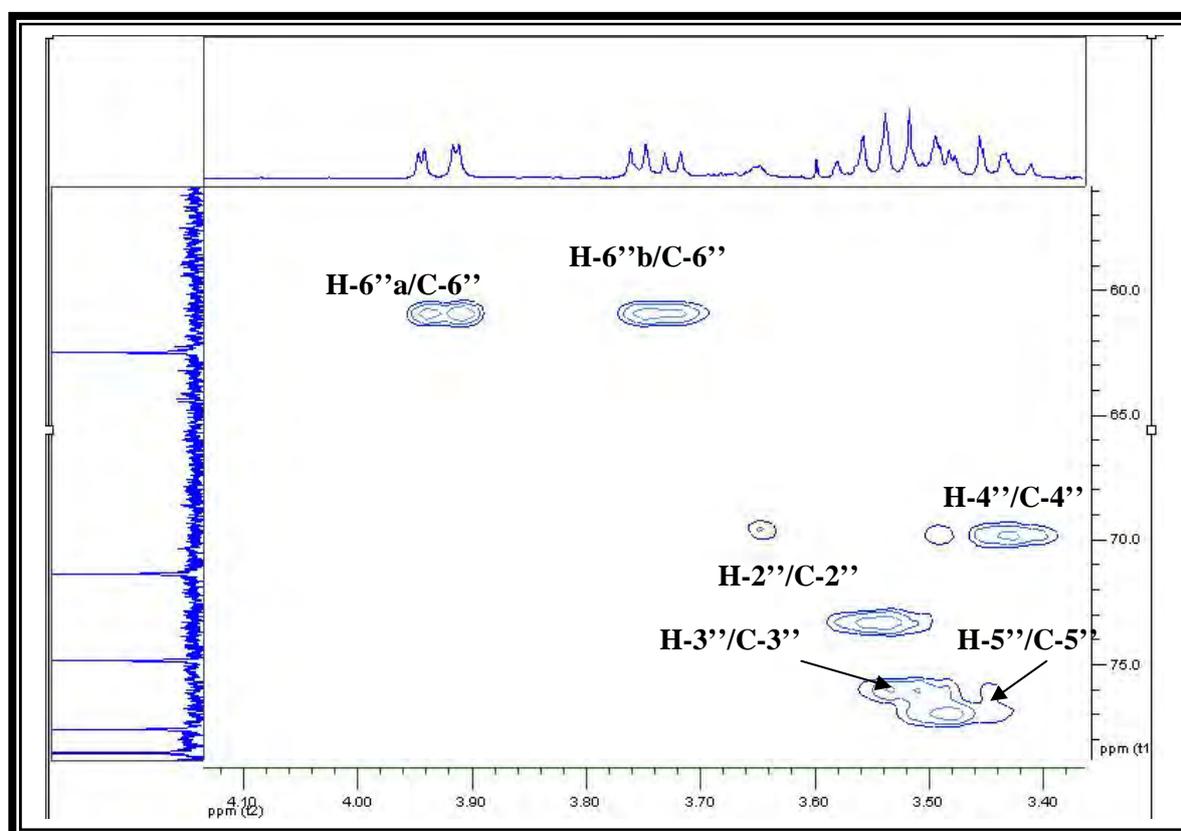


Spectre IV.23: Spectre HSQC (400 MHz) du composé AH5 dans CD₃OD

(Etalement).



Spectre IV.24: Spectre HSQC (400 MHz) du composé **AH5** dans CD_3OD (Etalement).



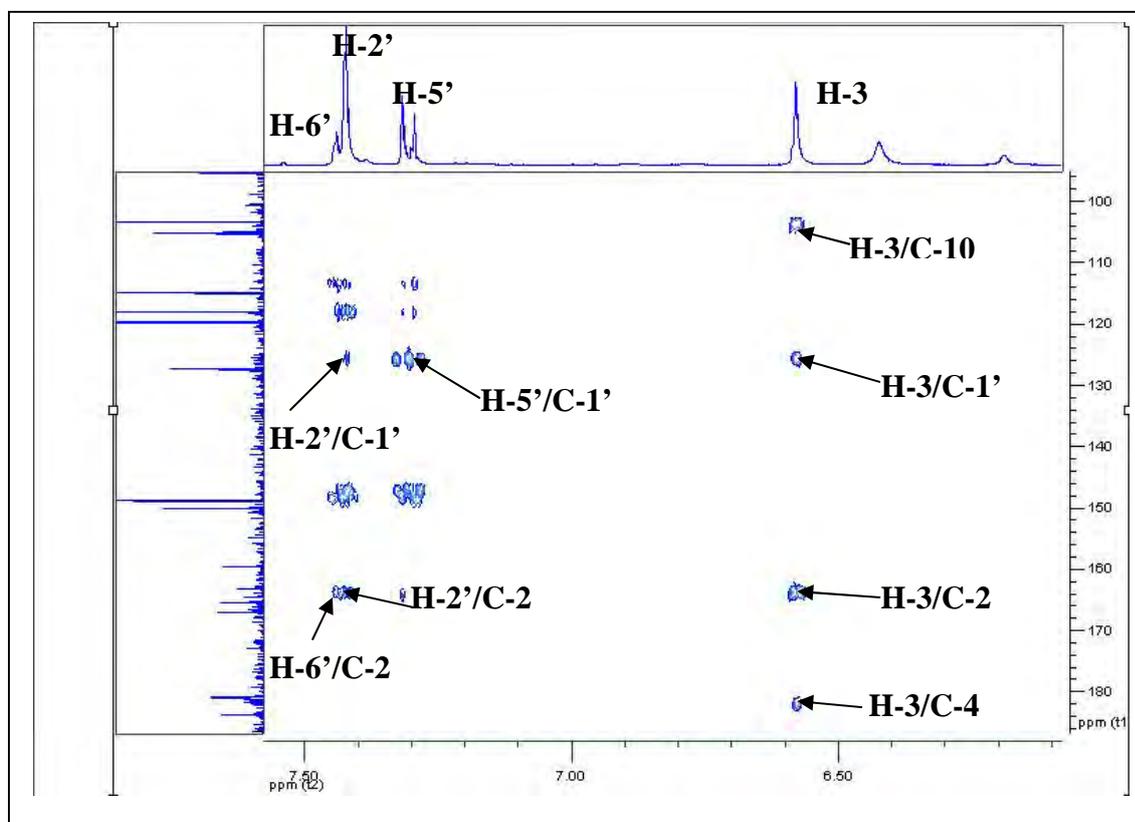
Spectre IV.25: Spectre HSQC (400 MHz) du composé **AH5** dans CD_3OD (Etalement).

Les attributions des carbones restants ont été complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (spectre n° IV.26 n° IV.27) et le spectre carbone 13 (spectre n° IV.29) qui montrent :

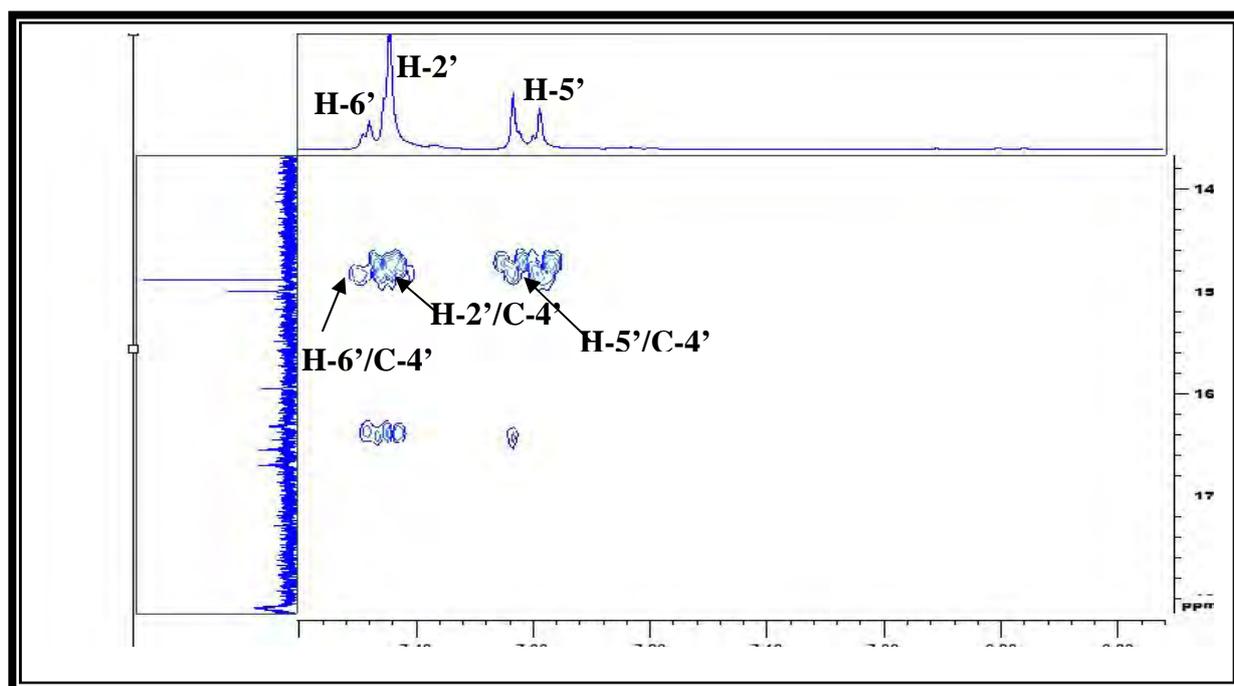
- ✚ C-2 à δ = 163,25 ppm grâce à sa corrélation avec H-2', H-6' et H-3.
- ✚ C-4 à δ = 180,96 ppm grâce à sa corrélation avec H-3.
- ✚ C-10 à δ = 105,27 ppm grâce à sa corrélation avec H-3.
- ✚ C-1' à δ = 127,63 ppm grâce à sa corrélation avec H-2', H-5' et H-3.
- ✚ Trois taches de corrélation entre H-2', H-5' et H-6' et un atome de carbone résonant à δ = 148,84 ppm attribuable à C-4'.

Toujours sur le spectre de l'expérience HMBC (spectre n° IV.28), le proton anomérique du glucose montre une tache de corrélation nette avec le carbone C-4'. La présence de cette corrélation entre le C-4' et le proton anomérique, indique de l'entité sucre est placée en C-4'.

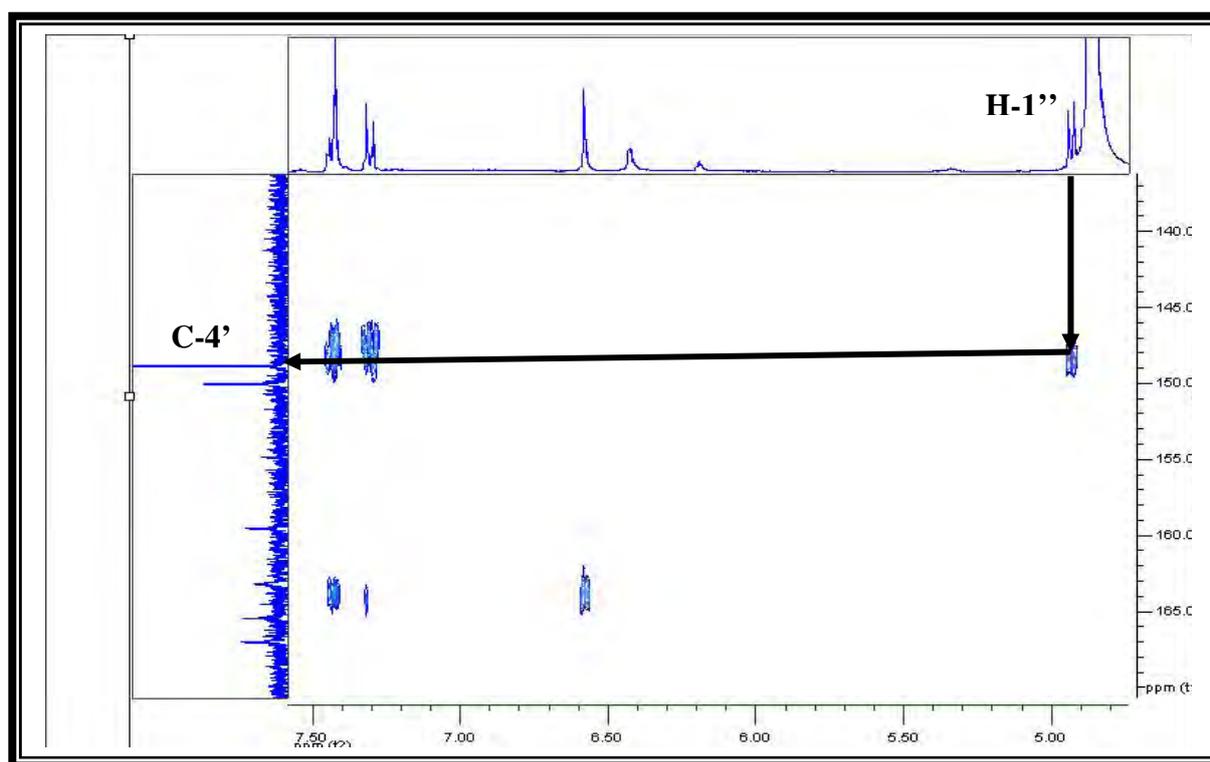
- ✚ Les atomes de carbone restants à 165,44 ; 163,19 ; 159,53 et 150,04 ppm sont attribuables à C-7, C-5, C-9 et C-6 respectivement, ces données sont comparables avec celles se trouvant dans la littérature [1,3].



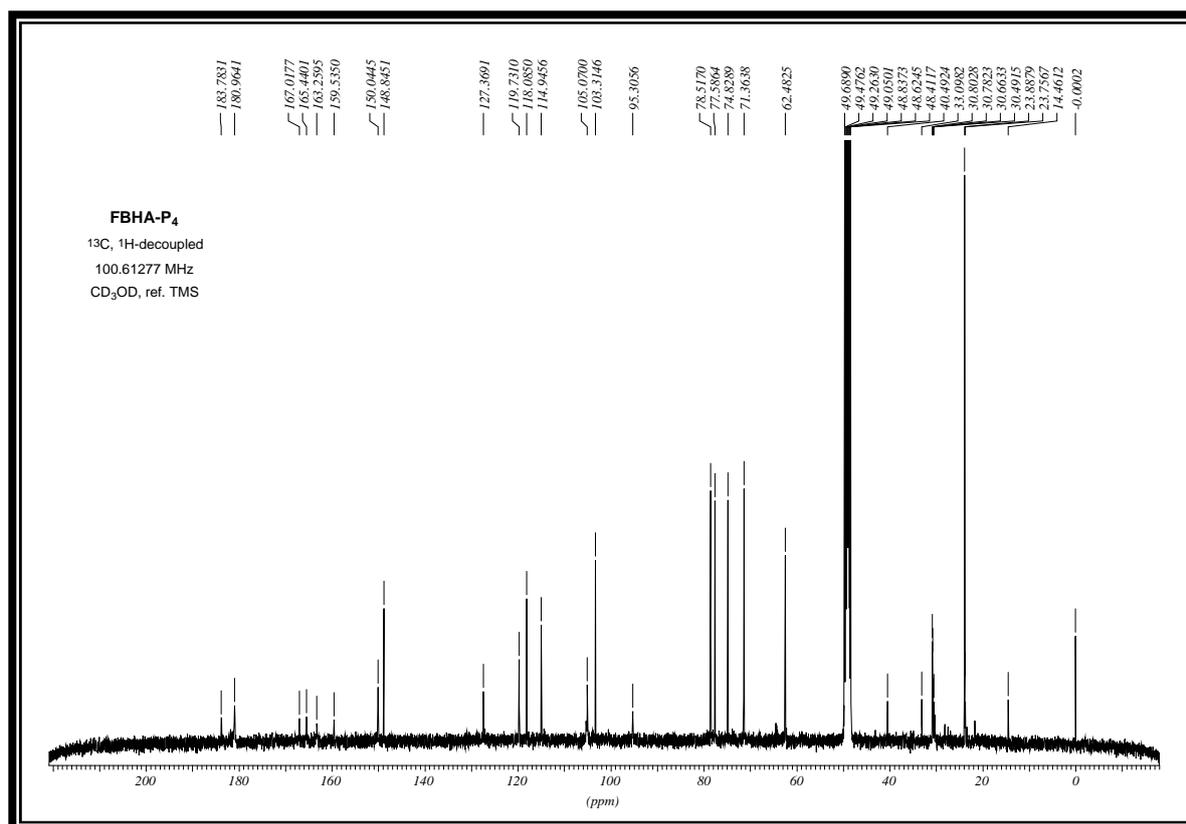
Spectre IV.26: Spectre HMBC (400 MHz) du composé AH5 dans CD₃OD (Etalement).



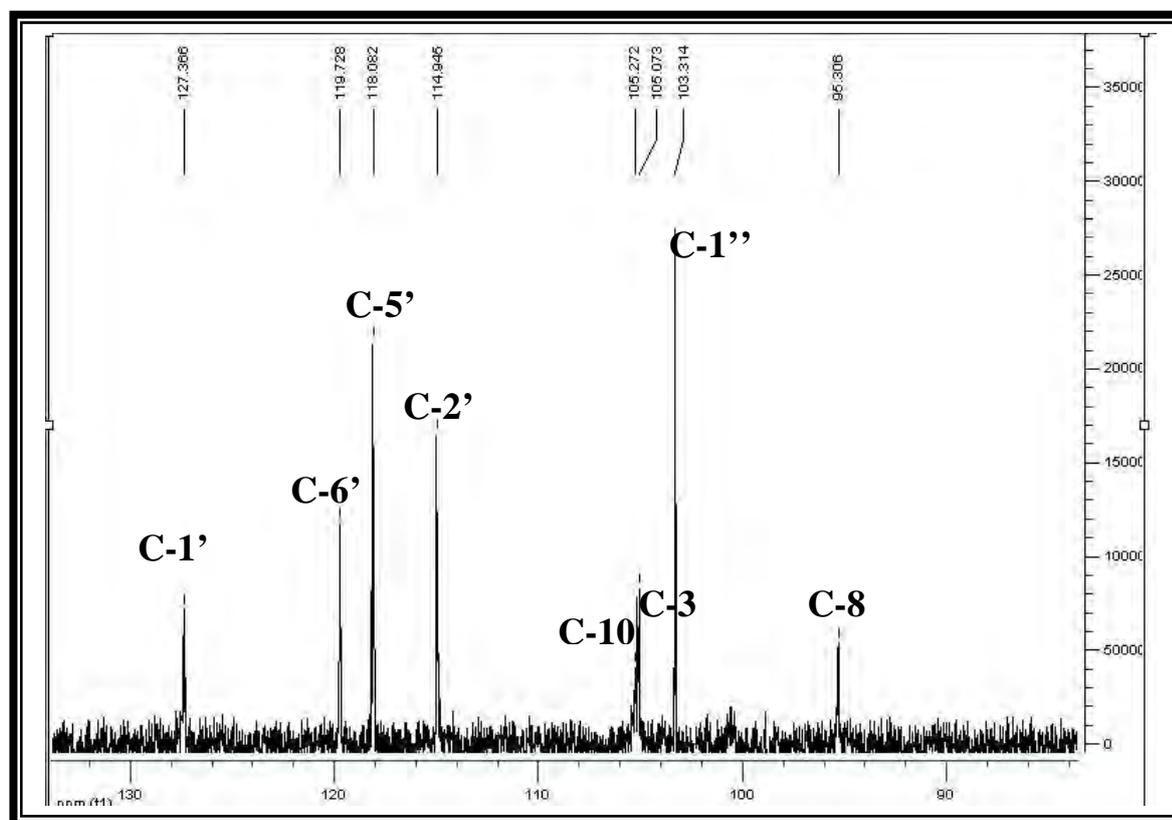
Spectre IV.27: Spectre HMBC (400 MHz) du composé AH5 dans CD₃OD (Etalement).



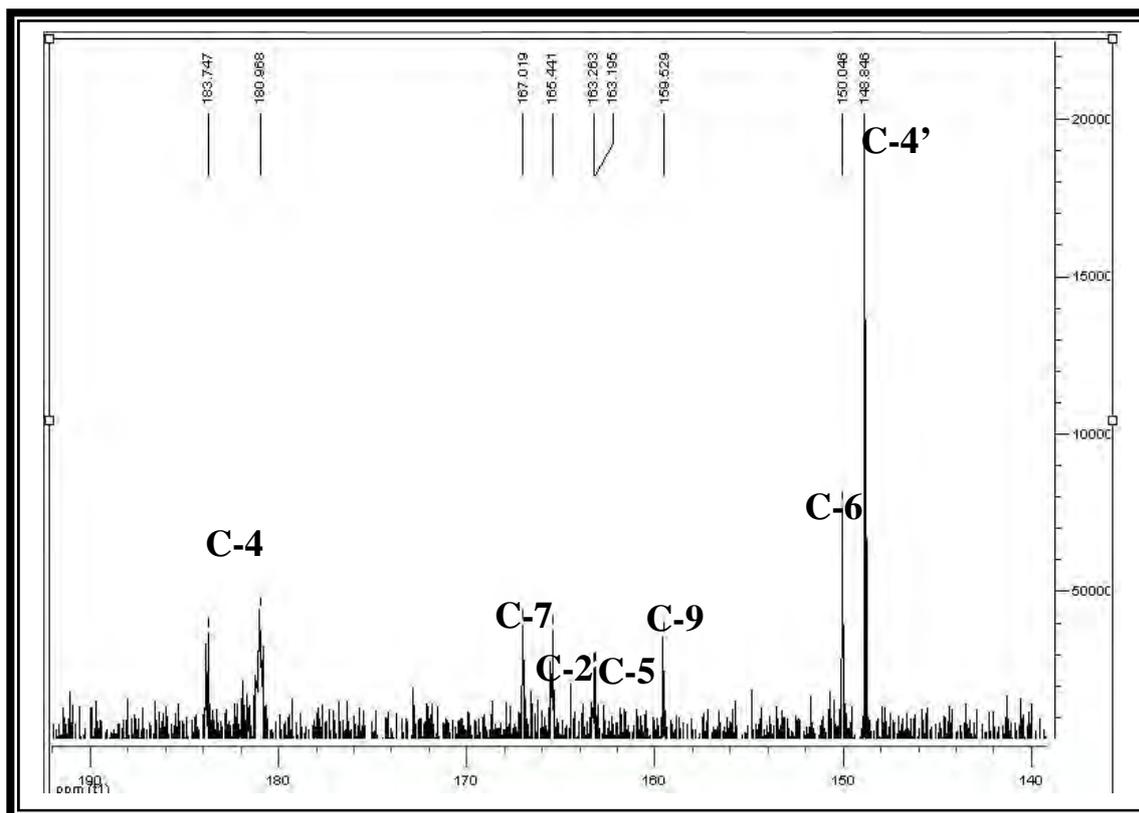
Spectre IV.28: Spectre HMBC (400 MHz) du composé AH5 dans CD₃OD (Etalement).



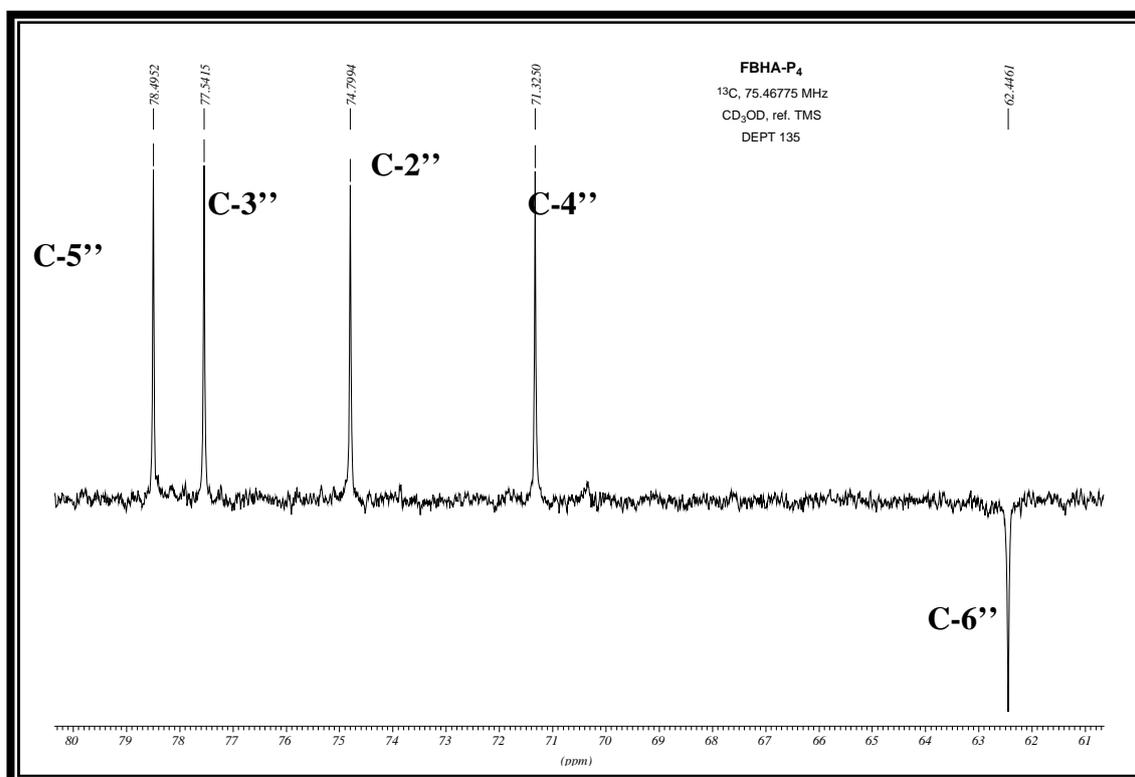
Spectre VI.29: Spectre de RMN ¹³C (100 MHz) du composé AH5 dans CD₃OD .



Spectre VI.30: Spectre de RMN ¹³C (100 MHz) du composé AH5 dans CD₃OD (Etalement).



Spectre VI.31: Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz) du composé AH5 dans CD_3OD (Etalement).



Spectre VI.32: DEPT 135 du composé AH5 dans CD_3OD (Etalement).

Tableau IV.5: Données de la spectrométrie RMN ^{13}C du composé AH5.

interprétation	ul (ppm)
2	163.25
3	105.07
4	180.96
5	163.19
6	150.04
7	165.44
8	95.30
9	159.53
10	105.27
1'	127.36
2'	113.45
3'	
4'	148.84
5'	118.08
6'	119.73
1''	103.31
2''	74.82
3''	77.58
4''	71.36
5''	78.51
6''	62.48

IV.2.3. Hydrolyse acide :

L'hydrolyse acide de ce composé confirme la nature du sucre (figure IV.5).

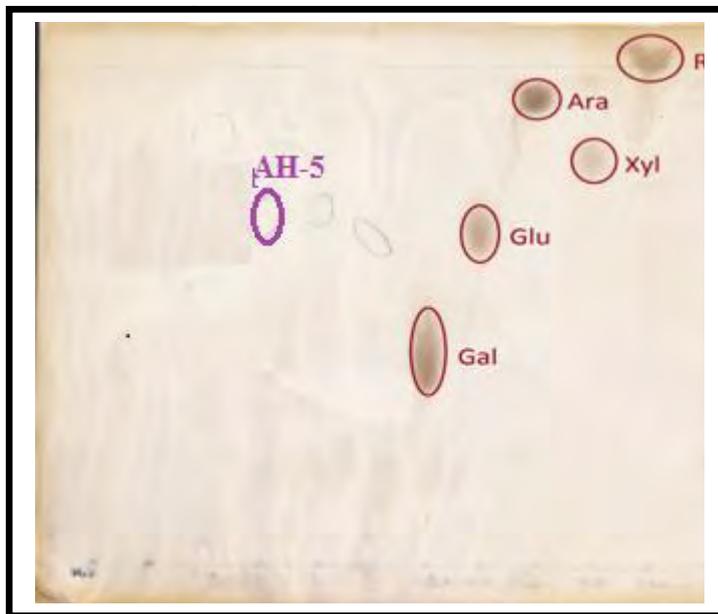


Figure IV.5: Hydrolyse acide du produit AH5.

La structure du composé **AH5** (figure IV.6) a donc pu être établie comme étant le 5, 6, 7,3'-4'-pentahydroxyflavone-4'-O- -D-glucoside.

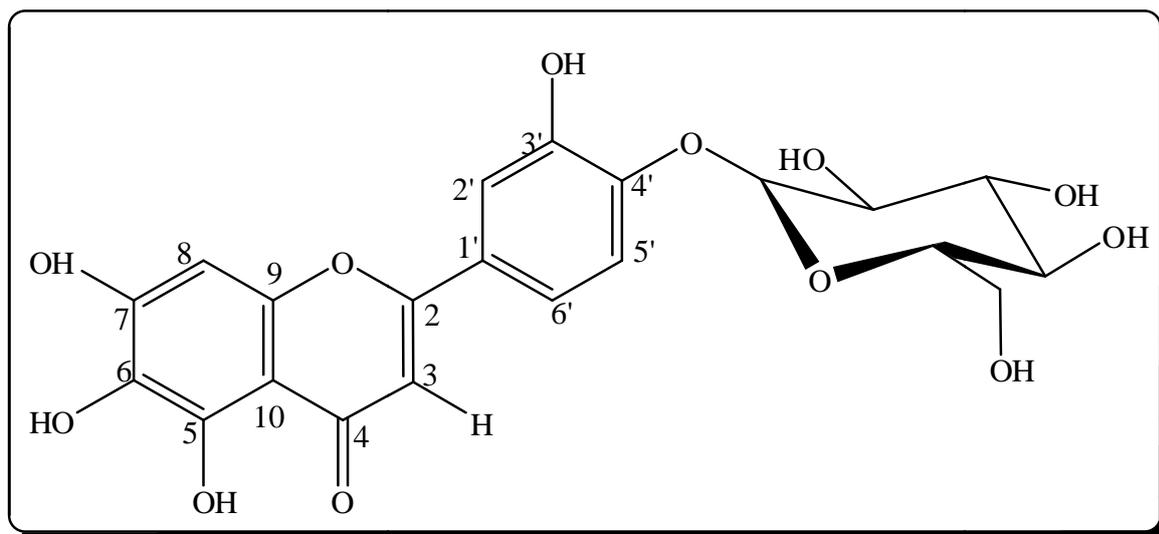


Figure IV.6: Structure du composé AH5

IV.3. Activité antioxydante

IV.3.1 Principe :

Le test présenté dans ce chapitre va nous permettre d'évaluer l'activité antioxydante des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *Matricaria chamomilla*. Le principe est de mesurer leur capacité à inhiber le radical stable 1,1-Diphényl-2-Picryl-Hydrazyl (**DPPH**).

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (**DPPH**) est un radical libre stable de coloration violette foncée et absorbe à 517 nm, lorsqu'il est réduit, en présence des composés anti radicalaires, il change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical **DPPH**, qui est proportionnel au pouvoir antioxydant de l'échantillon.

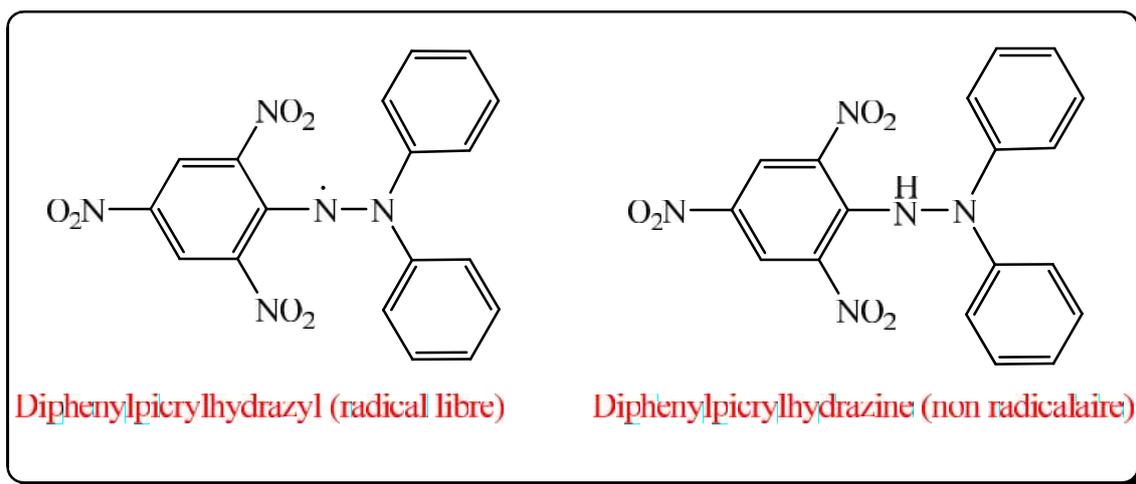


Figure IV. Forme libre et réduite du DPPH.

Généralement, les mesures de l'absorbance du DPPH des différentes substances antioxydantes (nos composés et témoin) permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Abs (CN)} - \text{Abs (ech)}}{\text{Abs (CN)}} \times 100$$

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures.

Les pourcentages d'inhibition ainsi déterminés, nous permettent de calculer la valeur du paramètre IC_{50} (concentration d'inhibiteur) qui représente la concentration de la substance nécessaire pour diminuer 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel.

IV.3.2. Protocole expérimental :

Le protocole utilisé est celui décrit par Barca et al [4].

Le **DPPH** (Mm = **394,33** g/mol) est solubilisé dans du méthanol absolu pour en avoir une solution de concentration connue.

- Les extraits ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu.
- Le blanc de chaque extrait (pour chaque concentration) est préparé par le mélange de deux volumes égaux de solution et de méthanol.
- Le contrôle négatif est préparé par le mélange de deux volumes égaux de **DPPH** et de méthanol.
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard (l'acide ascorbique), préparé par le mélange de deux volumes égaux de **DPPH** et d'acide ascorbique.

Différentes concentrations des extraits préparés dans le méthanol ont été ajoutées à 3ml d'une solution de DPPH après une période d'incubation de 30 min à température ambiante.

La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à **517** nm au spectrophotomètre.

IV.3.3. Résultat de l'activité antioxydante testée par la méthode du DPPH :

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres [5]. Leur intérêt comme antioxydants se manifeste également dans le domaine de la protection contre le stress photo-oxydant cutané induit par l'exposition aux rayons solaires [6].

Cette étude porte sur l'activité antioxydante des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol des parties aériennes de l'espèce *Matricaria chamomilla* par rapport à l'acide ascorbique contrôle positif ($IC_{50} = 5 \mu\text{g} / \text{ml}$).

La Figure IV.7 Présente les résultats du test DPPH réalisé pour les extraits acétate d'éthyle et n-butanol par rapport au témoin l'acide ascorbique. Nous avons observé que les extraits acétate d'éthyle et n-butanol sont capables d'inhiber le radical stable DPPH. Ainsi, il montre que l'extrait acétate d'éthyle présente un bon pouvoir antioxydant comparativement avec celui de l'extrait n-butanol avec des valeurs des $IC_{50} = 11.90 \mu\text{g/ml}$ et $21.23 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Cette activité est due à la richesse de ces extraits en flavonoïdes, ceci suggère un lien entre l'activité antioxydante des extraits testés et leurs constituants chimiques. Ce lien reste conditionner par la structure des flavonoïdes, particulièrement la substitution en groupement hydroxyles des cycles A,B et C dont les flavonoïdes les plus actifs possèdent de 3 à 6 groupements hydroxyles [7]. La présence de groupement hydroxyle en position 3 renforce davantage les propriétés antioxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé [8]. Par ailleurs, la glycosylation réduit leur capacité de piéger les radicaux libres [9].

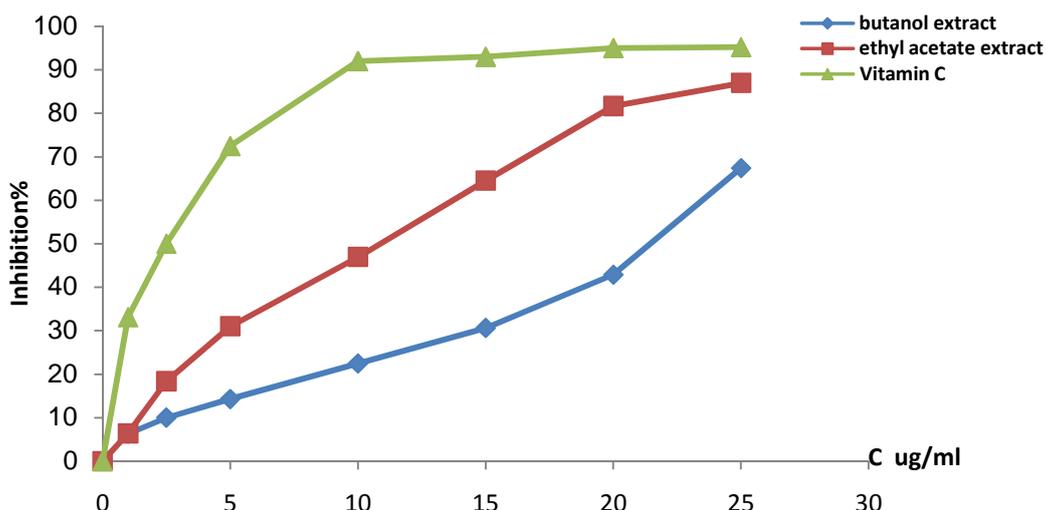


Figure IV.: L'activité antioxydante des extraits acétate d'éthyle et n-butanol et la vitamine C vis-à-vis de radical libre DPPH, chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart type (n = 3).

Pour cette étude, nous avons émis l'hypothèse que les plantes pouvaient être une source potentielle d'antioxydants naturels. Les résultats observés lors des tests antioxydants ont confirmé cette hypothèse.

Conclusion:

Les résultats de l'étude phytochimique de l'espèce *Matricaria chamomilla* ont révélé la richesse de cette dernière en métabolites secondaires de type flavonoïde.

Les établissements de structures ont été effectués par la combinaison des résultats d'études spectroscopiques notamment : la spectroscopie d'absorption UV, la spectrométrie de masse, la RMN ^1H , la RMN ^{13}C et les expériences de RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC). Cette étude a permis d'identifier deux structures. Il s'agit de :

- **Lutéoline-7-O- β -glucoside.**
- **5, 6, 7, 3'-tetrahydroxyflavone-4'-O- -D-glucoside.**

En conclusion, nos observations sur l'activité de piéger les radicaux libres par les extraits de *M.C* viennent confirmer les données bibliographiques et orientent vers la présence d'un type de molécules bien déterminées dans ces extraits, probablement des flavonoïdes.

Enfin, cette étude montre le potentiel scavenger de radicaux libres de la plante médicinale et pourrait être considérée comme une source d'antioxydants naturels.

Références

- [1] P.K.Agrawal, (1989), Carbon-13 NMR of flavonoids. Ed. Elsevier, New –York.
- [2] J.P.Harbone, (1994), The flavonoids-Advances in research since 1986. Ed Chapman &Hall.
- [3] A.Benavides, C.Bassarello, P.Montoro, W.Vilegas, S.Piacente, C.Pizza, (2007), *Phytochemistry*, 1277,1284.
- [4] A. Braca, N.De Tommasi, L.Di Bari, C.PizzaM.,Politi, I. Morelli, (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *Journal of Natural products*, 64,892-895.
- [5] A.Marfak, (2003), thèse de doctorat. Université de limogues, France.
- [6] R.Mekiou, (2004), Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine, Algérie.
- [7] D.tsimogiannis, M.Samiotaki, G.Panayatou, V.Oreopoulou, (2007), *Molecules* 12,593- 606.
- [8] D.Amic, D.Beslo, V.Restija, B.Trinajstic, (2007), *Current medicinal chemistry* 14,827-845.
- [9] J.Hmamouchi, (2002), Thèse de doctorat. Université Mohamed V-Souissi, Maroc.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le but principal de notre travail est d'isoler et d'identifier les métabolites secondaires de type flavonoïdes de l'espèce *Matricaria chamomilla* de la famille Asteraceae.

Cette étude complète les résultats préalables réalisés sur la phase chloroforme de cette espèce.

Après extraction hydroalcoolique des feuilles et des fleurs de cette espèce, concentration et affrontement à l'éther de pétrole, CHCl_3 , AcOEt et *n*-butanol successivement, l'extrait *n*-butanol obtenu a été soumis à la séparation et à la purification par chromatographie sur colonne et sur couches minces de gel de silice. Ce travail a mené à l'obtention de sept produits à l'état pur, parmi lesquels, nous avons pu établir à l'heure actuelle, la structure de deux produits.

- **Lutéoline-7-*O*- β -glucoside.**
- **5, 6, 7,3'4',-tetrahydroxyflavone-4'-*O*-*D*-glucoside.**

Les structures ont été établies par la combinaison des données de RMN ^1H , RMN ^{13}C , des expériences de la RMN bidimensionnelle, de la spectrométrie de masse et de la spectrophotométrie UV-Vis.

Résumé

Le but principal de ce travail est d'isoler et d'identifier les métabolites secondaires de type flavonoïdes de la phase *n*-butanol des parties aériennes de l'espèce *Matricaria chamomilla* appartenant à la famille des composées.

L'attention que nous avons donnée à cette plante est justifiée par le fait qu'elle appartient au genre *Matricaria* dont plusieurs espèces sont utilisées en médecine traditionnelle pour leur activité anti inflammatoire, antibactérienne, anti ulcéreuse, antipyrétique, antispasmodique, contre les douleurs gastriques, contre les contractions utérines....

Cette étude porte essentiellement sur l'investigation phytochimique de la phase *n*-butanol de l'extrait hydroalcoolique des feuilles et des fleurs de *Matricaria chamomilla*. Cette contribution a permis l'isolement de sept produits à l'état pur, parmi lesquels, nous avons pu établir à l'heure actuelle, la structure de deux produits.

- **Lutéoline-7-*O*- β -glucoside.**
- **5, 6, 7,3',4'-pentahydroxyflavone-4'-*O*-*D*-glucoside.**

La détermination structurale des composés isolés est basée sur l'utilisation combinée des différentes techniques spectroscopiques, telles que l'ultraviolet, RMN¹H, RMN ¹³C, des expériences de la RMN bidimensionnelle (COSY, HSQC, HMBC), et la spectrométrie de masse.

Il est important de signaler que le 5, 6, 7, 3',4'-pentahydroxyflavone-4'-*O*-*D*-glucoside est nouvelle et n'a jamais été décrite auparavant.

Mots clés :

Flavonoïdes, *Matricaria chamomilla*, Composées

Abstract

The main purpose in this work was, the isolation and the structural détermination of the secondary metabolites of the flavonoids type from the *n*-butanol phase of the aerial parts of *Matricaria chamomilla* species belonging to the Asteraceae family.

Our choice for this species is justified by the fact that several species of the genus *Matricaria* are used in folk medicine for their anti-inflammatory, anti-bacterial, anti-ulcerative, antipyretic, antispasmodic activities, for treatment of gastrointestinal disorders and against uterine shrinkages...

This study relates to the phytochemical investigation of the *n*-butanol phase of the aqueous-alcoholic extracts of the leaves and the flowers of *Matricaria chamomilla*. This contribution led to the isolation of seven products in the pure state, from which, we have established the structure of two products.

- **Luteolin-7-*O*- β -glucoside.**
- **5, 6, 7, 3', 4'-pentahydroxyflavone-4'-*O*- β -D-glucoside.**

The isolation and structure détermination of isolated compounds were based on the different spectroscopic techniques such as ultraviolet, ¹H NMR, ¹³C NMR, 2D NMR experiments (COSY, HSQC, HMBC) and mass spectrometry.

It is important to note, that 5, 6, 7, 3', 4'-pentahydroxyflavone-4'-*O*- β -D-glucoside is new and then, was not described elsewhere.

Key words:

flavonoids, *Matricaria chamomilla*, Asteraceae

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو ، فصل وتحديد نواتج الأيض الثانوي خاصة المركبات الفلافونيد، للطور البيثانولي لأجزاء الهوائية للنوع *Matricaria Chamomilla* من العائلة المركبة.

اختيارنا لهذا النوع يرجع إلى كون العديد من أنواع جنس *Matricaria* لفعاليتها المضادة للالتهاب المضادة للبكتيريا و القرحة المعدية وتقليل التشنجات

.....

هذه الدراسة تعتمد التحليل الفيتو كيميائي للطور البيثانولي من المستخلص الكحولي أزهار. هذه الدراسة من فصل سبعة مركبات في حالتها النقية تحديد بنية مركبين هما

- **Lutéoline-7-O- β -glucoside.**
- **5, 6, 7,3',4'-pentahydroxyflavone-4'-O- -D-glucoside.**

التقنيات الطيفية

التحليل البنوي لهذه المركبات تم اعتمادا على

ي البعد بالإضافة إلى مطيافية الكتلة.

البنفسجية، الرنين النووي المغناطيسي

من الجدير بالإشارة أن 5, 6, 7, 3',4'-pentahydroxyflavone-4'-O- -D-glucoside جديد و لم يسبق التعرف عليه مسبقا.

الكلمات المفتاحية

ركبة، الفلافونيدية *Matricaria Chamomilla*