

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

CENTRE UNIVERSITAIRE LARBI BEN M'HIDI OUM EL BOUAGHI

INSTITUT DES SCIENCES EXACTES



N° de Série:

Mag. / ch. / 0063
1^{er} ~~Exp. ch. 63 64~~

**ISOLATION ET IDENTIFICATION DE QUELQUES
COMPOSES FLAVONIQUES DE LA PLANTE
*TEUCRIUM POLIUM L. (LABIATAE)***

Mémoire Présenté Pour L'obtention Du Diplôme De Magister
Spécialité : Chimie

Option : Chimie Organique Industrielle

Présenté par : Abdelmoumene Medfouni

Devant le jury composé de :

Malek R.Y. AL-Hillo	Pr.	C.U. d'Oum El Bouaghi	Président
Kaddour Lamara	M.C.	C.U. d'Oum El Bouaghi	Rapporteur
Mustapha Bouhenguel	M.C.	C.U. d'Oum El Bouaghi	Examineur
Smaïl Khelili	C.C.	C.U. de Jijel	Examineur

Date de Soutenance : 26 /06/ 2002

06/A 47

Dédicaces

*A ma chère mère, ma lune dans les nuits, mon
bonheur
et ma joie qui s'est sacrifiée pour me donner
l'espoir
dans la vie.*

A mon père.

A mes frères, à mes sœurs.

A mes amis.

***Abdelmoumene
Medfouni***



Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements ainsi que ma profonde gratitude à mon directeur de thèse Monsieur : **Lamara Kaddour** Maître de Conférence et Chef de Département de Chimie à l'Institut des Sciences Exactes au Centre Universitaire Larbi Ben M'hidi d'Oum El Bouaghi, pour son concours pour la réalisation de ce travail.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à **Madame F. Benayache**, et **Monsieur S. Benayache** pour leur aide précieuse.

Je remercie **Monsieur A. H. MENAI**, **Monsieur M. BELAIDI** et **M^{elle} S. BELAIDI** pour leur accueil au sein du laboratoire de Chimie Industrielle et pour leur aide à la réalisation des spectres UV-Visible.

Je remercie vivement **Monsieur Touil Ahmed** chargé de cours à la Faculté des Sciences, Université de Constantine pour ses conseils précieux et son aide précieuse à la réalisation des spectres UV-Visible.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué à des titres divers à la réalisation de cette thèse.



**Abdelmoumene
Medfouni**

TABLE DES MATIERES

Introduction Générale	1
CHAPITRE I : Les flavonoïdes	
I.1- Généralités	3
I.2- Classification des flavonoïdes	4
I.3- La substitution du squelette flavonique	6
I.3.1- L'hydroxylation	6
I.3.2- La O-substitution	7
I.3.3- La C-substitution	8
I.4- Biosynthèse des flavonoïdes	10
I.5- Intérêts des flavonoïdes	13
I.5.1- Intérêts thérapeutiques	13
I.5.2- Intérêts biologiques	15
I.5.3- Intérêts économiques	15
CHAPITRE II : Méthodes d'analyses structurales des flavonoïdes	
II.1- Méthodes d'analyses structurales	16
II.1.1- Fluorescence sous lumière UV	16
II.1.2- Spectrométrie UV-visible	17
II.1.2.1- Absorption en milieu méthanolique neutre	17
II.1.2.2- Absorption en présence de réactifs	18
a- Hydroxyde de sodium - NaOH	18
b- Chlorure d'aluminium- AlCl ₃	19
c- Chlorure d'aluminium + acide chloridrique-AlCl ₃ + HCl	19
d- L'acétate de sodium- NaOAc	19
e- L'acétate de sodium+l'acide borique- NaOAc + H ₃ BO ₃	21
II.1.3-La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	22
a- La résonance magnétique nucléaire du proton ¹ H NMR	22
a.1- Les protons de la partie osidique (sucre)	26
a.1.1- Type de liaison	26
a.1.2- Séquence des sucres	27
a.1.3- Position du sucre	27
a.1.4- La C- glycosylation	27

b- La résonance magnétique nucléaire du carbone ¹³ C NMR	28
b.1- Identification de la O-sucre liaison des flavonoïdes	29
b.2- Identification de la C-sucre liaison des flavonoïdes	29
b.3- Séquence des sucres	29
b.4- Identification des aglycones	30
II.1.4- La spectrométrie de masse (SM)	30
a- Spectrométrie de masse à impact électronique (EI)	31
a.1- EI-MS des aglycones	31
a.1.1- EI-MS des aglycones de flavones	31
a.1.2- EI-MS des aglycones de flavonols	33
a.2- EI- MS des glycosides	35
a.2.1- Flavonoïdes O-glycosylés	35
a.2.1.1- EI- MS des O-glycosides libres	35
a.2.1.2- EI- MS des O-glycosides perméthylés	35
a.2.2- Flavonoïdes C-glycosylés	36
a.2.2.1- EI- MS des C-glycosides libres	36
a.2.2.2- EI- MS des C-glycosides perméthylés	36
b- Spectrométrie de masse à bombardement atomique rapide (FAB)	37

Chapitre III: Matériel végétale et méthodes expérimentales

III.1- Rappel botanique	39
III.1.1- Description	39
III.1.2- Répartition géographique	39
III.1.3- Systématique de la plante	39
III.2- Etude chimique	40
III.2.1- Matériel végétal	40
III.2.2- Tests chimiques d'identifications	40
III.2.2.1- Résultat des Tests chimiques d'identifications	42
III.2.2.2- Extraction	42
III.3- Séparation et purification	45
III.3.1- Chromatographie analytique sur couches minces	45
III.3.2- Chromatographie sur couches minces	45
III.3.2.1 - Préparation des plaques	45
III.3.2.2- Séparation de l'extrait brut	45
III.3.3- Chromatographie sur colonne	46
III.3.3.1- Séparation et purification par chromatographie sur colonne	46

III.3.4- Chromatographie sur papier	46
III.3.4.1- Séparation et purification par chromatographie sur papier	47
CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS	
IV.1- Etude structurale des composés flavoniques de la plante <i>Teurium Polium L.</i>	49
IV.1.1- Méthodes Chromatographiques	49
IV.1.2- Méthodes Spectrométriques	49
IV.2- Etude structurale du composés A	50
IV.2.1- Comportement Chromatographique	50
IV.2.2- Comportement Spectrométrique	50
IV.3- Etude structurale du composés B	51
IV.3.1- Comportement Chromatographique	51
IV.3.2- Comportement Spectrométrique	51
CONCLUSION GENERALE	55
BIBLIOGRAPHIE	56

RÉSUMÉ

RESUME

Les flavonoïdes sont l'une des plus grandes classes des produits naturels synthétisés par les plantes, ils ont été choisis pour leur stabilité chimique qui facilite leur stockage, leur dosage et leur identification. Les flavonoïdes sont présents dans la famille des labiées et particulièrement dans le genre *Teucrium*.

Notre choix s'est porté sur l'étude de l'espèce *Polium L.*, cette dernière n'a fait l'objet d'aucune étude en Algérie.

Pour l'extraction des composés flavoniques, on a suivi le protocole expérimental classique, dont les principales étapes consistent en la macération du produit végétal en poudre dans un mélange de solvant méthanol-eau (V/V : 70/30), puis à des extractions successives de la phase aqueuse par l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

La séparation et la purification sont réalisées par des méthodes chromatographiques tels que :

- Chromatographie sur couches minces de silica-gel : Kieselgel 60 G
- Chromatographie sur colonne de silica-gel : Kieselgel 40
- Chromatographie sur papier Wathman n° 3

L'identification des composés isolés est faite par :

- UV- fluorescence
- Spectrométrie UV- visible, avec des réactifs spécifiques.

Nos travaux de recherches sur l'espèce *Polium L.* ont abouti à l'isolement de deux composés flavoniques purs, l'un deux est le Cirsiol.

Mots-clés : Flavonoïdes ; *Teucrium Polium L.* ; Labiées ; Chromatographie ; UV-fluorescence ; Spectres UV-visible, RMN et masse.

ABSTRACT

ABSTRACT

Flavonoids are one of the most important classes of natural products synthesized by plants. They are chosen for their chemical stability, that facilitate their store, their dosage and their identification. Flavonoids are present in *Labiatae* family and particularly in *Teucrium* genus.

Our research project was focused on the studies of *Polium L.* species, which has never been studied in Algeria.

To extract flavonic compounds, we have followed the classical experimental procedure, which including the maceration of powdered plant in aqueous methanol (70 : 30 in volume), followed by a successive extractions of the aqueous layer with ethyl acetate and *n*-butanol.

The separation and purification of flavonoids were carried out by chromatographic methods such as :

- Thin layer chromatography of silica gel (Kieselgel 60 G).
- Column chromatography of silica gel (Kieselgel 40).
- Paper chromatography using Wathman paper n° 3.

The identification of isolated compounds was established by spectrometry methods such as :

- UV-fluorescence.
- Spectrometry UV-Visible with the use of specific reagents.

Our research work on *Polium L.* species permit us to isolate tow flavonic compounds, one of than is Cirsiliol.

Key-Words: Flavonoids; *Teucrium Polium L.*; *Labiatae*; Chromatography; UV-visible, NMR and mass spectra.

Introduction Générale

Introduction générale

Introduction générale :

Depuis l'antiquité, l'homme est attiré, voir fasciné par la couleur verte des plantes, ainsi que par les différentes couleurs des fleurs, des fruits, du monde végétal qui l'entoure. La plupart des couleurs présentes dans les plantes ; jaune, bleue, rouge, violet et même noire rencontrées dans les fleurs et les fruits sont dues à la présence d'un type ou d'un autre de flavonoïdes.

Aujourd'hui, beaucoup de produits pharmaceutiques proviennent du règne végétal, bien que l'homme a appris la manière d'utilisation des plantes depuis longtemps, sous l'expression de bonnes herbes et en particulier celles appartenant au groupe aromatique et médicinal.

L'histoire de la médecine traditionnelle est très ancienne aussi bien que la civilisation humaine. Des préparations pharmaceutiques étaient prescrites par les Egyptiens 1550 ans avant J-C. Dans la médecine chinoise, de grandes variétés de plantes ont été utilisées, en particulier dans les préparations pharmaceutiques complexes.

DIOSCORIDES physicien grec, a décrit 600 plantes connues pour leurs propriétés médicinales dans son livre « De Metereo Medica ».

Les physiciens arabes ont une contribution notable et significative. *AVICENNA* (Cheikh Bu Ali Sina, 980-1037) est célèbre pour son imminent ouvrage « La loi Dans La médecine».

RHAZES (Abu Baker Mohamed Bin Zakaria) est connu pour ses 250 ouvrages dans son livre « L'histoire De La médecine ».

La plante, sujet de notre étude appartient au genre *Teucrium* dont le nom générique est probablement dérivé de Teucer, prince de Troie, qui est censé avoir découvert les vertues médicinales de ce type de plante ¹.

Les plantes du genre *Teucrium* ont été utilisées en médecine traditionnelle sous forme de décoction et d'infusion pour le traitement de plusieurs maladies, telles que l'hépatite, la toux, les maladies des voies urinaires, la bronchite chronique, elles sont aussi réputées pour leurs effets anti-inflammatoires, anti-bactérien et anti-spasmodique. Tous les *Teucriums* sont amers, aromatiques, excitants et toniques ¹.

Introduction générale

Le genre du *Teucrium* appartient à la famille des *labiées* (*lamiacées*) dont le nom est donné par les premiers botanistes (du mot latin *Labium* : Lèvre). Les *labiées* sont chimiquement riches en composés terpéniques (huiles essentielles, diterpènes, triterpènes) et en flavonoïdes. Cette famille contient plus de 3000 espèces de plantes herbacées et de sous arbrisseaux répartis dans le monde entier et plus abondant dans la région méditerranéenne ².

Le genre *Teucrium* est l'un des plus riche en espèces, il compte plus de 300 espèces dont une vingtaine sont spontanées en Algérie, surtout dans la région de Tell ³, en Europe, on connaît 49 espèces ⁴. L'étude des flavonoïdes du genre *Teucrium* des espèces européennes a été faite essentiellement par Barberan F.A.T et Harborne J.B ⁴.

Les flavonoïdes étant d'une part une des plus grandes classes des produits naturels synthétisés par la plante et d'autre part connus pour leurs importances pharmaceutiques, économiques et en agriculture.

Du fait que l'espèce *Teucrium Polium L.* n'a fait l'objet d'aucune étude en Algérie, le but de cette recherche est consacré à l'isolation et la détermination (identification) des structures flavoniques contenues dans cette espèce. L'étude comprendra des généralités sur les flavonoïdes, les méthodes de leur séparation, les techniques de leur analyse structurale et enfin leur identification.

Premier Chapitre :

Les flavonoïdes

I.1- Généralités :

Les flavonoïdes, au sens strict, sont des pigments jaunes, le nom flavonoïde est dérivé du mot Grec « FLAVUS » qui veut dire jaune. Ce sont généralement des substances colorées très répandues dans les végétaux à l'exception des algues, ils sont surtout abondants dans les plantes supérieures, particulièrement dans certaines familles : Polyonacées, Rutacées, Légumineuses, Ombellifères et Composées^{5, 6}. Mais ils peuvent également se trouver dans le règne animal : les glandes à sécrétion odoriférante du castor, propolis (sécrétion d'abeille) et dans les ailes des papillons⁷.

Ces substances issues du métabolisme secondaire, et leur accumulation dans la plante est en quantités extrêmement faibles (leur concentration dans les cellules de la plante ne dépasse pas souvent 1 millimoles)⁸.

Pratiquement, les flavonoïdes se trouvent dans toutes les parties de la plante et leur teneur est maximale dans les organes jeunes (feuilles et bouton floraux)⁵.

Les flavonoïdes peuvent être divisés en trois groupes :

- Les aglycones lipophiliques libres dont la majorité sont des flavones, les flavonols sont rares.
- Les flavonoïdes glycosidiques qui sont généralement des flavones glycosylées en position 7 ou des flavonols plutôt glycosylés en position 3, les hétérosides C- glycosylés sont rares chez les *labiées*.
- Les anthocyanins qui sont identifiés dans la plus part des espèces de cette famille.

Les flavonoïdes sont caractérisés par une structure commune en C₆ – C₃ – C₆, dans laquelle deux cycles benzéniques A et B sont réunis par une chaîne de trois carbones (Fig.1); selon le degré d'oxydation de cette chaîne, on distingue un grand nombre de squelettes flavonoïques.

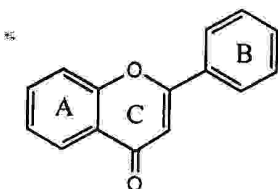
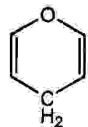


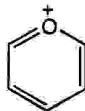
Fig.1 : Phenyl-2 chromone

I.2- Classification des flavonoïdes :

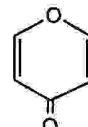
La structure des différents types de flavonoïdes varie selon la nature de l'hétérocycle oxygéné, cet hétérocycle est dérivé soit des formules du pyrane (1), du pyrylium (2) soit de celle de γ -pyrane (3).



(1) Pyrane

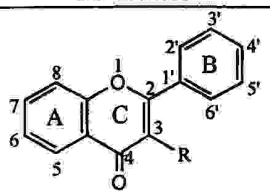
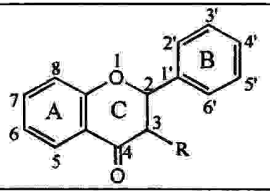
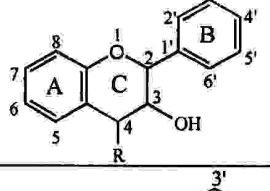
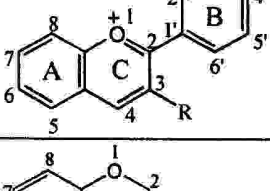
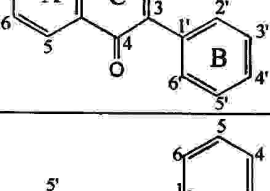
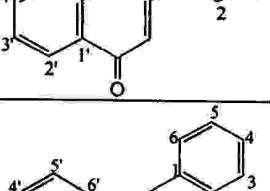
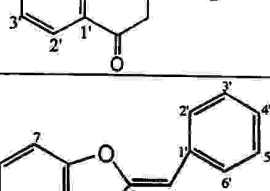
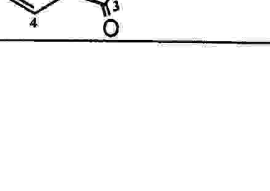


(2) Pyrylium

(3) γ -Pyrane

Les flavonoïdes se divisent en plusieurs classes selon le niveau d'oxydation du cycle central C_3 , tableau -I⁹.

Tableau-I : Les différentes classes des flavonoïdes

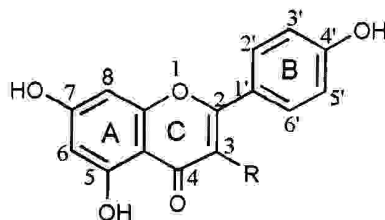
Différentes classes		Principales substances	
Structure	Nom de famille	Hydroxylation	Nom
	R=H FLAVONE	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Apeginine Luteoline
	R=OH FLAVONOL	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Kaempferol Quercetine
	R=H FLAVANONE (Dihydroflavone)	5, 7, 4' 7, 3', 4'	Naringenine Butine
	R=OH FLAVANONOL (Dihydroflavonol)	7, 3', 4' 5, 7, 3', 4'	Fustine Taxifoline
	R=H CATECHINE (Flavanol-3)	5, 7, 3', 4', 5' 5, 7, 3', 4'	Gallocatechine Catechine
	R=OH LEUCOANTHOCYANIDINE (Flavandiol-3, 4)	5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4', 5'	Leucocyanidine Leucodelphinidine
	R=H FLAVYLIUM (Anthocyane)	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Apigenidine Luteolidine
	R=OH ANTHOCYANIDINE	5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4', 5'	Cyanidine Delphinidine
	ISOFLAVONE	7, 4' 5, 7, 3', 4'	Daidzein Orobol
	CHALCONE	2', 4', 3, 4 2', 3', 4', 3, 4	Buteine Okanine
	DIHYDROCHALCONE	4, 2', 4', 6' 3, 4, 2', 4', 6'	Phloretine Hydroxyphloretine
	AURONE	6, 3', 4' 6, 7, 3', 4'	Sulphuretine Maritimetine

I.3- La substitution du squelette flavonique :

Les différents processus de substitution intervenant dans l'élaboration du squelette flavonique sont à l'origine de l'extraordinaire diversité structurale flavonique.

Le nombre, la nature et la position des substitutions sur l'aglycone flavonique sont subordonnés au fonctionnement des systèmes enzymatiques.

Le squelette de base de la structure flavonique est le suivant :



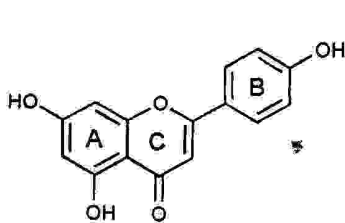
I.3.1- L'hydroxylation :

Les hydroxyyles originaux en position 5, 7, 4' sont d'une part introduits avant la formation de la molécule en C₁₅ ; les hydroxyyles portés par les carbones en 5 et 7 sur le noyau A apparaissent très précocement (avant le stade de chalcone et formation du noyau A).

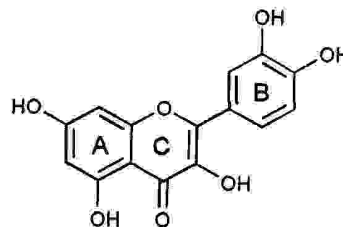
Il en est de même pour le OH du noyau B en position 4' (OH du para-coumaroyl-CoA), et d'autre part les OH du noyau A en position 6 et 8 et ceux du noyau B en 3', 5' et ceux de toute autre position sont considérés comme des extra hydroxyyles.

Le noyau B est souvent substitué en para ou simultanément en para et en meta.

Exemple :



Apigénine

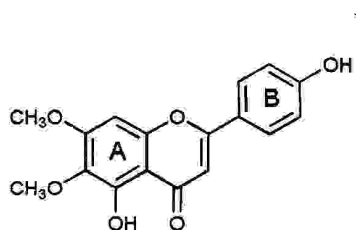


Quercétine

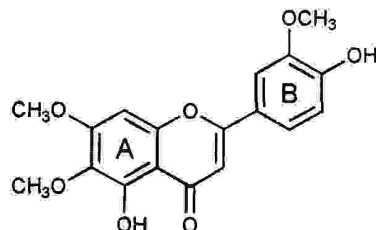
I.3.2- La O-substitution :

- La méthylation des hydroxyles (méthoxylation) :

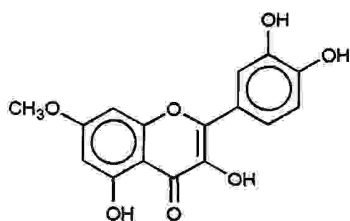
C'est la méthylation des groupements OH originaux ou extra hydroxyles.

Exemple :

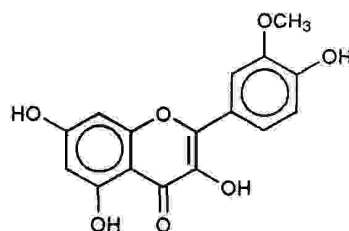
Circimaritine



Cirsilénéol



Rhamnétine

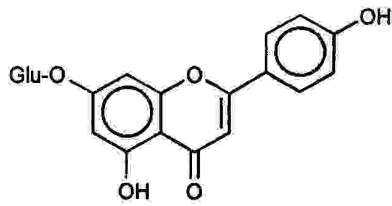


Isorhamnétine

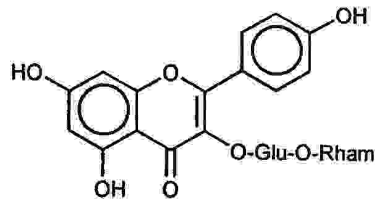
- La O-glycosylation :

Elle constitue un processus destiné à rendre la molécule flavonique moins réactive d'une part et plus soluble dans l'eau de l'autre part. Les sucres qui interviennent dans la structure des hétérosides phénoliques sont presque exclusivement des aldoses. Cette dernière propriété lui permet d'être stocké dans le compartiment vacuolaire de la plante ^{10,11}.

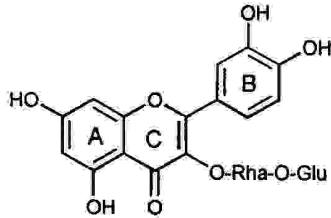
Dans le cas de la O-glycosylation, la liaison s'effectue entre un OH phénolique et un OH alcoolique d'un sucre tel que le glucose (le plus fréquent), le galactose, le rhamnose, le xylose, l'arabinose. Notons que le groupement osidique peut être aussi disaccharide, trisaccharide.



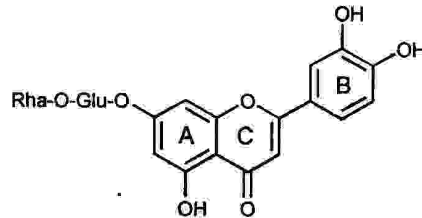
O-Glucosyl-7 Apigénine



O-Rutinosyl-3 Kaempférol



Rutine



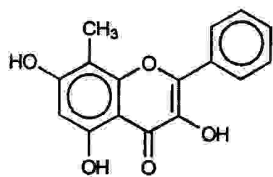
Diosmine

I.3.3- La C-substitution :

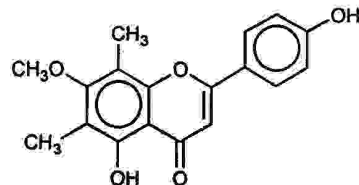
- La C-méthylation :

La C-méthylation est une liaison entre un méthyl et un carbone de l'aglycone ; le radical méthyl se lie au cycle benzénique par une liaison carbone- carbone. Elle se fait habituellement en C-6 et/ou C-8, parfois en d'autres positions (C-3 et C-7) ¹².

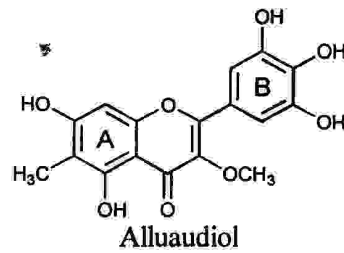
Exemple :



8-C-méthyl galangine



Sidéroxyline



Alluaudiol

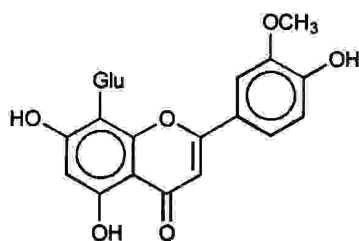
- La C-glycosylation :

Chez les végétaux, la C-glycosylation est un mode de substitution moins fréquent que la O-glycosylation, la liaison établit est de type carbone-carbone qui résiste à l'hydrolyse acide.

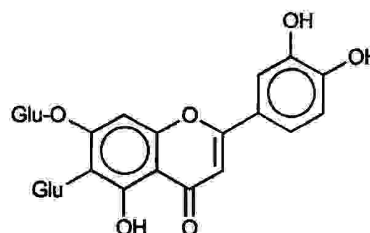
La C-glycosylation se fait en position C-6 et/ou C-8 ^{13, 14}. Parfois les deux modèles de glycosylation coexistent.

On connaît des C-glycosyl-flavonoïdes qui sont aussi C-glycosylés en position 7 ou en 4'.

Exemple :



C-glucosyl-8 chrysoériol (scoparine)



O-glucosyl-7- Isoorientine

I.4- Biosynthèse des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont issus de deux voies complémentaires :

- La voie de l'acide malonique :

Constitue la voie de synthèse du noyau A qui résulte de la condensation d'une unité phényl propanoïde (para-coumaroyl-CoA en C_6-C_3) avec trois unités malonyl-CoA.

- La voie de l'acide shikimique :

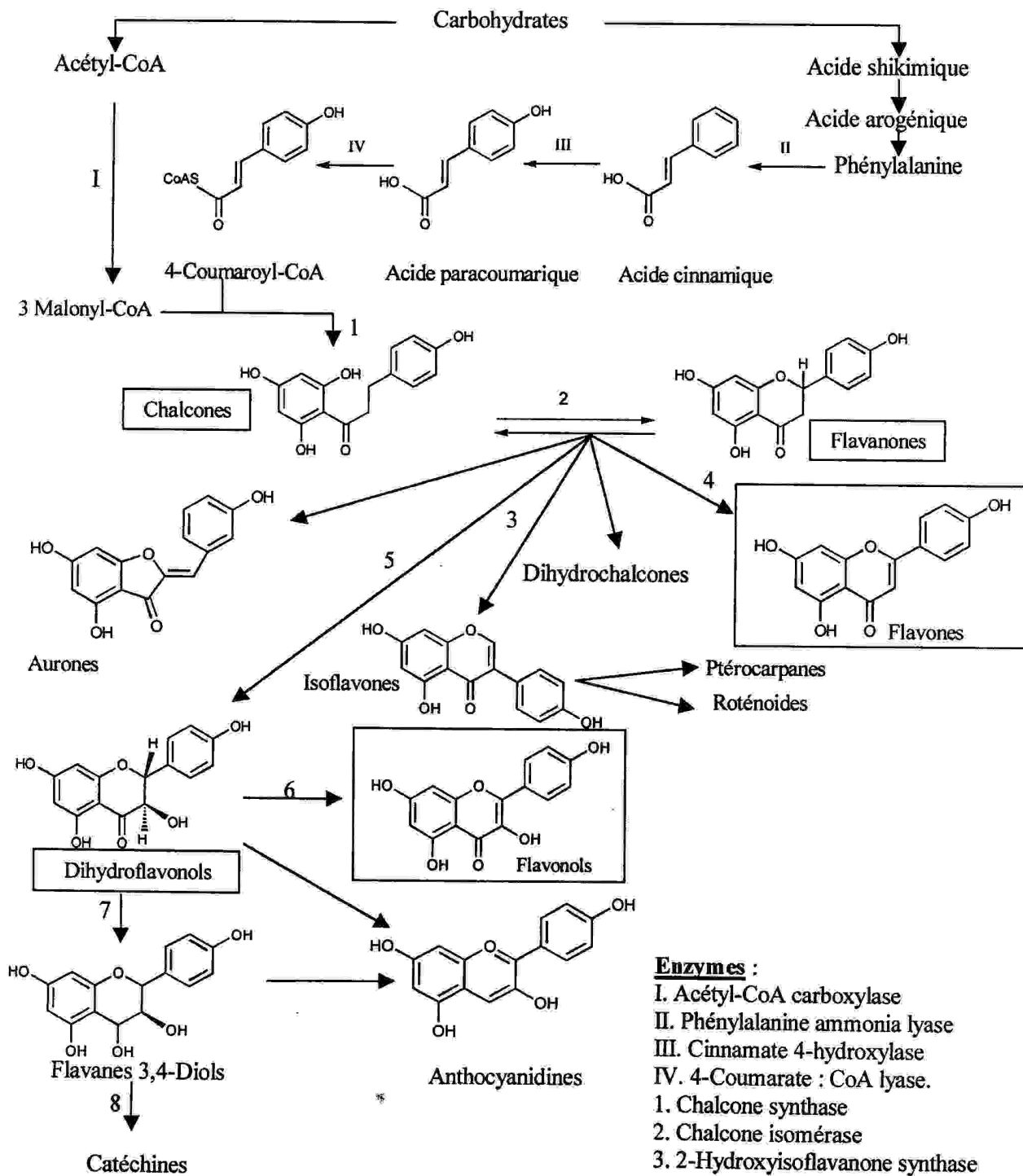
Pour la formation du noyau B et de l'élément central à trois carbones, UNDERHILL¹⁵ et AL, ont montré que les meilleurs précurseurs sont l'acide shikimique, la phénylalanine et parmi les dérivés des acides cinnamiques le composé p-coumarique. Ainsi, comme le montre le schéma-1, qui illustre la biosynthèse des flavonoïdes, l'acide shikimique conduit aux dérivés (C_6-C_3) sous l'action de l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL).

La voie de l'acide shikimique et malonique se croisent dans la réaction de condensation de l'acide hydroxy cinnamique-Co-A (4-coumaroyl-CoA) avec trois molécules de malonyl-CoA, cette réaction qui représente l'étape centrale de la synthèse de la molécule flavonique C-15, est catalysée par l'enzyme chalcone synthase.

Les premiers composés formés sont constitués par un équilibre chalcone-flavanone. Les chalcones qui se transforment donc par isomérisation (fermeture de l'hétérocycle) en flavanones, et c'est à partir du tronc commun que plusieurs voies divergent et conduisent ainsi aux différentes classes d'aglycones flavoniques (flavones et dihydroflavonols).

Les isoflavones résultent de la transposition du noyau B des flavones correspondantes.

A partir d'un second carrefour métabolique important des dihydro-flavonols, deux grandes classes de flavonoïdes sont synthétisées : les flavonols et les anthocyanes, et la biogenèse de ces derniers fait intervenir comme intermédiaire les flavanes-3, 4 diols^{10,16}.



- Enzymes :**
- I. Acétyl-CoA carboxylase
 - II. Phénylalanine ammonia lyase
 - III. Cinnamate 4-hydroxylase
 - IV. 4-Coumarate : CoA lyase.
 - 1. Chalcone synthase
 - 2. Chalcone isomérase
 - 3. 2-Hydroxyisoflavanone synthase
 - 4. Flavone synthase
 - 5. (2S)-Flavanone 3-hydroxylase
 - 6. Flavanol synthase
 - 7. Dihydroflavonol-4-réductase
 - 8. Flavane-3, 4 cis diol-4 réductase

Schéma 1 : Biosynthèse de différentes classes des flavonoïdes.

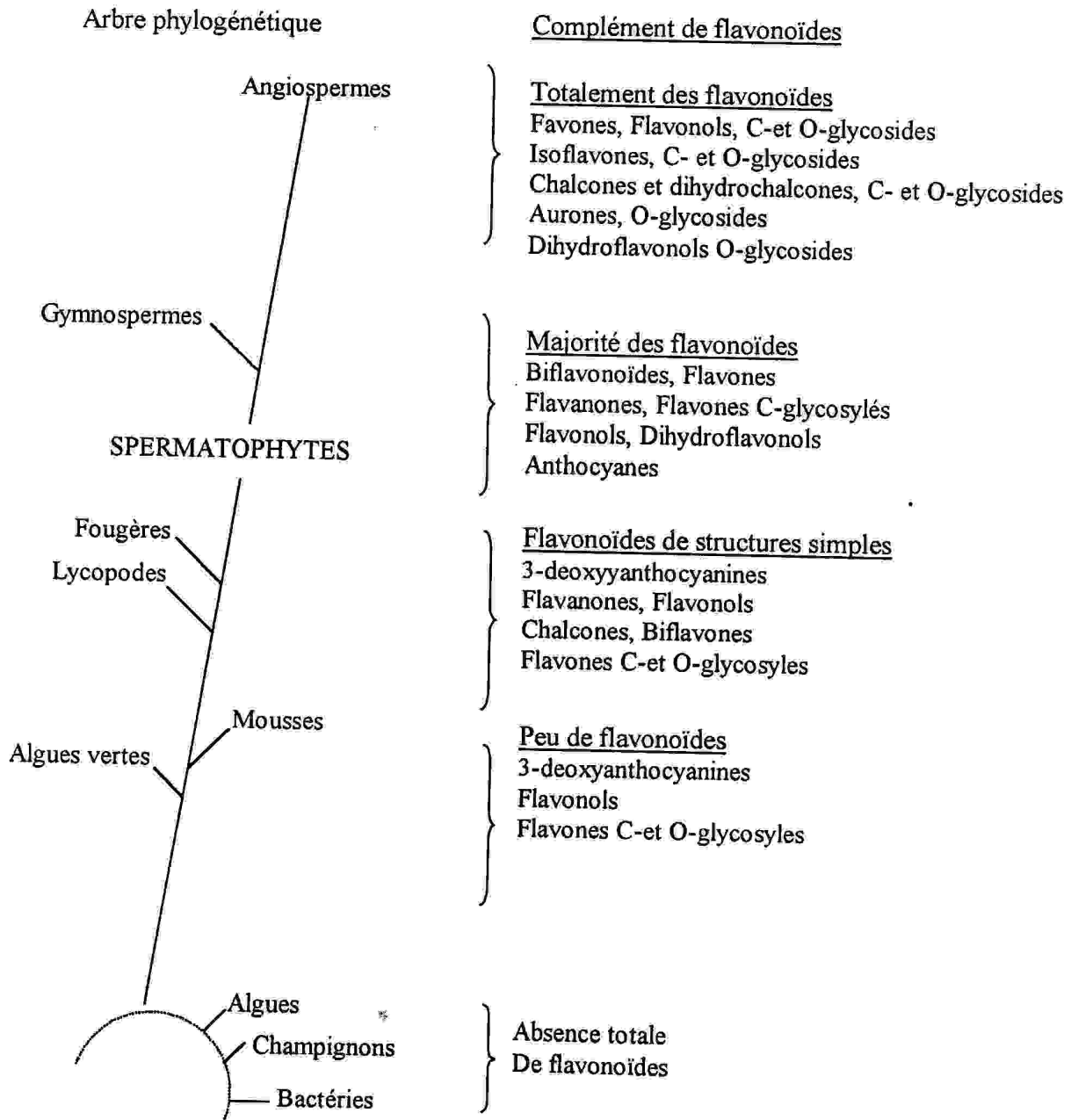


Schéma 2 : Evolution des flavonoïdes dans les plantes.

I.5- Intérêts des flavonoïdes :

Les flavonoïdes possèdent des caractéristiques particulières qui font d'eux des marqueurs de choix dans l'étude et la compréhension de l'organisation hiérarchique du monde végétal ¹⁰.

- La première caractéristique est d'être des métabolites secondaires dont la plupart sont chimiquement stables, ce qui facilite largement l'accès analytique.
- La seconde caractéristique est la diversité structurale.

I.5.1- Intérêts thérapeutiques :

Les flavonoïdes, et parmi eux la rutine, le rutoside et la quercitine, sont empiriquement depuis longtemps utilisés dans la pathologie circulatoire comme veinotique, vasculoprotecteur et comme antioedémateux et anti-inflammatoires ¹⁷⁻¹⁹.

La principale activité attribuée aux flavonoïdes est une propriété "facteur vitamine P".

Les principales indications thérapeutiques du facteur vitaminique sont :

- l'action diurétique (drogues à C-glycosyflavonoïdes)
- l'action antispasmodique des flavonoïdes et des chalcones de réglisse
- l'ophtalmologie : rétinopathie, hypermies conjonctivales
- l'action anti-oedémateuse (protecteurs du tissu conjonctif)
- la gynécologie : troubles veineux et prévention de leurs complications chez la femme enceinte ²⁰.

Il existe une relation entre la structure des flavonoïdes et leurs activités pharmacologiques, et le tableau-II ² en résume quelques exemples :

Tableau – II : Relation entre structures et activités thérapeutiques de quelques composés flavoniques.

Flavonoïdes	Emploi thérapeutique
Thymonine	- diurétique
Cirsiliol	- digestive
Nepitrine	- anti- inflammatoire - anti- arthrique
Hypolaetione-8-glycoside	- anti- inflammatoire - anti- ulcère
Dimethyl éther apigénine Fisetine	- anti- inflammatoire
Khellin (dimethoxy-methyl-furano-chromone)	- anti- allergique
8-methoxycirsilineol	- anti- spasmodique - stomachique
Cirsimaritine Baicaleine	- anti- prurique - antiseptique
Nepetine, eupatorine, eupatiline, jaceosidine, Hispidulin et 5, 7, 4'-tri OH 6-OMe flavone	- traitement des tumeurs
Quercétine	- anti- malaria - traitement de la parainfluenza
Glucoside- 3- Kaempferol Rutinoside- 3- Kaempferol	- crises hémorroïdaires - troubles cardio- vasculaires
3- methyl quercétine	- anti- viral
Morine	- traitement du poliovirus
Rutinoside- 7- hesperetin (flavanoïne)	- maladies cérébrales vasculaires - hypertension
Rhamnosyl- 3- Kaempferol Glucoside- 3- Kaempferol	- activité analgésique
C- glycosyl flavonoïdes	- maladies rénales

I.5.2- Intérêts biologiques :

L'activité biologique des flavonoïdes a été très étudiée et assez bien décrite ²¹. Nous ne ferons ici que rappeler les principales activités.

Les flavonoïdes (quercétol, tricol ...) peuvent contribuer efficacement dans le traitement de certains types de cancer ²² comme par exemple le cancer de l'œsophage humain causé par la consommation excessive des tanins qui se trouvent dans les boissons astringentes tels que le thé et le café ²³.

Parmi les flavonoïdes présentant des propriétés hypotensives, la 6,8-di-glycosylapigénine qui provoque notamment une baisse importante de la pression artérielle chez le rat ²⁴.

Les O-diphénols protègent contre les oxydations, ils exercent un effet "Scavenger" captant les radicaux libres ($O^{\cdot-}$, OH^{\cdot}), engendrés par l'hypoxie et l'inflammation.

Les flavonols forment des complexes avec les métaux ainsi que tous les flavonoïdes avec une configuration 3', 4' dihydroxy, possèdent une activité antioxydante ²⁵.

Les rotenoïdes (isoflavones) ont une activité toxique, et les produits contenant ces isoflavones étaient utilisés comme insecticides ²⁶.

I.5.3- Intérêts économiques :

Outre les intérêts thérapeutiques et biologiques, les flavonoïdes ont une importance économique, et sont utilisés dans l'industrie cosmétique, puisque les dérivés de la lutéoline réduisent l'hyperpigmentation de la peau. Dans l'industrie alimentaire, ils sont utilisés comme antioxydants naturels et inhibiteurs d'enzymes ²⁷.

Deuxième chapitre : _____

**Méthodes d'analyses structurales
des flavonoïdes**

II.1- Méthodes d'analyses structurales :

Les techniques suivantes sont utilisées pour déterminer la structure des composés flavoniques :

- Fluorescence sous lumière UV (254-365 nm)
- Spectrométrie UV-visible
- Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire
- Spectrométrie de masse.

II.1.1- Fluorescence sous lumière UV :

La fluorescence des composés apporte un certain nombre d'informations accessibles immédiatement à l'examen des chromatogrammes en lumière UV (254-365 nm).

En dehors des isoflavones, pratiquement tous les autres composés de la famille des flavonoïdes apparaissent en UV sous forme de spots colorés dont certains sont fluorescents, en effet, il existe une relation étroite entre la fluorescence du composé, sa nature et son mode de substitution, les différentes interprétations sont résumées dans le tableau-III ^{7, 13, 28, 29}.

Tableau-III : détermination de la structure des flavonoïdes par l'interprétation de leurs fluorescences.

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5, 6, 7 tri-OH libres Flavonols 5, 7, 8 tri-OH libres
Brun-noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4'-OH Flavones 3-OR et 5-OH ; 4'-OH Flavones 6- ou 8-OH Chalcones, isoflavones, dihydroflavonols, flavones
Bleu-clair (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libres Flavonols 5-OH libre sans 3-OH substitué
Jaune terne ; jaune ; fluorescence orangée	Flavonols 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre
Jaune vert brillant	5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3-OH libre Aurones, chalcones, flavanones
Jaune pâle	Dihydroflavonols

II.1.2- Spectrométrie UV-visible :

La spectrométrie UV-visible est très utilisée dans l'étude des flavonoïdes, car elle est sensible et n'exige que peu de produits (une tâche de chromatographie sur papier suffit), elle donne des renseignements structuraux de première importance dans la détermination de la nature et la position des substitutions sur le noyau flavonique.

Les mises au point de cette question ont été publiées par GEISSMAN (1955)³⁰, JURD (1962)³¹ et HARBORNE (1964)³².

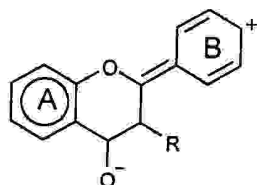
II.1.2.1- Absorption en milieu méthanolique neutre :

Les composés flavoniques présentent en milieu méthanolique neutre deux bandes intenses :

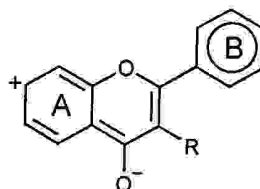
- Bande I située entre 300 et 385 nm

- Bande II située entre 240 et 280 nm

Selon JURD et Horowitz (1962)³¹ ces deux bandes sont attribuables au fait que les flavones et flavonols présentent des formes limites de type cinnamoyle ou benzoyle.



Cinnamoyle



Benzoyle

- La bande I correspond à l'absorption du système cinnamoyle qui fait intervenir la conjugaison du groupement CO de l'hétérocycle central avec le noyau B.
- La bande II est associée à l'absorption du système benzoyle qui fait intervenir la conjugaison du noyau A avec le groupe carbonyle. Cette bande permet de connaître le nombre de substituants du noyau B²⁹.

La position de la bande I permet de distinguer la structure flavonol de la structure flavone.

- Une monosubstitution en position 4' se traduit par une bande unique vers 270 nm.
- Une ortho disubstitution fait apparaître deux bandes ou une bande et une inflexion.
- Une trisubstitution est caractérisée par une seule bande située entre 250 et 270 nm.

Le tableau-IV illustre les ordres d'absorption pour les flavonoïdes ⁷ :

Tableau-IV : Ordres d'absorption ultraviolet pour les flavonoïdes.

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

II.1.2.2- Absorption en présence de réactifs :

a- Hydroxyde de sodium - NaOH :

L'hydroxyde de sodium (0,5N) base forte ionise tous les hydroxyles phénoliques de l'aglycone flavonique, et plus particulièrement les OH en position 3, 4' et 7 ; il en résulte un effet bathochrome (déplacement vers les grandes longueurs d'ondes) sur les deux bandes I et II, cet effet est plus marqué sur la bande I.

Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif et cette instabilité croit avec le nombre de substituants OH.

Ce réactif est utilisé en deux temps :

- Instantanément.
- Après cinq minutes.

On peut indiquer :

- Un effet bathochrome de 40-60 nm sur la bande I sans diminution d'intensité optique avec le temps, indique la présence d'un hydroxyle libre en 4'.
- Un effet bathochrome de 50-60 nm sur la bande I avec diminution d'intensité indique un 3-OH.
- La présence d'une bande III (située entre 320-335 nm) signale le présence d'un 7-OH.

b- Chlorure d'aluminium- AlCl_3 :

Comparativement aux autres réactifs utilisés, le chlorure d'aluminium (1%) reste le réactif de choix en spectrophotométrie UV-visible.

En milieu anhydre ou hydraté, les propriétés chélatantes du chlorure d'aluminium à l'égard des flavonoïdes se situent à deux niveaux :

- Formation de complexes labiles avec deux hydroxyles libres en position ortho sur le noyau A ou sur le noyau B, (7,8), (3',4') ou (6,7).
- Formation de complexes stables avec le carbonyle en 4 et l'hydroxyle en 5 et (et ou) en 3.
5 et/ou en 3

Chacun des pics du spectre initial se dédouble avec un effet bathochrome :

- Un effet bathochrome de 20-45 nm indique 5-OH
- Un effet bathochrome de 60 nm indique 3-OH.

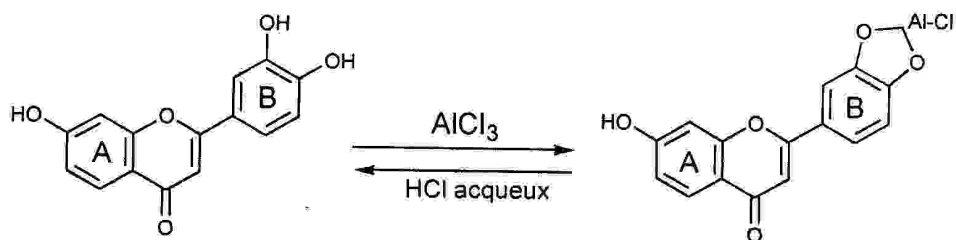
c- Chlorure d'aluminium + acide chlorhydrique- AlCl_3 + HCl :

L'addition d'HCl (50%) permet de s'assurer de la labilité ou de la stabilité du complexe ; en effet après acidification du milieu, seul consiste l'effet de chélation des hydroxyles en position 3 ou 5 ; les liaisons établies en milieu neutre et relatives à l'ortho dihydroxylation sont rompues.

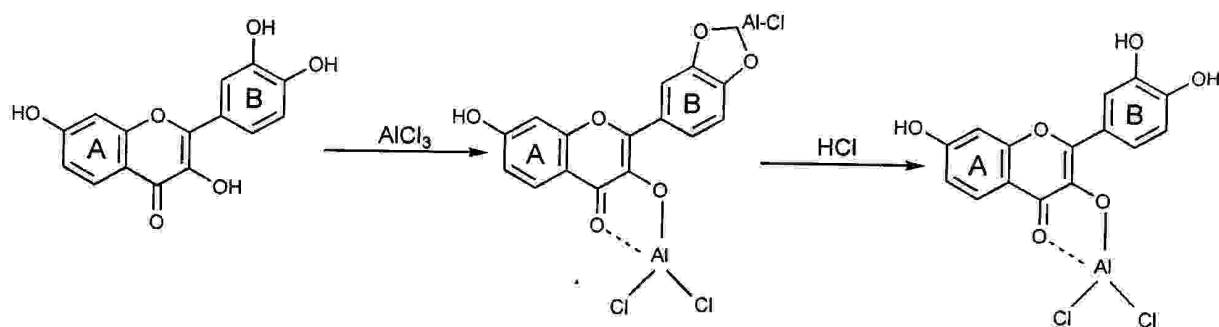
L'effet bathochrome observé avec AlCl_3 seul est réduit après addition d'HCl par un effet hypsochrome provoqué par la décomposition des complexes orthodihydroxylés.

d- L'acétate de sodium- NaOAc :

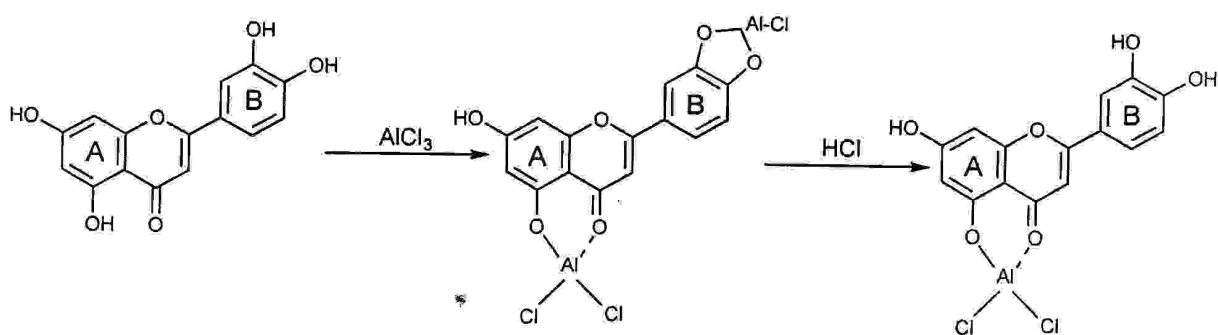
L'acétate de sodium en excès (anhydre ou fondue), est une base faible qui provoque l'ionisation des hydroxyles phénoliques les plus fortement acides, notamment ceux en position 3, 7 et 4' les autres hydroxyles ne sont pas affectés³³.



1^{er} cas :



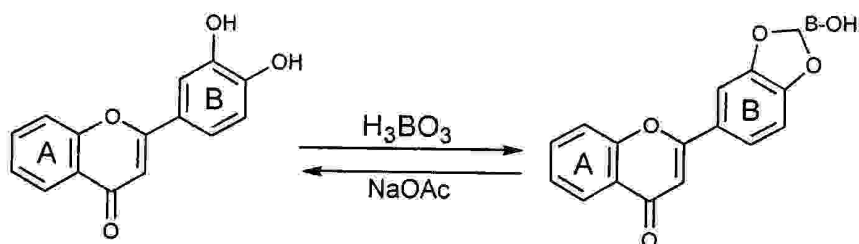
2^{ème} cas :



Shéma-4 : Schémas des complexes formés par AlCl₃/HCl avec une flavone ou un flavonol

e- L'acétate de sodium+l'acide borique- NaOAc + H₃BO₃ :

L'addition d'acide borique (1%) en présence d'acétate de sodium chélate les hydroxyles en position ortho, à l'exception des hydroxyles de C-5, C-6. Il se produit un effet bathochrome de BI de 12 à 30 nm par rapport au spectre méthanolique neutre, causé par la chélation du système orthohydroxylé du cycle B. Quand le cycle A est orthodihydroxylé (6,7 ou 7,8) ce déplacement est réduit à 5-10 nm. Si l'un de hydroxyles est méthoxylé, cet effet est annulé ²⁹.



En résumé, ces réactifs entraînent des déplacements de BI et BII permettant la localisation de la plupart des groupements hydroxyles de la molécule, si bien qu'il est possible de prévoir la substitution des hydroxyles chez les flavones et les flavonols; s'ils sont méthylés ou glycosylés, il n'y a pas de déplacement spectral.

Les interprétations des déplacements en U.V-visible avec addition de réactifs sont résumées dans le tableau-V ^{7, 29, 31, 34, 35} ;

Tableau -V : Interprétation des déplacements en U.V-visible avec addition de réactifs

Réactifs	Déplacement λ en nm		Interprétations
	Bande I	Bande II	
MeOH	310-350 330-360 350-385	250-280 250-280 250-280	Flavones Flavonols (3-OH libre) Flavonols (3-OH substitué)
NaOH	+40 à 60 avec stabilité d'intensité +50 à 60 avec diminution d'intensité Faible déplacement avec diminution d'intensité Absence de bande entre 320-335 Apparition d'une bande entre BI et BII Transformation de BI en une inflexion Instabilité instantanée ou progressive (Dégénérescence)		4' -OH 3,4' -di OH 4' - OMe 7 -OR 7 -OH 5-OH (seul hydroxyle libre) Flavonol : 3, 3', 4'-tri OH ou 3, 4', 5' -tri OH ou 3', 4', 4'-tri OH ou 3, 3', 4', 5'-tetra OH
AlCl ₃ / MeOH	+20 à 45 +60		5-OH 3-OH
AlCl ₃ + HCl/ AlCl ₃	-30 à 40 -10 -20 à -25		3', 4'-di OH 3',4' -OH, OMe 3',4',5' -tri OH
AlCl ₃ + HCl / MeOH	+35 à 55 +17 à 20		5 -OH 5-OH (avec 6-oxygénation)
NaOAc/MeOH		+ 20 à 80 Déplacement très faible Diminution d'intensité avec le temps 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 / MeOH	+ 12 à 36 +5 à 10		3',4' -di OH 6,7 ou 7,8 -di OH

II.1.3-La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) :

a- La résonance magnétique nucléaire du proton ¹H NMR :

La RMN du proton permet :

- La localisation des protons (H) sur la molécule ³⁶.
- La définition du modèle d'oxygénation.
- La détermination du nombre (et position) des groupements méthoxy.
- La détermination du nombre, de la nature et la position des sucres présents ^{13, 37}.

Le choix du solvant se fait selon la nature de la molécule flavonique, pour les aglycones flavoniques et les hétérosides on utilise généralement le DMSO (hexadeutereodimethyl sulfoxide), parfois on utilise le CCl_4 , mais il faut au préalable procéder à une triméthylsilylation pour protéger les hydroxyles libres de la molécule. Aussi l'addition d'une ou deux gouttes de D_2O permet d'éliminer du spectre les signaux des protons des groupements hydroxyles ³⁸.

Pour les flavonoïdes méthoxylés, deux solvants sont utilisés, le benzène deutéré C_6D_6 avec le chloroforme deutéré (CDCl_3) ou alors C_6D_6 avec CCl_4 ³³. Les données de la résonance sont comprises dans l'intervalle 0-10 ppm par rapport au TMS.

Contrairement à la SM, la RMN nécessite des quantités pondérales importantes de substances (de un à plusieurs dizaines de milligrammes) ce qui en limite souvent l'application dans le cas des études des substances naturelles.

Le tableau-VI : contient les différents déplacements des flavonoïdes en RMN proton.

On désigne par :

(s) : singulet

(d) : doublet

(q) : quadruplet

(dd) : doublet de doublet

Tableau – VI : Déplacements chimiques des protons des flavonoïdes en $^1\text{H NMR}$

Nature du flavonoïde	Déplacement chimique (ppm)	J : constante de couplage	Remarque
Protons du noyau A			
5,7 dihydroxy flavone et flavonols	H-6 : d (6,0-6,2) H-8 : d (6,3-6,5)	J = 2,5 HZ J = 2,5 HZ	
7 glycosy flavones et flavonols	H-6 : d (6,2-6,4) H-8 : d (6,5-6,9) (déplacement vers les champs faibles)		
7- hydroxy – 5 déoxy flavones et flavonols	H-5 : d (7,9-8,2) H-6 : dd (6,7-7,1) H-8 : d (6,7-7)	J = 9 HZ J = 9,0 et 2,5 HZ J = 2,5 HZ	
Protons du noyau B			
- Flavones disubstituées en (3',4'-OH) et (3OH, 4'OMe)	H-5' : d (6,7-7,1) H-2' : d (7,2-7,3) H-6' : dd (7,3-7,5)	J = 8,5 HZ J = 2,5 HZ J = 2,5 et 8,5HZ	Le signal de H-2' est déplacé vers les champs faibles
- Flavonols disubstitués en (3',4'-OH) et (3OH, 4'OMe)	H-5' : d (6,7-7,1) H-2' : d (7,5-7,7) H-6' : dd (7,6-7,9)		
- Flavonols (3' OMe,4' OH)	H-2' : d (7,6-7,8) H-6' : dd (7,4-7,6)		
- Flavonols (3', 4'OH, 3-O-glycosyl)	H-2' : d (7,2-7,5) H-6' : dd (7,3-7,7)		
- Flavones et flavonols trisubstitués en (3',4',5'-OH)	H-2',6' : s(6,5-7,5)		Equivalence de H-2'et H-6'.
- Flavones et flavonols (CH ₃ ou sucre en 3' ou 5')	H-2' : d * distincts H-6' : d H-3',5' : d (6,5-7,1)	J = 2 HZ	Non équivalence de H-2' et H-6'.
- Flavones monosubstituées en 4'	H-2',6' : d (7,7-7,9) H-3',6' : d (6,5-7,1)	J = 8,5 HZ	Deux paires de doublets
- Flavonols monosubstitués en 4'	H-2',6' : d (7,9-8,1)	J = 8,5 HZ	Le doublet dépend de l'oxydation du cycle C

Suite :

Protons du noyau C - Flavones	H-3 δ ppm 6,3(s)			
Protons osidiques	H-1'' δ ppm	les autres protons δ ppm		
4',5,7-O-glycosides	5,0	3,5-4,3		
3-O-glycosides	5,8	3,5-4,3		
7-O-glycosides	4,8-5,2	3,5-4,3		
3-O-glycosides	5,8-6,0	3,5-4,3		
Substitutions	δ ppm			
MeO	3,7-4,1			
CH ₃ CO	1,6-2,5			
6-Me	2,0-2,3			
8-Me	2,1-2,5			
Protons de solvants	δ ppm			
TMS	0,1-0,5			
DMSO-d ₆	2,4-2,6			
MeOH	3,3-4,1			
CDCl ₃	7,3			

Pour les flavonols monosubstitués en 4', nous notons des couplages ortho ($J = 9\text{Hz}$) entre les protons 2' et 3', 5' et 6'.

Dans le cas des flavones, le proton H-3 (cycle C) apparaît sous forme d'un singulet à 6,3 ppm qui chevauche très souvent le signal du proton H-6 ou H-8 dans le cas d'une oxygénation en 5,6,7 ou 5,7,8 ou 5,6,7,8³⁹.

a.1- Les protons de la partie osidique (sucre) :

Le signal du proton osidique H-1 se trouve généralement vers les champs faibles par rapport aux autres signaux des protons du sucre. Son déplacement chimique exact peut donner des informations concernant la nature du sucre et de son mode de liaison.

Dans les trois types de flavonoïdes O-glycosylés en C-4', C-5 et C-7 le signal du proton de C-1" apparaît entre 4,8 et 5,2 ppm, alors que dans le flavonol 3-O glycosylé, ce signal apparaît entre 5,7 et 6 ppm ²⁸.

De plus, les flavonoïdes 3-O- glucosylés sont bien distingués des 3-O rhamnosylés (le proton de C-1" dans le 3-O glycoside a un déplacement chimique situé entre 5,35 et 5,56 ppm, alors que ce déplacement se trouve entre 4,96 et 5,36 ppm pour le 3-O rhamnoside) ³⁸.

Le signal de H-1" du sucre attaché à un autre sucre (sucre terminal) peut être toujours distingué de celui du sucre directement attaché au flavonoïde (sucre primaire) dans lequel H-1" résonne normalement vers les champs forts par rapport au sucre primaire ³⁸.

Dans les flavonoïdes 3-rutinosylés, les signaux de H-1" du glucose et du rhamnose apparaissent respectivement à 5,3 et 4,44 ppm ³⁸.

a.1.1- Type de liaison :

Le signal du proton anomérique apporte des informations sur une liaison α ou β glycosidique et cela par la constante de couplage entre H-1/H-2 de la molécule de sucre ⁴⁰ :

- Le sucre forme une liaison α avec l'aglycone quand les protons H-1" et H-2" du sucre sont axial – équatorial, avec une constante de couplage de 3-4 Hz.
- Le sucre forme une liaison β avec l'aglycone quand les protons H-1" et H-2" du sucre sont diaxiaux, avec une constante de couplage de 7-8 Hz.

a.1.2- Séquence des sucres :

Le signal de H-1 du sucre terminal se distingue lors de son apparition dans les champs forts par rapport au signal de H-1 du sucre premier, le tableau-VII en fournit quelques exemples ⁴¹.

Tableau-VII : Déplacements chimiques des protons anomériques en ¹H NMR pour les flavonoïdes O- glycosylés (dans DMSO -d₆)

Sucre primaire	Déplacement chimique (ppm)	Sucre terminal	Déplacement chimique (ppm)
3-O- β-D-glycosyl	5,72-5,75	2-O- β-D-glycosyl	4,63-4,65
7-O- β-D-glycosyl	4,90-5,25	2-O- β-D-glycosyl	4,43-4,68
	5,05-5,56	2-O- α -L-rhamnosyl	5,56
3-O- α -L-rhamnosyl	5,21-5,50	3-O- β-D-glycosyl	4,32-4,48

a.1.3- Position du sucre :

On peut avoir la position du sucre sur le squelette flavonique grâce à son déplacement chimique ⁴¹, on peut citer quelques exemples :

3-O-glycosides (5,35-5,56 ppm).

7-O-glycosides (4,90-5,25 ppm).

3-O-rhamnosides (4,96-5,36 ppm).

7-O-rhamnosides (5,22-5,75 ppm).

3-O-glucoronides (5,48 ppm).

7-O-glucoronides (5,10-5,18 ppm).

a.1.4- La C- glycosylation :

On peut distinguer les 6-C-glycosyl flavonoïdes des 8-C-glycosyl flavonoïdes par les déplacements chimiques ; en effet les premiers résonnent à des champs plus forts que les seconds ⁴¹, le tableau-VIII illustre quelques exemples :

Tableau-VIII : Déplacement chimiques des protons anomériques en RMN des C-glycosyl flavonoïdes (dans DMSO-d₆)

Glycosides	Déplacement chimique δ (ppm)	J
6-C- β -D-glucosides	4,58-4,90	10 HZ
8-C- β -D-rhamnosides	4,64-4,88	10 HZ
6-C- α -L-arabinosides	4,67	8,2 HZ
6-C- α -L-arabinosides	4,75-4,89	9 HZ

J : constante de couplage entre H-1/H-2 de la molécule du sucre.

b- La résonance magnétique nucléaire du carbone ¹³C NMR :

Le spectre RMN du carbone-13 est complémentaire de la spectrométrie RMN du proton. Elle est appliquée aux différents types de flavonoïdes naturels ⁴², à la différence avec les spectres RMN proton, l'intensité du signal carbone-13 ne représente pas le nombre de carbones ⁴³.

La résonance du carbone-13 prédomine dans une rangée de 0-220 ppm par rapport au TMS (tetraméthylsilane).

Le solvant fréquemment utilisé est le DMSO-d₆ qui produit ses propres signaux à 39.5 ppm⁷. Parmi les applications de l'RMN du carbone-13 on cite :

- L'établissement du nombre total d'atomes pour la molécule.
- Le nombre de carbones dans le sucre.
- Le nombre de carbones oxygénés dans le noyau des flavonoïdes .
- L'identification de C-(et O-) sucres liaisons.
- La détermination de la liaison interglycosidiques .

Dans les spectres des flavonoïdes , la résonance C-13 des carbones nucléaires des flavones et flavonols ont lieu entre 90 – 185 ppm ¹³.

b.1- Identification de la O-sucre liaison des flavonoïdes :

La O-glycosylation des hydroxyles des flavonoïdes, produit un déplacement vers les champs forts de 2 ppm pour le signal du carbone adjacent, et un effet contraire (déplacement vers les champs faibles) pour les signaux des carbones ortho et para de 1-4 ppm ⁷.

Pour les flavonoïdes O-glycosylés, le signal du carbone anomérique C-1 du sucre apparaît dans la région 98-112 ppm ; le nombre de signaux qui apparaissent pour les carbones anomériques dans le spectre ¹³C du glycoside par rapport au spectre ¹³C de son aglycone donne le nombre de monosaccharide dans l'hétéroside, le reste des carbones du sucre absorbant entre 60-85 ppm ⁴⁴.

b.2- Identification de la C-sucre liaison des flavonoïdes :

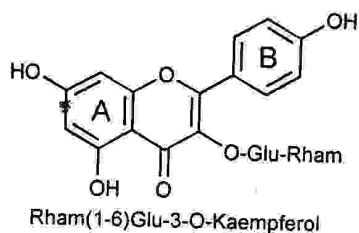
La C-glycosylation des aglycones flavoniques, provoque un déplacement chimique vers les champs faibles de 10 ppm des signaux des carbones des glycosides, les autres signaux restent relativement inaffectés ⁷.

Le carbone anomérique C-1 du sucre des flavonoïdes C-glycosylés résonne dans la même rangée que les autres carbones du sucre, entre 60-82 ppm ⁴⁴.

b.3- Séquence des sucres :

La différence entre le déplacement du carbone C-1 du sucre terminal et celui du sucre intérieur dans un disaccharide est 2-4 ppm, le signal du sucre terminal est situé dans la région des champs faibles.

Exemple :



Le carbone anomérique C-1 du glucose résonne à 98,4 ppm, tandis que celui du rhamnose est à 100,5 ppm ⁴⁵.

b.4- Identification des aglycones :

L'hydroxylation ou la méthylation donne un déplacement vers les champs faibles du signal du carbone adjacent par rapport à son signal dans l'aglycone, quelque uns de ces effets sont résumés dans le tableaux-IX ⁴⁴.

Tableau-IX : Effets de l'hydroxylation ou de la méthylation sur les déplacements chimiques des carbones de flavonoïdes.

Type de flavonoïdes	Effets de l'hydroxylation et (et ou) de la méthylation	Résonances
5,7 – dihydroxy flavones	Déplacement vers les champs forts	C-6 : 99,2 ppm C-8 : 94,4 ppm
5, 7 – dihydroxy 6 – methoxy flavones	Déplacements vers les champs faibles	C-6 : 94,4 ppm
5, 7 – dihydroxy 8 – methoxy flavones		C-8 : 99,0 ppm
5 – hydroxy flavones	Déplacement de 5,5 ppm vers les champs faibles du signal de C-4	C-4 : 182,5 ppm
	Déplacement de $1,5 \pm 0,8$ ppm vers les champs forts du signal de C-3	C-3 : 105,6 ppm
Flavones non substituées en 2' et 6'		C-3 : entre 102,0 et 108,6 ppm
2 – methoxy flavones	Déplacements vers les champs faibles	C-3 : 112 ppm
2',6'– dimethoxy flavones	Déplacements vers les champs faibles	C-3 : 115 ppm
Flavones hydroxylées ou Methoxylées en 2'et/ou 6'	Déplacements vers les champs faibles du signal de C-3	C-3 : entre 110 et 115 ppm

II.1.4- La spectrométrie de masse (SM) :

Ultrasensible, la spectrométrie de la masse est une technique de choix pour l'étude structurale des flavonoïdes, tant par sa faible consommation de substance (moins de 1mg, aspect quantitatif) que pour la nature des renseignements structuraux très précis qu'elle apporte (aspect qualitatif).

Dans certains cas elle peut suffire pour confirmer l'identification structurale en donnant les informations suivantes :

- La formule brute de la molécule, lorsque la détermination de pic moléculaire est effectuée à haute résolution.

- La répartition des substituants sur les noyaux A et B à partir de la détermination des pics de fragmentation de la molécule ⁴⁶.
- La détermination de la nature et du site d'attachement des sucres dans les « O » ou « C » glycosides ¹³.

L'étude des fragmentations issues de la coupure des noyaux A et B, selon les schémas de Audier (1966), permet de connaître le nombre et la nature des substituants de chacun des noyaux du squelette flavonique.

Il existe différentes techniques en SM dont les plus citées sont :

a- Spectrométrie de masse à impact électronique (EI) :

C'est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée, elle consiste à volatiliser la molécule par chauffage à une température de 100-300°C sous vide et à bombarder cette vapeur par un courant d'électrons à forte énergie, de l'ordre de 70 eV.

Le processus d'ionisation a pour résultat la formation de l'ion moléculaire M^+ selon la réaction ^{47, 48}.



a.1- EI-MS des aglycones :

a.1.1- EI-MS des aglycones de flavones :

La fragmentation de l'aglycone de flavone est donnée selon le mécanisme du schéma-5 ⁴⁹. Le pic moléculaire M^+ ($m/e = 222$) subissant une transposition Retro- Diels- Alder (RDA) conduit à un nombre de fragments caractéristiques, tableau-X ^{49, 50}.

Tableau-X : Pics caractéristiques d'une flavone

Noyaux	Pics (m/e)	Interprétations
A	120	Noyau A non substitué
	121	Noyau A mono ou polyhydroxylé
	152-153	Noyau A mono hydroxylé
	166-167	Noyau A mono hydroxylé mono methoxylé
B	102	Noyau B non substitué
	118	Noyau B mono hydroxylé
	148	Noyau B mono hydroxylé mono methoxylé
	B-15 ($m/e = 87$)	Noyau B O-methoxylé
	Pic A plus grand que le pic B	Dérivés non oxygénés sur noyau B
	Pic B plus grand que le pic A	Noyau B methoxylé

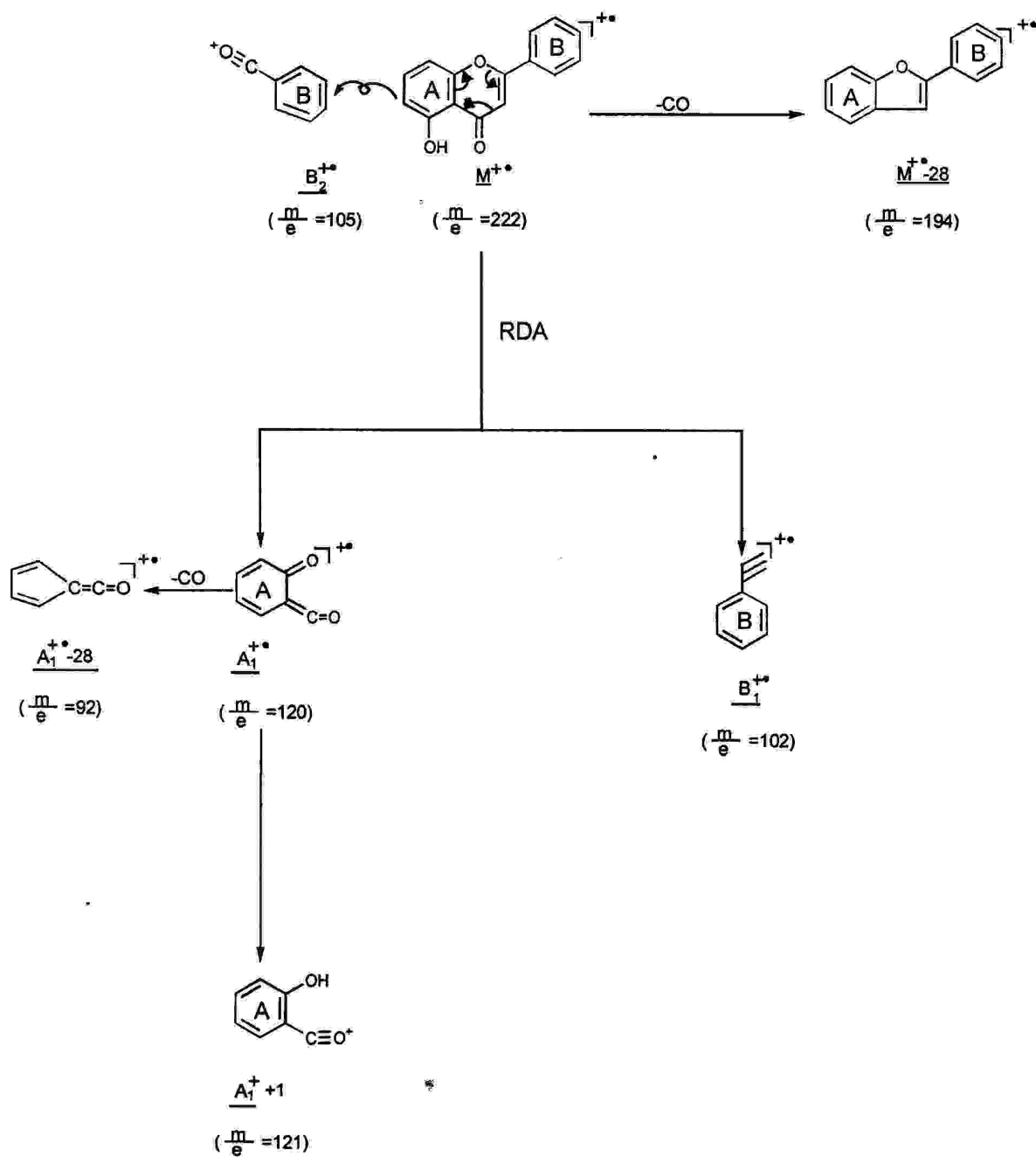


Schéma-5 : Mécanisme de fragmentation d'un aglycone de flavone

a.1.2- EI-MS des aglycones de flavonols :

Le pic caractéristique des flavonols est le pic B_2^+ ($m/e = 105$) dont le mécanisme de formation est représenté par le schéma-6⁴⁹.

Les spectres des flavonols présentent des pics caractéristiques, tableau -XI³⁶.

Tableau-XI : Pics caractéristiques d'un flavonol

Noyaux	Pics (m/e)	Interprétations
A	121	Noyau A non substitué
	153	Noyau A di- O- substitué
	169	Noyau A tri- O- substitué
B	105	Noyau B substitué
	121	Noyau B mono- O- substitué
	137	Noyau B di- O- substitué

Les valeurs mentionnées sont celles observées dans le cas des fragments hydroxylés libres. Les fragments méthoxylés sont scindés avec formation de quinone.

Enfin, les spectres des flavonols présentent un grand nombre de pics des ions fragments ordinairement rencontrés tels que : M^+ (pic de base), $M^+ -1$, $M^+ -15$ (pic de base dans le cas des 6- ou 8- méthoxy flavonols), $M^+ -17$, $M^+ -18$, $M^+ -28(29)$, $M^+ -31$, $M^+ -43$ et $M^+ -55(56)$ ^{13,39}.

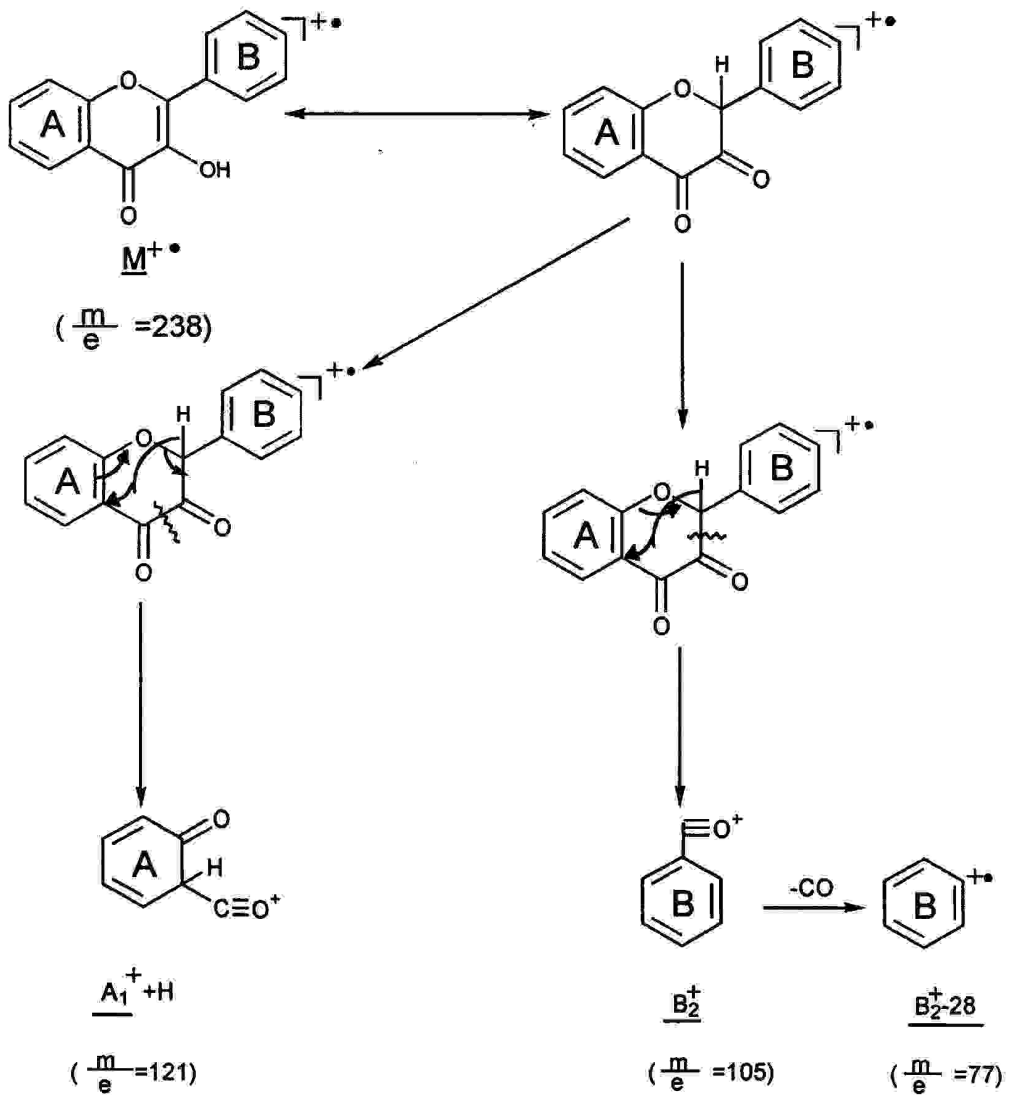


Schéma-6 : Mécanisme de fragmentation d'un aglycone de flavonol

a.2- EI- MS des glycosides :

a.2.1- Flavonoïdes O-glycosylés :

a.2.1.1- EI- MS des O-glycosides libres :

Pour les O-glycosides, la fragmentation débute par l'élimination globale de l'ose liée en donnant l'ion radical correspondant à la masse de l'aglycone, en général le pic de base dans lequel la partie osidique a été remplacée par un proton.

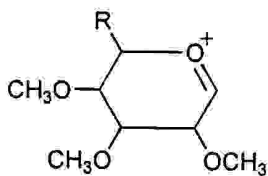
a.2.1.2- EI- MS des O-glycosides perméthylés :

On procède à une perméthylation ou une perdeuterométhylation des flavonoïdes pour les rendre plus volatils. Les flavonoïdes 3,5,4'-O glycosides donnent des ions moléculaires de basses intensités (0,1-2%), par contre les flavonoïdes 7-O-glycosylés donnent des ions moléculaires à intensités plus élevées (10-90%)⁷.

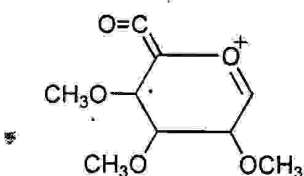
Les fragments de sucres issus des mono-O-glycosides perméthylés sont caractérisés par la perte séquentielle de MeOH qui révèle le type de sucre, quelques exemples sont illustrés dans le tableau -XII⁷.

Tableau - XII : Fragmentations des sucres des mono- O- glycosides perméthylés

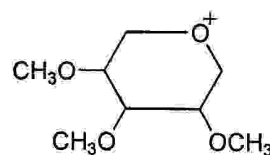
O-glycosides perméthylés	Pics (m/e)
Hexosides	218,187,155,111
Glucuronides	201,169,141,111
Rhamnosides	189,157,125,111
Pentosides	175,143,111



Pentosides (R=H)
Hexosides (R=CH₃ ou CH₂OH)



Glucuronides



Rhamnosides

Par la nature des fragments, il est possible de déterminer la séquence du sucre, la position et le rattachement inter glycosidique des sucres⁵¹.

a.2.2- Flavonoïdes C-glycosylés :

a.2.2.1- EI- MS des C-glycosides libres :

La spectroscopie de masse des C-glycosides libres produit rarement l'ion moléculaire et donne peu d'informations sur le sucre, cependant elle produit un pic de base qui représente le fragment de l'aglycone contenant le groupement CH_2^+ résultant de la perte du sucre sans son carbone ⁷.

a.2.2.2- EI- MS des C-glycosides perméthylés :

Les spectres de masse des mono et di-C-glycosides perméthylés donnent des pics moléculaires d'intensités (15-100%) ⁵².

Pour les dérivés mono-C-glycoside perméthylés, la SM permet de distinguer les 6-C-glycosides de leurs isomères 8-C-glycosides.

Les dérivés di-C-glycosides se distinguent par la différence d'intensités des pics relatifs aux sucres perdus, tableau-XII ^{7, 52, 53}.

Tableau – XII : Quelques pics des C-glycosides perméthylés

	C-glycosides	Intensité relative des pics caractéristiques
Mono- C-glycosides	8-C-glycosides	Absence du pic M^+-31 Présence de M^+ (d'intensité 60à100%)
	6-C-glycosides	M^+-31 pic intense M^+ d'intensité 20 à 40 %
6,8-di-C-glycosides	6,8-di-C-glycosides	M^+-31 (généralement pic de base)
	6-C-pentosides	$M^+-31 > M^+-175$
	6-C-hexosides	$M^+-175 > M^+-131$
	6-C-rhamnosides	$M^+-145 > M^+-175$
	6-C-arabinosides	$M^+-131 > M^+-119 > M^+-145$
	6-C-xylosides	$M^+-119 > M^+-131 > M^+-145$

b- Spectrométrie de masse à bombardement atomique rapide (FAB) :

Cette technique récente permet de connaître l'ion moléculaire et la nature des sucres ⁵⁴ des molécules hétérosidiques polaires peu volatils, ou de poids moléculaires élevés qui ne peuvent être analysés directement en SM par impact électronique ⁵⁵.

L'échantillon solide déposé sur une cible est bombardé par un faisceau d'atomes neutres (Ar, Xe, Cs, ...).

Le bombardement par des électrons d'atomes d'argon fournit des ions Ar^+ , qui à suite d'une accélération sont retransformés par fixation d'électrons en atomes d'une énergie équivalente à celle des ions.

Le produit est dissout dans une matrice liquide visqueuse (glycérol / H_2O , ou thioglycerol), cela a pour avantage de fournir une surface contenant continuellement des molécules durant la désorption ^{56, 57}.

Pour une FAB standard, il faudrait mélanger 1 μ l de solution aqueuse de produit à analyser avec 2 à 4 μ l de glycérol ⁵⁸.

Le spectre de masse obtenu est caractérisé par des ions pseudo-moléculaires, $(M+H)^+$; $(M+Na)^+$ dans les spectres d'ions positifs et les ions $(M-H)^-$; $(M-Na)^-$ dans les spectres d'ions négatifs, d'où la FAB positive et la FAB négative.

La méthode FAB est caractérisée par ^{55, 59, 60} :

- La durée de vie importante de l'échantillon qui permet de travailler pendant un temps relativement long avec le même échantillon.
- L'ionisation des échantillons se fait à basse température, la volatilisation n'est pas nécessaire.
- Le spectre de masse peut être obtenu pour des molécules de poids moléculaires élevés.
- Cette méthode fournit, dans les spectres, des ions quasi-moléculaires négatifs en plus d'ions fragments significatifs pour la structure.
- Eviter la dérivation des composés (que certains d'entre eux ne supportant pas) mais fournit un nombre d'information structurales souvent beaucoup limité (valeurs de la masse moléculaire et des masses du sucre et de l'aglycone) que la méthode d'impact électronique appliquée avec dérivés hétérosidiques.

L'inconvénient mineur de cette méthode est la production des ions additionnels dus à l'interaction avec les matériaux de la matrice comme par exemple le mélange glycérol-eau qui peuvent compliquer l'interprétation du spectre^{13, 54}.

Troisième chapitre : _____

***Matériel végétal et méthodes
expérimentales***

III.1- Rappel botanique :**III.1.1- Description :**

Teucrium polium : feuilles linéaires ou lancéolées à marges en général révolutes, denticulées, crénelées, inflorescences en têtes denses capituliformes ou un peu allongées, à bractées florales réduites mais semblables aux feuilles, espèce très polymorphe, où la détermination des micromorphes reste toujours délicate.

III.1.2- Répartition géographique :

Le genre *Teucrium* est l'un des plus riches en espèces, il compte plus de 300 espèces réparties sur différents pays du bassin méditerranéen. Une vingtaine de cette espèce poussent spontanément en Algérie, elles prédominent dans la région du tell³ et seule une révision générale permettra de préciser leur valeur réelle.

III.1.3- Systématique de la plante :

La systématique de la plante est résumée comme suit :

- Embranchement : *Angiospermes*
- Classe : *Dicotylédones*
- Ordre : *Tubiflorae*
- Famille : *Labiées* ou *lamiacées*
- Genre : *Teucrium*
- Espèce : *Polium L*
- Ssp : *Thymoides*.

III.2- Etude chimique :

III.2.1- Matériel végétal :

L'extraction des composés phénoliques d'un tissu végétal est toujours un problème difficile, et il ne semble pas qu'il existe actuellement des méthodes tout à fait satisfaisantes. L'aspect important du problème de l'extraction des composés phénoliques, c'est que les cellules végétales contiennent différents types d'enzymes, susceptibles de provoquer des modifications dans les composés phénoliques lors de l'extraction, en particulier des polyphénol-oxydases et glycosidases. Sous l'action des glycosidases, les hétérosides complexes peuvent être transformés en hétérosides plus simples ou même en aglycones ⁶¹. En général on peut éliminer cet inconvénient par séchage rapide du matériel, aussitôt après sa collection.

La plante a été récoltée au mois de Juin 2000 dans la région de Boukhadra, Wilaya de Tébessa à l'est de l'Algérie. Cette région est connue par son climat subsaharien. La partie de la plante utilisée est constituée de feuilles, tiges, fleurs (partie aérienne).

III.2.2- Tests chimiques d'identifications:

On procède aux tests chimiques d'identifications, de la manière suivante:

- Flavonoïdes :

Macérer 10 g du produit dans 150 ml d'HCl à 1% pendant une nuit, filtrer et procéder aux tests.

-Prendre 10 ml du filtrat, le rendre basique par NH₄OH. L'apparition de la couleur jaune clair indique la présence des flavonoïdes.

- Ajouter 5 ml du filtrat, 2.5 ml d'alcool amylique, la phase alcoolique colorée en jaune indique la présence des flavonoïdes libres.

- Evaporer la phase aqueuse du test précédent sous vide, ensuite dissoudre le précipité dans 3 ml d'HCl à 1% en chauffant légèrement, refroidir et ajouter 2.5 ml d'alcool amylique. L'apparition de la couleur jaune indique l'existence de glycosides de flavones.

- Alcaloïdes :

Prendre 10 g du produit et l'extraire avec 50 ml d'HCl à 1% dilué, rendre l'extrait basique avec NH_3 puis extraire le mélange trois fois avec CHCl_3 , chaque fois 20 ml Evaporer la phase organique puis dissoudre le précipité dans 2 ml d'HCl à 1% dilué. Ajouter à la solution acide trois gouttes du réactif de Mayer, l'apparition d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes.

- Huiles essentielles :

Prendre environ 10 g du produit sec broyé, le mettre dans un appareil à entraînement à la vapeur selon la norme (E.P.1953), chauffer doucement pendant 4 à 5 heures ; l'apparition d'une couche huileuse sur le distillat indique la présence des huiles essentielles.

- Saponosides :

Prendre 2 g de produit sec, le chauffer dans 80 ml d'eau distillée, filtrer et refroidir la solution, agiter le filtrat. L'apparition de mousses indique la présence des saponosides.

- Cardénolides :

Prendre 1 g du produit sec, macérer dans 20 ml d'eau distillée et filtrer, prélever 10 ml du filtrat. Celui-ci est ensuite extrait avec un mélange de 10 ml CHCl_3 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, évaporer la phase organique, dissoudre le précipité dans 3 ml d'acide acétique glacial. Ajouter quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 suivie de 1 ml d' H_2SO_4 . La présence de la couleur verte bleue dans la phase acide implique la présence des cardénolides.

- Tanins :

Prendre 10 g du produit, l'extraire avec de l'alcool éthylique 50°, filtrer puis tester le filtrat avec quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 . L'apparition d'une couleur verte indique la présence des tanins.

- Stéroïls non saturés et terpènes :

Prendre environ 5 g de produit, le dissoudre dans 20 ml de CHCl_3 , filtrer, ajouter au filtrat 1 ml d' H_2SO_4 avec précaution sur les parois du tube. Le point de rencontre entre les deux phases donne une couleur verte, qui indique la présence des stéroïls insaturés et les triterpènes.

III.2.2.1-Résultats des Tests chimiques d'identifications :

Avant d'entamer le travail expérimental, la matière végétale réduite en poudre, subit une série de tests chimiques, et les résultats obtenus sont les suivants :

	<u>Poudre végétale</u>
- Flavonoïdes	+
- Glycosides	+
- Alcaloïdes	-
- Huiles essentielles	+
- Saponosides	+
- Cardénolides	+
- Tanins	+
- Stéroles non saturés et triterpènes	+

III.2.2.2- Extraction :

L'extraction des flavonoïdes se fait selon le protocole préconisé par LEBRETON (1967)⁶² modifié par BOUTARD (1972)⁶³, GONNET (1973)⁶⁴ et JAY (1975)⁶⁵.

La matière végétale réduite en poudre (200 g), subit une macération dans 1500 ml d'un mélange méthanol-eau (70 : 30 en volume) trois fois pendant 24 heures et une quatrième fois à chaud, avec agitation mécanique. Après filtration, les diverses fractions récupérées sont réunies et évaporées à sec sous pression réduite à une température inférieure à 50°C jusqu'à l'obtention d'un résidu sirupeux. On reprend avec de l'eau distillée bouillante, on laisse décanter une nuit dans un endroit froid afin d'éliminer les composés hautement lipophiles (la chlorophylle, les cires, les résines, la boue...).

La solution aqueuse ainsi dégraissée subit une ou plusieurs filtration sur verre fritté n° 3 ou 4. Cette opération facilite l'étude chromatographique.

La phase aqueuse obtenue subit trois extractions successives avec l'acétate d'éthyle (500 ml), les trois fractions sont réunies et évaporées à sec sous pression réduite. L'extrait obtenu pesé 5.2 g (rdt = 0.74%). L'acétate d'éthyle permettra d'extraire essentiellement les aglycones et certaines hétérosides (les mono-O-glycosides et une partie des di-O-glycosides). La phase aqueuse extraite par l'acétate d'éthyle, subit trois extractions successives au n-butanol (500 ml), les trois fractions sont réunies et évaporées à sec sous pression réduite, ce qui permet d'obtenir un extrait de masse 27.2 g (rdt = 3.89%). Le n-butanol entraîne le reste des di-O-glycosides, les tri-O-glycosides et les C-glycosides ⁴⁶.

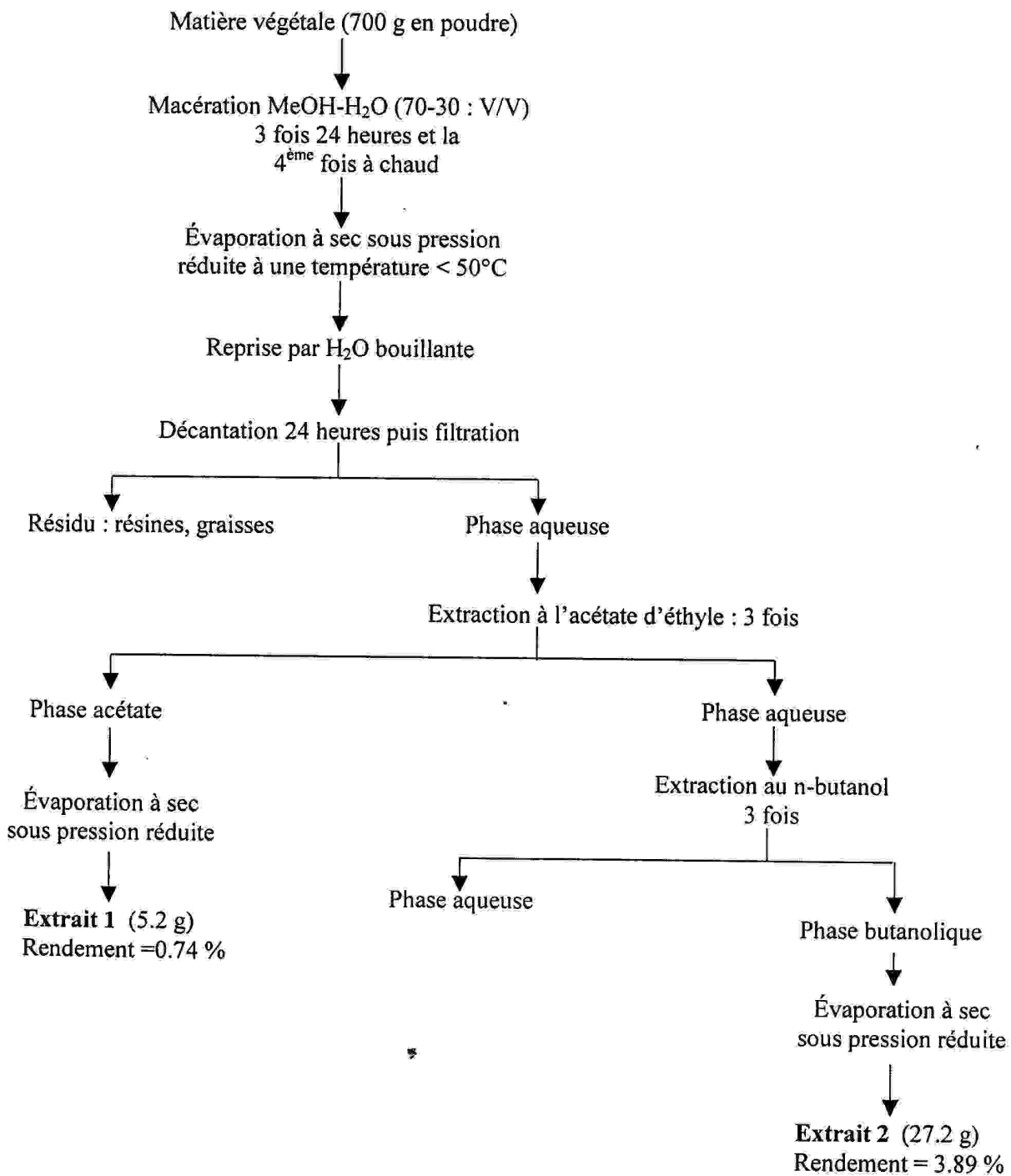


Schéma 3 : Extraction des flavonoïdes.

III.3- Séparation et purification :

La séparation et la purification des produits flavoniques ont été essentiellement réalisées par des méthodes chromatographiques :

- Chromatographie sur couches minces.
- Chromatographie sur colonne.
- Chromatographie sur papier.

III.3.1- Chromatographie analytique sur couches minces :

C'est une étape dont le but est de donner une image d'ensemble du contenu flavonique de l'échantillon, et de choisir les meilleurs solvants (ou mélanges de solvants) pour une meilleure séparation.

III.3.2- Chromatographie sur couches minces :**III.3.2.1- Préparation des plaques :**

On opère sur des couches de silica-gel (Kieselgel 60 G) préparées au laboratoire et cela en étendant sur des plaques de verre un mélange contenant 30 g de silica- gel (Kieselgel 60 G) et 3 g de $MgSO_4$ anhydre comme fixateur dans 90 ml d'eau distillée. Ce mélange sert à préparer six plaques (20 x 20 cm), puis sécher dans une étuve à une température avoisinante de 80°C pendant 24 heures.

III.3.2.2- Séparation de l'extrait brut :

Deux grammes (2 g) de l'extrait brut d'acétate d'éthyle dissout dans un minimum de méthanol, subit une première séparation par chromatographie sur couches minces. La solution méthanolique est étalée sur la plaque chromatographique à l'aide d'une pipette de pasteur, on laisse sécher, puis on émerge la plaque dans la cuve de développement contenant l'éluant, un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole (3 : 2 en volume), dès que l'éluant atteint le front de la plaque, on retire la plaque, on laisse sécher sous la hotte, puis exposée sous la lumière UV. Cette technique révèle la présence de quatre bandes de produits distincts.

Les différentes bandes de produits présentes dans le chromatogramme sont délimitées, sous lumière UV selon leurs fluorescences, grattées et éluées dans le méthanol, après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite permettant d'avoir quatre fractions de produits (F1, F2, F3 et F4) de masse: 80 mg (Rdt = 4 %), 100 mg (Rdt = 5 %), 360 mg (Rdt = 18 %), 300 mg (Rdt = 15 %), respectivement.

III.3.3- Chromatographie sur colonne :

Elle s'apparente étroitement à la CCM, ici cependant, la phase stationnaire, silica-gel (Kieselgel 40) remplit une colonne de longueur et de section variable.

La chromatographie sur colonne permet la séparation de quantités importantes de produits, ou encore comme moyen de purification pour les composés isolés par une chromatographie sur couches minces.

III.3.3.1- Séparation et purification par chromatographie sur colonne :

Les quatre fractions, sont chromatographiées sur colonne remplit de silice (Kieselgel 40), l'élution se fait par l'éther de pétrole enrichi à l'acétate d'éthyle (V/V : 30/70, 40/60, 50/50, 60/40), pour la première et la quatrième fraction, l'élution se fait à l'aide de l'éther de pétrole enrichi à l'acétone (30 : 70, 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40 en volume), pour la deuxième et la troisième fraction, suivi le contrôle sur CCM analytique. Les fractions de produits récupérées sont évaporées sous pression réduite, et reprises par un minimum de chloroforme (ou du méthanol).

Finalement, on a aboutit à six produits (P1, P2, P3, P4, P5 et P6) de masses: 110 mg (Rdt = 5.5%), 180 mg (Rdt = 9%), 140 mg (Rdt = 7%), 50 mg (Rdt = 2.5%), 60 mg (Rdt = 3%), 300 mg (Rdt = 15%), respectivement.

III.3.4-Chromatographie sur papier :

C'est la méthode chromatographique la plus ancienne pour séparer les mélanges des composés polaires comme les glucosides flavoniques¹³. Malgré son pouvoir séparateur limité dans le cas de mélanges complexes, elle demeure une technique courante au laboratoire, notamment dans l'analyse des fractions simples issues de la colonne.

Le papier Wathman n° 3 (46 x 57 cm) est l'un des supports les plus convenant pour séparer et purifier les flavones et flavonols glycosylés, car il présente l'avantage d'accumuler d'assez importantes quantités de produits.

Les systèmes de solvants utilisés sont nombreux ; parmi les usuels citons :

- AcOH : Acide acétique à différentes concentrations de 5 à 70%.
- BAW (4/1/5) : n-Butanol-Acide acétique-Eau.
- MAW (4/1/5) : Méthanol-Acide acétique-Eau.
- TBAW (3/1/1) : Tertiobutanol-Acide acétique-Eau.

Pour une chromatographie monodimensionnelle avec l'acide acétique à 15%, un aglycone s'éloigne peu de la ligne de départ, tandis qu'un glucoside a un facteur de rétention proportionnel au nombre de sucres liés, où un dioside migre plus qu'un monoside ⁶⁶.

La chromatographie bidimensionnelle donne en générale une très bonne séparation des hétérosides flavoniques. Dans le cas de micro-échantillons, cette méthode peut conduire à l'isolement des produits purs ⁶⁷.

Après développement du chromatogramme en mode descendant, les bandes correspondantes aux composés flavoniques sont délimitées sous lumière UV (254-365 nm) puis découpées. Les produits flavoniques de chaque série de bandes sont récupérés par deux méthodes :

La première consiste à broyer les bandes et l'imprégner dans l'éthanol chaud. Le filtrat obtenu est évaporé à sec puis repris par un minimum de méthanol.

La deuxième consiste à faire une migration descendante à front perdu pour chaque bande de produit avec du méthanol. Cette méthode est plus avantageuse que la précédente car les fractions qui sont issues contiennent moins de cellulose.

III.3.4.1- Séparation et purification par chromatographie sur papier :

L'analyse par spectroscopie UV-Visible des six produits dissous dans le méthanol montre que le 1^{er} et le 4^{ème} n'appartiennent pas à la famille des flavonoïdes, seuls les produits n° 2, 3, 5 et 6 ont montré des absorptions caractéristiques des composés flavoniques.

Notre étude est portée sur le produit n° 6 car on l'a obtenu avec une quantité suffisamment grande par rapport aux autres (n° 2, 3 et 5).

Un examen chromatographique sur papier cellulose de ce produit avec une solution aqueuse de AcOH à 20% comme éluant, a montré l'existence de plusieurs composés.

Le produit n° 6 ayant subi une chromatographie descendante à front perdu sur papier WATHMAN n°3, avec une solution aqueuse à 20% d'AcOH comme éluant, l'opération a duré 42 heures. Après cela le papier est séché à l'air libre, puis découpé en petits morceaux. Ces morceaux sont extraits à chaud avec du méthanol. L'opération d'extraction est suivie d'une évaporation du solvant à sec sous pression réduite. Les fractions obtenues sont reprises par un minimum de méthanol. Finalement on a obtenu trois composés purs notés A, B, C.

L'analyse par spectroscopie UV-Visible du composé C a montré que ce dernier n'appartient pas à la famille de flavonoïdes. Par contre le test est avéré positif pour les composés A et B.

La série spectrale UV-Visible avec réactifs spécifiques pour les composés A et B est résumée dans les tableaux 1 et 2 du quatrième chapitre.

Quatrième chapitre : _____

Résultats et discussions

IV.1- Etude structurale des composés flavoniques de la plante *Teucrium polium L.* :

L'extraction et la purification des composés flavoniques a été réalisée grâce à l'utilisation des produits et supports chimiques suivants :

- Méthanol.
- Acétate d'éthyle
- n- butanol
- Acétone
- Chloroforme
- Na₂SO₄ anhydre
- MgSO₄ anhydre
- Silica-gel : Kieselgel 40
- Silica-gel : Kieselgel 60 G
- Papier Watman n° 3 (46 x 57 cm)

L'identification des composés flavoniques a été réalisée par des méthodes chromatographiques et spectrométriques.

IV.1.1- Méthodes Chromatographiques :

La fluorescence des composés flavoniques a été déterminée par l'exposition de ces derniers à la lumière ultra- violette (254-365 nm).

IV.1.2- Méthodes Spectrométriques :

- Les spectres UV-Visibles des composés isolés ont été obtenus avec un appareil type **SHIMADZU UV-160A**

IV.2- Etude structurale du composé A :

IV.2.1- Comportement chromatographique :

Couleur : bleu claire fluorescente.

IV.2.2- Comportement spectrométrique :

Tableau-I : Données spectrales de l'UV- Visible du composé A :

Réactifs	$\lambda(\text{nm})$					$\Delta\lambda(\text{nm})$ Déplacements	
	BII		BI			BII	BI
	BIIb	BIIa	BIIb	BIa			
MeOH	258	268		344			
NaOH	265		dégénérescence instantané de la bande				
AlCl ₃	270	300		396			+52
AlCl ₃ + HCl	263	280	298	350	370		+26/MeOH -26/AlCl ₃
NaOAc	266			350		-2	
NaOAc + H ₃ BO ₃	260			371			+27

L'apparition d'une fluorescence bleu-claire en UV et d'un maximum d'absorption d'une bande I situé à 344 nm dans le méthanol indiquent une structure de flavonol. Une bande d'absorption II composée d'un pic à 258 nm et un épaulement à 268 nm annonce un noyau B polysubstitué.

L'addition d'une solution de NaOH provoque une instabilité instantanée (dégénérescence) de la bande I, ceci à cause de la décomposition alcaline. Cette dégénérescence nous oriente vers une hypothèse de 3, 3', 4'- tri OH, ceci est prouvé par :

- La fluorescence bleu-claire en UV.

- La comparaison des spectres UV-Visible du composé A en présence de AlCl₃+ HCl d'une part et de AlCl₃ d'une autre part, montre un déplacement hypsochrome de la bande I avec $\Delta\lambda = -26$ nm, ce qui prévoit un système ortho-dihydroxylé en position 3' et 4'. Cette dernière hypothèse est confirmée par le déplacement bathochrome par rapport au méthanol de la bande I, avec $\Delta\lambda = 26$ nm dans le système NaOAc + H₃BO₃.

L'absence d'un pic entre 320-335 nm nous oriente vers l'hypothèse d'un 7-OH bloqué, ceci est confirmé par le faible déplacement de la bande II avec $\Delta\lambda = -2$ nm dans NaOAc.

L'addition d'une solution de AlCl_3 conduisant à un déplacement bathochrome de la bande I avec $\Delta\lambda = 52$ nm, signifie la présence d'un groupement hydroxyle en position 5, ceci est prouvé par un autre déplacement bathochrome de la bande I avec $\Delta\lambda = 26$ nm dans le système $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au méthanol. De plus ce dernier déplacement est significatif de l'existence d'une O-oxygénation en position 6 (Voirin, 1983) ⁶⁶.

Cette étude nous a permis de conclure que le composé A, a la structure probable schématisée dans la figure 1.

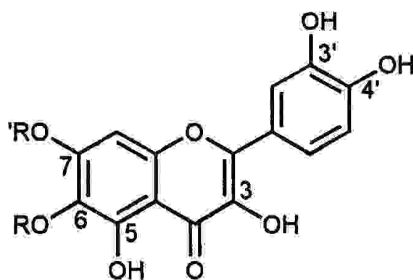


Figure 1 : structure probable du composé A

IV.3- Etude structurales du composé B :

IV.3.1- Comportement chromatographique :

Couleur : Violette fluorescente.

IV.3.2- Comportement spectrométrique :

Tableau-II : Données spectrales de l'UV- visible du composé B :

Réactifs	$\lambda(\text{nm})$				$\Delta\lambda(\text{nm})$ Déplacements	
	BII		BI		BII	BI
	BIb	BIa	BIb	BIa		
MeOH	258	272		344		
NaOH		275		403		+59
AlCl_3		275	*	391		+47
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	263	280 295		366		+22/MeOH -25/ AlCl_3
NaOAc		275		343 400	+3	
NaOAc + H_3BO_3		260		368		+24

La présence d'une fluorescence violette en UV et d'un maximum d'absorption d'une bande I à 344 nm dans le méthanol indiquent une structure de flavone, une bande II composée d'un pic à 258 nm et d'un épaulement à 272 nm annonce un noyau B polysubstitué.

L'addition d'une solution de NaOH provoque un déplacement bathochrome de bande I, $\Delta\lambda = 59$ nm avec une stabilité d'intensité, indique la présence d'un hydroxyle en position 4'. L'absence de pic entre 320-335 nm nous oriente vers l'hypothèse d'un 7-OH bloqué, ce qui est confirmé par le faible déplacement de la bande II avec $\Delta\lambda = 3$ nm dans NaOAc.

L'addition d'une solution de AlCl_3 conduisant à un déplacement bathochrome de la bande I avec $\Delta\lambda = 47$ nm, signifie la présence d'un hydroxyle en position 5, ceci est prouvé par un déplacement bathochrome de la bande I avec $\Delta\lambda = 22$ nm dans le système $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au méthanol. De plus ce dernier déplacement est significatif de l'existence d'une O-oxygénation en position 6 (Voirin, 1983)⁶⁶.

La comparaison des spectres UV-Visible du composé B dans $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ d'une part et de AlCl_3 d'une autre part, montre un déplacement hypsochrome de la bande I avec $\Delta\lambda = -25$ nm ce qui prévoit un système ortho-dihydroxylé en position 3' et 4', la confirmation de cette hypothèse est donnée par le déplacement bathochrome par rapport au méthanol de la bande I avec $\Delta\lambda = 24$ nm dans le système $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_2$.

L'apparition de la bande I situé à la même longueur d'onde sur les deux spectres de NaOH et NaOAc, $\lambda_{\text{max}}(\text{NaOH}) = \lambda_{\text{max}}(\text{NaOAc})$ témoigne d'une substitution de type OR et plus précisément d'un groupement OCH_3 en position 7 (Bacon et Coll., 1976)³⁴. On remarque d'une part que dans le méthanol la position de la bande II est inférieure à 279 nm et d'autre part la bande I apparaît sous forme d'un seul pic dans $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ à une longueur d'onde inférieure à 368 nm, ces deux données caractérisent un méthoxyl en position 6 (Voirin, 1983)⁶⁶.

Toutes ces données apportent que le composé B a probablement la structure du cirsiolol (5,3',4'-tri OH 6,7 OMe flavone), qui est représentée par la figure 2.

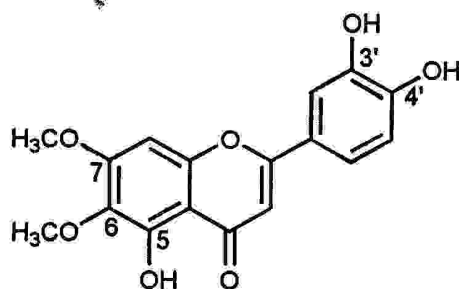


Figure 2 : structure du composé B (Cirsiolol)

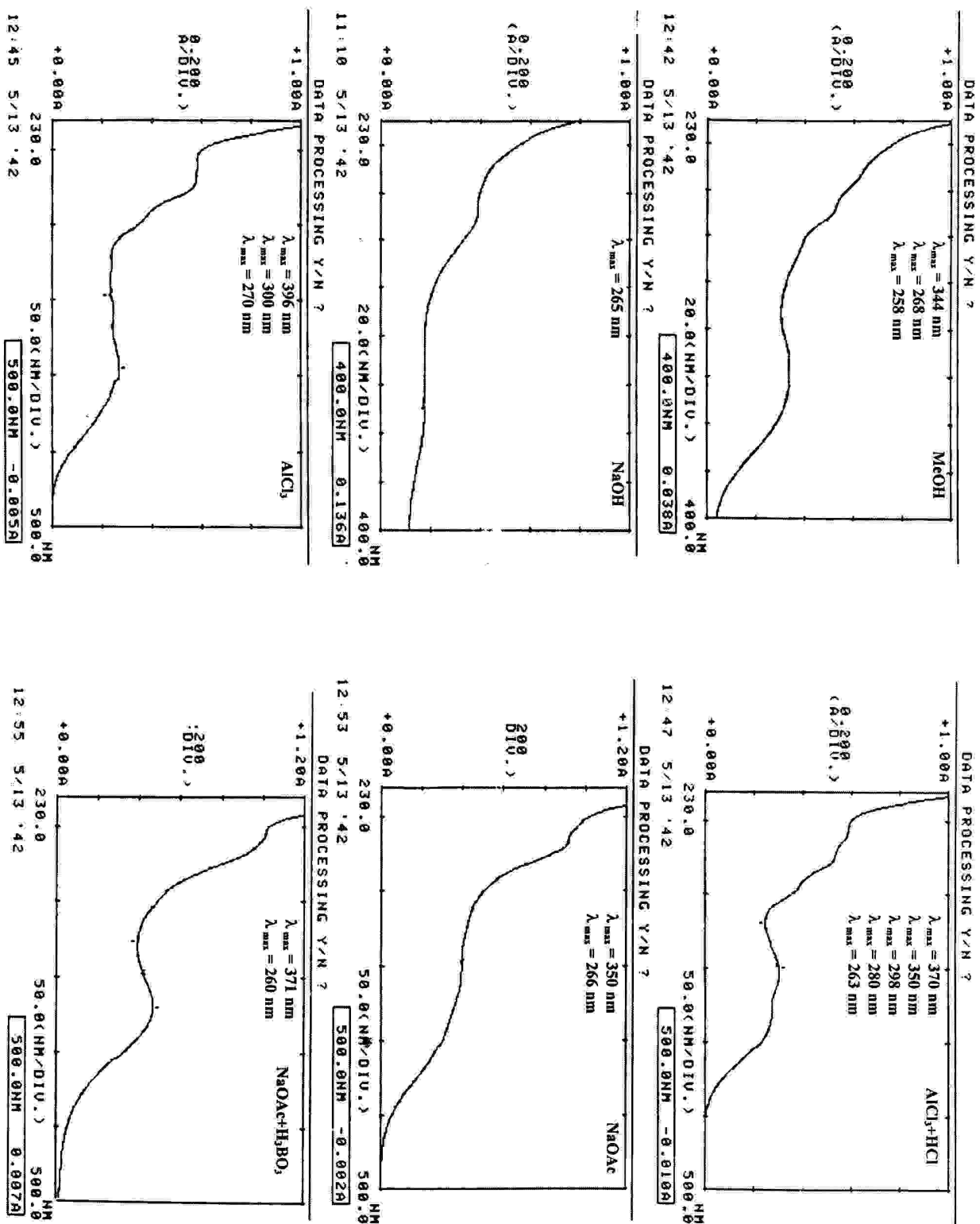


Fig. 1 : Spectres UV-Visible du composé A

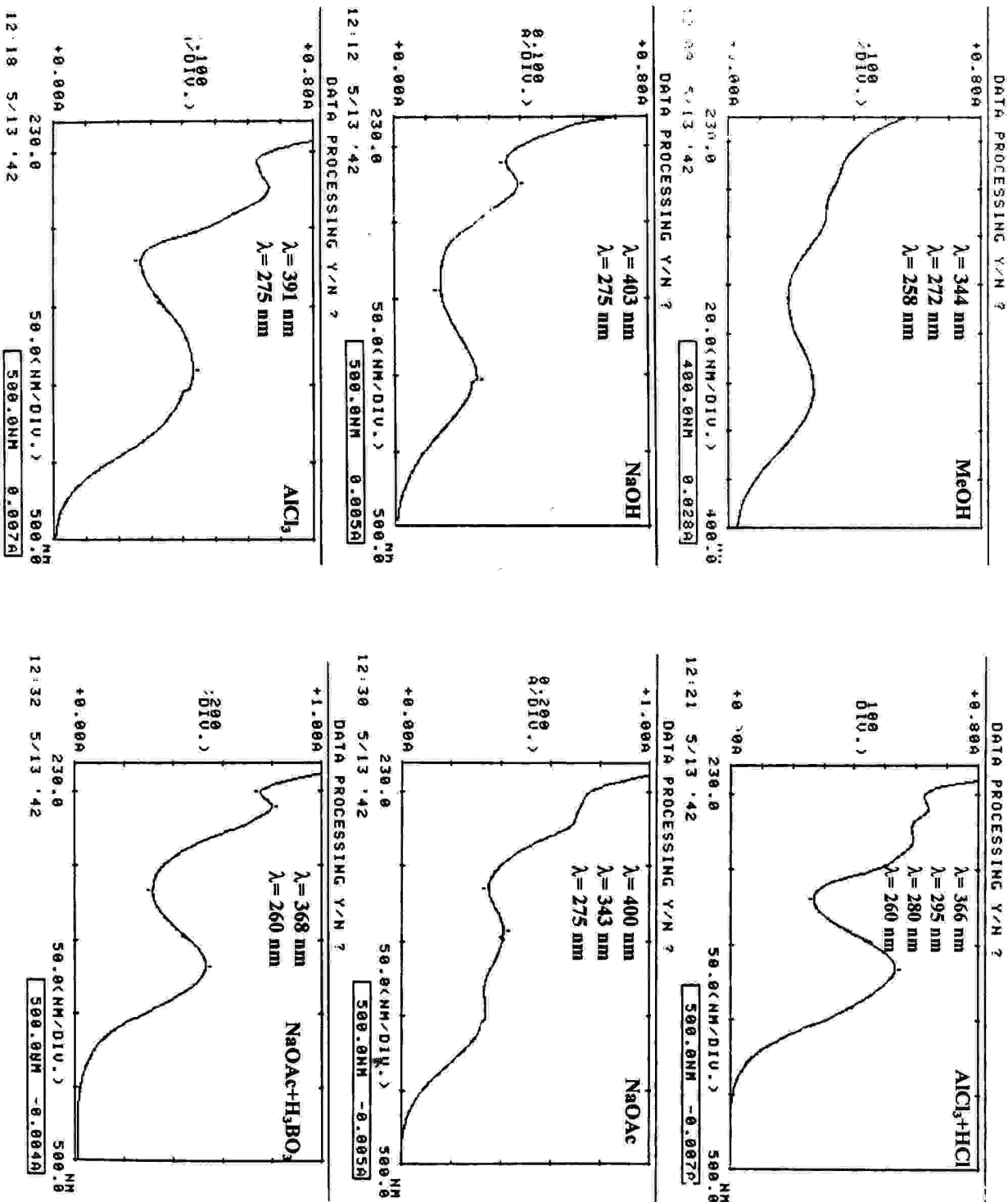


Fig. 2 : Spectres UV-Visible du composé B

Conclusion Générale

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'étude expérimentale du chimisme flavonique de l'espèce *Teucrium Polium L.*, a montré la présence d'aglycones flavoniques libres et des hétérosides (glucosides).

L'extraction des aglycones flavoniques et des hétérosides est obtenue avec des rendements variés, selon la nature des composés isolés (aglycone ou hétéroside).

- Les aglycones flavoniques ont été obtenus avec un rendement de 0,74%.
- Les hétérosides ont été obtenus avec un rendement de 3,89%.

L'analyse phytochimique des pigments flavoniques de la plante *Teucrium Polium L.*, a été réalisée grâce à des méthodes chromatographiques et spectrométriques.

L'analyse par l'UV-fluorescence a donnée une identification préliminaire de la nature des composés flavoniques isolés. Ces derniers se présentent sous forme de spots colorés, dont certains sont fluorescents, surtout les structures flavones et flavonols, que l'UV-fluorescence donne leur mode de substitution et la position des hydroxyles attachés aux noyaux A et B.

La spectrométrie UV-visible nous a permis d'identifier la nature de l'aglycone et la position des différents substituants sur le squelette flavonique et ceci grâce à l'addition de réactifs spécifiques.

Finalement, notre contribution à l'étude phytochimique de l'espèce *Teucrium Polium L.*, nous a permis d'isoler trois composés purs dont deux sont des flavonoïdes. Suite à ces résultats, il est recommandé de faire une étude plus poussée, pour élucider la nature du glycosyl et le type de la liaison sucre-aglycone, en utilisant des techniques de pointes tels que : L'HPLC couplée à la masse, l'RMN 2D homonucléaire (^1H , ^1H -COSY), l'RMN hétéronucléaire (^1H , ^{13}C -COSY) et la spectrométrie de masse.

A ceci, il est intéressant de faire une étude reliant la composition flavonique a l'activité pharmaceutique des plantes de la famille des *Labiées*.

Bibliographie

Bibliographie

1. ERNEST SOMON. *Arbres, arbustes et arbrisseau en Algérie*, p.133, édition OPU (1987).
2. K. NASSIRA. *Thèse de Magister Université de Constantine Institut de chimie*, p.3-22, (1998).
3. QUEZEL P., SANTA S. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome II, p.790, C.N.R.S, (1963).
4. HARBORNE J.B., BARBERAN F.A.T. *A chemotaxonomic study of flavonoïds from European Teucrium species*, phytochem. **25**, p.2811-2816, (1986).
5. PARIS M. et HURABIELLE M. *Abrégé de matière médicale (pharmacognosie)*. Tome I. Ed : Masson, Paris, New York, (1981).
6. OLIVIER – BEVER BEP. *Medical plants in tropical West Africa*. Cambridge University press , (1986).
7. MARKHAM K.R. *Techniques of flavonoids identification*. Academic press, London, (1982).
8. PUPPO A. *Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-Type reactions; influence of the iron chelaton*. Phytochemistry **31**, p.85-88, (1992).
9. GAYON P.R. *Les composés phénoliques des végétaux*, Ed : Dunod, (1968).
10. GONNET J.F. *Apport de la biologie micromoléculaire (flavonoïdes) à la compréhension de la structure et du fonctionnement de l'espèce allogame Centaurea montana (composées) thèse de doctorat d'état*, Université CLAUD-BERNARD, Lyon I, (1989).
11. BENSEGHENI. *Thèse de magistère*, Institut de biologie, Constantine, (1987).
12. WOLLENWEBER E. and JAY M. *Flavones and flavonols in «The flavonoids»*, (HARBORNE J.B.) Ed: Chapman and Hall, London, p.223-295, (1988).

BIBLIOGRAPHIE

13. MARKHAM K.R. *Flavones, flavonols and their glycosides in « Methods in plant biochemistry»*, (DEY P.M. and HARBORNE J.B.). Academic press. Vol.I, Chapitre 6, p.197-232, (1989).
14. LARDY C., BOUILLANT M.L., CHOPIN J. *Journal of chromatography*. Vol.291, p.307-315, (1984).
15. UNDERHILL E.W., WALKIN J.E., NEISH A.C. *Canad. J.BIOCHEM. PHYSIO.*, **35**, p.219, (1957).
16. HARBORNE J.B., and MABRY T.J. *The flavonoids: advances in research since 1980*. Ed: Chapman and HALL, London, (1988).
17. CODY V., MIDDLETON E., HARBORNE J.B. *Progress in chemical and biological research*. Vol.280, (1987).
18. BRASSEUR T. *J. Pharma. Bell* **44**, 235, (1989).
19. BIDET D., GAIGNAUT J.C., GNARD P., POTIER P. *Actual. Chim.* **4**, 89, (1987).
20. BRUNETON J. *Eléments de phytochimie et de pharmacognosie, technique et documentation*, Lavoisier, (1987).
21. CODY V., MIDOELTON E., HARBORNE J.B. *Progress in clinical and biological research*. Vol.218, (1987).
22. BEZANGES SEAUQUESNE. *Plantes médicinales et phytothérapie*. Tome **XXI** n° 1, p.79-93, (1987).
23. HARBONE J.B., MABRY T.J., and MABRY H. *The flavonoïds*. Tome **I,II**. Ed : Chapman and Hall, London, (1975).
24. MATSUBARA Y., SWABE A., MIZAMO T., LIZUKA Y. *Daigaka Igaka Zasshi* **12**, 89, (1987).
25. PRATTDAN E. *Natural antioxydants not exploited commercially in food antioxydants*, edited by Hudson B.J.F., Elsevier Applied Science, London and New York, p.176, (1990).

BIBLIOGRAPHIE

26. HARBONE J.B. *Flavonoids, in phytochemistry, organic metabolites*, Vol. II, edited by P.M. Miller, (1973).
27. BARBERAN F.A.T., TOMAS-LORENTE F., and GARCIA-GRAUM. *The wastes of the industrial treatment of salvia lavandulaefolia as Source of biologically active flavonoids*. *Fitoterapia*, **59**, p.62-64, (1988).
28. MABRY T.J., MARKHAM M.R., THOMAS M.B. *The systematic identification of flavonoids*, Springer-Verlag, New York, (1970).
29. VOIRIN B. *Thèse de doctorat*, Université de Lyon, (1970).
30. GEISSMAN T.A., HARBONE J.B. *Biochem. Biophys.*, **55**, p.447, (1955).
31. JURD L. *Spectral properties of flavonoids compounds, in "the chemistry of flavonoid compounds"*, Pergamon press, (1962).
32. HARBORNE J.B, SIMMONDS N.W. *In Biochemistry of phenolic compounds*, J.B. Harborne, editor: academic press, (1964).
33. MARKHAM K.R., MABRY T.J. *Ultra violet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids in "The flavonoids"*, Chapman and Hall, p.45-77, (1976).
34. BACON J.D., MABRY T.J., MEARS J.A. *UV spectral procedures for distinguishing free and substituted 7-hydroxy groups in flavones and flavonols*. *Rev. Latinoam. Quim*, **7**, p.83-86, (1976).
35. MEARS J.A., MABRY T.J. *Phytochem.* **11**, p.411, (1972).
36. COMBIER H. *Thèse de doctorat* Université Claude-Bernard, Lyon I, (1968).
37. PAWAN K.A. *NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides*. *Phytochem.* **10**, p. 3307-3330, (1992).
38. MARKHAM K.R., and GEIGER H. *¹H Nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethyl sulfoxide* In « *the flavonoids advances in research since 1986* », (HARBORNE J.B.) Ed : Chapman and Hall, chapter **10**, p.441-473, (1993).

BIBLIOGRAPHIE

39. MARKHAM K.R., and MABRY T.J. *Ultraviolet-Visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids, chap. 2 et Mass spectrometry of flavonoids* In « *the flavonoids* », chap.3, (HARBORNE J.B., MABRY H.), Ed : Chapman and Hall, London. Tome I, p.46-126, (1975).
40. MABRY T.J. *The ultraviolet and nuclear magnetic resonance, Analysis of flavonoids in Perspectives in phytochemistry*, edited by HARBORNE J.B., p.1-45, (1969).
41. HARBORNE J.B. *The flavonoids advances in research since 1986, Chapman and Hall*, (1993).
42. WENKERT E., GOTTLIEB HUGO E. *Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and isoflavonoids compounds*. *Phytochemistry* **16**, p.1811-1816, (1977).
43. TERNAI B., MARKHAM K.R. *Carbon-13 NMR studies of flavonoids -I, flavones and flavonols*, *Tetrahedron*, **32**, p 565-569, (1976).
44. AGRAWAL P.K. *Carbon-13 NMR of flavonoids*, (1989).
45. MARKHAM K.R., TERNAI.B., STANLEY R., GEIGER H., MABRY T.J. *Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III*. *Tetrahedron*, Vol. **34**, p.1389-1397, (1978).
46. HASSAN A. *Contribution à l'étude biochimique de trois représentants de la tribu des Lotées : Dohyncium Vill, Bonjeania Reichneb, Lotus L. (Légumineuses)*. Thèse de doctorat de spécialité (3^{ème} cycle). Lyon, (1976).
47. CONSTANTIN E., SCHENELL A. *Spectrométrie de masse. Principes et application. Techniques et documentation*. Lavoisier, (1986).
48. HARBORNE J.B. *The flavonoids advances in research since 1980, Chapman and Hall*, New York (1988).
49. AUDIER H. *Etude des composés flavoniques par la spectroscopie de masse*, *Bull.Soc.Chim.Fr.* **9**, p 2892-2899, (1966).
50. ZAIDI F. *Thèse de magister*, Université de Constantine (1989).

BIBLIOGRAPHIE

51. SHMID R.D. *Tetrahedron*, Vol.28, p.3259-3269, (1972).
52. BOUILLANT M.L., BONVIN F., CHOPIN J. *Spectroscopie de masse des permethyl C-glycosy flavones*. *Phytochem.* 14, p. 2267-2274, (1975).
53. BESSON E. *Thèse de doctorat* (1977).
54. KAUNDUN Sh. *Etude phytochimique (Flavonoïdes) de Didy mopanax Morotoni Decne (Famille des Araliacées). Thèse, D.E.A de Biochimie (ISPB Faculté de pharmacie).* Lyon, (1991).
55. GONNRT J.F. *Apport de la biologie micromoléculaire (flavonoïdes) à la compréhension de la structure et du fonctionnement de l'espèce allogame Centaurea montanu (composées). Thèse de doctorat d'état, université Claude-Bernard, Lyon -I, (1989).*
56. CHRISTOPHER J.F., and NELL TOWERS G.H. *Inhibition of infectivity of potato virus by flavonoids*. *Phytochem.*31., N° 9, p. 3017-3020, (1992).
57. CARATINI R. *Les plantes*, ed : Bordas, Paris, (1984).
58. CAPRIOLI R.M. *Continuous flow Fast atom Bombardment mass spectrometry*, edited by Jhon Wiley and Sons, (1990).
59. BARBER M., BORDOLI R. S., DONALD R., TYLER A.N. *FAB of solids : A new ions source for mass spectroscopy*, *J.C.S. Chem. Commu.*, p. 325, (1981).
60. WILLIAMS D.H., BRADLEY C. *Fast atom bombardment mass spectrometry : A powerful technique for the study of polar molecules*. *J.Am. Chem. Soc.*, 103, p.5700-5704, (1981).
61. KIBERAU-GAYON P. *Les composées phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris, (1968).
62. LEBRETON P., et coll. *Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes*. *Chim. Anal. France* 49 (7), p.375-383, (1967).
63. BOUTARD B. *Contribution à l'étude des flavonoïdes de potamogeton natans L. et autres fluviales. Thèse de doctorat de spécialité (3^{ème} cycle)*. Lyon, (1972).

BIBLIOGRAPHIE

64. GONNET J.F., Jay M., VOIRN B., et LEBRETON P. *Récent développement dans l'analyse des aglycones flavoniques. Assemblée générale du « Groupe Polyphénols ».* Le pont de la marge. Suisse (1973).
65. JAY M., et Coll. *Sur l'analyse qualitative des aglycones flavoniques dans une optique chimio-taxonomique.* Phytochemistry 14, p.1605-1612, (1975).
66. VOIRIN B. *UV spectral differentiation of 5-hydroxy and 5-hydroxy, 5-methoxy flavones with mono (4'), di (3', 4') or (3', 4', 5') substituted B rings.* Phytochem.22, p.2107-2145 (1983).