

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

UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :

Série:

MEMOIRE
PRESENTE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE MAGISTER
EN CHIMIE

SPECIALITE
CHIMIE ORGANIQUE
Option : Analyses physico-chimiques et chimie organique
Par

Hanane AISSAOUI

**Recherche et détermination structurale des
métabolites secondaires de type flavonique d'une
espèce de la famille des Verbenacées**

SOUTENU LE : / / 2010

Devant le jury :

Président	: S. BENAYACHE	Prof.	Univ. Mentouri Constantine
Rapporteur	: R. MEKKIOU	MC.	Univ. Mentouri Constantine
Examineur	: F. BENAYACHE	Prof.	Univ. Mentouri Constantine
	: O. BOUMAZA	MC	Univ. Mentouri Constantine
	: O. SEGHIRI	MC.	Univ. Mentouri Constantine

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe de Phytochimie du laboratoire de Phytochimie et Analyses Physico_chimiques et Biologiques, Département de Chimie, Université Mentouri - Constantine.

Je tiens à remercier vivement mon encadreur, le docteur Mekkiou Ratiba, Maître de conférence au département de chimie – université Mentouri-Constantine, pour avoir dirigé ce travail avec compétence et professionnalisme, pour tous les conseils précieux qu'il m'a prodigués.

Je remercie l'ensemble des membres de jury : M. Benayache Samir, M^{me}. Benayache Fadila professeurs à l'Université Mentouri-Constantine, M. Seghiri Ramdane et M^{me} Boumaza Ouahiba Maîtres de conférences à l'Université Mentouri- Constantine, d'avoir bien voulu accepter et trouvé le temps pour lire le manuscrit de mon mémoire.

Je tiens également à remercier le professeur et le professeur Benayache Samir, pour le libre accès aux équipements du laboratoire, pour l'intérêt qu'ils portent au développement de la recherche et pour l'esprit d'équipe qu'ils ont su créer au sein du laboratoire. Qu'ils trouvent dans ce mémoire, le signe de mon respect et ma profonde reconnaissance.

J'adresse mes remerciements à M. Seghiri Ramdane et M^{me} Boumaza Ouahiba pour ses aides et ses conseils.

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 : M^{me} S. Mezhoud, M^{me} S. Bicha, M^{elle} L. Hammoud, M^{elle} K. Chebbah.

Je voudrais maintenant témoigner ma profonde gratitude à mes parents sans qui je ne serais jamais parvenue jusqu'ici, ils m'ont toujours encouragée et donné les moyens de réussir.

Abréviations et symboles :

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature, elles sont donc souvent issues de terminologie anglo-saxonne.

AcOEt : Acétate d'éthyle

APG : *Angiosperm Phylogeny Group*

BAW: *n*-butanol / Acide acétique/ Eau

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CDCl₃ : chloroforme deutéré

δ : déplacement chimique (en ppm)

d : doublet

Da : Dalton (unité de masse moléculaire)

DAD : détecteur à barrettes de diodes (*Diode Array Detector*)

dd : doublet dédoublé

DMSO-*d*₆ : diméthylsulfoxyde deutéré

EI : ionisation par impact électronique (*Electron Impact ionization*)

EtOH : éthanol

FAB : ionisation par bombardement d'atomes rapides (*Fast Atom Bombardment*)

IC: ionisation chimique

Glu : glucose

CHCl₃ : chloroforme

HPLC : chromatographie liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

J : constante de couplage

m : multiplet

m/z : masse / charge atomique

MeOH : méthanol

MS : spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*)

ppm : partie par million

R_f : rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMN¹³C: résonance magnétique nucléaire du carbone 13

RMN¹H : résonance magnétique nucléaire du proton

s : singulet

TEAC : Trolox Equivalent Antioxydant Capacity

t : triplet

Tol : Toluène

u.m.a: unité de masse atomique

UV : ultraviolet

Table des matières

<i>Introduction</i>	1
-------------------------------	---

*Chapitre I : Etude antérieure de l'espèce *Vitex agnus castus**

I.1 Description botanique.	3
I.2. Le genre <i>Vitex</i>	3
I.3. L'espèce <i>vitex agnus castus</i>	4
I.3.1. Classification botanique.	4
I.3.2. Description de l'espèce.	4
I.3.3. Répartition géographique.	5
I.3.4. Les noms communs / Synonymes.	5
I.4. Aspects historiques et usage traditionnel.	5
I.5. Etudes chimiques antérieures.	6
I.5.1. Les flavonoïdes.	6
I.5.2. Diterpenes.	11
I.5.3. Iridoïdes glycosides.	18
I.5.4. Huiles essentielles.	21
I.5.5. Les autres constituants.	21
I.6. Etude pharmacologique de l'espèce <i>Vitex agnus castus</i>	21

Chapitre II : Les flavonoïdes

II.1. Introduction.	23
II.2. Historique.	23
II.3. Chimie des flavonoïdes.	23
II.3.1. Définition.	23
II.3.2. Biosynthèse.	24
II.4. Classification des flavonoïdes.	26
II.4.1. Flavones et Flavonols.	26
II.4.2. Flavanones et Dihydroflavonols.	27
II.4.3. Flavan-3-ols, Flavan-3,4-diols et Anthocyanidols.	27
II.4.4. Chalcones et Aurones.	27
II.5. Substitution du squelette flavonique.	28
II.5.1. La <i>O</i> -substitution.	28

II.5.2. La C-substitution.	30
II.6. Distribution et localisation dans les plantes et le règne végétal.	30
II.7. Rôle des flavonoïdes dans les plantes.	31
II.8. Les flavonoïdes comme antioxydants.	32
II.8.1. Inhibition d'enzymes ou chélation des éléments traces impliqués dans la formation des radicaux.	32
II.8.2. Piégeage des radicaux.	32
II.9. Activités biologiques des flavonoïdes.	38
II.9.1. Effets antiallergiques.	38
II.9.2. Effets anti-inflammatoires.	38
II.9.3. Effets antiulcéreux.	38
II.9.4. Effets anticancéreux.	39
II.9.5. Autres effets biologiques.	38
II.10. L'étude chimique des flavonoïdes.	40
II.10.1. Extraction.	40
II.10.2. Séparation et purification.	40
II.11. Analyse structurale des flavonoïdes.	41
II.11.1. Généralités.	41
II.11.2. Facteur de retardement et comportement chromatographique.	41
II.11.3. La fluorescence sous lumière de Wood.	42
II.11.4. La spectrophotométrie UV-Visible.	43
II.11.5. La Spectrométrie de masse.	46
II.11.6. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N).	47

Chapitre III : Travaux personnels

III.1. Récolte de la matière végétale.	48
III.2. Extraction de la matière végétale.	48
III.3. Séparation chromatographique de l'extrait Acétate d'éthyle.	51
III.3.1. Séparation chromatographique sur colonne.	52
III.3.2. Séparation et purification des fractions sélectionnées.	57
III.5. Conclusion.	59

Chapitre VI : Interprétation des résultats

VI.1. Détermination de structure du composé H4.	60
IV.1.1. Fluorescence.	60
IV.1.2. Comportement chromatographique.	60
IV.1.3. La spectrophotométrie UV.	60
IV.1.4. Spectrométrie RMN ¹ H.	63
IV.1.5. Spectrométrie de masse.	67
IV.2. Détermination de structure du composé F _{16p}	69
IV.2.1. Comportement chromatographique.	69
IV.2.2. La spectrophotométrie UV.	70
IV.2.3. Spectrométrie RMN ¹ H.	73
IV.3. Détermination de structure du composé F _{24p}	76
VI.3.1. Comportement chromatographique.	76
IV.3.2. La spectrométrie de masse.	76
IV.3.3. La spectrophotométrie UV.	77
IV.3.4. Spectrométrie RMN ¹ H.	79
IV.3.5. Hydrolyse acide.	83
IV.3.6. Spectrométrie RMN ¹³ C.	85
<i>Conclusion.</i>	90
<i>Références.</i>	92

Introduction

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au Taxol, 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 400 000 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 [1].

Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte des nouvelles substances, si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires. Ce potentiel n'est que faiblement exploité, en effet, sur environ des milliers d'espèces végétales, seule une petite partie a fait l'objet d'investigations phytochimiques.

La flore Algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques [2], reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique.

Le genre *Vitex* (Verbenacées) a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques et pharmacologiques (activités oestrogéniques et progestérone anticancéreux, antibactérienne, cytotoxique) [47,53-55]. Ces travaux ont permis l'isolement de plusieurs types de produits dont les plus majoritaires sont les diterpènes, les flavonoïdes et les iridoïdes.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance de l'espèce *Vitex agnus-castus* connue dans la région de "Bachar" sous le nom de "Kef Meriem" et utilisée en médecine traditionnelle pour calmer les douleurs rhumatismales, afin de découvrir certains de ses constituants chimiques.

Cette étude consiste en l'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires notamment les flavonoïdes de l'espèce *Vitex agnus-castus*.

La présentation de notre manuscrit peut être répartie comme suit :

Une première partie, bibliographique, Comportant deux chapitres dont :

- Le premier sera consacré à une présentation botanique de la famille des verbénacées, au genre *Vitex*, aux travaux phytochimiques antérieurs relatifs aux métabolites secondaires les plus courants et reporte également les résultats relatifs aux activités pharmacologiques.
- Le deuxième sera consacré à l'étude bibliographique des métabolites secondaires (flavonoïdes), les différents squelettes flavoniques, leur biogenèse, leur diversité structurale et leur intérêt thérapeutique, reporte également toutes les démarches et les méthodes nécessaires à la séparation, la purification et l'établissement de structures de cette famille de substances naturelles.

Une deuxième partie, expérimentale, consacrée à la présentation de nos travaux personnels, comporte :

- 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.

Chapitre I

*Etude antérieure de l'espèce *Vitex agnus-castus**

I.1. Description botaniques:

Les Verbénacées est une famille de plantes dicotylédones, comprend environ 90 genres et près de 2000 espèces d'herbacées, de buissons et d'arbres. On distingue très communément des tiges à section quadrangulaire et un caractère aromatique dû à la présence d'huile essentielle. Les feuilles sont presque toujours opposées ou verticillées et simples, il n'y a pas de stipules. Les fleurs sont presque toujours bisexuées et zygomorphes elles sont de couleur bleu, lilas, rose ou blanchâtre. Le calice est synsépale et majoritairement pentamère. La corolle est sympétale et présente généralement cinq lobes inégaux. L'androcée consiste en quatre étamines didynames soudées au tube de la corolle ou à la zone périgyne et alternant avec les lobes. Le gynécée consiste en un seul pistil, presque toujours composé de deux carpelles, un seul style terminal ou subterminal, comprenant généralement quatre loculés (séparés par une fausse cloison), avec chacun un seul ovule axillaire. Un disque nectarifère peu développé, hypogyne et symétrique est présent chez de nombreuses espèces. Le fruit est une drupe composée de plusieurs nucules [3].

I.2. Le genre *Vitex* :

Le genre *Vitex* regroupe des arbrisseaux ou des petits arbres classés autrefois dans la famille des verbénacées, mais que la classification phylogénétique situe maintenant dans les lamiacées (APG II, 2003). Ils poussent dans les régions chaudes, et se reconnaissent notamment à leurs feuilles palmées. Le calice à 5 dents est généralement court. La corolle présente 5 lobes très inégaux formant plus ou moins 2 lèvres, le lobe inférieur étant nettement plus développé que les autres. Les 4 étamines font saillie, dépassant nettement la corolle et entourant un style à 2 stigmates. Le fruit est une drupe dont le noyau est divisé en 4 loges contenant chacune une graine.

Ce genre comprend plus de 200 espèces, parmi les quelles on cite :

- *Vitex negundo* L. : Aussi appelée indrasura (boisson enivrante d'Indra). Contient des flavonoïdes à effet anti androgène et une huile essentielle utilisée contre la fièvre et le rhumatisme.
- *Vitex mollis* Kunth. : Arbuste utilisé par les indiens Mayas comme plante décorative mais aussi pour ses fruits. Les feuilles prises en décoction, aideraient à remédier aux « douleurs du travail ».
- *Vitex trifolia* L. : utilisé comme épice, contre la fièvre et comme emménagogue.

➤ *Vitex agnus-castus*

- *Vitex agnus-castus* 'Alba' aux fleurs blanches.
- *Vitex agnus-castus* 'Latifolia' plante plus vigoureuse.
- *Vitex agnus-castus* 'Rosea' aux fleurs roses.

I.3. Espèce *vitex agnus-castus*:

I.3.1. Classification botanique:

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Verbenaceae
Genre	<i>Vitex</i>
Espèce	<i>Agnus-castus</i>

I.3.2. Description de l'espèce:

Vitex agnus-castus est un arbuste à feuilles caduques qui atteint une hauteur jusqu'à 5m. Les feuilles sont opposées, à pétiole allongé, composé de cinq à sept folioles rayonnant qui sont supportés sur une tige principale. Les folioles vertes sont linéaires, lancéolées, dentées, sombre sur le dessus et gris en dessous. Les fleurs sont parfumées, de coloration bleu, lilas, rose ou blanc. Les baies ressemblent à grains de poivre, dur, d'un pourpre à la peau noire, jaunâtre à l'intérieur, à moitié couvert par leur sage-calices verts et contenant quatre graines. L'odeur est aromatique et épicé, la saveur chaude et singulière après maturation [4-6].



I.3.3. Répartition géographique:

Vitex agnus-castus se rencontre dans les endroits humides, au bord des cours d'eau ou dans les régions maritimes, essentiellement dans la zone méditerranéenne. On la trouve aussi au nord de l'Afrique et en Asie centrale et l'Asie occidentale. Elle est maintenant cultivée partout dans le monde, y compris la partie sud des Etats-Unis [7].

En Algérie, cette espèce trouve un ultime refuge dans les oueds Menouaaraar et Kherrouaa en plein cœur du Sahara. (Gattilier ou « kherouaa ») [8].

I.3.4. Les noms communs / Synonymes:

L'espèce *Vitex agnus-castus* possède plusieurs noms communs tels que : Gattilier, agneau chaste, petit poivre, poivre sauvage, herbe aux poivre, arbre de poivre Agnolyt, l'agnus-castus, Berry chaste, baie de l'arbre chaste, chastetree, chanvre arbre, le poivre de moine, les épices indiennes. [9-10]

I.4. Aspects historiques et usage traditionnel :

Le nom de l'espèce *agnus-castus* combine deux mots d'origine latine: "agnus", qui signifie agneau, et "castitas" qui signifie la chasteté [4].

La description de *V. agnus-castus* comme herbe médicinale remonte à plus de 2000 ans [11]. Les anciens Egyptiens, les Grecs et les Romains l'ont utilisée pour une variété de problèmes de santé [4].

En 400 ans avant J.-C., Hippocrate recommandait l'utilisation de gattilier pour les blessures et les inflammations [4,11]. Quatre siècles plus tard, Dioscorides botaniste grec recommandé *V. agnus-castus* spécifiquement pour l'inflammation de l'utérus et de lactation [4,11]

L'utilisation de *V. agnus-castus* a persisté jusqu'aux temps modernes. Bien que son utilisation fût initialement concentrée dans la région méditerranéenne, sa popularité a augmenté en Angleterre et en Amérique depuis le milieu des années 1900 [11]. Les utilisations traditionnelles médicinales de *V. agnus-castus* se situent principalement autour de l'ingestion de fruits de leur arbuste [6,13]. L'extrait sec, liquide ou encore les huiles obtenues à partir du fruit ont été utilisés pour une variété de symptômes, le plus souvent liées au système reproducteur féminin [10,15-16]. D'autres utilisations comprennent le traitement des flatulences, bénigne de la prostate, hyperplasie, la nervosité, la démence, les maladies rhumatismales, les rhumes, la dyspepsie, troubles de la rate, la constipation et la promotion de la miction [10,15]

I.5. Etudes chimiques antérieures :

L'espèce *Vitex agnus-castus* est riche en métabolites secondaires, les principaux constituants incluent les flavonoïdes, les iridoïdes, les diterpènes, les huiles essentielles et autres constituants.

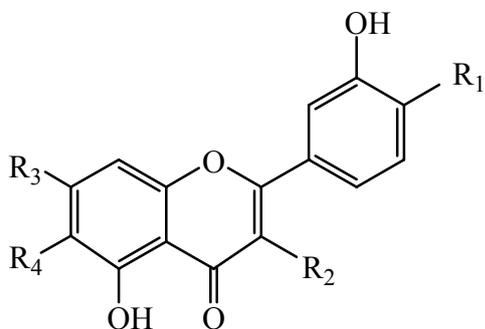
I.5.1. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des substances naturelles qui forment une grande partie des métabolites secondaires. Les flavonoïdes ont été déterminés dans les feuilles des arbres chastes (1,0-2,7%), les fleurs (1,0-1,5%) et les fruits (0,5-1,0%) [16].

Ils sont présents dans l'espèce *Vitex agnus-castus* à l'état libre ou sous forme d'hétérosides. Les flavonoïdes majoritaires dans cette espèce sont la casticine et la lutéoline. Le tableau I.1 rassemble les flavonoïdes isolés et identifiés chez l'espèce *Vitex agnus-castus*.

Tableau I.1 : Flavonoïdes isolés de l'espèce *Vitex agnus-castus*

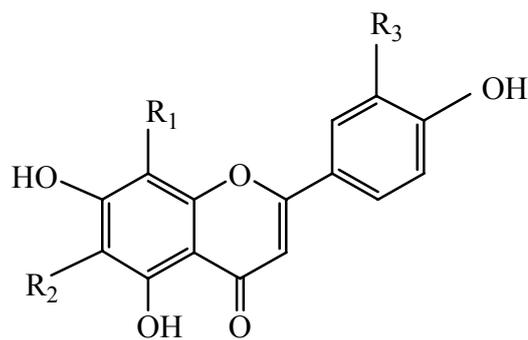
N° de structure		Nom du composé	Réf	
<u>1</u>	<u>1a</u>	Quercetagine	[16-19]	
	<u>1b</u>	Casticine	[16-19,26]	
	<u>1c</u>	Eupatorine	[26]	
<u>2</u>	<u>2a</u>	Vitexine	[16]	
	<u>2b</u>	Isovitexine	[4-19,26]	
	<u>2c</u>	Orientine	[4,19]	
	<u>2d</u>	Isoorientine		
<u>3</u>	Apigénine	[26]		
<u>4</u>	Kaempférol	[4-19]		
<u>5</u>	<u>5a</u>	6 -C- (4"-methyl-6"- <i>O-trans</i> caffeoylglucoside) Lutéoline	[20]	
	<u>5b</u>	6- C- (6"- <i>O-trans</i> caffeoylglucoside) Lutéoline		
	<u>5c</u>	6- C- (2"- <i>O-trans</i> caffeoylglucoside) Lutéoline		
<u>6</u>	<u>6a</u>	7- <i>O</i> - (6"- <i>p</i> - benzoylglucoside) Lutéoline	[21]	
	<u>6b</u>	5, 4'-dihydroxy-3,6, 7, 3'-tetramethoxyflavone		
	<u>6c</u>	Artemetine		[22-24,26]
	<u>6d</u>	isorhamnetine		[22]
<u>7</u>	<u>7a</u>	Lutéoline	[17, 22]	
	<u>7b</u>	7-Glucosyllutéoline	[18]	
<u>8</u>	<u>8a</u>	Penduletine	[26]	
	<u>8b</u>	5-hydroxy-3, 6,7, 4'-tetramethoxyflavone	[25-26]	
<u>9</u>	5,3'-dihydroxy-6, 7, 4'-trimethoxyflavanone	[26]		



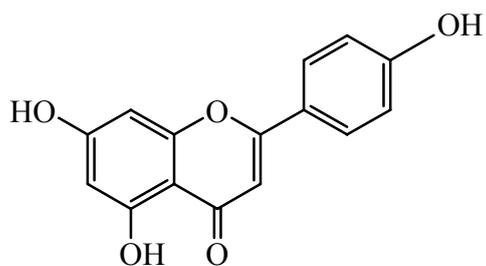
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>1a</u>	OH	OH	OH	OH
<u>1b</u>	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
<u>1c</u>	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃

1

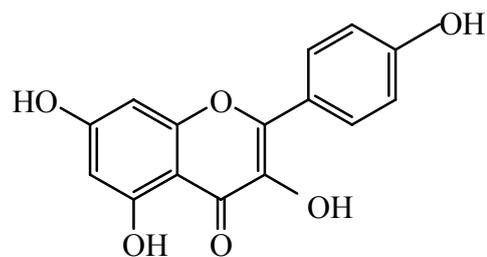
	R ₁	R ₂	R ₃
<u>2a</u>	C-glu	H	H
<u>2b</u>	H	C-glu	H
<u>2c</u>	C-glu	H	OH
<u>2d</u>	H	C-glu	OH



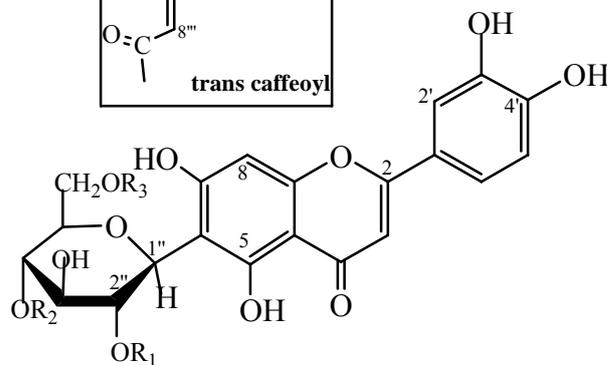
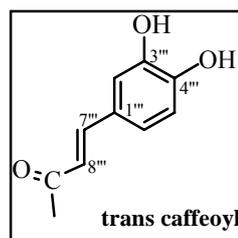
2



3

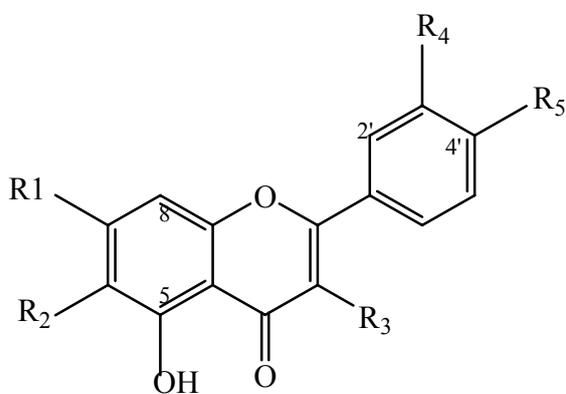


4



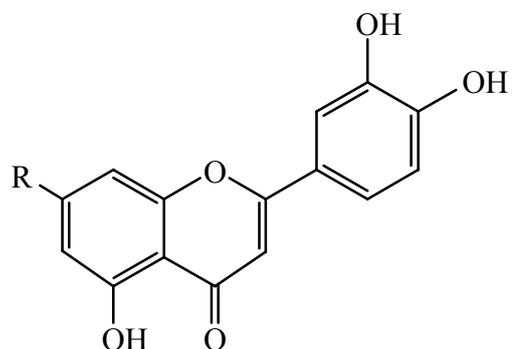
5

	R₁	R₂	R₃
5a	H	CH ₃	<i>trans</i> caffeoyl
5b	H	H	<i>trans</i> caffeoyl
5c	<i>trans</i> caffeoyl	H	H



6

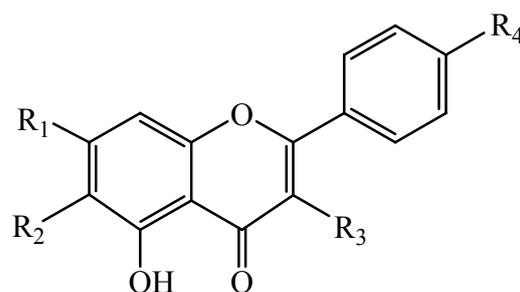
	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅
6a	<i>O</i> -Glu (6''- <i>p</i> -hydroxybenzoyl)	H	H	OH	OH
6b	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH
6c	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
6d	OH	H	OH	OCH ₃	OH



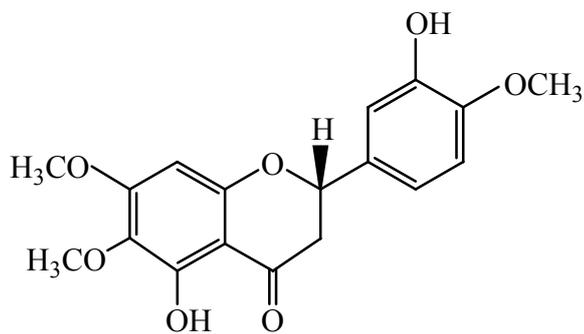
7

	R
7a	OH
7b	<i>O-glu</i>

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
8a	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH
8b	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃



8



9

I.5.2. Diterpènes:

L'étude phytochimique réalisée par M. Ono et al. (2008) sur les fruits de *Vitex agnus-castus* a permis l'obtention de deux nouveaux diterpénoïdes type halimane, viteagnusines A et B (10, 11), et trois nouveaux diterpénoïdes type labdane, viteagnusines C, D et E, (12, 13, 14), avec deux autres diterpénoïdes connus. En 2009, la même équipe a signalé l'isolement et l'élucidation de la structure de trois nouveaux diterpénoïdes type labdane viteagnusines F, G et H (15a, 16a, 17a) avec six composés connus dont quatre diterpénoïdes type labdane (22a, 22b, 23a et 23b), un diterpénoïde type norlabdane (24), un sesquiterpénoïde type aromadendrane (25).

Les diterpènes isolés de l'espèce *Vitex agnus-castus* sont rassemblés dans le tableau I-2

Tableau I.2 : Diterpènes isolés de l'espèce *Vitex agnus-castus*

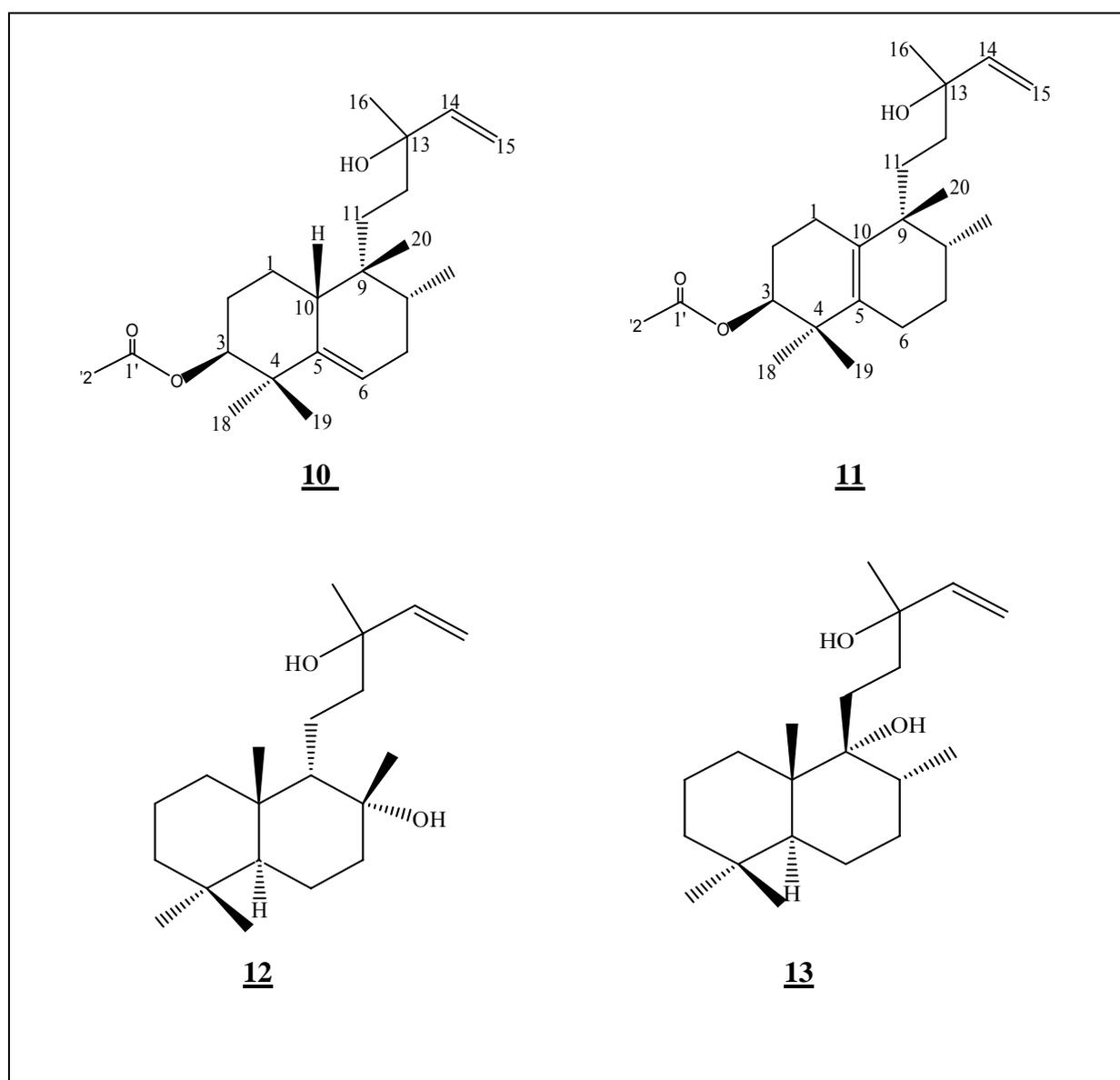
N° de structure		Nom du composé	Réf
<u>10</u>		Viteagnusine A	[27]
<u>11</u>		Viteagnusine B	
<u>12</u>		Viteagnusine C	
<u>13</u>		Viteagnusine D	
<u>14</u>		Viteagnusine E	
<u>15</u>	<u>15a</u>	Viteagnusine F (rel 5S,6R,8R,9R,10S,13R,14S,15S, 16R)-6-acetoxy-9,16;15,16-diepoxy-13,14-dihydroxy-15-methoxy-labdane	[28]
	<u>15b</u>	(rel 5S,6R,8R,9R,10S,13R,14S,15S, 16R)-6-acetoxy-9,16;15,16-diepoxy-13- hydroxy- 14-O-acetyl-15-methoxy-labdane	
	<u>15c</u>	(rel 5S,6R,8R,9R,10S,13R,14S,15S, 16R)-6-acetoxy-9,16;15,16-diepoxy-13,14- di-O-acetyl -15-methoxy-labdane	

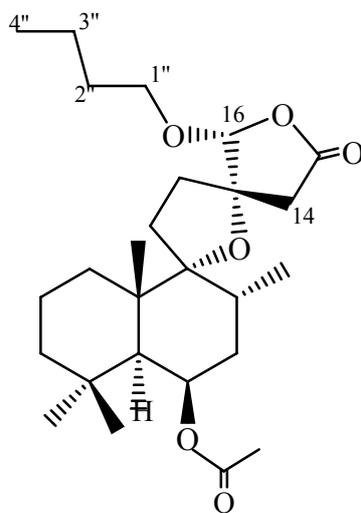
Tableau I.2 : Diterpènes isolés de l'espèce *Vitex agnus-castus* (suite)

N° de structure		Nom du composé	Réf
<u>16</u>	<u>16a</u>	Viteagnusine G	[28]
	<u>16b</u>	(rel 5S,6R,8R,9R,10S,13R,14S,15R, 16S)-6-acetoxy-9,16;15,16-diepoxy-13,14-diol acetonide -15-methoxy-labdane	
<u>17</u>	<u>17a</u>	Viteagnusine H (rel 5S,6R,8R,9R,10S)-6-acetoxy-9-hydroxy-16-methoxy-13(14)-labden-15,16-olide	[29]
	<u>17b</u>	Vitexilactone	
<u>18</u>		(rel 5S,6R,8R,9R,10S,13R)-6-acetoxy-9,13-epoxy-15-methoxy-labdan-16,15-olide	[29]
<u>19</u>		Nosyberkol	[30]
<u>20</u>	<u>20a</u>	8-epi-sclareol	[31]
	<u>20b</u>	Sclareol	[32]
<u>21</u>		Rotundifurane	[33]
<u>22</u>	<u>22a</u>	(rel 5S,6R,8R,9R,10S,13R,15R)-6-acetoxy-9,13;15, 16-diepoxy-15-methoxy-labdane	[34]
	<u>22b</u>	(rel 5S,6R,8R,9R,10S,13R,15S)-6-acetoxy-9,13;15, 16-diepoxy-15-methoxy-labdane	
<u>23</u>	<u>23a</u>	(rel5S,6R,8R,9R,10S,13S,15S)-6-acetoxy-9,13;15,16-diepoxy-15-methoxy-labdane	[34]
	<u>23b</u>	(rel5S,6R,8R,9R,10S,13S,15R)-6-acetoxy-9,13;15, 16-diepoxy-15-methoxy-labdane	
<u>24</u>		Iso-ambreinolide	[35]
<u>25</u>		4 β ,10 β - dihydroxyaromadendrane	[36]
<u>26</u>		6 β ,7 β – diacetoxy-13-hydroxylabda-8, 14 –diene	[26]
<u>27</u>		x-hydroxy-y-keto-15,16-epoxy-13(16)-14-labdadiene	
<u>28</u>		x-acetoxy-13-hydroxy-labda-y-14-diene	

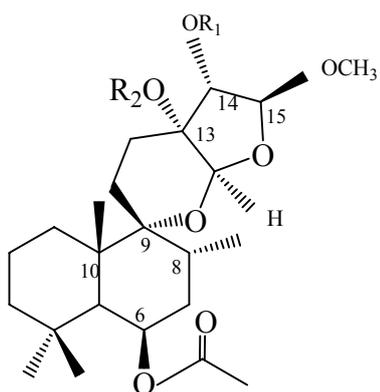
Tableau I.2 : Diterpènes isolés de l'espèce *Vitex agnus-castus* (suite)

N° de structure	Nom du composé	Réf
<u>29</u>	Cleroda-7,14-dien-13-ol	[26]
<u>30</u>	Cleroda-1,3,14-trien-13-ol	





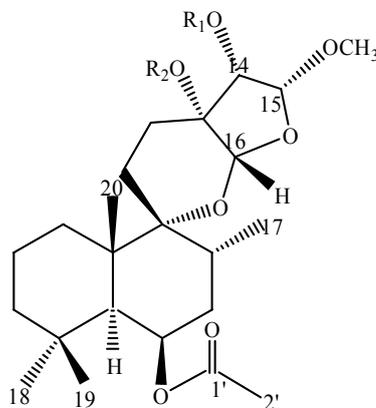
14



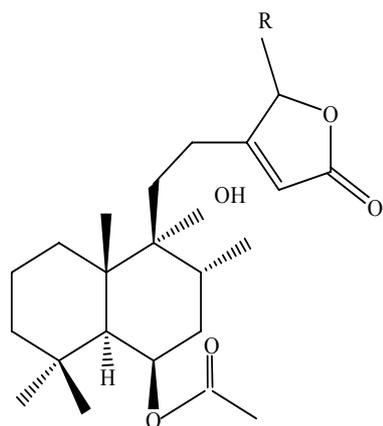
15

	R ₁	R ₂
15a	H	H
15b	Ac	H
15c	Ac	Ac

	R ₁	R ₂
16a	H	H
16b	Ip	

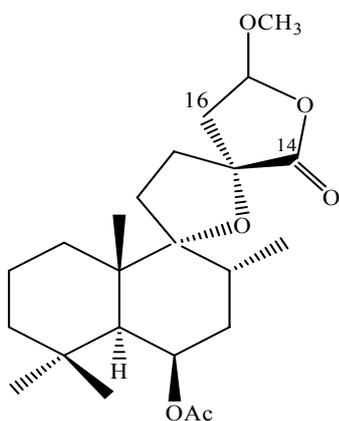


16

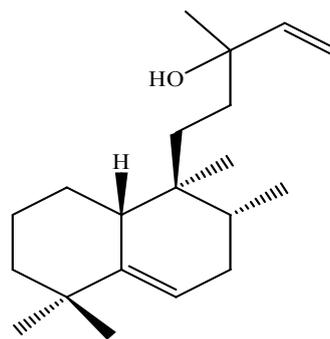


	R
17a	OCH ₃
17b	H

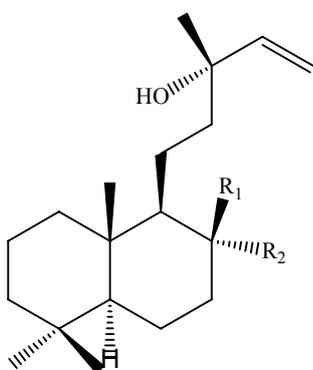
17



18

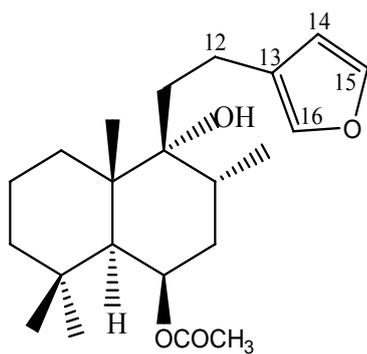


19

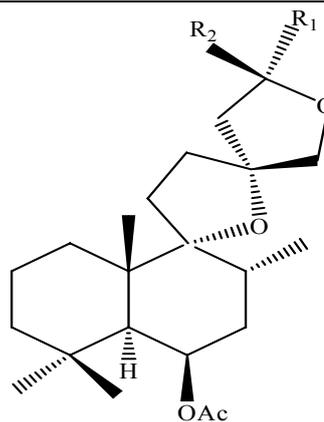


20

	R ₁	R ₂
20a	OH	CH ₃
20b	CH ₃	OH



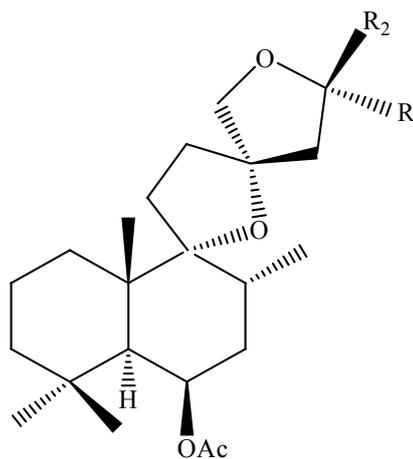
21



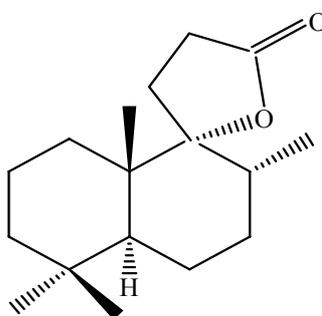
22

	R ₁	R ₂
<u>22a</u>	OCH ₃	H
<u>22b</u>	H	OCH ₃

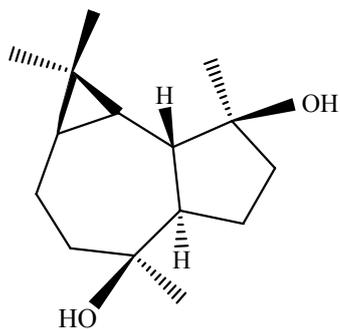
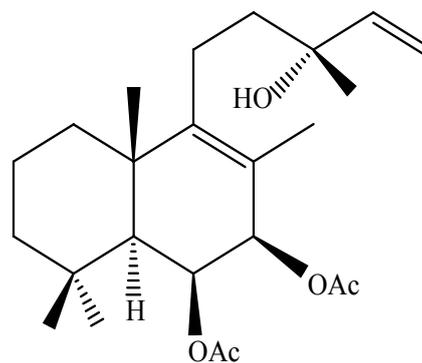
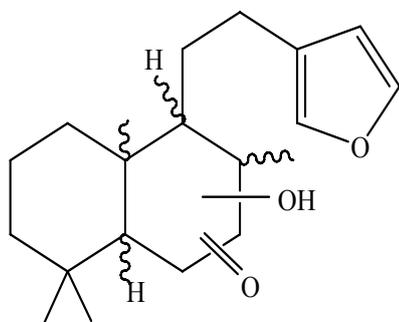
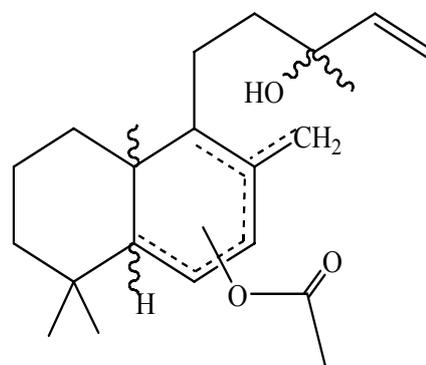
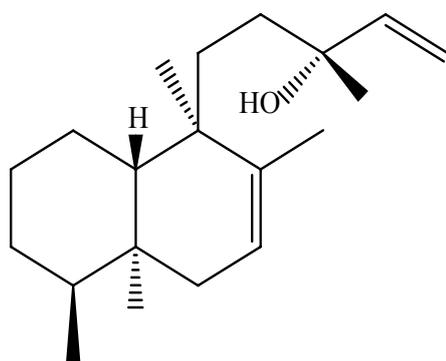
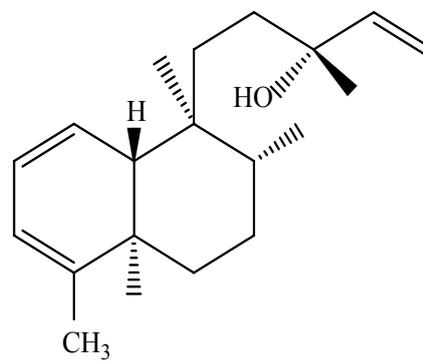
	R ₁	R ₂
<u>23a</u>	OCH ₃	H
<u>23b</u>	H	OCH ₃



23

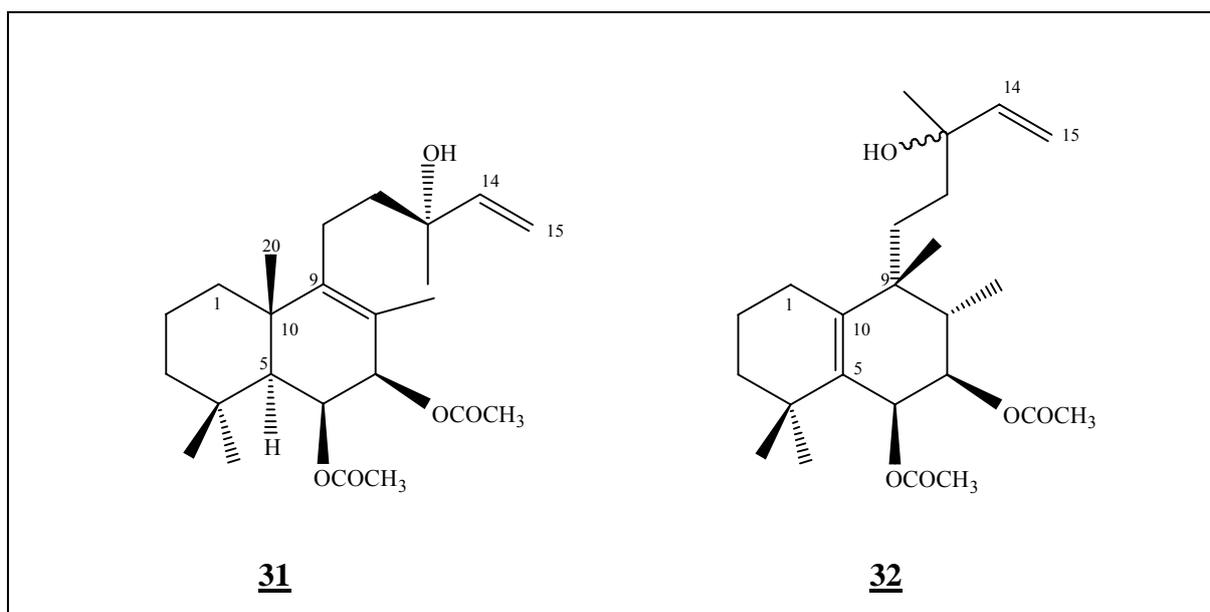


24

**25****26****27****28****29****30**

En 1999, E. Hoberg et al. ont mis au point l'isolement et l'élucidation de la structure 6 β ,7 β -diacétoxy-3-hydroxylabda-8,14-diène (31) à partir des fruits de *Vitex agnus-castus* [37]

Grace à l'utilisation d'un nouveau procédé de séparation HPLC / DAD (comparaison avec un échantillon authentique) ainsi que la RMN 1D et 2D, les investigations de E. Hoberg et al. (2003), ont montré que la structure du composé (31) est remplacée par la structure (32). Cette dernière est identique à vitetrifoline D [(rel 6S, 7R, 8S, 9R) -6,7-diacétoxy-5 (10), 14 halimadien-13-ol] [38].

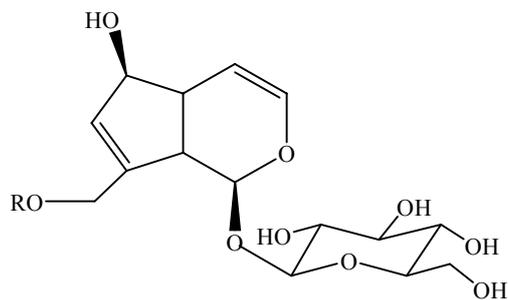


I.5.3. Iridoïdes glycosides:

Des études sur l'espèce ont montré la présence de 0,3% aucubine, 0,6% agnuside (le dérivé P- hydroxybenzoyl d'aucubine), et 0,07% de glycosides non identifiés dans les feuilles de *Vitex agnus-castus* [39], et d'acide 6'-O- foliamenthoylmussaenosidique (agnucastosite A), acide 6'-O (6,7-dihydrofoliamenthoyl) mussaenosidique (agnucastosite B), et acide 7-O-trans-coumaroyl-6'-O-trans-caffeoyl-8-epiloganique (agnucastosite C), aucubine, agnuside acide mussaenosidique, acide 6'-O-p-hydroxybenzoylmussaenosidique, et phenylbutanone glucoside (myzodendrone) dans les tiges en période de floraison.

Tableau I.3 : les iridoïdes isolés du l'espèce *Vitex agnus-castus*

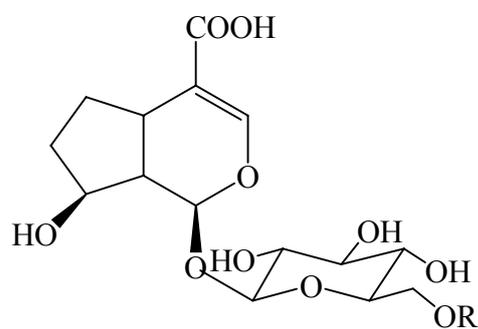
N° de structure		Nom du composé	Réf
<u>33</u>	<u>33a</u>	Aucubine	[40,41]
	<u>33b</u>	Agnuside	[40,42-43]
<u>34</u>	<u>34a</u>	Acide mussaenosidique	[44]
	<u>34b</u>	acid 6'-O-p-hydroxybenzoylmussaenosidic	[45]
	<u>34c</u>	Agnucastoside A. 6'-O-foliamenthoilmussaenosidique	[48]
	<u>34d</u>	Agnucastoside B acide 6'-O-(6,7-dihydrofoliamenthoyl) mussaenosidique	
<u>35</u>	Agnucastoside C acide 7-O-trans-p-coumaroyl-6'-O-trans-caffeoyl-8-epiloganique		
<u>36</u>	Myzodendrone	[46,47]	



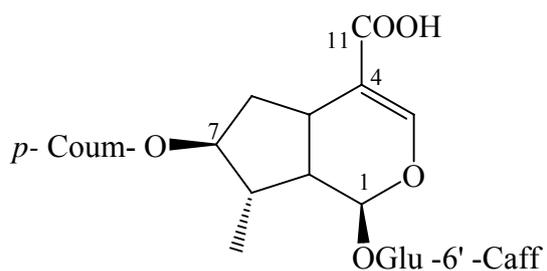
33

	33a	33b
R	H	<i>p</i> -OH-PH-CO-

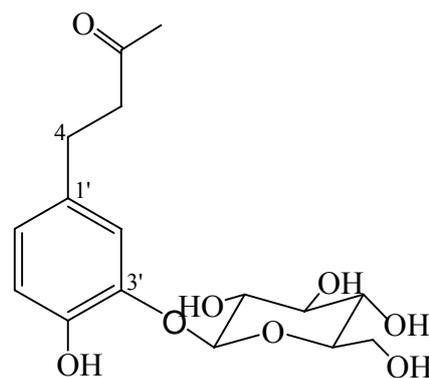
	R
34a	H
34b	<i>p</i> -OH-PH-CO-
34c	foliamenthoyl
34d	6,7-dihydro foliamenthoyl



34



35



36

I.5.4. Huiles essentielles :

Les composantes principales des feuilles et fleurs en huiles essentielles de *Vitex agnus-castus* peuvent être classées en deux catégories

- ✓ produits sesquiterpéniques tels que : Limonène, cinéole, sabinène, et α -terpinéol, linalol, citronellol, camphène, myrcène. α -pinène et β -pinène.
- ✓ produits monoterpéniques tels que : Le β -caryophyllène, β -gurjunene, cuparene et globulol [49, 6].

Selon la maturité des fruits utilisés et les procédés de distillation, la composition de l'huile essentielle peut varier considérablement.

I.5.5. Les autres constituants:

En plus des constituants majoritaires cités précédemment, plusieurs études ont montrées la présence d'autres constituants dans l'espèce *Vitex agnus-castus* parmi lesquels on cite :

- Les acides gras : y compris l'acide stéarique, oléique, linoléique et acide palmitique [6].
- Les acides aminés : glycine, l'alanine, la valine et la leucine.
- Des traces d'hormones progestérone et hydroxyprogestérone des feuilles et des fleurs, la testostérone, épitestostérone (fleurs), l'androstènedione (feuilles) [16]

I. 6. Etude pharmacologique de l'espèce *Vitex agnus-castus* :

Certaines preuves montrent que chastetree peuvent avoir des propriétés hormonal à travers les activités estrogéniques et progestérone, détectées dans l'espèce *Vitex agnus-castus* [50]. Il est demandé que les composés en chastetree se lient sélectivement aux récepteurs de l'estrogène beta dans le cœur, vaisseaux sanguins, les os et vessie [51].

La Chastetree peut affecter la dopamine, l'acétylcholine et des récepteurs opioïdes en haute doses [52]. Elle a aussi des effets agonistes sur les récepteurs d'hypophyse opaminergiques (D2) [53-54]. Il semble que chastetree supprime la libération de prolactine et normalise les anomalies de la phase lutéale du cycle menstruel chez les femmes avec hyperprolactinémie [58], mais elle n'affecte pas les niveaux de testostérone [55].

Les travaux in vitro suggèrent que *Vitex* peut inhiber la croissance des cancers du sein, des ovaires, col de l'utérus, de l'estomac, du colon et des cellules de cancer du poumon [56-

57]. Les extraits des Huiles essentielles de cette plante démontrent des propriétés antibactérienne et antifongique [19].

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 [59]

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 [60], et jouent un rôle important dans la protection des plantes [61].

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 [62].

II.2. Historique :

La première découverte des flavonoïdes a été réalisée en 1664, par Robert Boyle qui pour la première fois a fait une description des effets des pigments de fleurs en milieu acide et en milieu basique [63]. Ensuite ils ont été identifiés en 1930 par Szent-Györgyi, ce dernier a eu le Prix Nobel de médecine, et a isolé de l'écorce du citron, une substance, **citrine**, avec laquelle, il a tenté de réglementer la perméabilité des capillaires destinés à être consommés [64].

Au début, les flavonoïdes ont été nommés "vitamine P" (pour leur perméabilité) puis vitamine C2, parce que certains d'entre eux ont des propriétés semblables à la vitamine C. Le fait que les vitamines sont des flavonoïdes n'a pas pu être confirmé, mais les deux noms ont été abandonnés dans les années 1950 [64].

II.3. Chimie des flavonoïdes:

II.3.1. Définition :

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) [65].

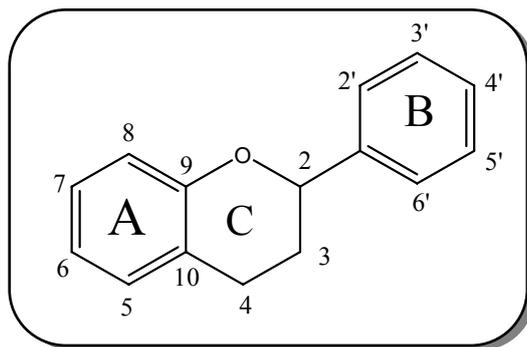


Figure II.1: squelette de base des flavonoïdes

II.3.2. Biosynthèse :

Les connaissances actuelles sur la biosynthèse et la production des flavonoïdes catalysée par des enzymes proviennent de plusieurs études réalisées par de nombreux chercheurs [66-67]. Malgré leur diversité structurale importante, tous les flavonoïdes semblent avoir une voie biosynthétique commune (figure II-2 et figure II-3).

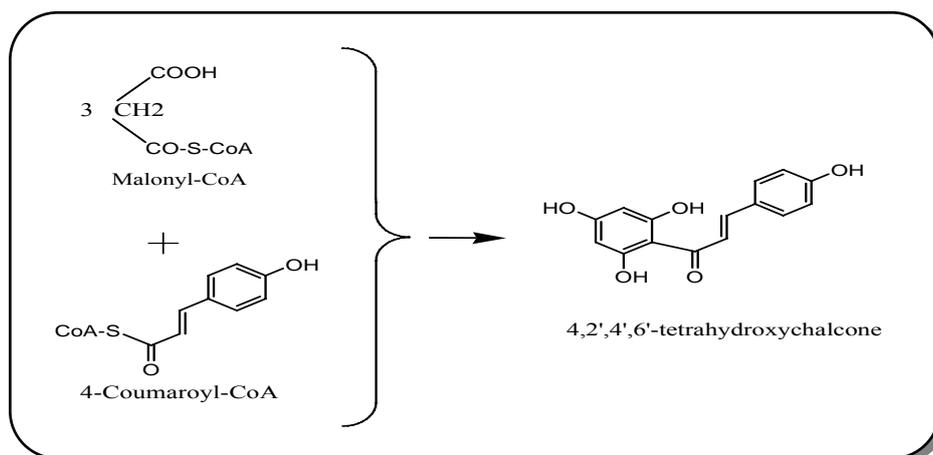


Figure II-2: Voie biosynthétique conduisant aux chalcones

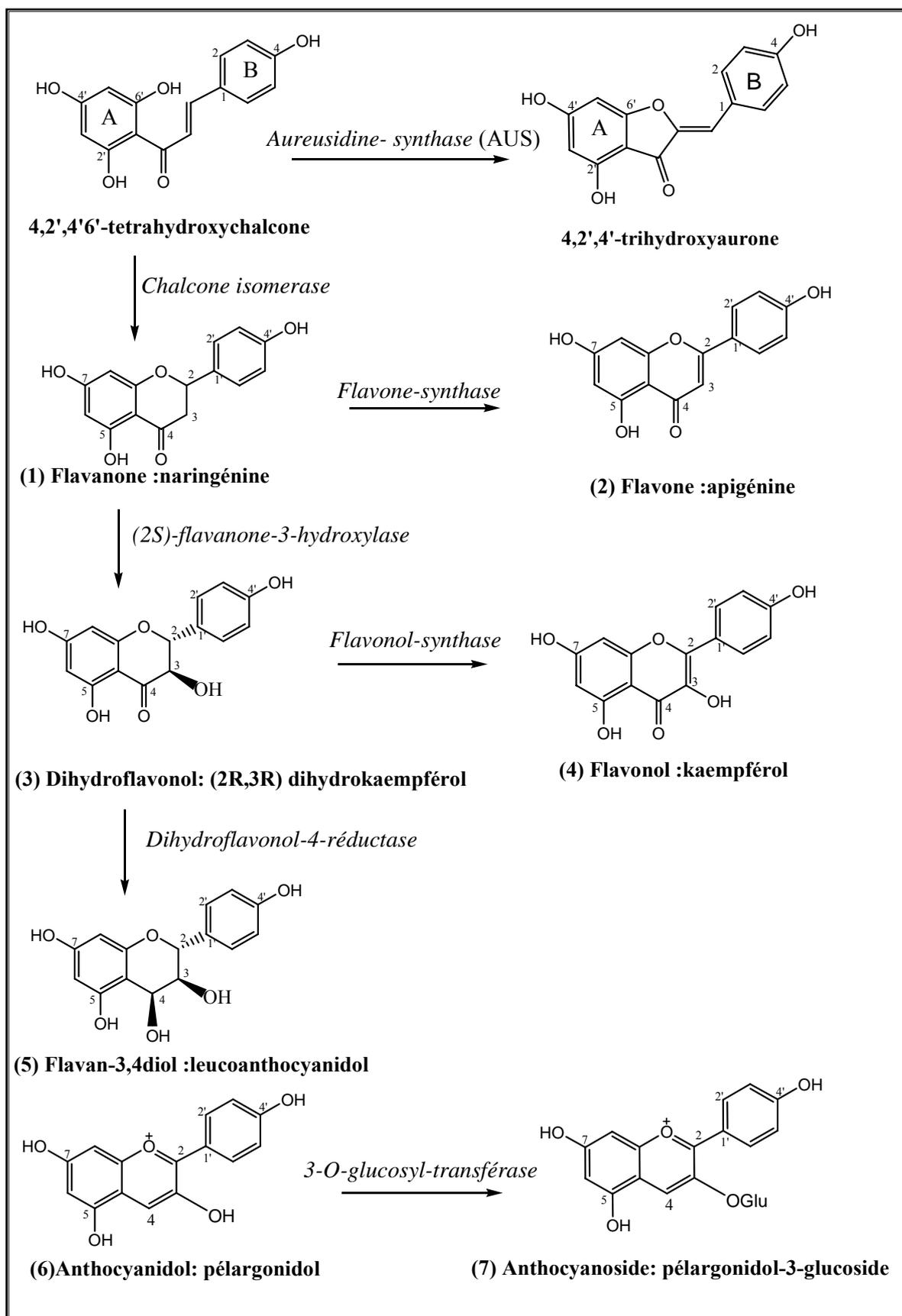
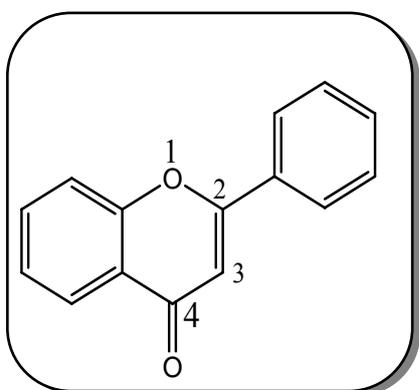


Figure II.3: schéma illustrant la biosynthèse des flavonoïdes [65]

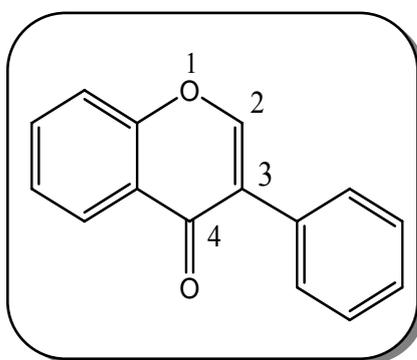
II.4. Classification des flavonoïdes:

Selon la nomenclature de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée, Les flavonoïdes peuvent être classés en fonction de leur squelette et voies métaboliques, en:

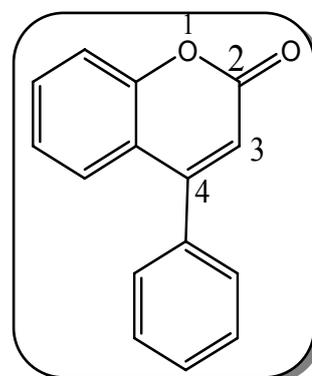
- **Flavonoïdes** dérivés de la structure 2-phénylchromen-4-one (2-phényl-1,4-benzopyrène).
- **Isoflavones**, dérivée de la structure 3-phénylchromen-4-one (3-phényl-1,4-benzopyrène).
- **Neoflavonoïdes**, dérivée de la structure 4-phénylcumarina (4-phén



La structure chimique des *flavonoïdes*



La structure chimique des *isoflavonoïdes*



La structure chimique des *neoflavonoïdes*

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 aures et les anthocyanes.

II.4.1. Flavones et Flavonols:

Tous les types de flavonoïdes dérivent de la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone et par conséquent, possèdent tous au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' (Figure II.3). Dans plus de 90% des cas, le cycle A des flavones et flavonols (structures (2) et (4) sur la Figure II.3) est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. 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.

II-4. 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 (structures (1) et (3) sur la 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.

II.4.3. Flavan-3-ols, Flavan-3,4-diols et Anthocyanidols:

A la différence des flavonoïdes décrits dans la (figure II.3), 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 pélagonidol 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 pélagonidol-3-*O*-glucoside et le cyanidol-3-*O*-rutinose ou kéraçyanine.

II.4.4. 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.3). 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-benzylidènocoumaranone. Sachant que, pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes décrits précédemment (Figure II.3).

II.5. 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 [68].

II.5.1. La O-substitution:

II.5.1. a- 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 [70- 71].

Les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylés [72].

II.5.1. b- La méthylation :

La fixation du groupement méthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (*O*-methyltransférase) 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 [70, 73].

Cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7, 8), noyau B (carbones 2', 3', 4', 5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones et flavonols [70].

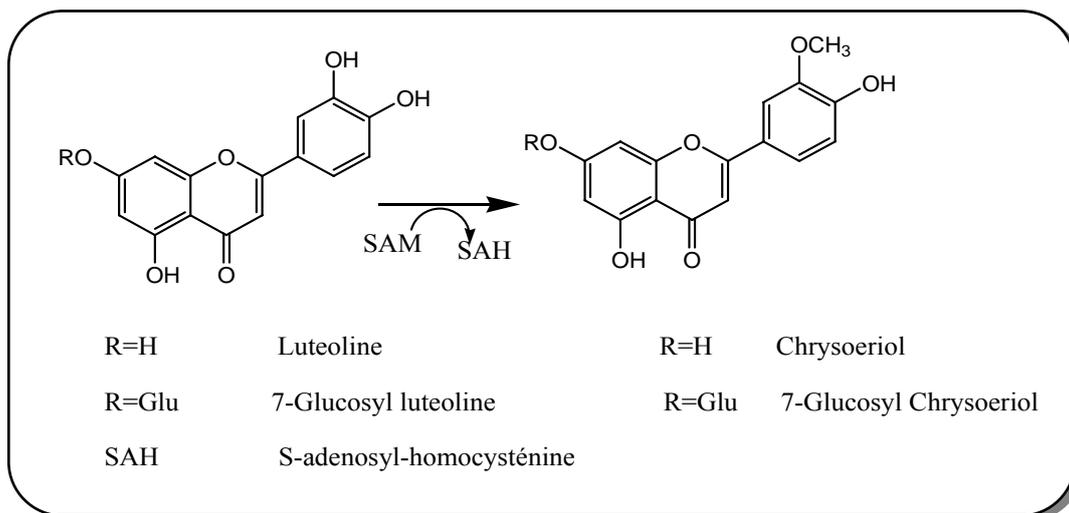


Figure II.4 : transfert enzymatique de Lutéoline vers Chrysoeriol

II.5.1. c- 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-5 [74].

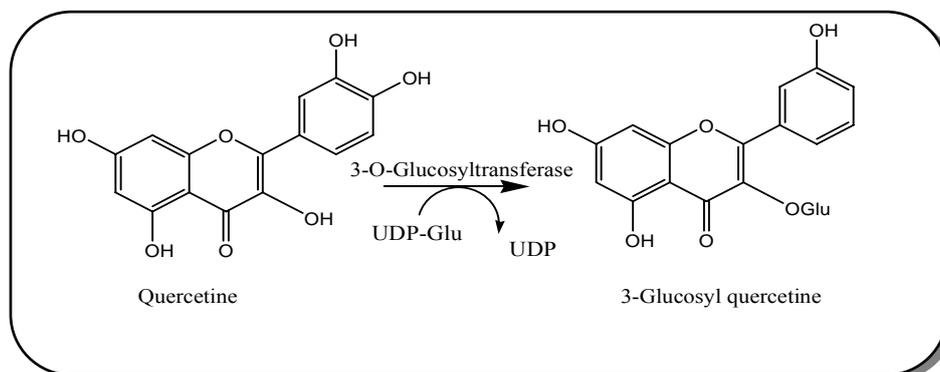


Figure II.5: Glycosylation de la quercétine

II.5.2. La C-substitution :

II.5.2. a- La C-méthylation :

Le radical méthyle dans ce type de substitution va se lier directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison est rencontrée en position C-6

ou en position C-8, ou encore en position C-6 et C-8. L'enzyme catalysant la C-méthylation en position 6 et / ou en position 8 est toujours inconnue [75].

II.5.2. b- La C-glycosylation :

Les flavonoïdes C-glycosylés ne sont pas rares, on y trouve plus de 350 hétérosides [65]. 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 [76].

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

Seules les plantes a, de rares exceptions près, 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 [65] . 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 [77]. 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 [78]

La présence de composés flavonoïdiques a été rapportée chez les Bryophytes, les Ptéridophytes, les Gymnospermes et chez les Angiospermes [79]. Cette distribution quasi-ubiquitaire 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 [80-81]

Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones [82-84]. Le Tableau II.1 regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes dans quelques plantes alimentaires.

Tableau II.1: Sources alimentaires des flavonoides

Flavonoides	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> Epicatéchine Catéchine	Thé vert, thé noir Thé vert, thé noir

II.7. 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 pathogénèses 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 [85].

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 [86-87].

II.8. Les flavonoïdes comme antioxydants :

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

II.8.1. 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 [87].

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 [88].

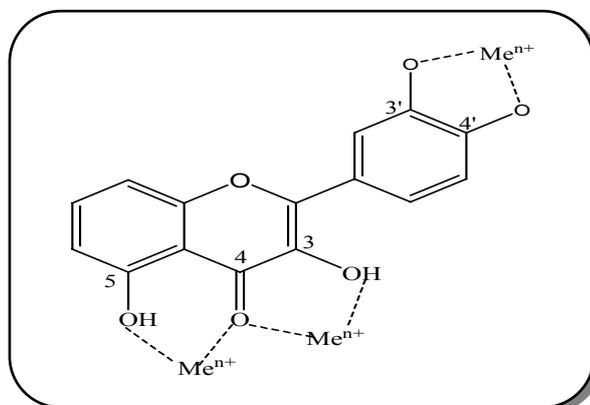


Figure II.7 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) [89].

II.8.2. 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 [87].

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.8) 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 [90].

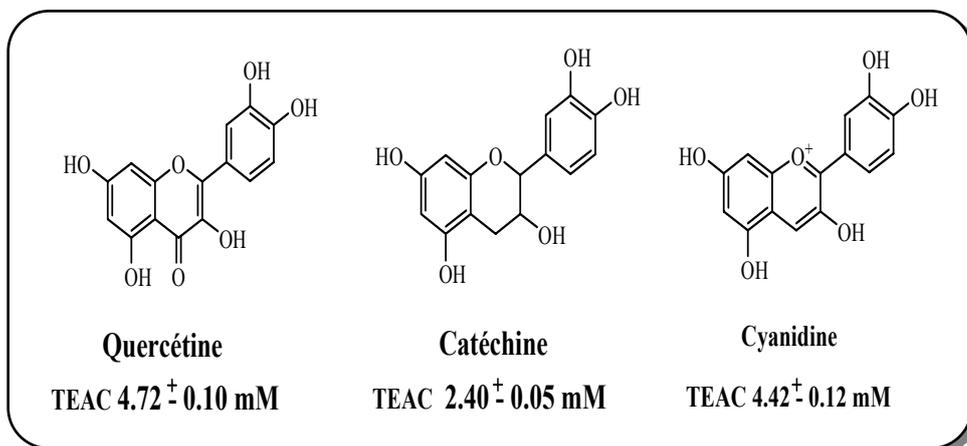


Figure II. 8 : Comparaison de l'activité antioxydante des différents 3, 5, 7, 3', 4'-pentahydroxy phénols.

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.9). 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 [90].

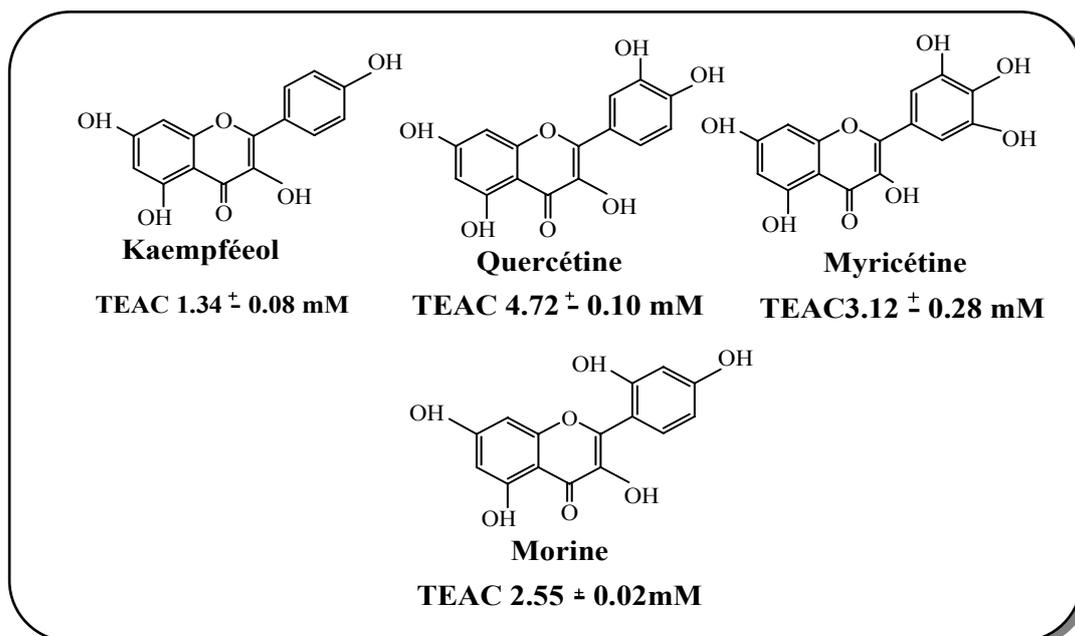


Figure II.9 : Valeurs montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavonols.

Pour les flavones, un cycle B dihydroxylé en ortho est aussi important pour l'activité antioxydante (Figure II-10). En effet, les deux flavones, apigénine (4' -OH) et chryisine (sans groupement OH sur le cycle B) ont presque la même valeur de TEAC (Figure II.10) [90].

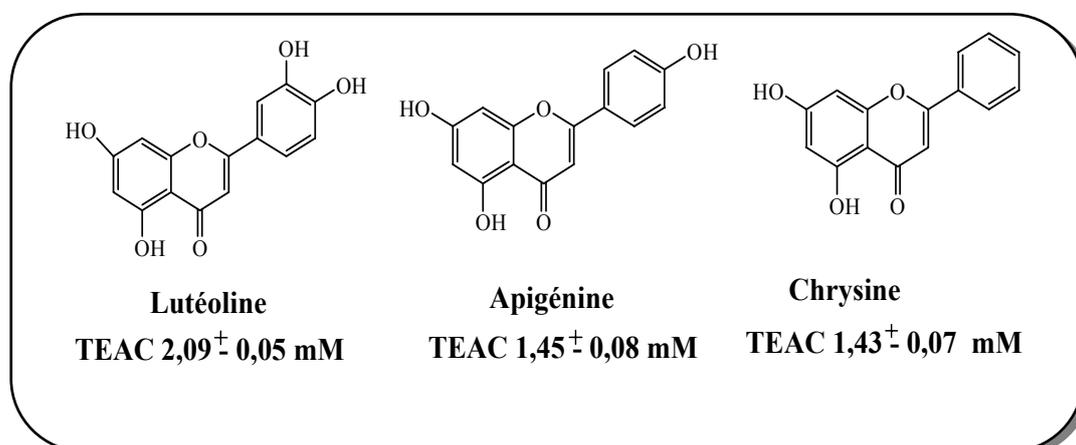


Figure II.10 : Valeurs montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavones.

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.11). 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 [90].

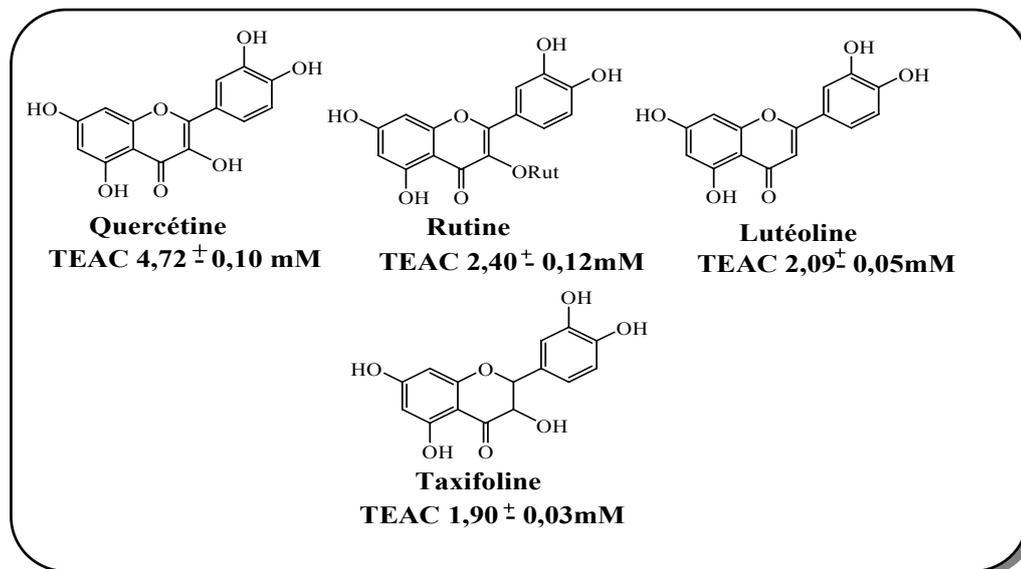


Figure II.11 : Valeurs indiquant l'importance du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 .

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

La comparaison de la naringénine avec le naringoside (Figure II.12) 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.12) [90].

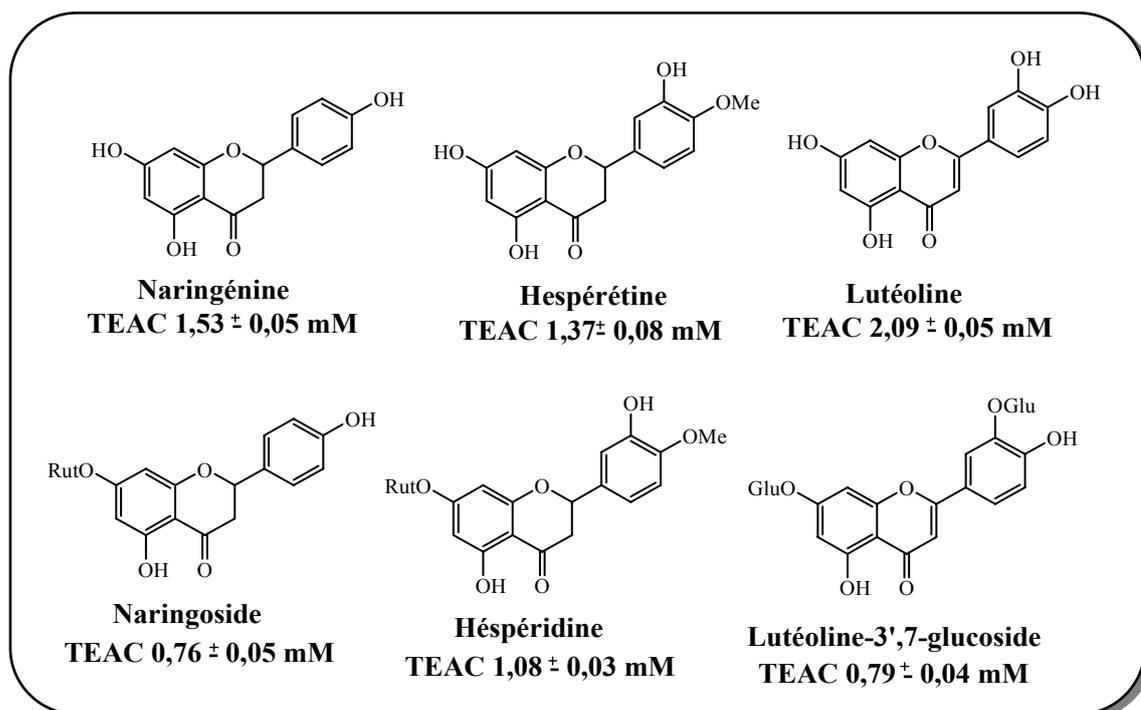


Figure II.12 : Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavones et flavanones.

e).Anthocyanidols

Le cyanidol, un équivalent de la quercétine, est le composé le plus actif de ce type de flavonoïdes (Figure II-13). 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 méthoxyle 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.13) [90].

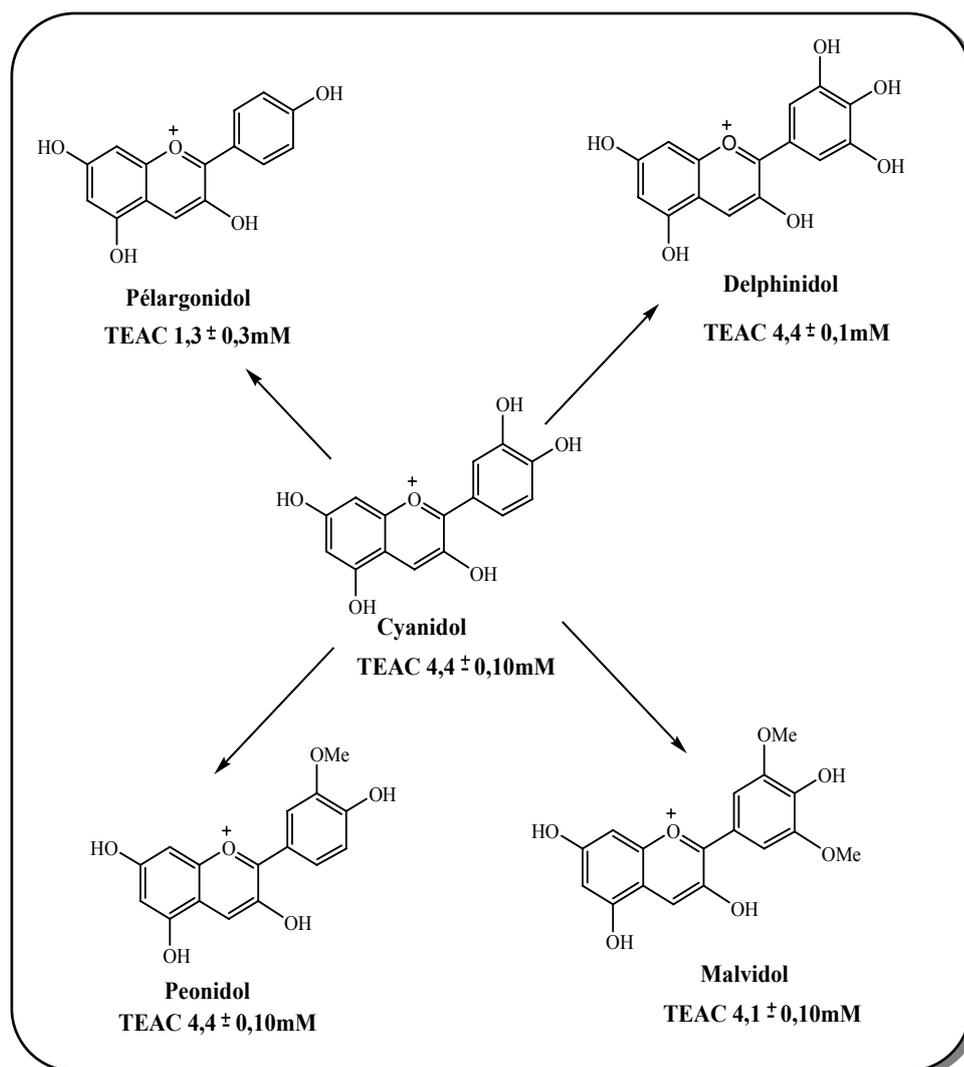


Figure II.13 : Effet de la substitution du cycle B sur l'activité antioxydante des anthocyanidols.

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.14).

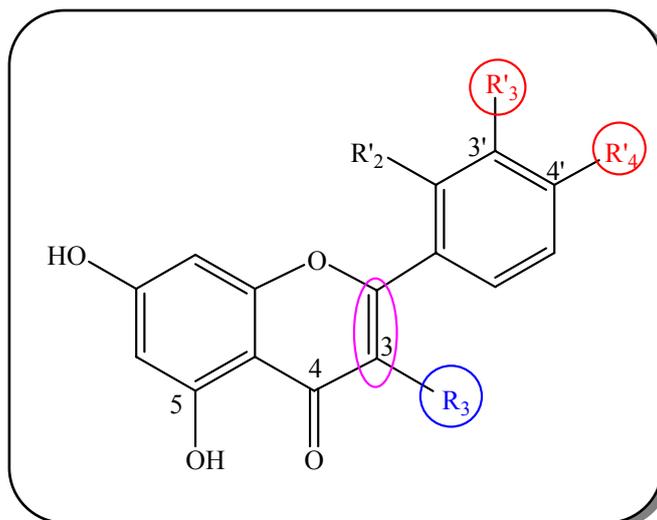


Figure II.14 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.

II.9. Activités biologiques des flavonoïdes :

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires anti-allergiques, anti-ulcèreux et anti-cancéreuses.

II.9.1. 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 Ca²⁺-dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca²⁺-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 [86].

II.9.2. 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 [91]. 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.9.3. 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 [86].

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 [92]. 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.9.4. 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 [93]. 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 [94].

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 [86]. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène [95] et inhibe l'activité de la collagénase [96].

II.9.5. Autres effets biologiques :

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase [97]. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques [98-99].

Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires [100- 102].

Les effets anti-viraux des flavonoïdes ont été également démontrés [103].

II.10. L'étude chimique des flavonoïdes :

II.10.1- Extraction :

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes [65, 104]. 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.10.2- Séparation et purification :

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

- la chromatographie liquide sur colonne (CC) : elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le silicagel, 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 [105].
- 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 [106] :

- L'acide acétique **15** et **30 %** constitue le système aqueux.
 - Le *n*-butanol / Acide acétique/ Eau (BAW) **4 /1/ 5** constitue le système organique.
- la chromatographie préparative sur couche mince (CCM), très simple et très rapide, est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification en utilisant les diverses phases stationnaires et les systèmes de solvants appropriés.
- La purification ultime des composés phénoliques isolés se fait généralement sur une colonne de Sephadex LH20 en utilisant le méthanol comme éluant.

II.11. Analyse structurale des flavonoïdes :

II.11.1. Généralités :

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 [106-107]. 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.11.2. 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 [105-106,108]. Le tableau suivant montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du R_f .

Tableau II.2 : 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>Méthylation des hydroxyles</i>	R_f augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue 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.

II.11.3. 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-3 montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [106].

Tableau II-3 : 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.11.4. 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 [109] (voir figure II-15).

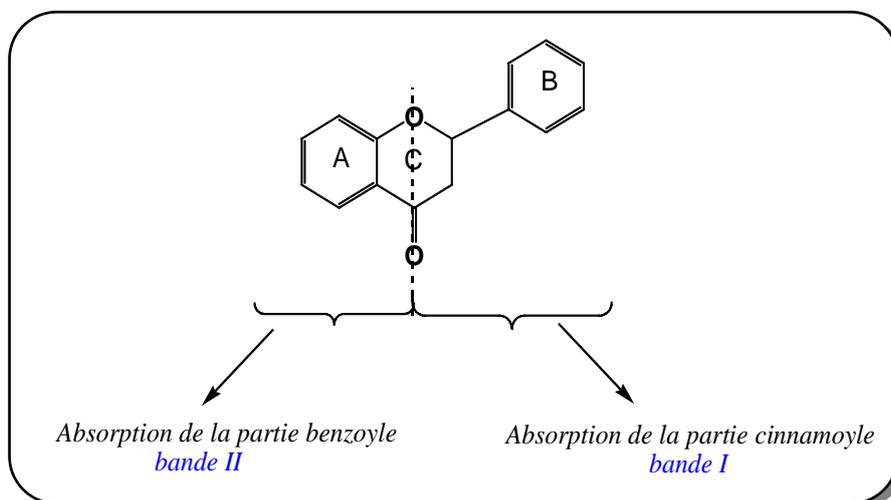


Figure II.15: Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

- **Bande I :** présentant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoylé qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2-C3) et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.
- **Bande II :** présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoylé qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [105].

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

Tableau II-3 : Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes.

<i>Type de composé flavonique</i>	<i>Bande I</i>	<i>Bande II</i>
Flavone	320-350	250-270
flavonol	352-385	250-280
flavanone	300-330	245-275
isoflavone	300-330 Ep	245-275

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 [110].

II.11.4. 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.11.4. a-1- Spectre en présence de NaOH :

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

Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de l'intensité lumineuse de la bande I renseigne sur le nombre et la position des hydroxyles libres [105]. 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.11.4. 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 [106].

II.11.4. 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 [106].

II.11.4. 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 **AlCl₃** et les groupes ortho dihydroxyles des noyaux aromatiques **A** et **B** sont instables et se décomposent en présence de **HCl** [108], par contre, ceux formés entre **AlCl₃** et les hydroxyles **5-OH** ou **3-OH** et la fonction carbonyle sont stables [111-112]. Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande I par rapport au spectre après addition d'**AlCl₃** et un déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le **MeOH**.

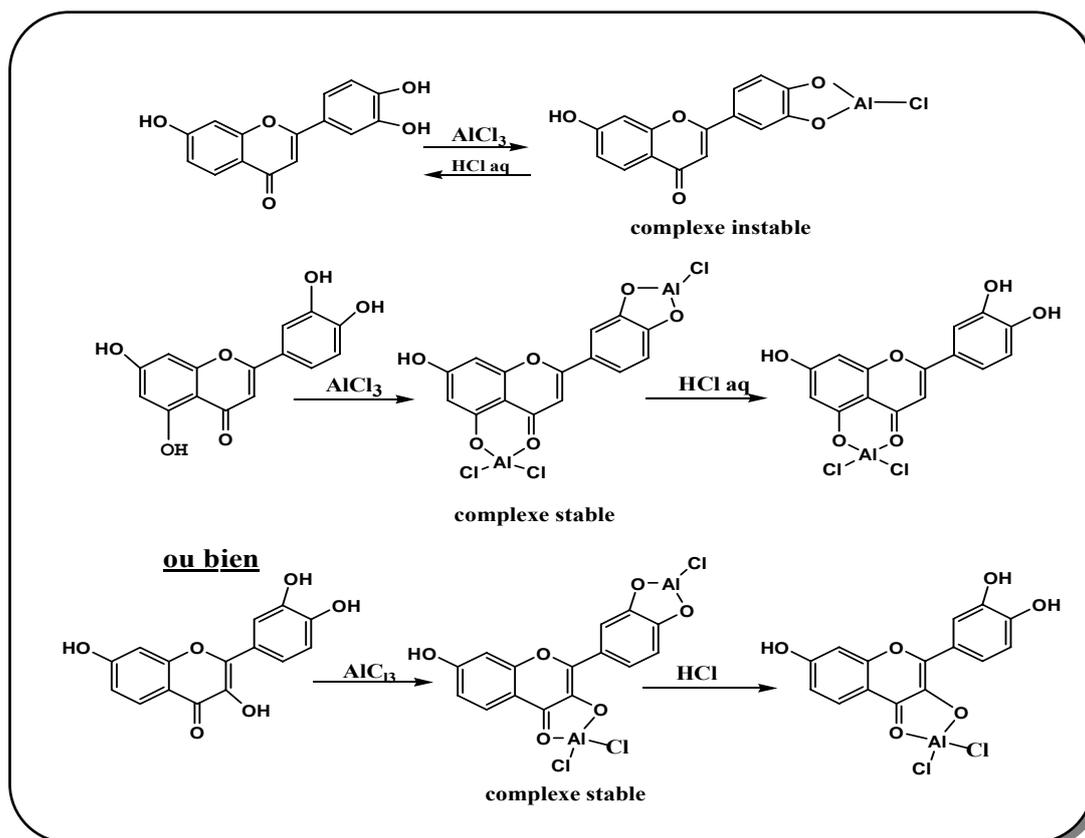


Figure II.16: Formation des différents types de complexes après addition d' AlCl_3 et en présence de HCl

II.11.4. 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.11.5. 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 [113- 114]

Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements utiles, notamment sur les structures ou les noyaux A et B sont substitués [115]. 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.11.6. 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 [116].

C'est une méthode précise et efficace, mais nécessite une grande quantité du produit ce qui limite son utilisation par rapport aux autres méthodes d'analyses.

La RMN du proton (RMN ^1H) : elle informe sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm et permet de connaître [116, 120] :

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

La RMN du carbone 13 (RMN ^{13}C) : donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telles que [105, 120] :

- 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.

Chapitre III
Travaux personnels

III.1. Récolte de la matière végétale:

La plante a été récoltée durant le mois d'avril 2006, de la région de Bechar (**Sud Ouest Algérien**).

L'espèce a été séchée dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires puis séparée en feuilles et fleurs. Ces derniers ont été broyés grossièrement puis pesés (fleurs **255g** ; feuilles **590g**)

III.2. Extraction de la matière végétale:

Le matériel végétal est mis à macérer dans un mélange hydroalcoolique (**Ethanol/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 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures.

Les trois extraits hydroalcooliques récupérés sont réunis et concentrés. A la solution obtenue, on ajoute sous agitation magnétique, de l'eau distillée (à raison de 400 ml d'eau distillée pour 1kg de matière sèche) et du tétraacétate de plomb **Pb(OAc)₄** jusqu'à disparition de la coloration verte au profit d'une coloration marron. 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 de coloration rouge brune. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol

Pour les feuilles:

Le filtrat est épuisé par le chloroforme, la phase organique séchée par (**Na₂SO₄ anhydre**), filtrée et concentrée à sec à une température n'excédant pas 35°C, donne une masse de **18.6g** de l'**extrait chloroforme**.

Durant la concentration de la phase chloroforme, nous avons constaté la formation d'un précipité que nous avons récupéré par filtration (33.1 mg)

La phase aqueuse résiduelle est reprise avec l'acétate d'éthyle. Cette phase acétate séchée par (**Na₂SO₄ anhydre**), filtrée et concentrée à sec, donne un **extrait** de masse **11.5g**.

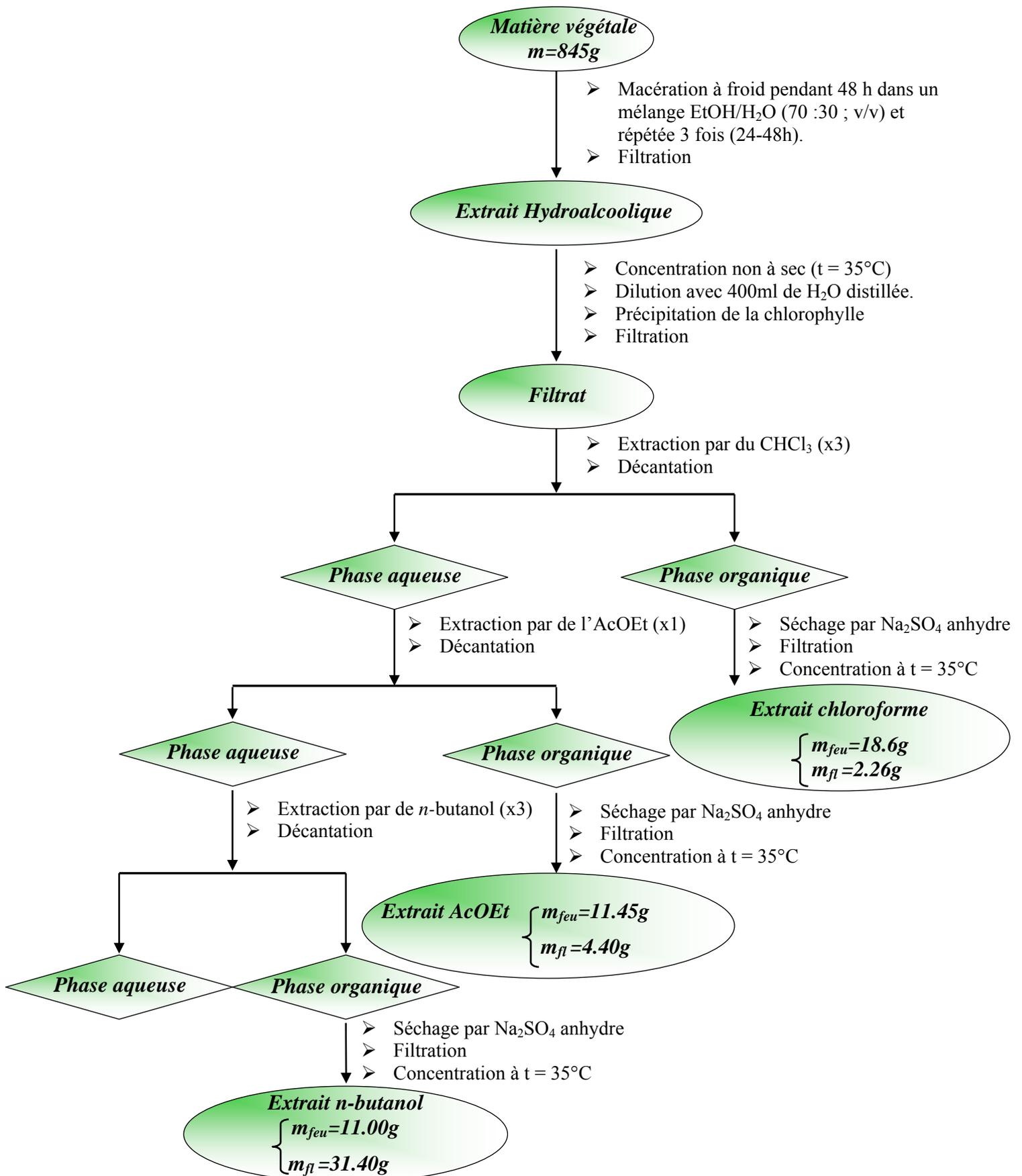
Finalement en suivant la même procédure avec du *n*-butanol, on obtient un **extrait** brut qui pèse **11g**.

Pour les fleurs:

Les fleurs ont subi les mêmes étapes d'extraction citées précédemment, on obtient ainsi les extraits :

- chloroforme de poids **m = 2.26g**
- d'acétate d'éthyle **m=4.4g**
- *n*-butanol de poids **m = 31.4g**

Le protocole d'extraction est résumé dans l'organigramme présenté ci-dessous montrant les différentes étapes du processus d'extraction (schéma III.1).

Schéma III.1: protocole d'extraction de l'espèce *Vitex agnus castus*

III.3. Séparation chromatographique de l'extrait Acétate d'éthyle :

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium, des extraits acétate d'éthyle des fleurs et des feuilles, la meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ dans les proportions (4:1).



Extrait des fleurs Extrait des feuilles
Système d'élution CHCl_3 : MeOH (4 : 1)

Figure III.1 : Profil chromatographique des deux extraits acétate d'éthyle des fleurs et feuilles de l'espèce *Vitex agnus-castus*.

La figure précédente montre un profil chromatographique similaire pour les deux extraits avec une différence de concentrations des différents spots.

Notre choix était en faveur de l'extrait des feuilles qui montre d'après la figure III-2 une richesse en composés flavoniques.

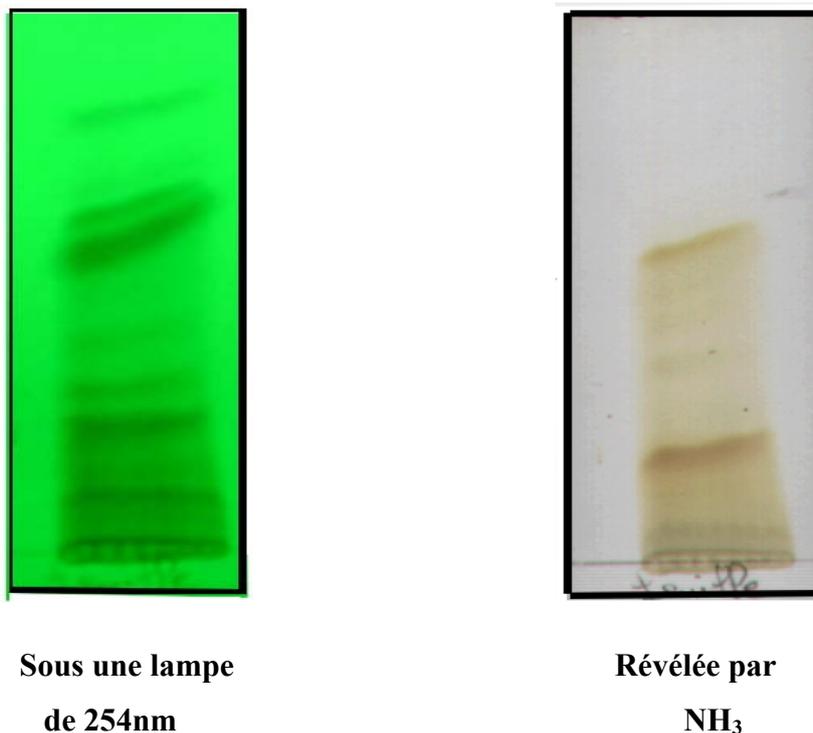


Figure III.2 : Plaque CCM de l'extraits acétate d'éthyle feuilles éluee dans le système CHCl₃ : MeOH (4 :1)

III.3.1. Séparation chromatographique sur colonne :

Une masse d'environ 8g d'extrait d'acétate d'éthyle est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans le chloroforme. L'élution à été réalisée par du CHCl₃ avec un gradient de CH₃OH en commençant par le chloroforme pur et en terminant par le méthanol pur avec un fractionnement tous les 25 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 révlées avec de l'acide sulfurique et chauffées pendant trois minutes à 100°C. La progression de cette colonne est donnée dans le tableau III.1.

Tableau III.1: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *Vitex agnus-castus*

Pots	Fractions	Système d'élution	
		CHCl ₃ %	CH ₃ OH %
1-5	f ₁	100	0
6-10	f ₂		
11-15	f ₃		
16-20	f ₄		
21-25	f ₅		
26-30	f ₆		
31-35	f ₇		
36-40	f ₈		
41-45	f ₉		
46-50	f ₁₀		
51-53	f ₁₁		
54-60	f ₁₂		
61-63	f ₁₃		
64-66			
67-70	f ₁₄		
71-93	f ₁₅		
94	f ₁₆		
95	f ₁₇		
96-98	f ₁₈		
99-107	f ₁₉		
108-110	f ₂₀		
111-113	f ₂₁		
114-115	f ₂₂		
116-120	f ₂₃		
121-125	f ₂₄		
126-130	f ₂₅	99	1
131-144	f ₂₆		

Tableau III.1: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *Vitex agnus-castus* (suite)

<i>Pots</i>	<i>Fractions</i>	Système d'élution	
		<i>CHCl₃</i> %	<i>CH₃OH</i> %
145-150	f ₂₇	99	1
151-155		98	2
156-166			
167-175	f ₂₈	96	4
176-180	f ₂₉		
181-195			
196-208	f ₃₀		
209-213	f ₃₁		
214-226	f ₃₂	94	6
227-229	f ₃₃		
230-232	f ₃₄		
233-245	f ₃₅		
246-256	f ₃₆		
257-275	f ₃₇	92	8
276-280			
281-290	f ₃₈		
291-300	f ₃₉		
301-310	f ₄₀	90	10
311-317			
318-326	f ₄₁	88	12
327-372	f ₄₂		
373-381			
382-391	f ₄₃		
392-405	f ₄₄		
406-433	f ₄₅	85	15
434-475			

Tableau III.1: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *Vitex agnus-castus* (suite)

<i>Pots</i>	<i>Fractions</i>	Système d'élution	
		<i>CHCl₃</i> %	<i>CH₃OH</i> %
476-478	f ₄₆	85	15
479-495		80	20
496-521	f ₄₇	75	25
522-564		70	30
565-600			
601-608	f ₄₈	65	35
609-644		60	40
645-690		55	45
691-734		50	50
735-740			
741-765	f ₄₉		

Les fractions obtenues de la colonne ont été testées par les systèmes **CH₃Cl / CH₃OH** et **CH₃Cl / AcOEt / CH₃OH** (avec différentes proportions). Ces tests nous ont permis de réaliser un second regroupement que nous représentons dans le tableau III-2

Tableau III.2 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle de *Vitex agnus-castus*

<i>N° des fractions</i>	<i>Non de la fraction</i>	<i>Le poids de la fraction (mg)</i>	<i>Observation</i>
f ₁ -f ₅	F ₁	6.8	Graisses
f ₆ -f ₁₀	F ₂	12.9	Mélange + chlorophyle
f ₁₁	F ₃	10.7	} Mélange à faible concentration
f ₁₂	F ₄	3.9	
f ₁₃ - f ₁₆	F ₅	37.8	Mélange (absorbe à 254 nm)
f ₁₇ -f ₂₃	F ₆	22.7	Mélange complexe
f ₂₄ -f ₂₆	F ₇	16.8	Mélange complexe
f ₂₇	F ₈	17.2	Mélange + chlorophyle
f ₂₈ -f ₂₉	F ₉	11.9	Mélange séparable
f ₃₀	F ₁₀	54.3	Mélange séparable
f ₃₁	F ₁₁	47.0	Mélange séparable
f ₃₂	F ₁₂	66.8	Mélange séparable
f ₃₃ -f ₃₄	F ₁₃	31.7	Mélange séparable
f ₃₅	F ₁₄	104.4	Mélange séparable
f ₃₆	F ₁₅	181.9	Mélange séparable (Le 1 ^{er} spot du produit majoritaire et les autres spots absorbent sous 254nm)
f ₃₇ - f ₃₉	F ₁₆	462.4	Mélange + une bonne quantité d'un précipité "produit majoritaire"
f ₄₀	F ₁₇	134.9	} Le produit majoritaire +des spots absorbent sous 254nm
f ₄₁	F ₁₈	117.2	
f ₄₂ -f ₄₄	F ₁₉	1101.2	
f ₄₅	F ₂₀	1159.8	Mélange séparable
f ₄₆	F ₂₁	501.0	Mélange séparable
f ₄₇	F ₂₂	1165.3	Mélange complexe +précipite
f ₄₈	F ₂₃	1211.2	} Mélange complexe
f ₄₉ -f ₅₀	F ₂₄	1345.4	

Parmi les 24 fractions obtenues, on a procédé à la séparation des fractions, F_{10} , F_{11} , F_{12} , F_{16} et F_{22} à cause soit de leur simplicité soit de leur poids relativement important. Pour les fractions F_{10} , F_{11} et F_{12} la séparation a été effectuée sur couche mince de gel de silice, alors que les fractions F_{16} et F_{22} contiennent un précipité.

III.3.2. Séparation et purification des fractions sélectionnées:

➤ Le précipité de la phase chloroforme :

Ce précipité de masse 33.1 mg soluble dans le MeOH, a été testé sur plaque analytique de gel de silice, éluee par le système $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} : (9/1)$. Ce précipité donne un spot de couleur noir violette sous la lumière de Wood (365 nm). La figure III.3 montre le profil chromatographique du précipité.

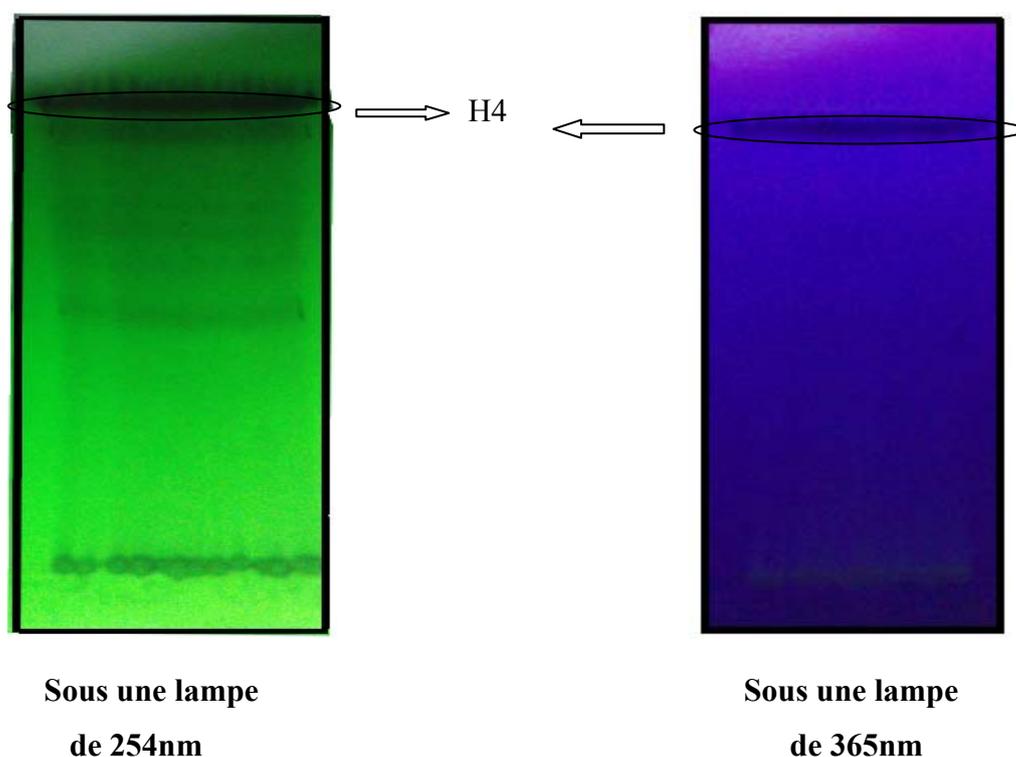


Figure II.3 : Plaque CCM du précipité renfermant le produit H4

Une purification de ce dernier sur une plaque de gel de silice dans le système $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} : (9/1)$ a permis l'obtention du produit H4.

➤ **La fraction F₁₀:**

La fraction F₁₀ de masse 54.3 mg a subi une séparation sur plaque de gel de silice, en utilisant comme système d'éluion : (CHCl₃/CH₃OH) (9.8 :0.2), les résultats obtenus sont reportés sur le tableau III.3.

Tableau III.3 : Résultat de séparation de la fraction F₁₀

<i>SOUS FRACTIONS</i>	<i>REMARQUES</i>
F ₁₀₋₁	(1,36 mg), produit pur de fluorescence noir violette sous 365 nm
F ₁₀₋₂	(1,93 mg), produit pur de fluorescence noir violette sous 365 nm
F ₁₀₋₃	mélange de fluorescence noir sous 254 nm et invisible sous 365 nm

➤ **La fraction F₁₁:**

La fraction F₁₁ de masse de 47mg, a subi une séparation sur plaque de gel de silice avec le même système d'éluion que la fraction F₁₀ CHCl₃ / CH₃OH (9.8 :0.2), les sous fractions obtenues sont rassemblées dans le tableau III.4:

Tableau III.4 : Résultat de séparation de la fraction F₁₁

<i>SOUS FRACTION</i>	<i>REMARQUES</i>
F ₁₁₋₁	Des traces du produit F ₁₀₋₁
F ₁₁₋₂	Des traces du produit F ₁₀₋₂
F ₁₁₋₅	(0,1 mg), produit de fluorescence noir violette sous 365 nm

➤ **La fraction F₁₂:**

Cette fraction de masse 66.8mg, a subi deux éluions dans le système CHCl₃/CH₃OH (9.8 :0.2), pour donner les sous fractions rassemblées dans le tableau III-5:

Tableau III-5 : Résultat de séparation de la fraction F₁₂

<i>SOUS FRACTION</i>	<i>REMARQUES</i>
F ₁₂₋₁	Produit de fluorescence noir sous 254 nm
F ₁₂₋₂	(0.9mg) produit de fluorescence noir violette sous 365 nm
F ₁₂₋₃	produit de fluorescence noir sous 254 nm
F ₁₂₋₄	Produit de fluorescence noir sous 254 nm
F ₁₂₋₅	(0.19mg), produit pur de fluorescence noir violette sous 365 nm

Une co-chromatographie sur plaque de gel de silice a permis de rassembler le produit F₁₁₋₅ et le produit F₁₂₋₂. Le produit résultant a subi une purification sur une plaque de gel de silice, éluée par le système CHCl₃/CH₃OH : (9.8/0.2) (F₁₁₋₅≡ F₁₂₋₂)

➤ **La fraction F₁₆:**

Cette fraction de masse 276.3mg, contenant un produit majoritaire qui a précipité dans le mélange (CHCl₃ / MeOH). Ce précipité a été lavé au méthanol pour donner le composé F_{16-p} (m_p=5 mg). Par ailleurs, ce précipité jaunâtre est dissous dans l'acétone, testé sur une plaque analytique de gel de silice, élué avec le système CHCl₃ / AcOEt / MeOH : (4/2/1), donne un spot unique de fluorescence noir violette à 365 nm.

Après analyse des fractions F₁₆, F₁₇, F₁₈ et F₁₉ le produit F_{16p} s'est révélé majoritaire

➤ **La fraction F₂₂:**

Cette fraction contient un précipité (m =6 mg) qui a été lavé plusieurs fois avec le méthanol et récupéré sous forme de poudre jaune.

Conclusion :

Les travaux de séparation chromatographique ont permis l'obtention de sept produits à l'état pur et natif dont quatre (F₁₀₋₁, F₁₀₋₂, F₁₁₋₅≡F₁₂₋₂, et F₁₂₋₅) sont en très faible quantité. Alors, nous avons soumis à l'étude structurale les trois produits (H₄, F_{16-p}, F_{22-p}).

Chapitre IV
Interprétation des résultats

IV.1. Détermination de structure du composé H4 :

IV.1.1. Fluorescence :

Le composé **H4** se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le chloroforme. Ce composé de fluorescence noire violette sous la lumière de Wood (365 nm) réagit avec le réactif NH_3 en affichant une coloration jaune terne laissant envisager une structure de type flavonoïde (flavone ou flavonol substitué en 3).

IV.1.2. Comportement chromatographique :

Le produit H4 a été élué sur plaque chromatographique polyamide DC6.6 dans deux systèmes de solvant, l'un est organique : Toluène/MeCOEt/MeOH (4/3/3), l'autre est aqueux $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCOEt}/\text{MeOH}/(\text{Ac})_2\text{CH}_2$ (13/3/3/1). Ce même produit élué sur plaque chromatographique cellulose dans un système aqueux (acide acétique 15 %), a donné les résultats consignés dans le tableau ci-dessous :

Système		$R_f * 100$
Toluène/MeCOEt/MeOH	4 / 3 / 3	89.6
$\text{H}_2\text{O}/\text{MeCOEt}/\text{MeOH}/(\text{Ac})_2\text{CH}_2$	13 / 3 / 3 / 1	10.7
AcOH	15 %	22

Les valeurs du R_f enregistrées pour ce produit révèlent la méthylation des hydroxyles du squelette flavonique.

IV.1.3. La spectrophotométrie UV:

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

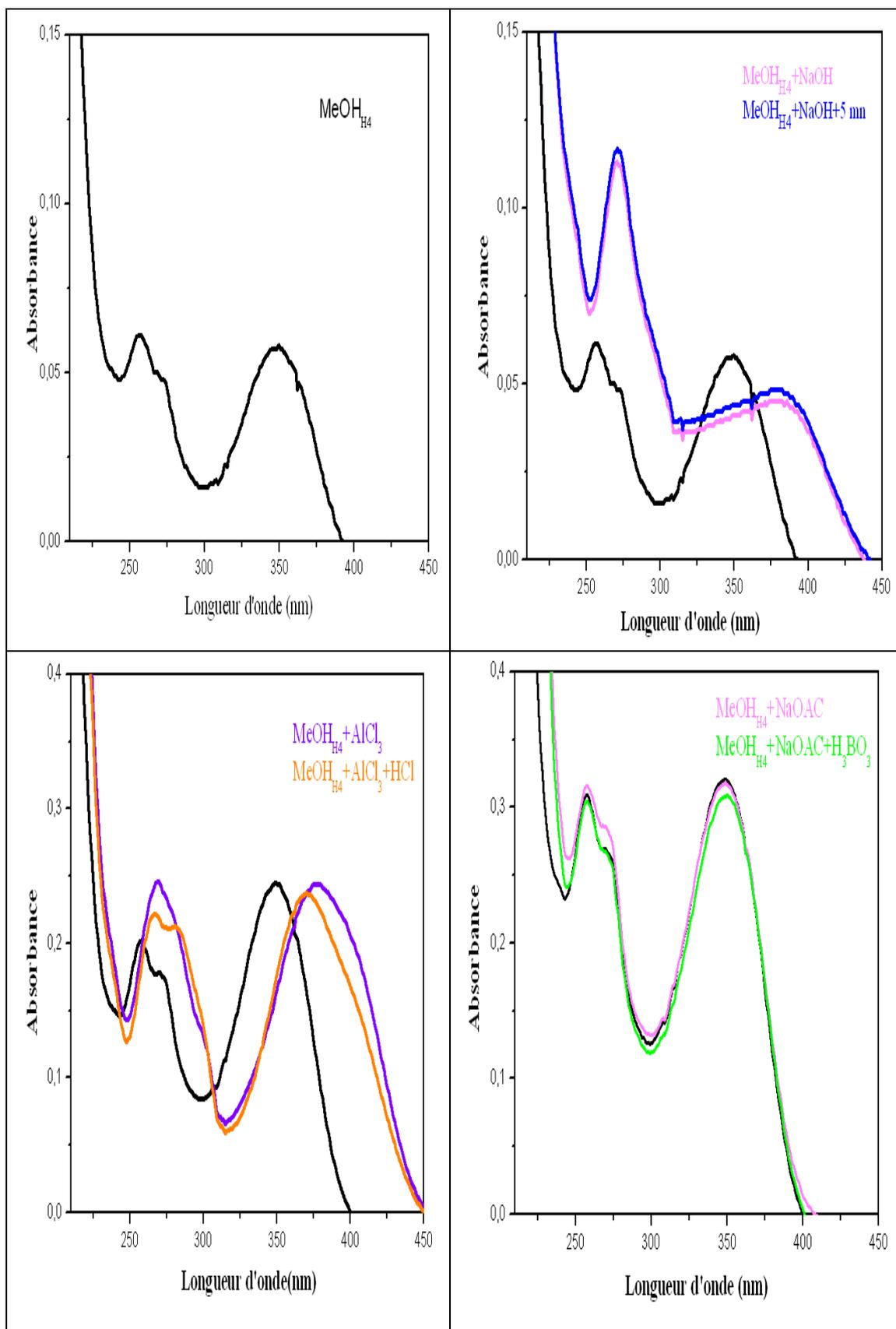
- ❖ Le spectre enregistré dans le méthanol montre deux bandes d'absorption dont la bande I est à 350 nm indiquant ainsi qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavonol, la fluorescence noire violette sous lumière de Wood montre qu'il s'agit d'un flavonol substitué en 3 (3-OR₁).
- ❖ La présence d'un épaulement dans la bande II du spectre UV de H4 sur le spectre MeOH indique par ailleurs la présence d'un système 3',4'-dioxycéné [121].

- ❖ L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_1=+33\text{nm}$) avec une diminution de l'intensité comparativement à celui enregistré dans le méthanol laisse supposer la présence d'un OR₂ en 4'. L'absence d'une nouvelle bande dans ce même spectre révèle l'absence d'un OH libre en position 7. Cette hypothèse est confirmée par l'absence de déplacement bathochrome de la bande II après addition de la base faible NaOAc comparativement au spectre enregistré dans le méthanol.
- ❖ Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_1 = +27 \text{ nm}$) enregistré après addition de AlCl₃ comparativement à celui enregistré dans le méthanol révèle la présence d'un OH libre en 5.
- ❖ L'absence d'un déplacement hypsochrome de la bande I en comparant le spectre AlCl₃ + HCl et le spectre AlCl₃ indique l'absence de groupe ortho-dihydroxyle libre sur le squelette flavonique.
- ❖ Le déplacement bathochrome ($\Delta\lambda_1 = +21 \text{ nm}$) de la bande I en comparant les spectres méthanol et AlCl₃ + HCl confirme la présence d'un OH libre en 5 et laisse prévoir une oxygénation en 6.

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

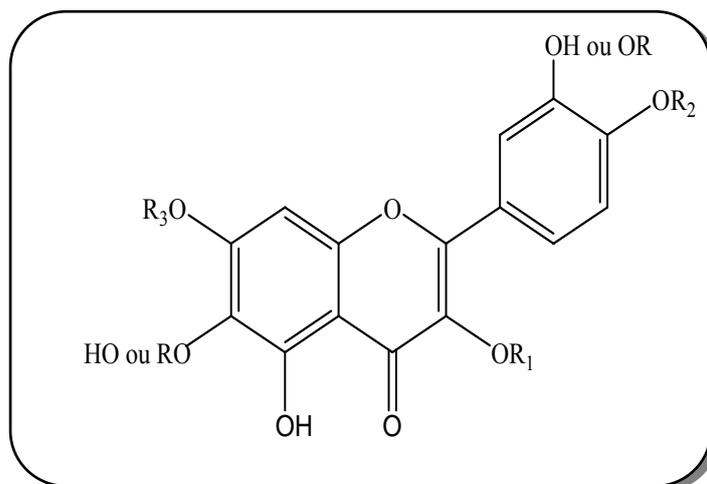
Tableau IV.1: Données de la série spectrale UV du composé H4

RÉACTIFS	BANDE I	BANDE II	AUTRE BANDE	COMMENTAIRES
MeOH	350	258	271	Flavonol (3-OR)
+ NaOH	383	271	/	OR en 4'
+AlCl ₃	377	270	/	OH libre en 5 Avec un 6-OR
+AlCl ₃ +HCl	371	268	281	
+NaOAc	349	258	271	OR en 7
+NaOAc+H ₃ BO ₃	350	258	268	/
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				



Spectre IV.1: La série spectrale UV du composé H4

Ces résultats permettent de proposer la structure partielle suivante :



IV.1.4. Spectrométrie RMN-¹H :

L'examen du spectre RMN ¹H (spectre IV-2) du composé **H4** permet de tirer les indications suivantes :

- ❖ Un singlet d'intégration 1H à $\delta = 12.67$ ppm attribuable à un groupement hydroxyle en position 5 du cycle A.
- ❖ Un singlet d'intégration 1H à $\delta = 6,53$ ppm attribuable à H-8.
- ❖ Un doublet large ($J = 8,5$ Hz) d'intégration 1H à $\delta = 7,75$ ppm attribuable à H-6'.
- ❖ Un singlet large d'intégration 1H à $\delta = 7,71$ ppm attribuable à H-2'.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,99$ ppm ($J = 8,5$ 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 dioxygénation de ces atomes.

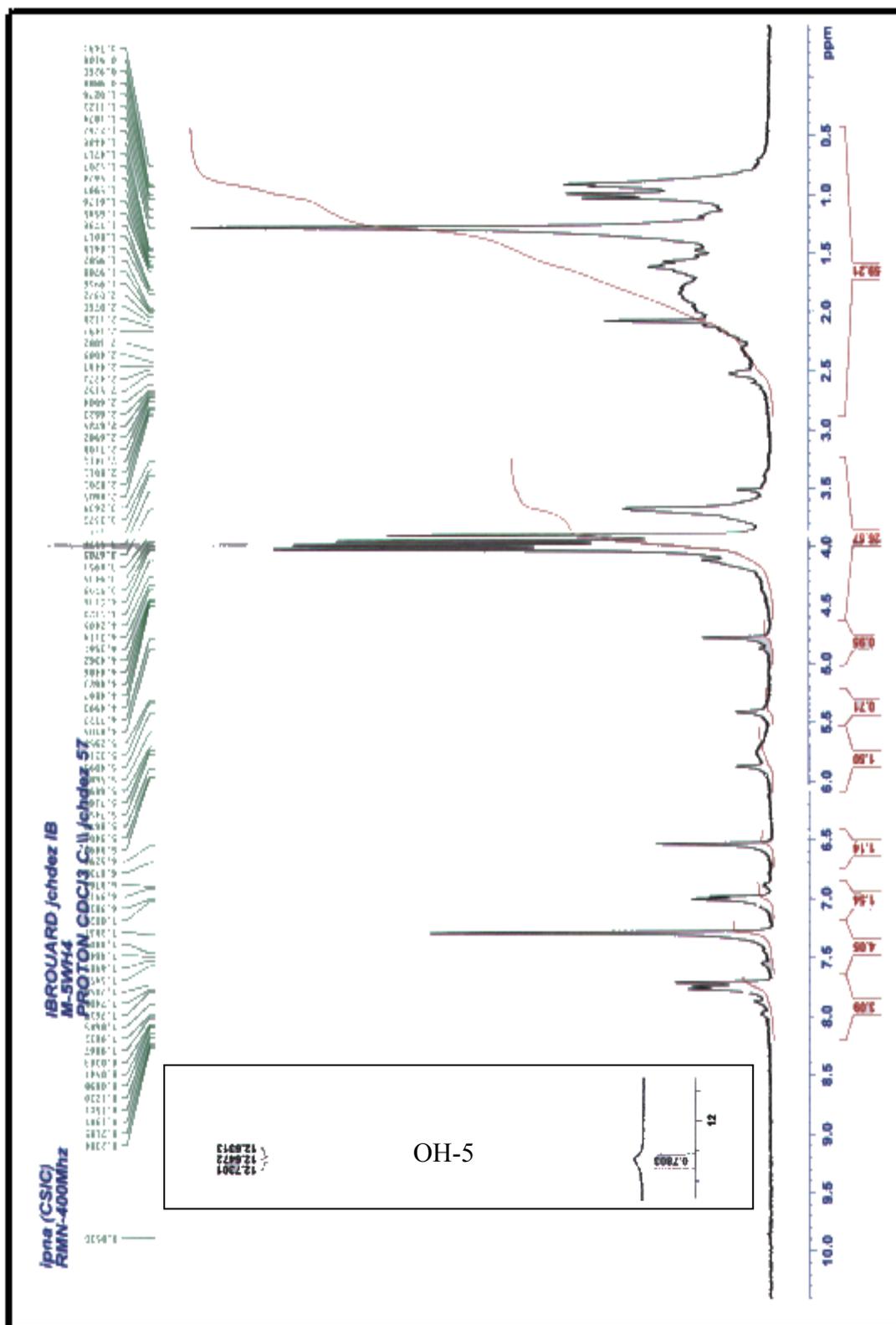
- ❖ Un ensemble de 4 singlets, chacun d'intégration 3H à $\delta = 3.89, 3.94, 3.98$ et 4.01 ppm respectivement révèle la présence de 4 groupements méthoxyle.

La présence de ces 4 signaux prouve que R, R₁, R₂, et R₃ sont des méthyles.

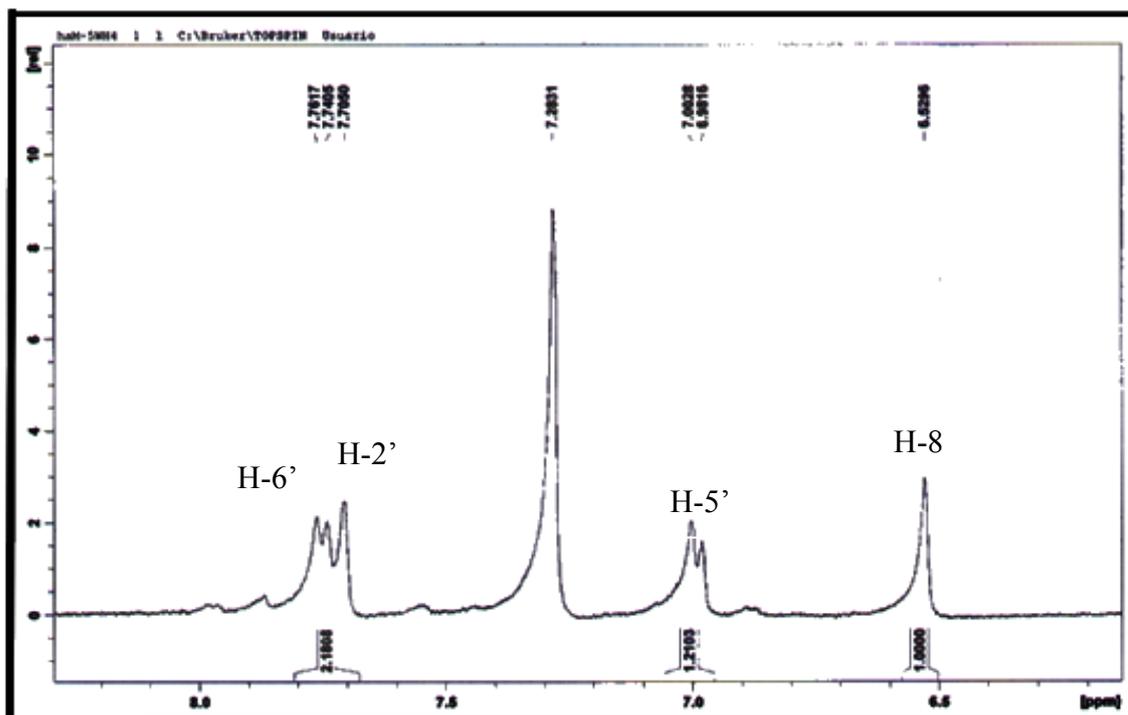
Les données relatives à la RMN-¹H de ce composé sont reportées dans le tableau IV-1.

Tableau IV.1: Données de la spectrométrie RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃)
du composé **H4**

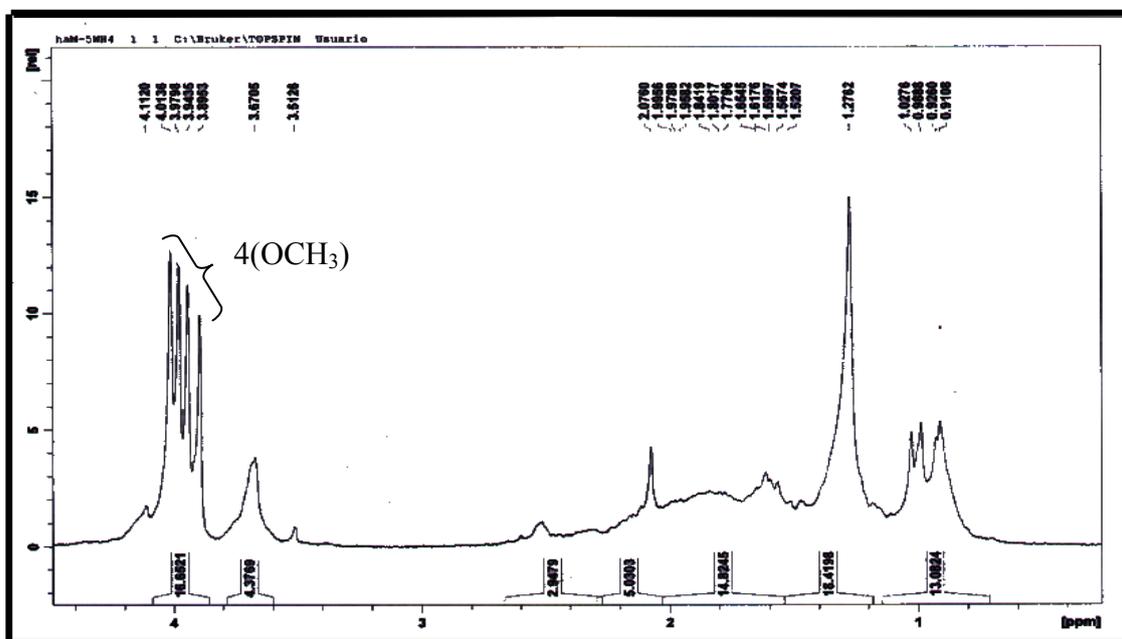
DEPLACEMENT CHIMIQUE δ (PPM)	INTÉGRATION	MULTIPLICITÉ (J HZ)	ATTRIBUTION
12.67	1H	s	5-OH
7,75	1H	dl (8,5)	H-6'
7,71	1H	sl	H-2'
6,99	1H	d (8,5)	H-5'
6,53	1H	s	H-8
3.89	3H	s	OCH ₃
3.94	3H	s	OCH ₃
3.98	3H	s	OCH ₃
4.01	3H	s	OCH ₃



Spectre IV.2: Spectre de RMN-¹H (400 MHz) du composé H4 dans CDCl₃



Spectre IV.2: Spectre de RMN- ^1H (400 MHz) étalé (6 à 8.3 ppm)
du composé **H4** dans CDCl_3



Spectre IV.2: Spectre de RMN- ^1H (400 MHz) étalé (0 à 4.3 ppm)
du composé **H4** dans CDCl_3

Les données de la RMN-¹H rassemblées avec celles de la série spectrale UV permettent de proposer la structure suivante.

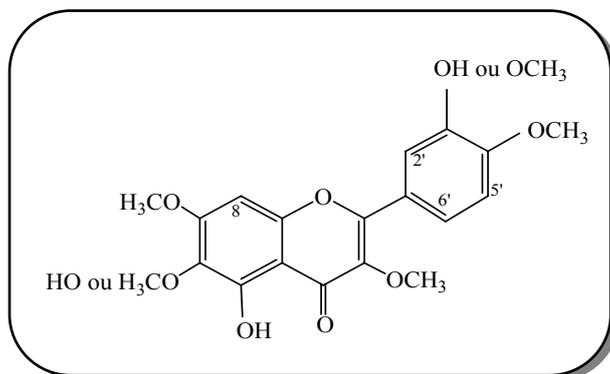
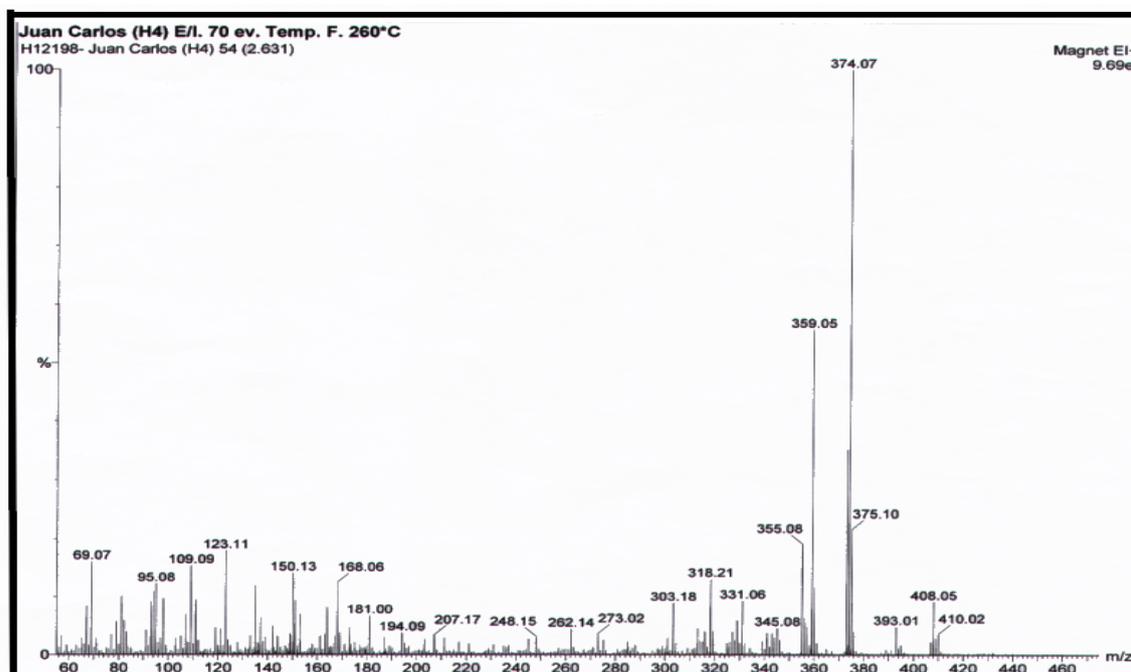


Figure IV.2: structure du composé H4

IV.1.5. Spectrométrie de masse :

Cette structure est confirmée par l'étude du spectre de masse en ionisation sous impact électronique (EI) en mode positif (spectre IV-3). Ce spectre montre un pic à m/z 374 qui correspond à l'ion moléculaire M^+ et une masse de 374 Da confirmant le squelette d'un flavonoïde de type aglycone de formule brute $C_{19}H_{18}O_8$ avec un degré d'insaturation de 11.



Spectre IV.3: Spectres SMIE du composé H4

La présence du fragment à m/z 359 indique une perte de CH_3^\bullet pouvant correspondre à la perte d'un méthyle, le fragment à m/z 331 révèle la perte d'un CH_3CO (43) et enfin le fragment à m/z 151 indique que le cycle B comporte deux substituants, un méthoxy et un hydroxyle. La figure IV.3 illustre les différentes voies de fragmentation de ce composé.

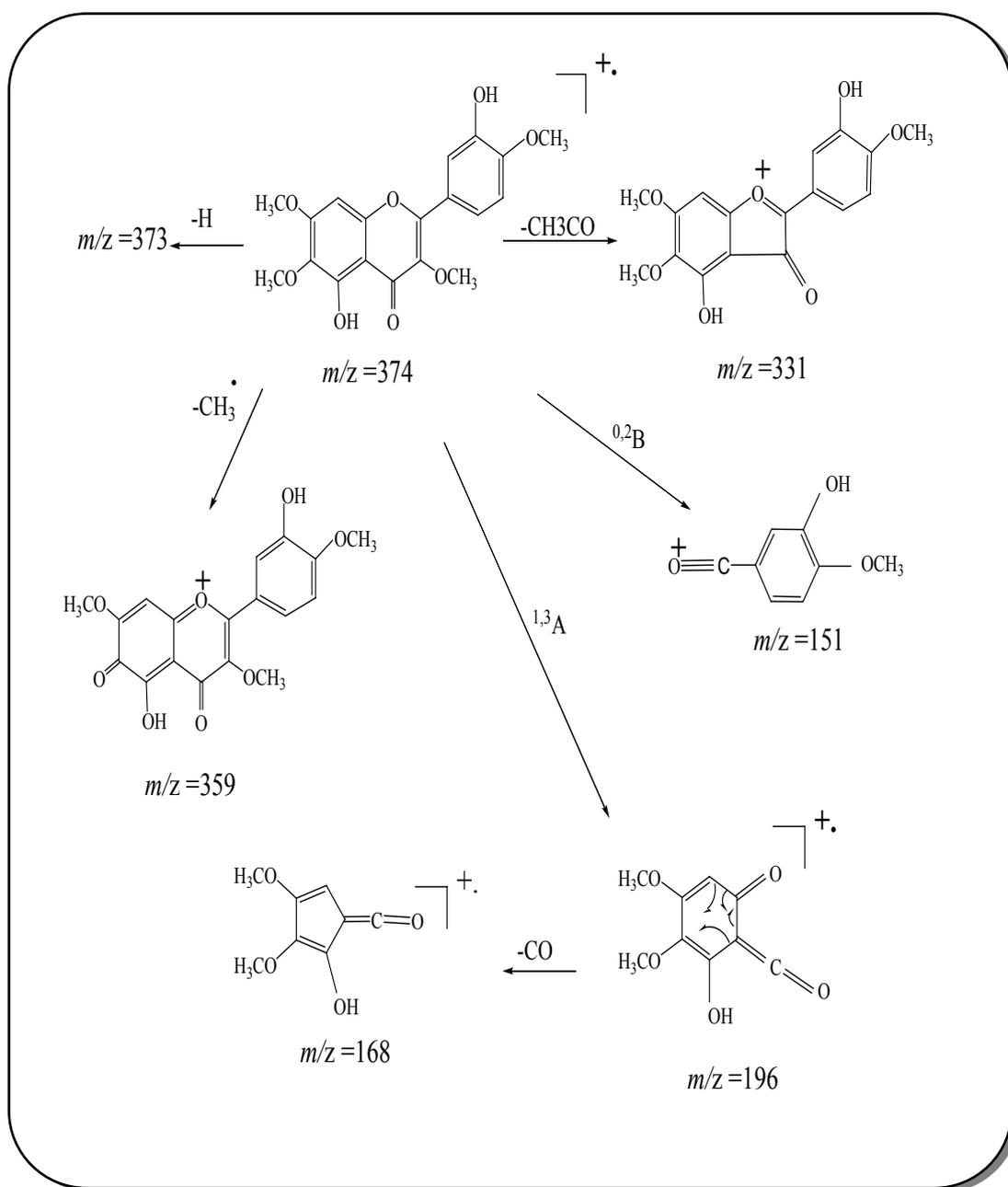


Figure IV.3: Différentes voies de fragmentation du composé H4

L'ensemble de ces données est en faveur de la structure du composé qui est le: **5,3'dihydroxy 3, 6, 7,4'-tetraméthoxyflavone** connue sous le nom de **Casticine**

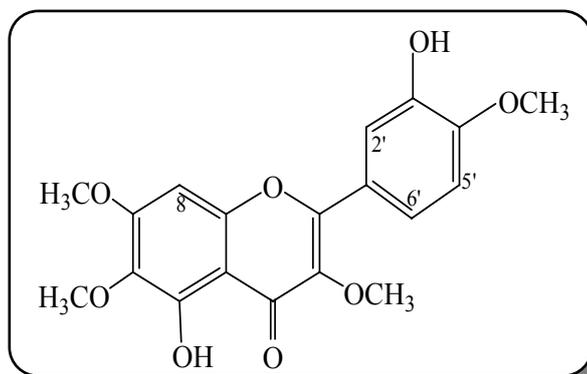


Figure IV.4: la structure du composé **H4**

Le composé **H4** est donc la casticine, dont la présence a été relevée dans un certain nombre d'espèces du genre *Vitex* [16].

IV.2. Détermination de structure du composé **F_{16p}** :

Le composé **F_{16p}** se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans l'acétone. Ce composé d'une fluorescence noire violette sous lumière de Wood réagit avec le réactif NH_3 en affichant une coloration jaune laissant envisager une structure de type flavonoïde.

IV.2.1. Comportement chromatographique :

Le produit **F_{16p}** a été élué sur plaque chromatographique polyamide DC6.6 dans deux systèmes de solvant, l'un est organique (4/3/3), l'autre est aqueux (13/3/3/1), ce même produit élué sur plaque chromatographique cellulose dans un système aqueux (acide acétique 15 %), a donné les résultats consignés dans le tableau ci-dessous :

Système		R _f * 100
Toluène/MeCOEt/MeOH	4 / 3 / 3	51,6
H ₂ O/ MeCOEt/MeOH/(Ac) ₂ CH ₂	13 / 3 / 3 / 1	3,45
AcOH	15 %	7,2

L'augmentation de la valeur du R_f dans le système organique indique une méthylation des hydroxyles de la molécule.

IV.2.2. La spectrophotométrie UV:

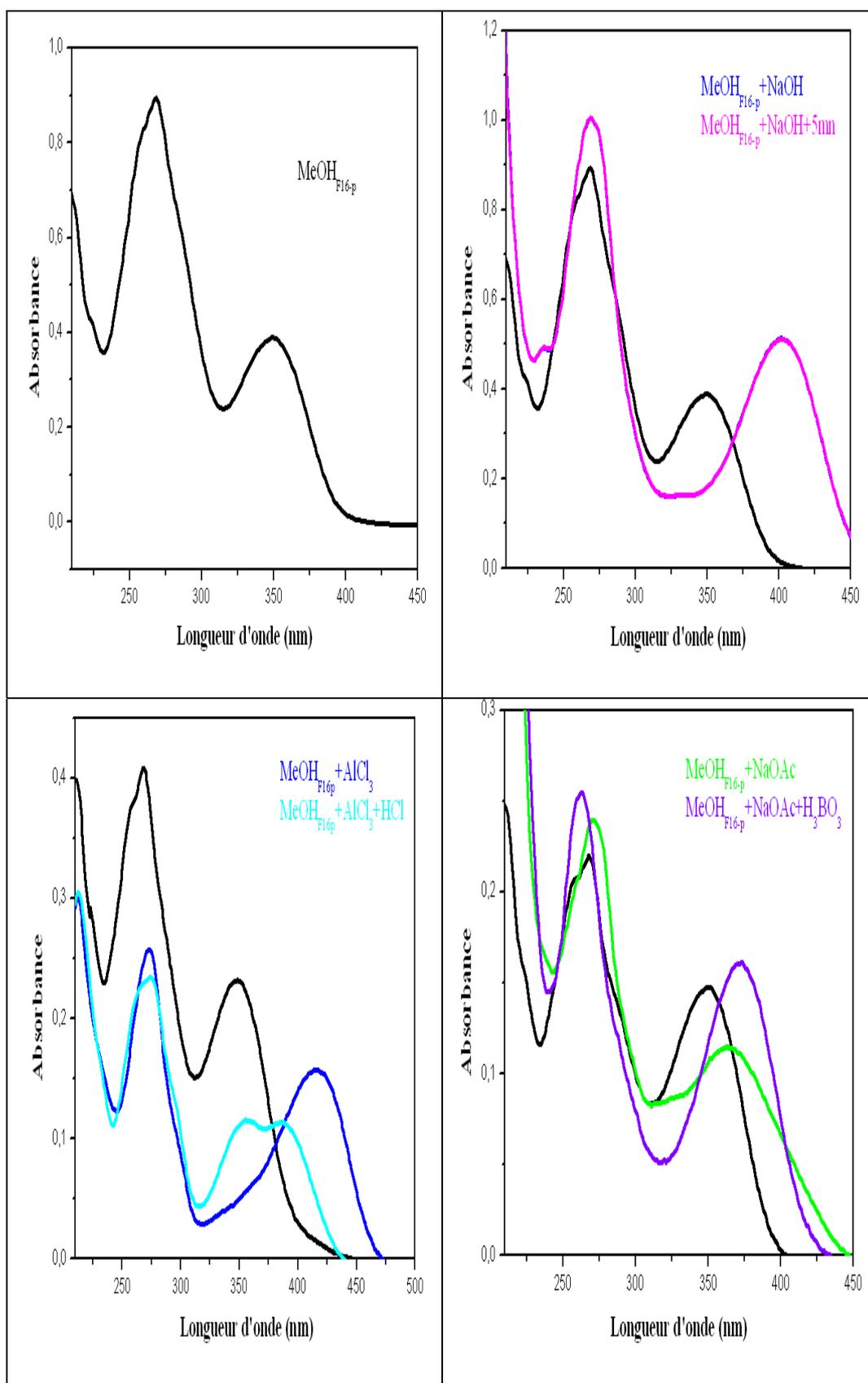
Le spectre d'absorption UV montre deux λ_{\max} à 268 et 349 nm, caractéristiques des bandes II et I d'une flavone ou un flavonol substitué en 3.

- ❖ L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +53\text{nm}$) avec une augmentation de l'intensité indiquent ainsi la présence d'un OH libre en 4'.
- ❖ Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +39\text{ nm}$) en comparant les spectres AlCl_3+HCl et CH_3OH , laisse prévoir la présence d'un groupe hydroxyle libre en position 5.
- ❖ Le déplacement hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = -30\text{ nm}$) enregistré en comparant les spectres AlCl_3+HCl et AlCl_3 laisse prévoir la présence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B.
- ❖ Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +25\text{nm}$) en comparant le spectre enregistré dans $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ avec celui enregistré dans le CH_3OH confirme la présence du système ortho dihydroxyle sur le cycle B.
- ❖ L'addition de NaOAc provoquant un déplacement très faible de la bande II ($\Delta\lambda_{II} = +1\text{ nm}$) par rapport au spectre CH_3OH suppose la présence d'un OR en position 7. Cette supposition est confirmée par l'absence d'une nouvelle bande sur le spectre enregistré dans NaOH comparativement à celui enregistré dans le MeOH.

Les données relatives à cette série spectrale sont rassemblées dans le tableau IV-3.

Tableau IV-3: Données de la série spectrale UV du composé F_{16p}

RÉACTIFS	BANDE I	AUTRES BANDES	BANDE II	COMMENTAIRES
MeOH	349	/	269	Flavone ou Flavonol (3-OR)
+ NaOH	402	/	269	OH libre en 4'
+AlCl ₃	418	/	273	ortho di-OH sur le cycle B et OH libre en 5
+AlCl ₃ +HCl	388	356	275	
+NaOAc	363	/	270	OR en 7
+NaOAc+H ₃ BO ₃	374	/	263	ortho di-OH sur le cycle B
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				



Spectre IV.4: La série spectrale UV du composé F_{16p}

Selon les résultats de la série spectrale UV, la structure partielle proposée pour le composé F_{16p} est la suivante.

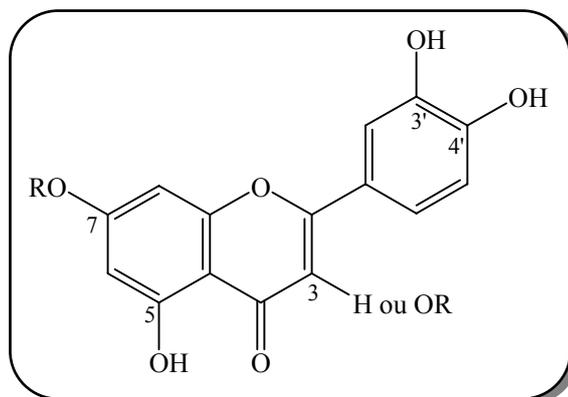


Figure IV.4: la structure partielle du composé F_{16p}

IV.2.3. Spectrométrie RMN- 1H :

L'étude du spectre RMN- 1H montre la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type **flavone** reconnaissable par :

- ❖ Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6.61$ ppm attribuable à H-3.
- ❖ Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6.55$ ppm, le second à $\delta = 6.27$ ppm avec une constante de couplage $J = 2.1$ 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 $\delta = 13.05$ ppm attribuable à un OH formant une chélation avec le carbonyle montre que cette position est hydroxylée.
- ❖ Un doublet de doublé d'intégration 1H ($J = 2,1$ Hz) à $\delta = 7.48$ ppm partiellement recouvert par un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,52$ ppm attribuable à H-6'.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H ($J = 2,1$ Hz), indicateur d'un couplage méta à $\delta = 7,52$ ppm attribuable à H-2'.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7.02$ ppm ($J = 8,2$ Hz), indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5'.

Les trois signaux confirment la disubstitution du cycle B.

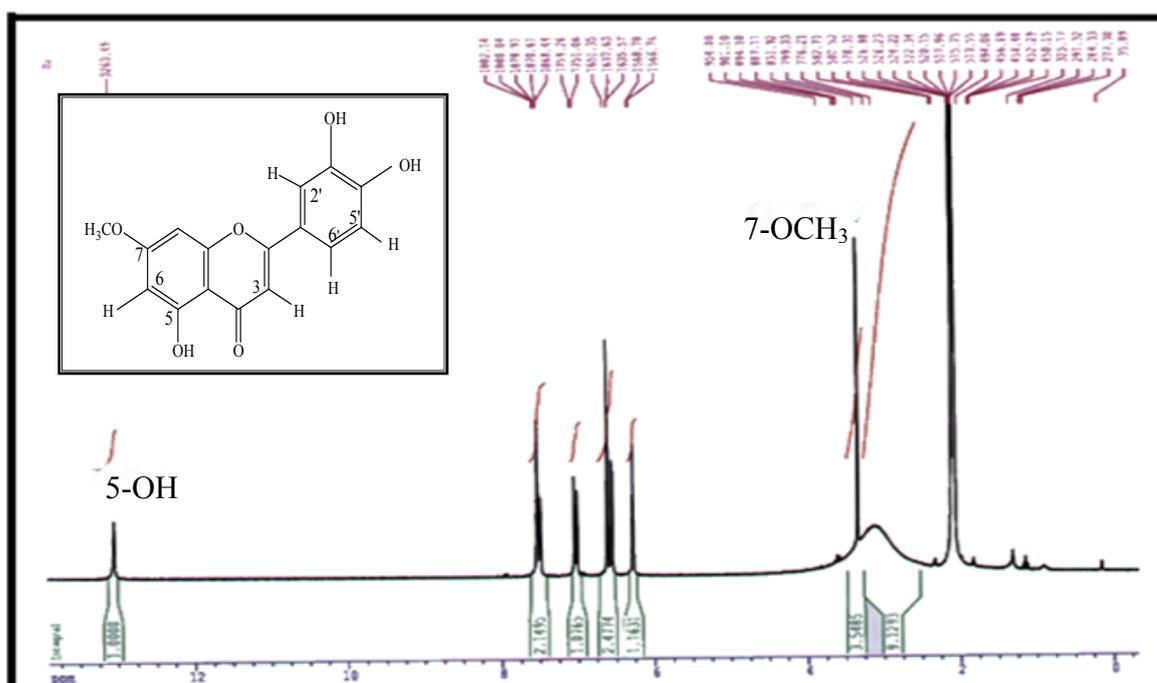
- ❖ Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3.33$ ppm attribuable à un groupement OCH_3 .

La combinaison de ces données avec celles de la série spectrale UV permet de localiser le groupement méthoxyle en position 7.

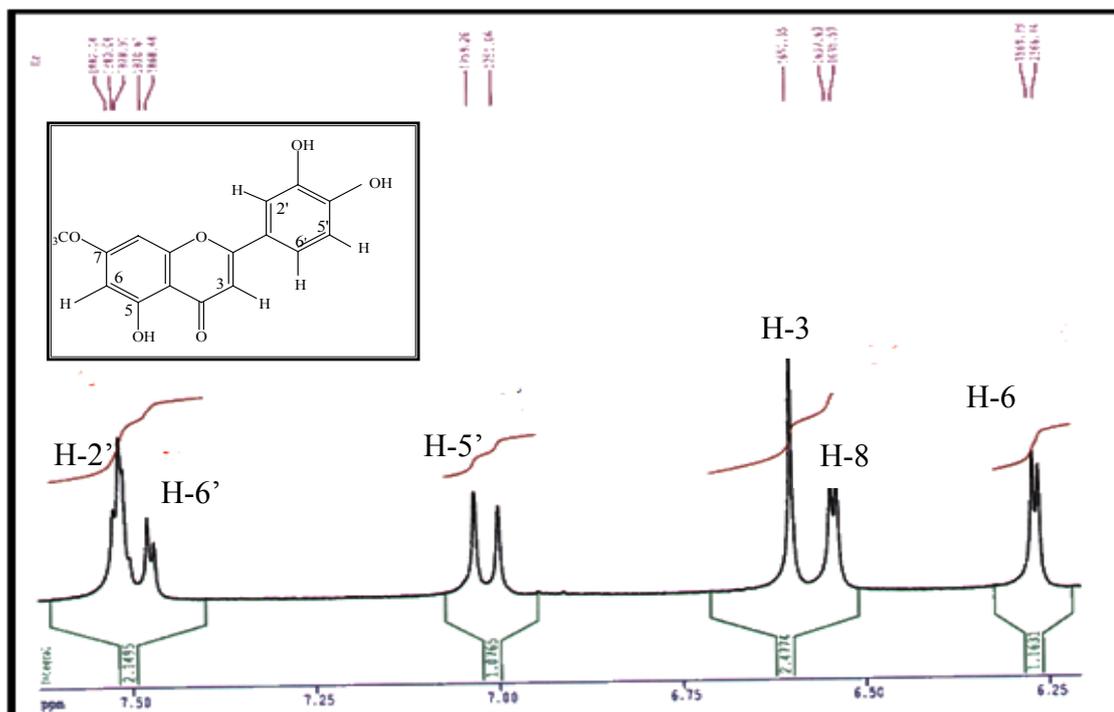
Les données relatives à la RMN-¹H de ce composé sont reportées dans le tableau IV.4

Tableau IV.4: Données de la spectrométrie RMN-¹H (250 MHz) du composé **F_{16p}** dans (CD₃)₂CO

DEPLACEMENT CHIMIQUE δ(PPM)	INTÉGRATION	MULTIPLICITÉ (J HZ)	ATTRIBUTION
13.05	1H	s	5-OH
7,52	1H	d (2,1)	H-2'
7.48	1H	dd (8,6 et 2,1)	H-6'
7.02	1H	d (8,6)	H-5'
6.60	1H	s	H-3
6.55	1H	d (2.1)	H-8
6,27	1H	d (2.1)	H-6
3.33	3H	s	7-O CH ₃



Spectre IV.5: Spectre de RMN-¹H (250 MHz) du composé **F_{16-p}** dans (CD₃)₂CO



Spectre IV.5: Spectre de RMN- ^1H (250 MHz) étalé (6.25 à 7.55 ppm) du composé F_{16-p} dans $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

L'ensemble de ces données suggère la structure: **5.3'.4'-trihydroxy 7-méthoxy flavone** connue sous le nom de **7-methyl Lutéoline**.

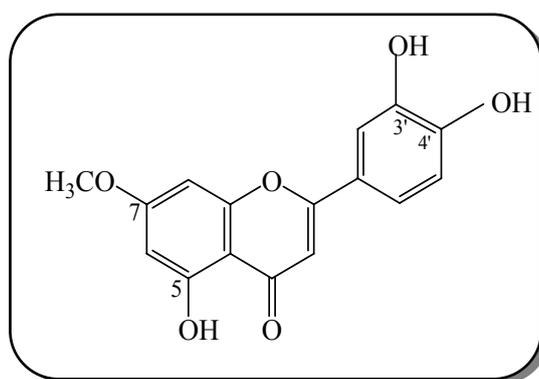


Figure IV.5: la structure du composé F_{16-p}

Une étude bibliographique signale la présence de ce composé dans l'espèce *Salvia hypoleuca* (Lamiacée), connu sous le nom de **7-methyl Lutéoline**. [122]

IV.3. Détermination de structure du composé F_{22p} :

Le composé F_{22p} se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le DMSO. Ce composé réagit avec le réactif NH₃ présentant une coloration jaune; et une fluorescence noire violette sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde.

IV.3.1. Comportement chromatographique :

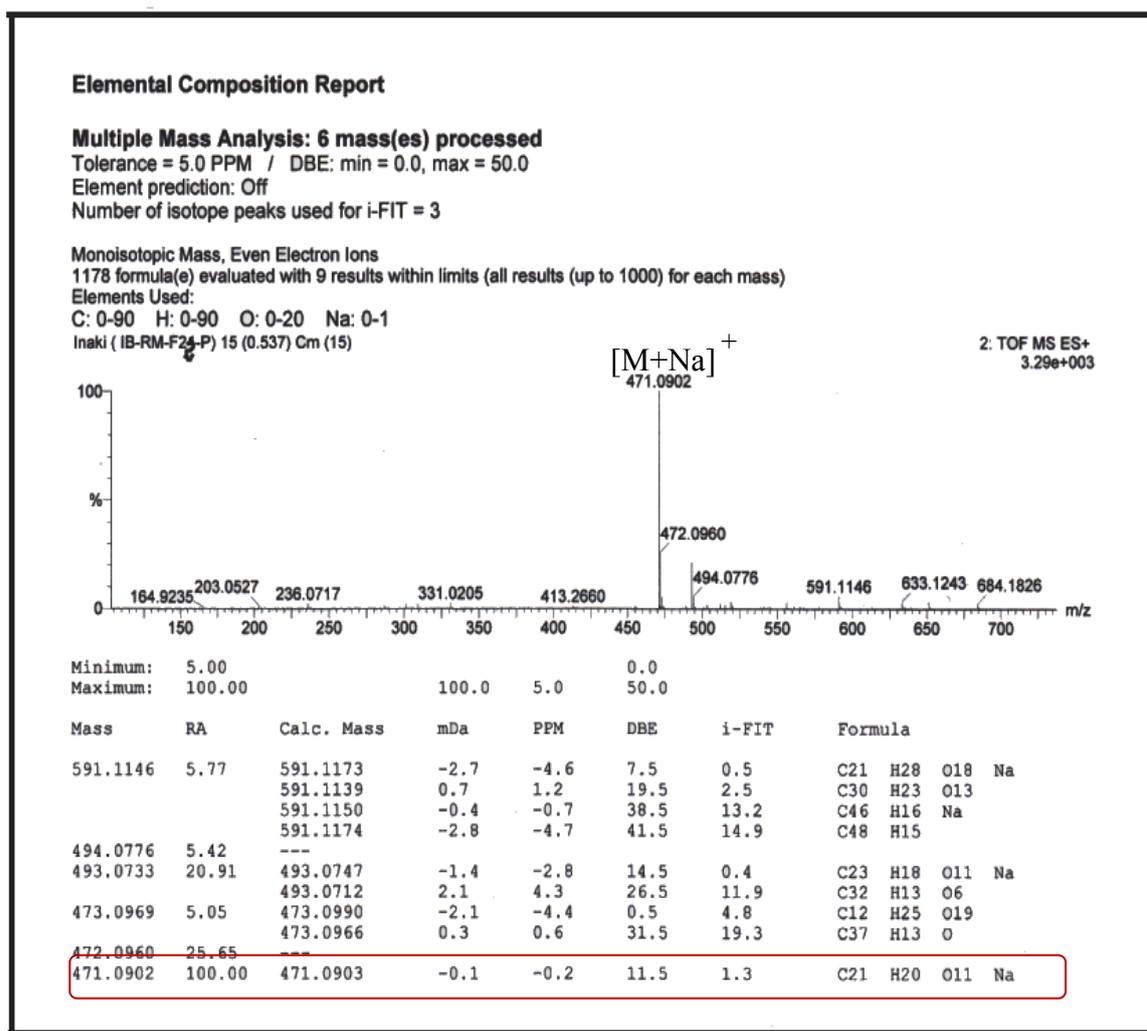
Le produit F_{22p} a été élué sur plaque chromatographique polyamide DC6.6 dans deux systèmes de solvant, l'un est organique (4/3/3), l'autre est aqueux (13/3/3/1), ce même produit élué sur plaque chromatographique cellulose dans un système aqueux (acide acétique 15 %), a donné les résultats consignés dans le tableau ci-dessous :

Système		R _f * 100
Toluène/MeCOEt/MeOH	4 / 3 / 3	31.0
H ₂ O/ MeCOEt/MeOH/(Ac) ₂ CH ₂	13 / 3 / 3 / 1	17.8
AcOH	15 %	46.0

Augmentation de la valeur du R_f dans le système aqueux indique une glycosylation du composé F_{22p}.

IV.3.2. La spectrométrie de masse :

Le spectre de masse en mode d'ionisation électrospray positif obtenu pour le produit F_{22-p} (spectre IV-6), donne un pic quasimoléculaire [M+Na]⁺ de masse exacte $m/z=471.0902$ (calculée pour C₂₁H₂₀O₁₁Na = 471.0903) permettant ainsi de déduire une formule brute de C₂₁H₂₀O₁₁ pour cette molécule et une masse de 448 Da avec 12 insaturations.



Spectre IV-6: Spectres SMES⁺ du composé F_{22-p}

IV.3.3. La spectrophotométrie UV:

Les données de la série spectrale UV (tableau IV.6, spectre n° IV.6) montrent :

- ❖ 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 ($\Delta\lambda_I = +58$ 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 NaOH comparativement à celui enregistré dans le MeOH.

- ❖ Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_1 = +25\text{nm}$) noté en comparant les spectres CH₃OH et NaOAc + H₃BO₃ révèle également la présence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B.
- ❖ L'addition de la solution d'AlCl₃ montre par ailleurs, un unique maximum de la bande I à 420 nm confirmant ainsi la présence de groupe ortho-hydroxyle libre sur le cycle B avec un groupe hydroxyle libre en position 5.

L'ensemble de ces données rassemblés dans le tableau IV.6, nous mène à proposer la structure partielle suivante pour le composé F_{22p} (figure IV.6).

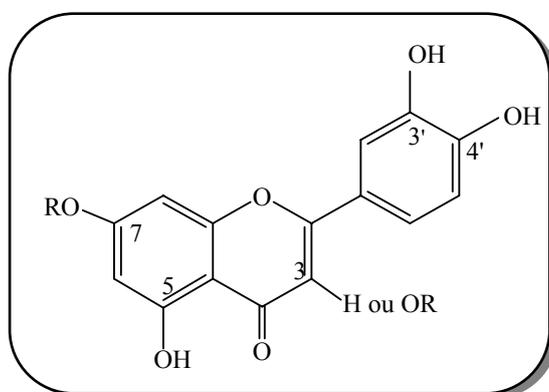
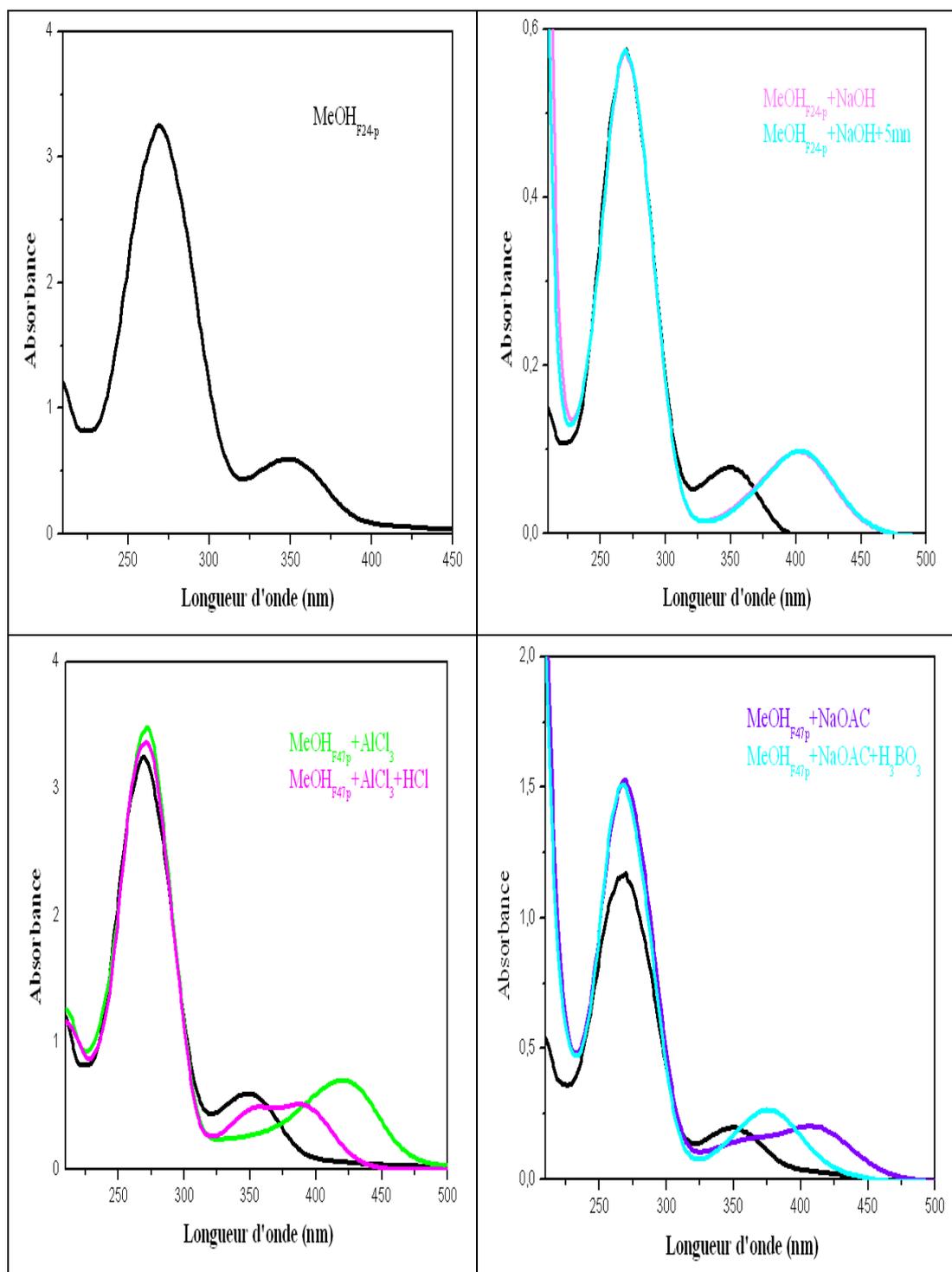


Figure IV.6: Structure partielle du composé F_{22p}

Tableau IV.6: Données de la série spectrale UV du composé F_{22p}

RÉACTIFS	BANDE I	AUTRES BANDES	BANDE II	COMMENTAIRES
MeOH	349	/	270	Flavone ou Flavonol (OR-3)
+ NaOH	405	/	270	OH libre en 4'
+AlCl ₃	420	/	272	OH libre en 5 ortho di-OH sur le cycle B
+AlCl ₃ +HCl	387	356	272	
+NaOAc	407	/	270	OR en 7
+NaOAc+H ₃ BO ₃	375	/	270	ortho di-OH sur le cycle B
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				



Spectre IV.7: La série spectrale UV du composé F_{22p}

IV.3.4. Spectrométrie RMN ¹H:

L'examen du spectre RMN ¹H (spectre n° IV.8) 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 $\delta = 6,81$ ppm, le second à $\delta = 6,46$ ppm avec une constante de couplage $J = 2,1$ 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 $\delta = 13,02$ ppm attribuable à un OH formant une chélation avec le carbonyle confirme que cette position est hydroxylée.
- ❖ Un doublet d'intégration 1H ($J = 2,1$ Hz), indicateur d'un couplage méta à $\delta = 7,44$ ppm attribuable à H-2'.
- ❖ Un doublet dédoublé ($J = 8,3$ Hz ; $J = 2,1$ 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 $\delta = 6,91$ ppm ($J = 8,3$ Hz), indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5'.

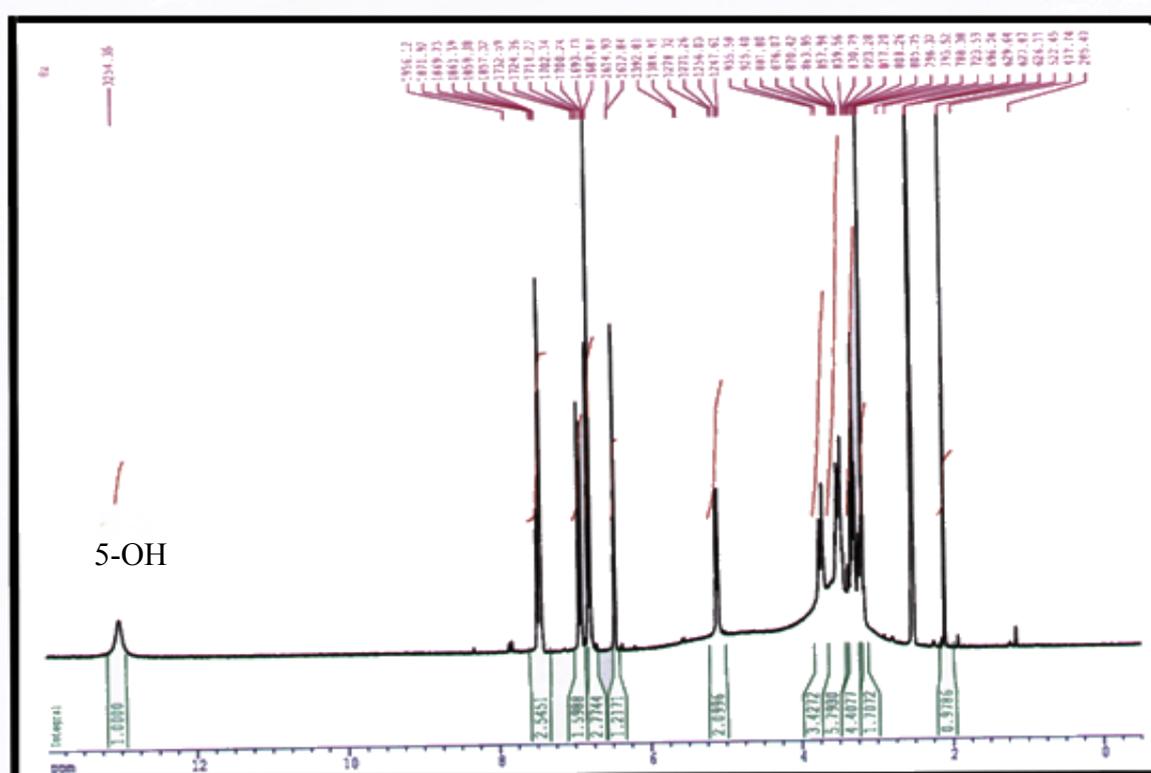
La présence de ces trois derniers signaux est en faveur d'un cycle B substitué en positions 3' et 4' confirmant ainsi la présence de système dihydroxyle sur le cycle B.

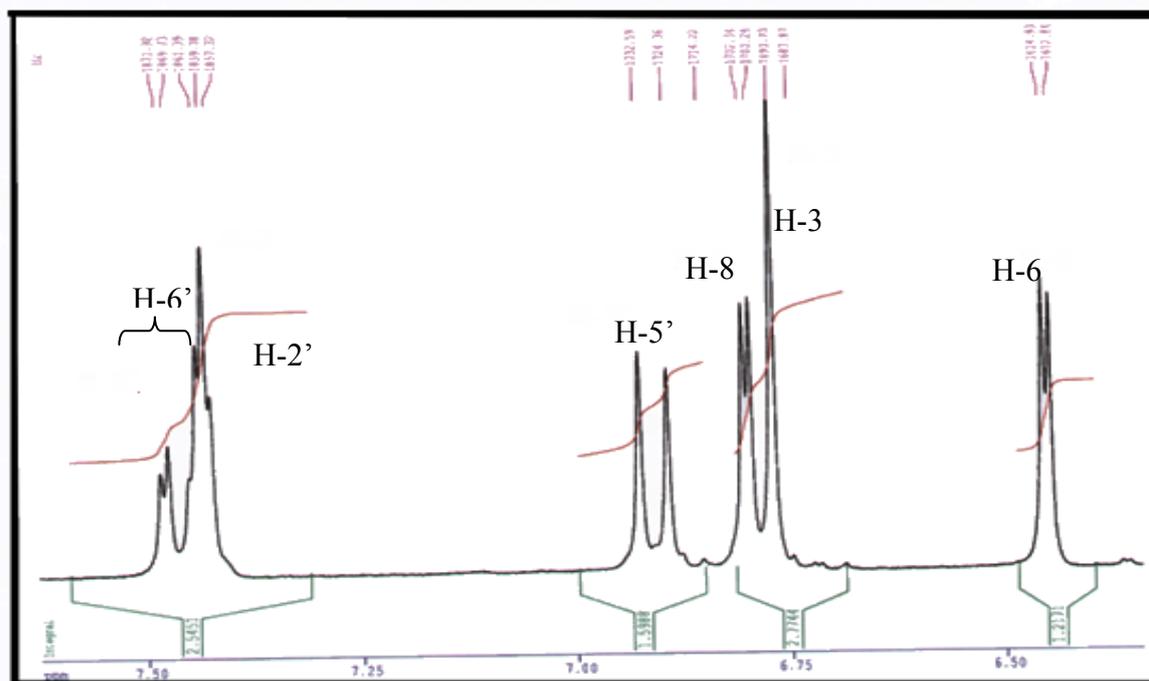
- ❖ Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 5,1$ ppm ($J = 7,1$ Hz), attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène. D'après la valeur de la constante de couplage ($J = 7,1$ Hz), cette entité peut être un glucosyle ou un galactosyle avec une configuration β entre le 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. 7.

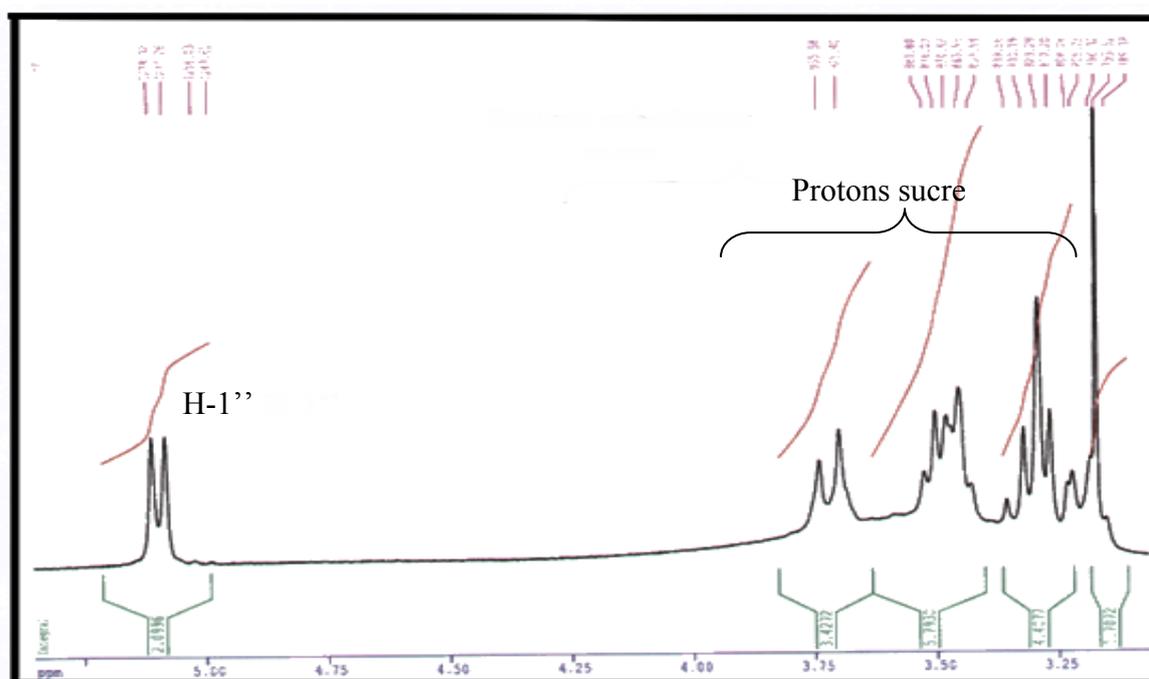
Tableau IV.7: Données de la spectrométrie RMN ^1H (250MHz) du composé $\text{F}_{22\text{p}}$

DEPLACEMENT CHIMIQUE $\delta(\text{PPM})$	INTÉGRATION	MULTIPLICITÉ (J HZ)	ATTRIBUTION
13,02	1H	s	OH en 5
7,48	1H	dd (8.3 - 2,1)	H-6'
7,44	1H	d (2,1)	H-2'
6,91	1H	d (8,3)	H-5'
6,81	1H	d (2,1)	H-8
6,77	1H	s	H-3
6,46	1H	d (2,1)	H-6
5,10	1H	d(7.1)	H-1''
3.2-3.7	-	m	Protons substituant sucre

Spectre IV.8: Spectre de RMN- ^1H (250 MHz) du composé $\text{F}_{22\text{p}}$ dans DMSO-d_6



Spectre IV.8: Spectre de RMN-¹H (250 MHz) étalé (6.50 à 7.50 ppm) du composé F_{22-p} dans DMSO-d₆



Spectre IV.8: Spectre de RMN-¹H (250 MHz) étalé (3.25 à 5.25 ppm) du composé F_{22-p} dans DMSO-d₆

L'ensemble de ces données montre que la structure partielle du composé F_{22-p} est de type lutéoline substitué en 7 par un sucre (voir figure IV.7).

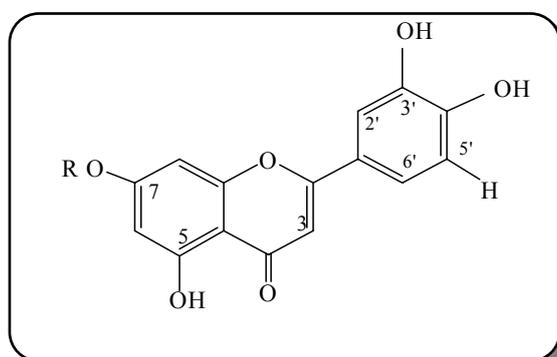


Figure IV.7: structure partielle du composé F_{22-p}

IV.3.5. Hydrolyse acide :

Pour déterminer 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 F_{254} et éluée par le système Acétone-eau (9/1) de la phase aqueuse en présence d'échantillons authentiques des sucres, il est apparu que le sucre en question est le glucose. La figure IV.8 représenté si dessous, montre le résultat de cette étape:

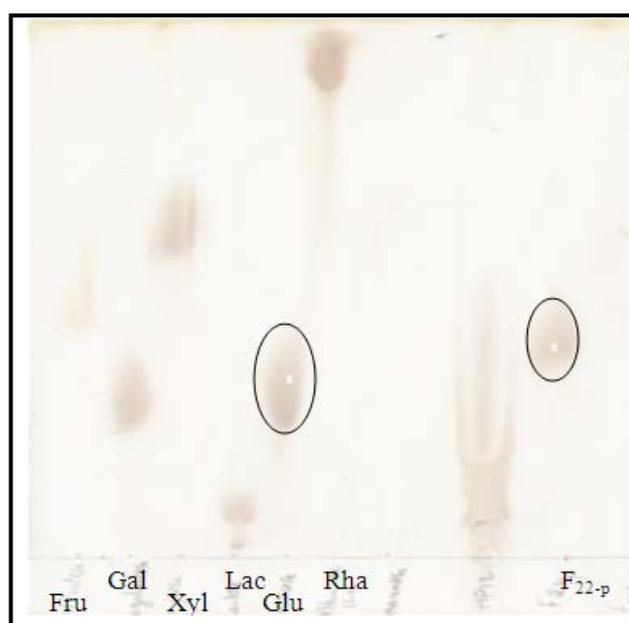


Figure IV.8 : Co-chromatographie avec des échantillons authentiques de sucres, de la phase aqueuse après hydrolyse acide du composé F_{22-p}

Le fait que le sucre se soit détaché de l'aglycone confirme bien la présence du pont oxygène entre les deux entités.

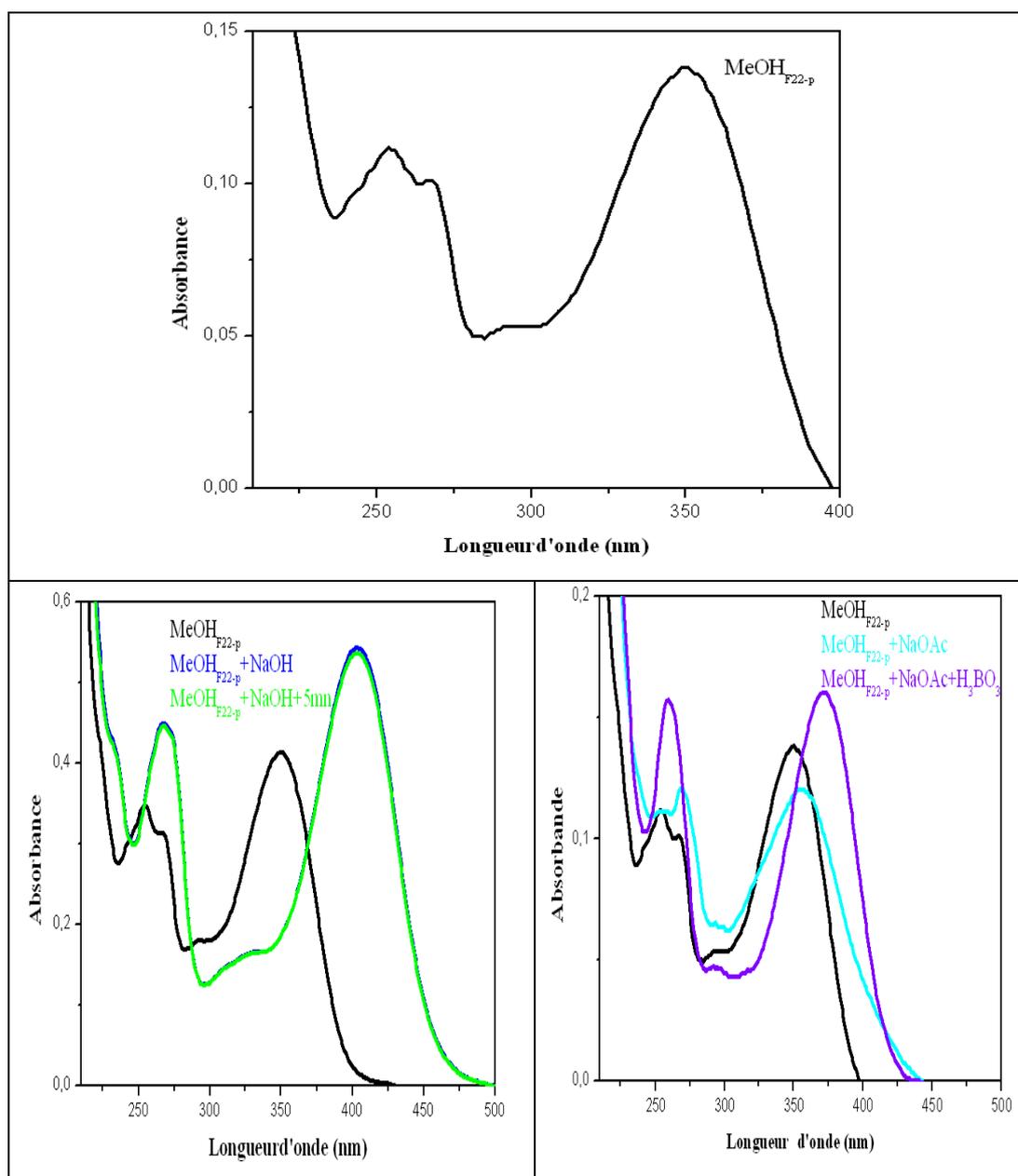
D'autre part, on examine la phase organique du composé **F_{22-p}** en enregistrant le spectre UV en présence de NaOH (base forte) et NaOAc (base faible) pour confirmer la position du groupe *O*-glucose.

L'ajout de la base faible (NaOAc) provoque un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda_{II} = +6\text{nm}$) entre le spectre MeOH et le spectre NaOAc, ce qui montre la présence d'un groupe OH en 7. Cette supposition est confirmée par la présence d'une nouvelle bande dans le spectre enregistré après l'addition de NaOH comparativement à celui enregistré dans le MeOH.

Cette constatation permet de positionner le glucose en C-7.

Tableau IV.8: Données de la série spectrale UV du composé **F_{24p}** après l'hydrolyse acide

RÉACTIFS	BANDE I	AUTRES BANDES	BANDE II	COMMENTAIRES
MeOH	349	295 - 268	254	Flavone
+ NaOH	404	329	269	OH libre en 4'
+NaOAc	358	270	260	OH en 7



Spectre IV.10: La série spectrale UV de la partie aglycone du composé **F_{22p}**

IV.3.6. Spectrométrie RMN ¹³C:

Le spectre de RMN-¹³C (spectre n° IV.9) du composé **F_{22-p}** 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.

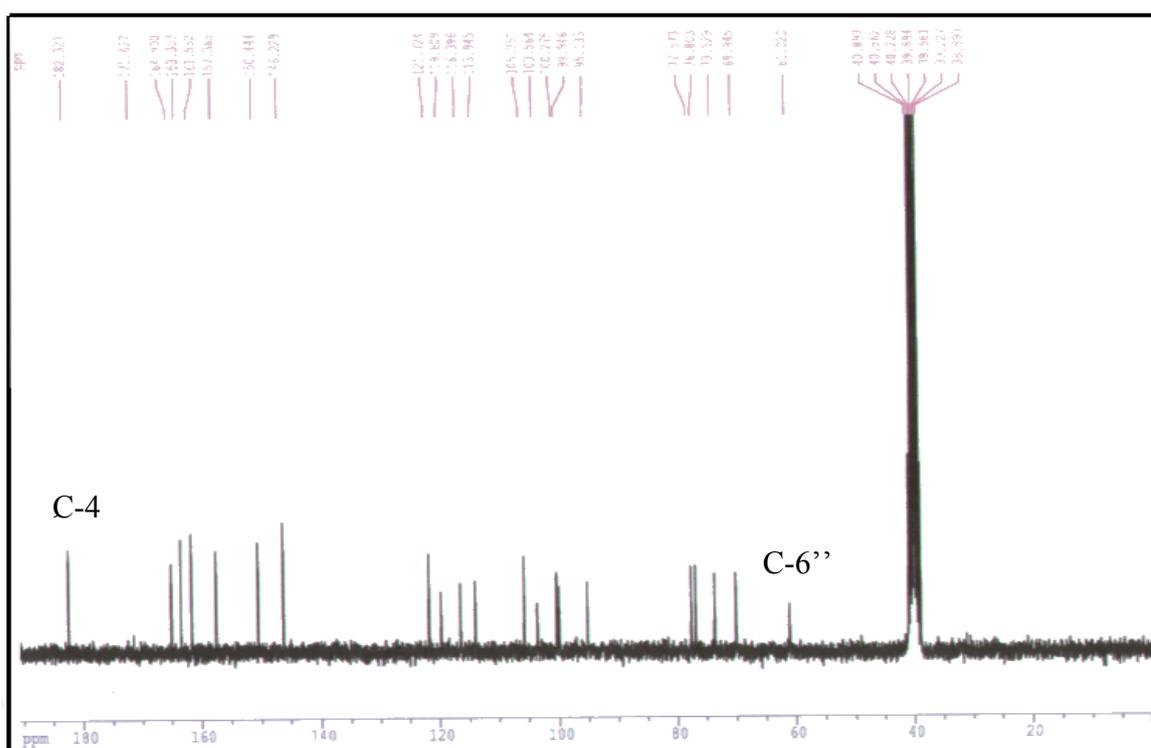
Ce spectre confirme les données des analyses précédentes par la présence de :

- ❖ Un signal à $\delta = 182.3$ ppm attribuable au carbone du groupement carbonyle C-4.

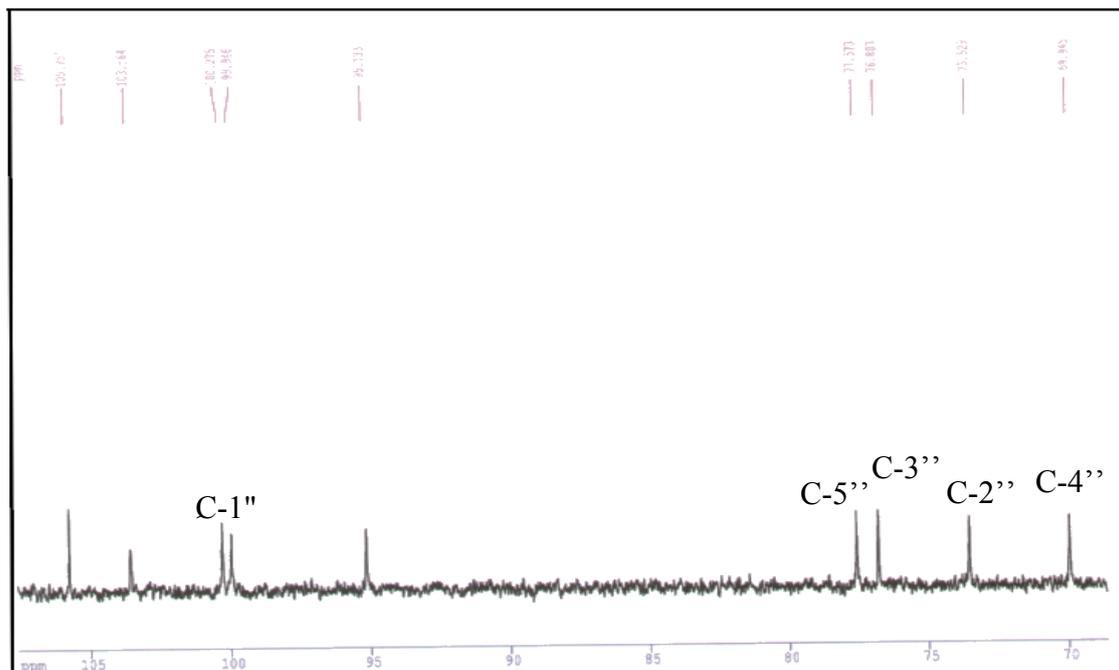
- ❖ Un signal à $\delta=100.3$ ppm caractéristique du carbone anomérique confirmant ainsi la jonction *O*-glucoside.
- ❖ Les signaux à ($\delta = 73.5, 76.8, 69.9, 77.6$ et 61.02 ppm pour C-2, C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'') caractéristiques d'un glucopyranoside.

Le spectre J modulé montre la présence de :

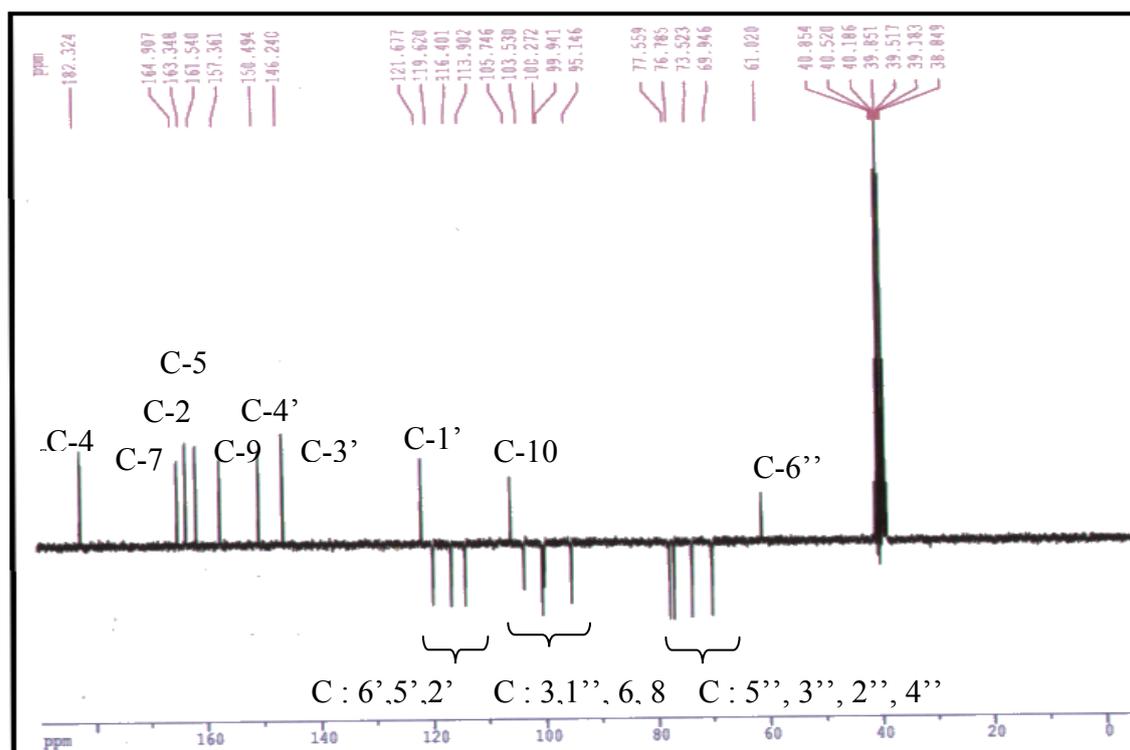
- ❖ 9 signaux de carbone quaternaire (C-2, C-4, C-5, C-7, C-9, C-10, C-1', C-3', C-4') et un signal CH₂ (C-6'').
- ❖ 11 signaux CH (C-3, C-6, C-8, C-2', C-5', C-6', C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'').



Spectre VI.9: Spectre de RMN-¹³C (62.9 MHz) du composé F_{22-p} dans DMSO-d₆



Spectre IV.9: Spectre de RMN-¹³C (250 MHz) étalé (70 à 105ppm) du composé F_{22-p} dans DMSO-d₆



Spectre IV.10: Spectre de RMN-¹³C séquence J module (62.9 MHz) du composé F_{22-p} dans DMSO-d₆

Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C avec leurs attributions sont présentés dans le tableau IV-9, avec ceux rapportés dans la littérature pour le même composé [123-124].

Tableau IV.9: RMN ^1H et du ^{13}C (250 et 62.9 MHz) du composé F_{22-p} et du 7-*O*-glucosyl lutéoline dans le DMSO- d_6 .

	Composé F_{22-p} (δ ppm, J Hz)		7- <i>O</i> -glucosyl lutéoline [123-124] (δ ppm, J Hz)	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
Lutéoline				
2	-	163.4	-	163.2
3	6,77s	103.6	6.75	103.5
4	-	182.3	-	182.2
5	-	161.5	-	161.0
6	6.46 d (2.1Hz)	99.9	6.45 d (2.1Hz)	99.9
7	-	164.9	-	164.8
8	6,81 d (2.1Hz)	95.1	6.79 d (2.1Hz)	95.3
9	-	157.4	-	157.3
10	-	105.7	-	105.7
1'	-	121.7	-	121.7
2'	7,44 d (2.1Hz)	113.9	7.43 d (2.1Hz)	113.7
3'	-	146.2	-	145.9
4'	-	150.4	-	150.0
5'	6,91 d (8.2Hz)	116.4	6.92 d (8.2Hz)	116.4
6'	7,48 dd(8.1Hz,2.1Hz)	119.6	7.45 dd(8.1Hz,2.1Hz)	119.6
OH-5	13,02 s	-	12.95 s	-
Glucose				
1''	5,10 d(7.1Hz)	100.3	5.05 d (7.2Hz)	100.3
2''		73.5		73.5
3''		76.8		76.4
4''		69.9	3.1-3.5 m	69.9
5''		77.6		77.3
6''	3.72 dl	61.02	3.71 dl	60.9

La structure du composé F_{22-p} (figure IV.8) a pu être établie comme étant le 5,7,3',4-tetrahydroxyflavone-7-*O*- β -D-glucopyranoside (7-*O*-glucosyl lutéoline).

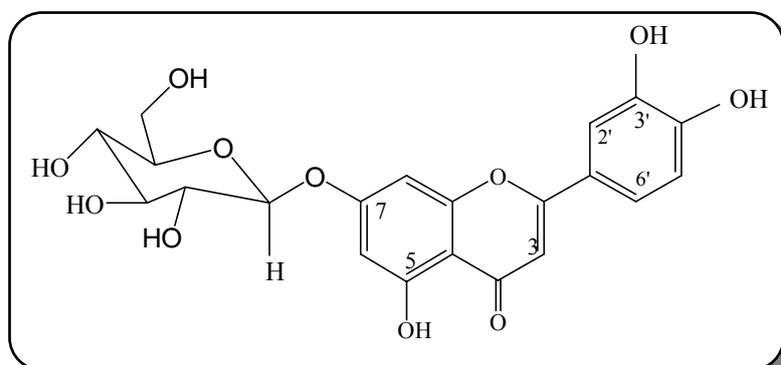


Figure IV.8: La structure du composé F_{22-p}

Une étude bibliographique montre la présence de ce composé dans l'espèce *Vitex agnus-castus* [18].

Conclusion:

Les résultats de l'étude phytochimique de l'espèce *Vitex agnus-castus* ont révélé la richesse de cette dernière en métabolites secondaires de type flavonoïde (flavone et flavonol).

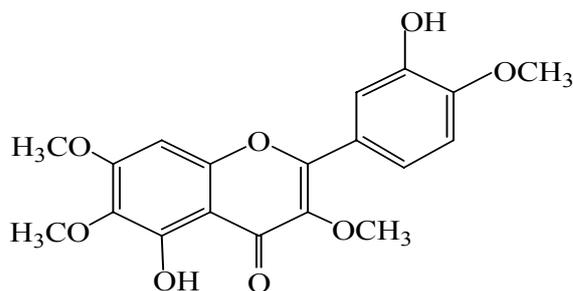
Conclusion générale

Le but principal de notre travail est d'isoler et d'identifier les métabolites secondaires de type flavonoïdes de l'espèce *Vitex agnus castus* du genre *Vitex*, récoltée du Sud Ouest Algérien.

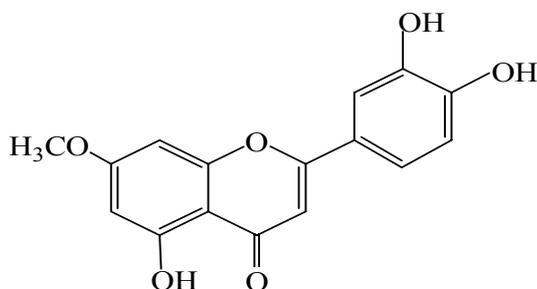
Après extraction hydroalcoolique des feuilles et des fleurs de cette espèce, concentration et affrontement à l'éther de pétrole, CHCl_3 , AcOEt et *n*-butanol successivement, nous avons soumis l'extrait acétate d'éthyle obtenus à la batterie chromatographique notamment la chromatographie sur colonne de gel de silice et sur plaques préparatives de gel de silice

L'étude phytochimique de cette plante a permis l'isolement de sept produits à l'état pur, parmi lesquels, nous avons pu établir à l'heure actuelle, la structure de trois d'entre eux (deux flavones et un flavonol) et qui sont :

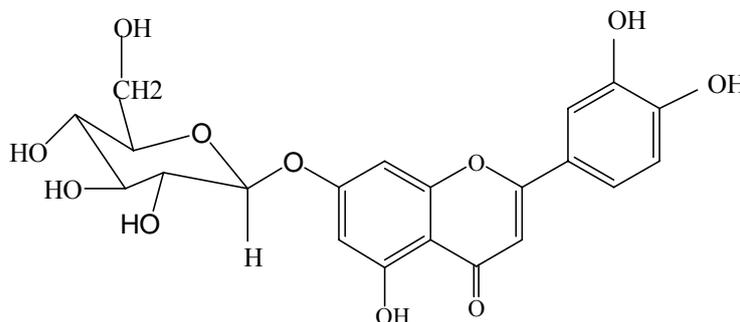
- ✓ Le composé **H4** : Casticine (5,3'-dihydroxy 3, 6, 7,4'-tetramethoxyflavone)



- ✓ Le composé **F_{16-p}** : 7-méthyl lutéoline (5,3',4' -trihydroxy -7-méthoxyflavone)



- ✓ Le composé **F_{24-p}** : 7-*O*-glucosyl lutéoline (5,7, 3',4'-tetrahydroxyflavone-7-*O*-β-D-glucopyranoside)



Les structures des produits isolés ont été déterminées par la combinaison des différentes méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN¹H et RMN¹³C et la séquence J-modulé ainsi que la spectrométrie de masse en mode Impact Electronique (IE) et Eletrospray (ESI).

Références bibliographiques

- [1] K. Hostettmann, O. Potterat, J. L. Wolfender, (1998), *Chimia*. 52, 10-17.
- [2] P. Ozenda, (1962.1963). *Flore du sahara*. Ed. CNRS, Paris-France.
- [3] T. Hennebelle, (2006), Thèse de doctorat, Université de Lille.
- [4] D. J. Brown, (1994), *Qtrly. Rev. Nat. Med*, 2, 111–121
- [5] S. Foster, (2002), *A Field Guide to Western Medicinal Plants and Herbs*, Boston: Houghton Mifflin, Co.
- [6] C. Du Mee, (1993), *Aust. J. Med. Herb*, 5, 63–65.
- [7] R. Upton, (2001), *Chaste Tree Fruit, Vitex agnus-castus: Standards of Analysis, Quality Control and Therapeutics*, Ed. American Herbal Pharmacopoeia, Santa Cruz, CA.
- [8] A. Benkheïra. *Guide des habitats aride et saharien*. Projet ALG/00/G35
- [9] J. M. Jellin, F. Batz, K. Hitchens, (2002), *Natural medicines comprehensive database*, 3rd Ed. Stockton, CA: Therapeutic Research Faculty. 1530.
- [10] M. Grieve, (1982), *A modern herbal*, 2^{ed} Ed. Dover Publications, New York, Vol. I, 188.
- [11] C. Hobbs, (1991), *Pharm. Hist*, 33, 19–24.
- [12] J. M. Jellin, P. Gregory, eds. *Natural medicines comprehensive database*. Stockton: Therapeutic Research Faculty, 2003, www.naturaldatabase.com (Last updated, December 13, 2003). Date accessed on June 16, 2006.
- [13] E.G. Loch, H. Selle, N. Boblitz, (2000), *J. Women's Health. Gend. Based. Med*, 9, 315–320
- [14] J. Barnes, L. A. Anderson, J. D. Phillipson, (2002), Eds. *Herbal Medicines*, 2^{ed} Ed. Pharmaceutical Press, London.
- [15] M. Blumenthal, A. Goldberg, Brinckmann, (2000), Eds. *Chaste Tree Fruit*. In: *Herbal medicine, expanded Commission E monographs*, Austin: American Botanical Council; Boston: Integrative Medicine Communications.
- [16] Anonymous, (1998), *Chaste Tree*. In: Dombek C, Ed. *Lawrence Review of Natural Products*. St. Louis: Facts and Comparisons.
- [17] Y. Hu, T. T. Hou, Q. Y. Zhang et al., (2007), *J. Pharm. Pharmacol*, 59, 1307–1312.
- [18] J. Raynaud. et al., (2005), *Prescription et conseil en phytothérapie*, Ed. Tec et Doc, 97-9.
- [19] S. Mills, K. Bone, (2000), *Principles and Practice of Phototherapy: Modern Herbal Medicine*, Ed. Churchill Livingstone, London.
- [20] C. Hirobe, Z. S. Qiao, K. Takeya et al., (1997), *Phytochemistry*. Vol 46 , 521–524.

- [21] Atta-ur-Rahman, D.Ahmed, M. I. Choudhary et al., (1988), *Planta. Medica*, 54, 173.
- [22] J. B. Harborne, (1988), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*, Ed. Chapman and Hall, London.
- [23] B. Voirin, (1983), *Phytochemistry*, 22, 2107.
- [24] M. Inuma, S. Matsuura, K. Kusuda, (1980), *Chem. Pharm. Bull*, 28, 708.
- [25] L. K. Sy, G. D. Brown, (1998). *Phytochemistry*, 48, 1207-1211.
- [26] H. Jarry, B. Spengler, W. Wuttke et al., (2006), *Mat*, 55S ,S26-S36.
- [27] M. Ono, T. Yamasaki, M. Konoshita et al., (2008), *Chem. Pharm. Bull.* 56(11), 1621-1624.
- [28] M. Ono, Y. Nagasawa, T. Ikeda et al., (2009), *Chem. Pharm. Bull.* 57(10), 1132-1135.
- [29] M. Ono, M. Yamamoto, T. Yanaka et al., (2001), *Chem. Pharm. Bull*, 49, 82-86.
- [30] A. Rudi, M. Aknin, E. Gaydou et al., (2004), *J. Nat. Prod*, 67, 1932-1935.
- [31] R. Torrenegra, J. Pedrozo, J. Robles et al., (1992), *Phytochemistry*, 31, 2415-2418.
- [32] S. Almqvist, C. R. Enzell, F. W. Wehrli, (1975), *Acta. Chem. Scand.*, B29, 695-702.
- [33] Y. Asaka, T. Kamikawa, T. Kubota, (1973), *Chem. Lett.*, 937.
- [34] M. Ono, M. Yamamoto, C. Masuoka et al., (1999), *J. Nat. Prod.*, 62, 1532-1537.
- [35] M. Ono, T. Yanaka, M. Yamamoto et al., (2002), *J. Nat. Prod.*, 65,537-541.
- [36] F. Bohlmann, M. Grenz, J. Jakupovic et al., (1983), *Phytochemistry*, 22, 1213-1218.
- [37] E. Hoberg, J. Orjala, B. Meier, O. Sticher. (1999), *Phytochemistry* 52, 1555-1558.
- [38] E. Hoberg, J. Orjala, B. Meier, O. Sticher. (2003), *Phytochemistry* 63, 375.
- [39] C. A. Newall, L. A. Anderson, J. D. Phillipson, (1996), *Herbal medicines: a guide for health-care professionals*, Ed. Pharmaceutical Press, London.
- [40] K. Görler, B. Oehlke, H. Soicke, (1985), *Planta Medica* 51, 530–531.
- [41] M. Nicoletti, (1983), *Org. Mag. Res.*, 21, 460–461.
- [42] P. K. Dutta, U. S. Chowdhury, A. K. Chakravarty et al., (1983), *Studies on Indian medicinal plants—part LXXV. Tetrahedron*, 39, 3067–3072.
- [43] E. Okuyama, S. Fujimori, M. Yamazaki et al., (1998), *Chem. Pharm. Bull.*, 46, 655-662.
- [44] S. Damtoft, S. B. Hansen, B. Jacobsen et al., (1984), *Phytochemistry*, 23, 2387-2389.
- [45] C. K. Sehgal, S. C. Taneja, K. L. Dhar et al., (1983), *Phytochemistry*, 22, 1036-1038.
- [46] I. Kouno, M. Inoue, Y. Onizuka et al., (1988), *Phytochemistry* 27, 611-612.
- [47] A. Pabst, D. Barron, R. Adda et al., (1990), *Phytochemistry*, 29, 3853-3858.

- [48] A. Kuruüzüm-Uz a, K. Ströch, L. Ö. Demirezer et al., (2003), *Phytochemistry*, 63, 959–964.
- [49] T. Fleming, (1998). *PDR for herbal medicines*. NJ: Montvale, Medical. Economics. Company, Inc.
- [50] J. Liu et al., (2001), *J. Agric. Food. Chem*, 49(5), 2472-9.
- [51] W. Wuttke et al., (2003), *Phytomedicine*, 10(4), 348-57.
- [52] B. Meier et al., (2000), *Phytomedicine*, 7, 373-81.
- [53] W. Wuttke, (1996), *Forschende Komplementar Medizen*, 3, 329-30.
- [54] H. Jarry et al., (1994), *Exp. Clin. Endocrinol*, 102(6), 448-54.
- [55] P. Merz et al., (1996), *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 104, 447-53.
- [56] D. Dixon-Shanies, N. Shaikh, (1999), *Oncol. Rep*, 6, 1383-7.
- [57] K. Ohyama et al., (2003), *Biol. Pharm. Bull*, 26, 10-8.
- [58] A. Milewicz et al., (1993), *Arzneimittelforschung*, 43, 752-6.
- [59] B. H. Havasteen, (2002). *Pharmacol. herap*, 96, 67-202.
- [60] I. Erlund, (2004), *Nut. Res*, 24, 851-74.
- [61] J. Bruneton, (1993), *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*, 2^{ème} Ed. Lavoisier, Paris.
- [62] G. Delporte, N. Mascolo, A. A. Izzo, et al., (1999), *Life. Scien.*, 65(4), 337-53.
- [63] B. Winkel-Shirley, (2001), *Plant. Physiology*, 126, 485-493.
- [64] V. L. Singleton, (1981), *Flavonoids*. En: Childester CO, Mrak EM, Stewart Gf (eds.): *Advances in Food Research*. New York: Academic Press, 149-242.
- [65] J. Bruneton, (1999), *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, 3^{ème} Ed. Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- [66] G. Forkman, (1992), *Structure and biosynthesis of flavonoids*, *Proceedings International Conference of Group Polyphenol*. V. 16(1), 19-27.
- [67] G. Richter, (1993), *Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie)*. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lansanne CH-1015.
- [68] J. B. Harborne, (1988), *In plant pigments*, Ed. T. W. Goodwin, Academic Press. London, pp. 299-343.
- [69] J. B. Harborne, (1975), *Flavonoids in phytochemistry*, Vol. II, Ed. Lawrence, P. L., Litton Educational Publishing.
- [70] W. Heller, G. Forkmann, (1988), *In the flavonoids advances in research since 1980*. Ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, London, 399-425.
- [71] V. Deluca, R. K. Ibrahim, (1985), *Arch. Biochem. Biophysics*, 606.

- [72] M. Inuma, M. Mizuno, (1989), *Phytochemistry*, 28, 681.
- [73] J. Ebel, K. Hahlbrock, (1982), In the flavonoids advances in research, Ed. J. B. Harborne and T. J. Mabry, Chapman and Hall, London, pp.641-659.
- [74] J.B. Harborne, C.A. Williams, (1988), In the flavonoids advances in research since 1986. Ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall. Ltd. p.303.
- [75] W. Heller, G. Forkmann, (1993), In the flavonoids advances in research since 1986, Ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, London, pp.499-535.
- [76] J. Chopin, (1966), *Actualité de phytochimie fondamentale*, IIème série, Ed. Masson, Paris, p 119.
- [77] T. Iwashina, (2000). *Journal of Plant Research* , 113(3), 287-299.
- [78] H. M. Merken, G. R. Beecher, (2000), *J. Agric. Food. Chem*, 48(3), 577-599.
- [79] 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.
- [80] G. A. Cooper-Driver, M. Bhattacharya, (1998), *Phytochemistry*, 49(5), 1165-1174.
- [81] R. J. Grayer, M. W. Chase, M. S. J. Simmonds, (1999), *Biochem. System. Ecol*, 27(4), 369-393.
- [82] W. E. Bronner, G. R. Beecher, (1995), *J. Chromato. A* 705, 247-256.
- [83] P. C. H. Hollman, M. G. L. Hertog, M. B. Katan, (1996), *Food. Chem.*, 57, 43-46.
- [84] A. Crozier, E. Jensen, M.E.J. Lean et al., (1997), *J. Chromato.*, 761, 315-321.
- [85] 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
- [86] G. Di Carlo, N. Mascolo, A.A. Izzo et al., (1999), *Life. Scien.*, 65(4), 337-353.
- [87] P. Pietta, (2000), *J. Nat. Prod.*, 63(7), 1035-1042.
- [88] F. Cuyckens, M. Claeys, (2004), *J. Mass. Spec.*, 39(4), 1-15.
- [89] 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.
- [90] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, (1996), *Free Rad. Biol. Med.*, 20, 933-956.
- [91] R. Landolfi, R. L. Mower, (1984), *Biochem. Pharmacol.*, 33, 1525-1530.
- [92] A. A. Izzo, (1996), *J. Pharm. Pharmacol*, 48, 1103-11.
- [93] M. Bracke, B. Vyncke, G. Opendakker et al., (1991), *Clin. Exp. Metastasis*, 9, 13-25.
- [94] L. M. Larocca, M. Giustacchini, N. Maggiano et al. (1994), *J. Urol.*, 152, 1029-1033.

- [95] A. Scutt, S. Meghji, J. P. Canniff et al., (1987), *Experientia*, 43, 391-393.
- [96] M. Makimura, M. Hirasawa, K. Kobayashi et al., (1993), *J. Periodontol.*, 64, 630-636.
- [97] P. S. Chaudhry, J. Cabrera, H. R. Juliani et al., (1983), *Biochem. Pharmacol.*, 32, 1995.
- [98] *Gen.* (1997), *Pharmacol.*, 29, 121-126.
- [99] K. C. Ong, H. E. Khoo, (2000), *Life. Scien.*, 67, 1695-1705
- [100] M. G. Hertog, E. J. Feskens, P.C. Hollman et al., (1993), *Lancet*, 342, 1007-1011.
- [101] M. G. Hertog et al., (1995), *Arch. Inter. Med.*, V155, 4.
- [102] L. Yochum, et al., (1999), *Amer. J. Epid.*, 149, 10.
- [103] S. C. Chu, Y. S. Hsieh, J.Y. Lin, (1992), *J. Nat. Prod.*, 55, 179-183.
- [104] J. B. Ribereau-Gayou, (1968), *The phenolic compounds of vegetals*, Ed. Dundo, Paris.
- [105] K. R. Markham, (1982), *Technique of flavonoids identification*, Academic press, London.
- [106] T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, (1970), *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.
- [107] J. B. Harborne, (1966), In *Comparative Phytochemistry*, Ed. T. W. Goodwin, Academic Press London.
- [108] A. Berthillier, (1972), *La chromatographie et ses applications*, Dunod Paris.
- [109] L. Jurd, R. Horowitz, (1962), *pergamon press*, Oxford, 107-2055
- [110] K. R. Markham, T. J. Mabry, (1968), *Phytochemistry*, 7, 1197.
- [111] L. Horhammer, R. Hänsel, (1952), *Arch. Pharm.*, 285, 438.
- [112] L. Jurd, T. A. Geissman, (1956), *J. Org. Chem.*, 21, 1395.
- [113] H. Audier, (1966), *Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse*.
- [114] J. G. Nielsen, J. Moller, (1970), *Acta. Chem. Scand*, 24, 2665.
- [115] H. Combier, (1968), *Thèse de doctorat*, Université de Lyon.
- [116] K. R. Markham, H. Geiger, (1993), *The Flavonoids Advances in research since 1986*, Ed. J. B. HARBORNE, Chapman & Hall, London.
- [117] R. G. Wilson, J. H. Bowie, D. H. Williams, (1986), *Tetrahedron*, 24, 1407.
- [118] E. Rodriguez, N. J. Carman, T. J. Mabry, (1972), *Phytochemistry*, 11, 409.
- [119] K. R. Markham, (1989), *Flavones, flavonols and their glycosides*, in *Methods in Plant biochemistry*, P.M. Dey and J.B. Harborne, Academic Press, 197-262.
- [120] K. R. Markham, (1976), *Tetrahedron*, 32, 2607-2612.
- [121] P. Waridel, (2003), *Thèse de doctorat*, Université de Lausanne.

- [122] E. Wollenweber, et al., (1992), *Z. Natur-forsch.*, 47c, 782.
- [123] P.K.Agrawal, (1989), *Carbon-13 NMR of flavonoids*. Ed. Elsevier, New –Yourk.
- [124] J.P.Harbone, (1994), *The flavonoids-Advances in research since 1986*. Ed Chapman &Hall, Cambridge.

Lexique de botanique

Caduque

Qualifier un organe (feuille, sépale, pétale en particulier) qui meurt et se détache après avoir rempli sa fonction lors de chaque cycle de vie annuel.

Didyname

Se dit d'une fleur ayant 4 étamines, 2 grandes et 2 plus petites.

Drupe

Fruit indéhiscent dont l'épicarpe est membraneux, le mésocarpe charnu et pulpeux tandis que l'endocarpe sclérifié constitue le noyau

Gynécée

Ensemble des carpelles constituant la partie femelle d'une fleur, ordinairement situés au centre de celle-ci, en spirale ou en verticille.

Hypogyne

Se dit d'une fleur dont les pièces florales (sépalés, pétale et étamines) sont insérées au-dessous de l'ovaire qui est dit supère.

Périgyne

Se dit d'une fleur dont les enveloppes florales et l'androcée sont insérés autour de l'ovaire infère, libre au fond du réceptacle creux.

Phylogénétique

Branche de la biologie qui s'intéresse aux relations de parenté entre les organismes.

Synsépale

Synonyme de gamosépale.

Zygomorphes

Se dit d'une fleur dont les différentes pièces de chaque verticille (sépalés, pétale, étamines) sont disposées symétriquement par rapport à un plan (plan axe / bractée). On a donc une moitié droite et une moitié gauche.

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à la connaissance de la famille des verbénacées à travers le genre *Vitex* et plus particulièrement l'espèce *Vitex agnus-castus* reconnue pour ces propriétés pharmacologiques, elle est utilisée en médecine traditionnelle pour calmer les douleurs rhumatismales dans la région sud ouest du pays.

Cette étude porte essentiellement sur l'investigation phytochimique de la phase semi polaire (extrait acétate d'éthyle) de l'extrait hydroalcoolique des feuilles de l'espèce *Vitex agnus-castus*. 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 trois d'entre eux (deux flavones et un flavonol) et qui sont :

- ✓ 5,3'-dihydroxy 3, 6, 7,4'-tetramethoxyflavone (Casticine)
- ✓ 5,3',4' -trihydroxy 7-méthoxyflavone (7-méthyl lutéoline)
- ✓ 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone-7-O- β -D-glucopyranoside (7-O-glucosyl lutéoline)

L'élucidation des différentes structures a été réalisée au moyen de techniques spectroscopiques, telles que l'ultraviolet, la spectrométrie de masse et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.

Mot clé : Flavonoïdes, *Vitex agnus-castus*, Verbenacée.

Summary

This work is a modest contribution to knowledge the verbenaceae family through the *Vitex* genus in particularly *Vitex agnus-castus* species which is recognized by its pharmacological properties, it is also used in traditional medicine as to calm the rheumatism pains in south and west south region of the country.

This study relates to the phytochemical investigation of the semi polar phase of the aqueous-alcoholic extracts of the leaves of *Vitex agnus-castus* species. This contribution led to the isolation of seven products in the pure state, from which, we have established the structure of three in still now: two flavones and one flavonol.

- ✓ 5,3'-dihydroxy 3, 6, 7,4'-tetramethoxyflavone (Casticin)
- ✓ 5,3',4' -trihydroxy 7-methoxyflavone (luteolin7-methyl)
- ✓ 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone-7-O- β -D-glucopyranoside (luteolin 7-O-glucoside)

The elucidation of different structures was carried out by using spectroscopic methods, especially UV spectrophotometry, MS spectrometry as well as ^1H NMR, ^{13}C NMR experiments.

Key words: Flavonoids, *Vitex agnus-castus*, Verbenaceae.

ملخص

يندرج هذا العمل في إطار المساهمة في معرفة العائلة *verbenacée* من خلال الجنس *Vitex* وعلى الأخص النوع *Vitex agnus-castus* المعروف بخصائصه العلاجية والذي يستخدم كمسكن لآلام الروماتيزم في الجنوب الغربي للبلاد.

هذه الدراسة تعتمد أساسا على التحليل الفيتوكيميائي للطور متوسط القطبية (مستخلص خلات الإيثيل) من المستخلص الكحولي لأوراق النوع *Vitex agnus-castus* سمحت هذه الدراسة من فصل سبعة مركبات في حالتها النقية ، وتمكنا في الوقت الحالي من تحديد بنية ثلاثة مركبات (اثنان من نوع فلافون والآخرفلافونول) و هي :

- ✓ 5,3'dihydroxy 3, 6, 7,4'-tetramethoxyflavone (Casticine)
- ✓ 5,3',4' -trihydroxy 7-méthoxyflavone (7-methyle lutéoline)
- ✓ 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone-7-O- β -D-glucopyranoside)
(7-O-glucosyl lutéoline)

تم تحديد بنية المركبات المفصولة اعتمادا على استخدام مختلف التقنيات الطيفية ، مثل الأشعة فوق البنفسجية ، مطيافية الكتلة والرنين النووي المغناطيسي .