

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ MENTOURI – CONSTANTINE
FACULTÉ DES SCIENCES Exactes
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre.....

Série.....

MEMOIRE

PRESENTE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE MAGISTER
EN CHIMIE ORGANIQUE

OPTION
Phytochimie

**Investigation phytochimique de la phase *n*-butanol de
l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de
Centaurea parviflora (Compositae).**

PAR

Mme BELKACEM Souada

Epouse MAIMOUR

Sous la direction du professeur :

Mme. BENAYACHE

Fadila

Devant le jury:

Président	S. BENAYACHE	Prof	Univ. Mentouri	Constantine
Rapporteur	F. BENAYACHE	Prof	Univ. Mentouri	Constantine
Examineurs	A. BENTAMENE	M. C.	Univ. Mentouri	Constantine
	C. BEHLOUL	M. C.	Univ. Mentouri	Constantine
	N. BEGHIDJA	M. C.	Univ. Mentouri	Constantine

Soutenu en 2009

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Phytochimie et Analyses Physico-Chimiques et Biologiques, Université Mentouri – Constantine, sous la direction de Madame Fadila BENAYACHE, Professeur à l'Université Mentouri – Constantine. J'aimerais tout d'abord la remercier pour m'avoir acceptée dans son groupe, et pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse en acceptant la lourde tâche d'être ma directrice. Je la remercie également pour ses précieux conseils en Phytochimie, nos nombreuses discussions scientifiques, sa collaboration enrichissante, et sa grande patience qui ont permis la réalisation de ce travail.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur Samir BENAYACHE, professeur à l'Université Mentouri – Constantine, pour sa disponibilité et sa compétence qui ont été des atouts précieux pour la réalisation de ces travaux. Je le remercie également pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

Je remercie également messieurs: Ali BENTAMENE, Noureddine BEGHIDJA et Cherif BEHLOUL, Maîtres de Conférences à l'Université Mentouri – Constantine, d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie vivement madame le professeur A. LOBSTEIN et le docteur M. CHAABI de la faculté de pharmacie de Strasbourg, pour l'enregistrement des spectres de RMN du composé F03.

J'aimerais remercier certaines personnes, trop nombreuses pour les citer, qui n'ont pas participé scientifiquement à ce travail, mais qui ont partagé une grande partie de ma vie durant ces trois années : les membres de ma famille pour leur gentillesse, leur soutien moral et financier.

Je remercie également mes amis pour m'avoir aidée dans certaines manipulations et soutenue par leur sympathie : Zahia, Hanéne, Chawki, Ameer, Kaouther, Ouahiba, Sabrina, El hadj.....

J'adresse mes plus sincères remerciements à mes frères: Soufiene, Fateh, Bilel, Islem, à mes parents surtout pour leur présence de tous les instants, pour le soutien qu'ils m'ont apporté, avec toute mon affection et ma reconnaissance sans lesquels je n'aurais

certainement pas pu venir à bout de cette thèse.

*Je remercie également Messieurs SEGHIRI, BOUHEROUM, BENTAMENE,
Maîtres de Conférences à l'Université Mentouri – Constantine, pour leurs précieux
conseils.*

*J'exprime toute ma gratitude à mon mari Mohamed, pour sa disponibilité.
Je remercie madame BENSIALI née CHANDARLI BRAHIM Dalila pour son aide
et ses conseils précieux, un grand merci pour elle ainsi qu'à tous ceux qui liront cette thèse
et la feront vivre.*

*Et finalement, je remercie toutes les personnes que j'aurais malencontreusement oubliées
mais à qui je témoigne toute mon affection.*



Dédicace

*Je dédie ce modeste travail
à mes chers parents
à mes frères
à mes amies
à mon fils Zakaria,*

*pour leur présence de tous les instants, pour le soutien qu'ils
m'ont apporté, avec toute mon affection et ma reconnaissance.*

*« On ne devrait pas être obligé de toujours donner les noms, ce qu'il
faudrait, ce n'est pas qu'untel a fait ceci, mais qu'il a été possible de
le faire ».*

KARL KRAUS.

Les Abréviations

Acide acétique	AcOH	
Méthanol	MeOH	
Ethanol	EtOH	
Eau	H₂O	
Acide sulfurique	H₂SO₄	
Chlorure d'aluminium	AlCl₃	
Hydroxyle de sodium	NaOH	
Acétate de sodium	NaOAc	
Acide borique	H₃BO₃	
Acide chlorhydrique	HCl	
Ether de pétrole	Ep	
Acétate d'éthyle	EtOAc	
Chloroforme (trichlorométhane)	CHCl₃	
Chloroforme deutérié	CDCl₃	
Méthanol deutérié	MeOH-d₄	
Chromatographie sur Couches Minces	CCM	
Facteur de Retardement	R_f	
Lumière ultraviolette	UV	
Spectrométrie de Masse en mode Impact Electronique	SMIE	
Résonance Magnétique Nucléaire	RMN	
Carbone 13	¹³C	
Proton	¹H	
Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity	HMBC	
Heteronuclear Single Quantum Coherence	HSQC	
Correlation Spectroscopy	COSY	
Distortionless Enhancement by Polarization Transfert	DEPT	
Déplacement chimique en parties par millions	δ (ppm)	
Constante de couplage exprimée en hertz	J (Hz)	
Singulet	s	
Doublet	d	

Doublet de doublets	dd
Triplet	t
Quadruplet	q
Multiplet	m
Température en degrés Celsius	°C
Gramme	g
Hertz	Hz
Milligramme	mg
Minute	min
Millilitre	ml

Table des matières

Table des figures et tableaux et schémas et spectres.....	i
Abréviations utilisées	iii
Introduction générale.....	iv
Introduction	1
<i>Chapitre 1 : Les flavonoïdes</i>	
I-1-Généralités.....	5
I-2-Découverte des flavonoïdes.....	5
I-3-Diversité des composés phénoliques.....	5
I-3-1-Définition.....	5
I-3-2-Nomenclature	6
I-3-3-Sources.....	7
I-3-4-La distribution dans la nature.....	8
I-4-La biosynthèse des flavonoïdes.....	8
I-4-1-Importance de la voie métabolique du shikimate.....	8
I-4-2-La voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	8
I-5-Les différents types de flavonoïdes.....	11
I-5-1-Les flavonoïdes glycosylés.....	13
I-5-1-1 Nature des substituants sucrés.....	13
I-5-1-2 Nature des génines.....	16
I-6-La synthèse des flavonoïdes.....	17

I-7-Les activités biologiques des flavonoïdes et leurs effets sur la santé.....	18
I-7-1-Les flavonoïdes et la santé.....	18
I-7-2-Activité biologique des flavonoïdes.....	19
I-8-Propriétés des flavonoïdes.....	20
I-8-1-Propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes et effets sur le système immunitaire.....	20
I-8-2-Propriétés antivirale et antibactérienne.....	21
I-8-3-Biodisponibilité des flavonoïdes.....	21
<i>Chapitre II :Les méthodes d'analyse physico-chimiques d'analyse structurale des flavonoïdes</i>	
II -Les méthodes physico-chimiques d'analyse structurale des flavonoïdes.....	23
II-1-Introduction.....	23
II-2-Matériel végétal	23
II-3-Extraction.....	23
II-4-Séparation chromatographique.....	24
II-4-1-Définition.....	24
II-4-2-Chromatographie sur colonne.....	24
II-4-2-1-Description et principe.....	24
II-4-3-Chromatographie sur papier.....	25
II-4-3-1- Principe de la technique et applications.....	25
II-4-3-2-Papier.....	26
II-4-4-Chromatographie sur couche mince.....	26

II-4-4-1-Définition et appareillage.....	26
II-4-4-2-Principe de la technique.....	27
II-5-Révélation.....	27
II-6-Calcul de R_f (retarding factor ou rapport frontal).....	27
II-7-Filtration et purification sur gel de sephadex LH 20.....	28
II-7-1-Séparation par perméation selon le poids moléculaire.....	29
II-8-Les techniques d'identification structurale.....	29
II-8-1-Définition.....	29
II-8-2-L a résonance magnétique nucléaire (RMN).....	29
II-8-3-La spectroscopie UV-Vis.....	30
II-8-4-Spectre UV-Vis avec addition de réactifs (série spectrale UV-Vis).....	32
II-8-4-1-Spectre en présence de NaOH.....	32
II-8-4-2-Spectre en présence de NaOAc	33
II-8-4-3-Spectre en présence de NaOAc+H ₃ BO ₃	33
II-8-4-4-Spectre en présence de AlCl ₃ et AlCl ₃ +HCl.....	34
II-8-5-L'hydrolyse acide des hétérosides.....	37
II-8-6-La spectrométrie de masse.:.....	37
 Chapitre III : Partie expérimentale	
III-1-Etude phytochimique de <i>Centaurea parviflora</i>	39
III-1-1-Place dans la systématique.....	39
III-1-2-Description de l'espèce <i>C-parviflora</i>	39

III-2-Travaux antérieurs.....	41
III-3-Travaux personnels.....	42
III-3-1-Extraction de <i>Centaura parviflora</i>	42
III-4-Les méthodes de séparation chromatographique.....	44
III-4-1-Sur papier Wattman.....	44
III-4-2-Séparation par chromatographique sur colonne.....	46
III-4-3-Séparation chromatographique sur plaques préparatives.....	49

Chapitre IV : Résultats et Discussions :

IV-Identification structurale des composés isolés.....	53
IV-1-Identification structurale du composé F ₂₀₋₂	53
IV-2-Identification structurale du composé F ₁₄₋₃	60
IV-3-Identification structurale du composé F ₁₂	66
IV-4-Identification structurale du composé F ₀₃	71
Conclusion.....	84
Conclusion générale	85
Références Bibliographiques.	86

Résumé

Abstract

Table des figures et tableaux

Liste des Figures

Figure 1 : Voie générale des phénylpropanoïdes	2
Figure 2 : Plaque chromatographique éluée permettant le calcul de R_f	28
Figure 3 : Les 2 bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.....	30
Figure 4 : Formation de complexe après addition de H_3BO_3	33
Figure 5 : <i>Centauria parviflora</i> Desf.....	40
Figure 6 : Récapitulatif du protocole d'extraction des feuilles de <i>C. parviflora</i>	43
Figure 7-1 : Carte phénolique sur papier Wattman de l'extrait <i>n</i> -butanol des feuilles	45
Figure 7-2: Chromatogramme sur papier Wattman dans le système (B. A. W) de l'extrait <i>n</i> -butanol des fleurs.....	45
Figure 7-3: Chromatogramme sur papier Wattman dans le système acide acétique 15% de l'extrait <i>n</i> -butanol des fleurs.....	46
Figure 7-4 : Chromatogramme de comparaison des extraits <i>n</i> -butanol des feuilles et des fleurs dans le système $CHCl_3 / MeOH / H_2O$ (6,5 / 4,5 / 1,2) obtenu après révélation.....	46
Figure 8 : Résumé des travaux chromatographiques effectués.....	51
Figure 9 : Structure partielle du composé F_{20-2}	55
Figure 10 : Co-chromatographie de la phase aqueuse avec des échantillons de référence après hydrolyse acide du composé F_{20-2}	59
Figure 11: Structure finale du composé F_{20-2} , nicotiflorine.	60
Figure 12 Co-chromatographie de la phase aqueuse avec des échantillons de référence après hydrolyse acide du composé F_{14-3}	64
Figure 13: Structure du composé F_{14-3} . 3-(4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosyl-3,5-dimethoxy)-phenyl-2 E-propenol.....	66
Figure 14 Co-chromatographie de la phase aqueuse avec des échantillons de référence après hydrolyse acide du composé F_{12}	68
Figure 15: Structure du composé F_{12} , <i>O</i> - α - <i>D</i> -arabinofuranosyl éthane.....	70
Figure 16: Structure du composé F_{03} (aglycone plane)	75
Figure 17: Structure finale du composé F_{03} (cornicinine).....	769

Liste des Tableaux

Tableau 1: Liste des enzymes conduisant aux différentes classes de flavonoïdes.....	9
Tableau 2: Hexoses les plus communs	15
Tableau 3 : Quelques activités biologiques des composés phénoliques.....	20
Tableau 4 : Intervalle du maximum d'absorption des bandes I et II dans le MeOH de quelques types de flavonoïdes.....	31
Tableau 5 : Relation entre la couleur de la fluorescence sous la lumière de Wood et les structures flavoniques	36
Tableau 6 : Résultats des séries spectrales UV après addition de réactifs.....	41

Tableau 7: Flavonoïdes isolés de <i>Centaurea parviflora</i>	46
Tableau 8 : Les résultats de la colonne	49
Tableau 9: Données de la série spectrale UV (λ_{\max} nm) du composé F ₂₀₋₂	56
Tableau 10: Données du spectre de RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 250 MHz) du composé F ₂₀₋₂	58
Tableau 11: Données du spectre de RMN ¹³ C (MeOH-d ₄ , 62,9 MHz) du composé F ₁₄₋₃	65
Tableau 12 : Données des spectres RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 250 MHz) du composé F ₁₄₋₃	66
Tableau 13 : Données des spectres RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 250 MHz) et RMN ¹³ C, séquence <i>J</i> mod (MeOH-d ₄ , 62,9 MHz) du composé F ₁₂	68
Tableau 14 : Données du spectre de RMN ¹³ C (MeOH-d ₄ , 75 MHz) du composé F ₀₃	76
Tableau 15: Données du spectre de RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 300 MHz) du composé F ₀₃	77

Table des schémas et spectres

Liste des schémas

Schéma 1 : Flavane	6
Schéma 2 : Flavone	6
Schéma 3 : Structure générale des flavonoïdes.....	6
Schéma 4 : Mécanisme général de biosynthèse des flavonoïdes	10
Schéma 5 :Les différents types de flavonoïdes	12
Schéma 6 :Structure chimique de deux flavonoïdes glycosylés.	13
Schéma 7 : Classification des glucides	14
Schéma 8 : Quelques flavonoïdes glycosylés	17
Schéma 9 : La rétro synthèse des flavonoïdes	18
Schéma 10 : Formation des différents types de complexes après addition de AlCl ₃ et en présence de AlCl ₃ + HCl	35

Liste des Spectres

Spectre 1, 2-1 et 2-2 : Spectres d'absorption ultraviolette du composé F ₂₀₋₂ dans le MeOH et en présence de NaOH	54
Spectre 3 et 4 : Spectres d'absorption ultraviolette du composé F ₂₀₋₂ dans le MeOH en présence de AlCl ₃ et AlCl ₃ + HCl	54
Spectre 5 : Spectres d'absorption ultraviolette du composé F ₂₀₋₂ dans le MeOH et en présence de NaOAc	55
Spectre 6: RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 250 MHz) du composé F ₂₀₋₂	57
Spectre 6-1 : RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 250 MHz) du composé F ₂₀₋₂ , étalement	57
Spectre 7 : RMN ¹³ C (MeOH-d ₄ , 62,9 MHz) du composé F ₁₄₋₃	62
Spectre 7-1 : RMN ¹³ C (MeOH-d ₄ , 62,9 MHz) du composé F ₁₄₋₃ étalement.....	62
Spectre 8 : RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 250 MHz) du composé F ₁₄₋₃	63
Spectre 8-1 : RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 250 MHz) du composé F ₁₄₋₃ étalement.....	63
Spectre 8-2 : RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 250 MHz) du composé F ₁₄₋₃ étalement	64
Spectre 9 : RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 250 MHz) du composé F ₁₂	69
Spectre 9-1, 9-2 : RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 250 MHz) du composé F ₁₂ étalement	69
Spectre 10: <i>J</i> mod (MeOH-d ₄ , 62,9 MHz) du composé F ₁₂	70

Spectre 11 : Spectre ESI MS du composé F ₀₃	72
Spectre 12 : RMN ¹³ C (MeOH-d ₄ , 75 MHz) du composé F ₀₃	78
<u>Spectre 12-1</u> : RMN ¹³ C (MeOH-d ₄ , 75 MHz) du composé F ₀₃ _étalement	78
Spectre 13 : RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 300 MHz) du composé F ₀₃	79
<u>Spectre 13-1</u> : RMN ¹ H (MeOH-d ₄ , 300 MHz) du composé F ₀₃ étalement	79
<u>Spectre 14</u> : DEPT-135 (MeOH-d ₄ , 300 MHz) du composé F ₀₃	80
<u>Spectre 14-1</u> DEPT-135 (MeOH-d ₄ , 300 MHz) du composé F ₀₃ étalement	80
Spectre 15: Spectre COSY (MeOH-d ₄ , 300 MHz) du composé F ₀₃	81
Spectre 16 : Spectre HSQC (MeOH-d ₄ , 300 MHz) du composé F ₀₃	82
Spectre 17 : Spectre HMBC (MeOH-d ₄ , 300 MHz) du composé F ₀₃	82
Spectre 18 : Spectre NOESY (MeOH-d ₄ , 300 MHz) du composé F ₀₃	83

INTRODUCTION

Introduction Générale

La médecine par les plantes est l'une des plus vieilles médecines du monde. Elle représente une alternative intéressante pour traiter et soigner sans créer de nouvelles maladies. Malgré le développement phénoménal de l'industrie pharmaceutique et chimique, l'intérêt populaire pour la médecine par les plantes n'a jamais cessé d'évoluer. De nos jours ces deux types de médication se retrouvent intimement liés puisque le modèle moléculaire de la plupart des médicaments mis sur le marché, ont pour origine la plante. Dans ce contexte, notre laboratoire a, depuis une vingtaine d'années, développé un axe de recherche consacré principalement à la phytochimie et à l'évaluation biologique des plantes algériennes reconnues médicinales, à la recherche de nouveaux modèles.

Cet axe de recherche est privilégié par notre laboratoire où plusieurs molécules nouvelles ont été isolées et déterminées notamment d'espèces du genre *Centaurea* (Compositae). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'espèce *Centaurea parviflora* notamment l'investigation de la phase *n*-butanol de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes.

Notre travail s'articule autour de quatre chapitres :

- le premier propose une mise au point bibliographique sur les flavonoïdes.
- le deuxième traite de l'étude bibliographique des méthodes d'analyse structurale des flavonoïdes par les méthodes physico-chimiques.
- le troisième reporte l'étude botanique de *Centaurea parviflora* Desf. et la description des travaux expérimentaux portant sur l'étude phytochimique menée, notamment l'extraction, la séparation et la purification des métabolites secondaires de la phase *n*-butanol des parties aériennes de cette espèce.
- Le quatrième est consacré l'analyse structurale des composés obtenus.

CHAPITRE I

Les métabolites secondaires de type flavonoïde

I- LES FLAVONOIDES :

I-1-Généralités :

Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues de plantes, présentes dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV [3]; ce qui explique une grande part de leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire et des colorants. Ils possèdent en outre un intérêt médical considérable [8].

I-2-Découverte des flavonoïdes :

L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C, à la suite des travaux de Szent Gyorgi en 1938. Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque. Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique p (p étant la première lettre du mot perméabilité). Cette notion de vitamine p n'existe plus à l'heure actuelle puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines; par contre, les flavonoïdes sont considérés comme des micros nutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants ou posséder des propriétés biologiques [3].

I-3-Diversité des composés phénoliques:

Les composés phénoliques des végétaux constituent un groupe d'une extrême diversité dont les flavonoïdes font partie. Plusieurs milliers de molécules ont été identifiées à ce jour. Ainsi, nous en absorbons chaque fois que nous consommons un aliment d'origine végétale.

I-3-1- Définition:

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone (Schéma 1), ou 2-phenyl chromone portant des hydroxyles libres, éthers ou glycosides.

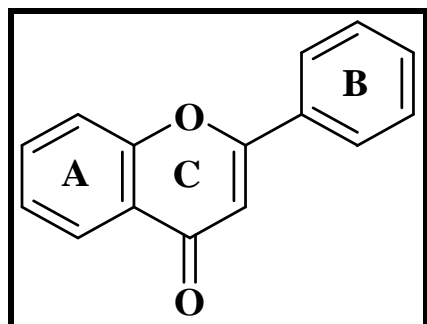


Schéma 1 : Flavone

Le noyau flavone est lui même un dérivé du noyau flavane (Schéma 2).

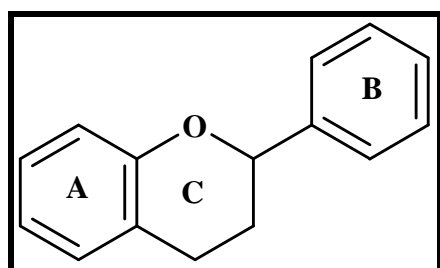


Schéma 2 : Flavane

Les flavonoïdes sont donc des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (cycles A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C) comme reporté dans le (schéma 3).

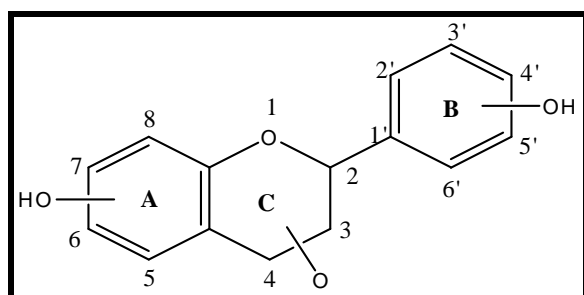


Schéma 3 : Structure général des flavonoïdes

I-3-2- Nomenclature :

En général, il y a deux systèmes parallèles pour la nomenclature des flavonoïdes, le premier est basé sur des noms insignifiants, tels que la flavane et la chalcone, comme structure parente; l'autre est basé sur la nomenclature chimique systématique, tel que 3,4-dihydro-2-phenyl-2H-1-benzopyran (nomenclature IUPAC) pour des flavanes et 2-phenyl-4-oxo-4H-1-benzopyran pour la flavone.

Le dernier système devient encombrant et facile d'être erroné dans les cas de polysubstitution c'est pourquoi il est rarement employé.

Il y a également deux systèmes pour indiquer les substituants autour des noyaux flavane ou flavone.

-Un dans lequel des substituants précis sont placés en des positions précises des trois cycles comme par exemple 3, 5, 7,3',4'-pentahydroxyflavone à qui est attribué le nom de quercétine, l'autre utilise la nature et la position des substituants suivies du nom du noyau en question.

Des noms insignifiants sont utilisés intensivement dans la littérature pour la nomenclature des flavonoïdes. Certains indiquent la classe du composé comme par exemple la fin « inidine » qui dénote une anthocyanidine comme la pélargonidine alors que la fin « étine » dénote un flavonol comme la quercétine. L'évolution des noms a fait que certains glycosides ont des noms particuliers notamment certains dérivés de la quercétine comme la quercitrine qui désigne la 3-rhamnosylquercétine, l'isoquercitrine qui désigne la 3-glucosylquercétine ou la quercimetrine qui désigne la 7-glucosylquercétine.

Cependant, il y a peu d'uniformité dans l'appellation des flavonoïdes et beaucoup de noms sont dérivés du nom générique ou spécifique de la source comme tricine de *triticum* ou hypolaétine de *hypoleana*) [9].

I-3-3-Sources :

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs, par contre, on les trouve en abondance dans les familles suivantes :

- rutacées, légumineuses, apiacées ou ombellifères, astéracées ou composées.

En effet, les flavonoïdes se répartissent volontiers dans les organes aériens jeunes (jeunes feuilles, boutons floraux) où ils sont localisés dans les tissus superficiels (assise palissadique).

Ils se répartissent également dans les racines. Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux.

De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique [3].

I-3-4-La distribution dans la nature :

En général, les flavonoïdes sont universellement distribués chez les plantes supérieures.

Ils se produisent également dans beaucoup de groupes de plantes inférieures, notamment dans les mousses et des liverworts. Cependant ils sont rarement présents dans les mycètes. En raison de l'intérêt résultant en particulier des couleurs vives, belles et remarquables que ces colorants donnent à diverses parties de la plante, des flavonoïdes ont été extraits à partir des fleurs, du nectar, du pollen, des feuilles, des racines, du bois, de l'écorce, de la peau des fruits et des graines. Ils ont également été détectés pendant la fermentation du thé, et la fabrication du cacao [9].

I-4-La biosynthèse des flavonoïdes :

I-4-1- Importance de la voie métabolique du shikimate :

La voie du shikimate est présente uniquement chez les bactéries, les champignons et les plantes, les animaux ne possèdent pas cette voie métabolique, ceci ayant pour conséquence que les acides aminés aromatiques doivent faire partie intégrante de leur alimentation. La spécificité de ce métabolisme aux micros organismes et aux plantes supérieures a conduit à la recherche et à l'obtention de nouveaux antibiotiques et herbicides ayant pour cibles moléculaires des enzymes intervenant dans cette voie [10].

Dans les conditions normales de croissances, 20% du carbone fixé par les plantes passe par la voie du shikimate, cette dernière lie le métabolisme de l'hydrate de carbone à la voie de biosynthèse des composées aromatiques en conduisant à la synthèse de la structure de base, le noyau aromatique [2] .

I-4-2-La voie de biosynthèse des flavonoïdes :

Les connaissances actuelles sur la biosynthèse et l'enzymologie de la production des proanthocyanidines dans les plantes proviennent d'une étude détaillée réalisée par Stafford. Il a également décrit les relations entre lignine et proanthocyanidines, mais n'a pas pu montrer de rôle structural pour les proanthocyanidines contrairement à la lignine. Stafford suggère que la lignine et les proanthocyanidines ont des rôles similaires de défense.

La biosynthèse des proanthocyanidines est résumée dans le schéma 4, et la liste des enzymes qu'elle implique est présentée dans le tableau 1. Les étapes réactionnelles conduisant aux précurseurs de flavonoïdes et à leurs différentes classes impliquent des intermédiaires 4'-hydroxylés (sur le noyau B), les flavonoïdes obtenus sont ensuite hydroxylés (ou fonctionnalisés) sur les noyaux A et B pour conduire aux autres classes de flavonoïdes.

La voie de biosynthèse des flavonoïdes et plus particulièrement celle des anthocyanes a été bien étudiée chez les fleurs, permettant la détermination des différentes étapes ainsi que des enzymes reliées à ces étapes.

La première étape est la condensation entre le 4-coumaroyl-CoA (A) et trois unités malonyl-CoA (B) conduisant à la formation du squelette flavonoïdes en C₁₅, cette étape est catalysée par l'enzyme chalcone synthase (CHS) et conduit à la formation du 2',4',6',4-tétrahydrochalcone (C).

La cyclisation stéréospécifique de cette chalcone conduit à la formation du cycle C du squelette flavonoïde. Cette cyclisation est catalysée par la chalcone isomérase (CHI) qui conduit à la formation de la naringénine (D), qui fait partie de la famille des flavanones.

La chalcone (C) peut également conduire à la formation des aurones. La naringénine (D) obtenue par cyclisation est le précurseur de nombreuses sous familles de flavonoïdes comme les flavones, les isoflavones et les flavan - 4 - ols qui peuvent conduire aux 3-deoxycyanidines. La naringénine (D) peut également être hydrolysée en position 3 par la flavanone 3-hydroxylase (F3H) pour conduire au dihydrokaempférol (E), qui fait partie de la famille des flavanols. Le dihydrokaempférol (E) peut aussi après déshydrogénation du noyau C et fonctionnarisation du noyau B former les flavanols [10], comme reporté dans le schéma 4.

Numéro	Enzyme	Acronyme
Précurseurs non flavonoïdes		
I	Acetyl-CoA carboxylase	ACC
II	Phénylalanine ammonialyase	PAL
III	Cinnamate 4-hydroxylase	C4H
Classes de flavonoïdes		
1	Chalcone synthèse	CHS
2	Polyketide réductase	PKR
3	Chalcone isomérase	CHI
4	2-Hydroxyisoflavone synthase	IFS

Tableau 1 : Liste des enzymes conduisant aux différentes classes de flavonoïdes

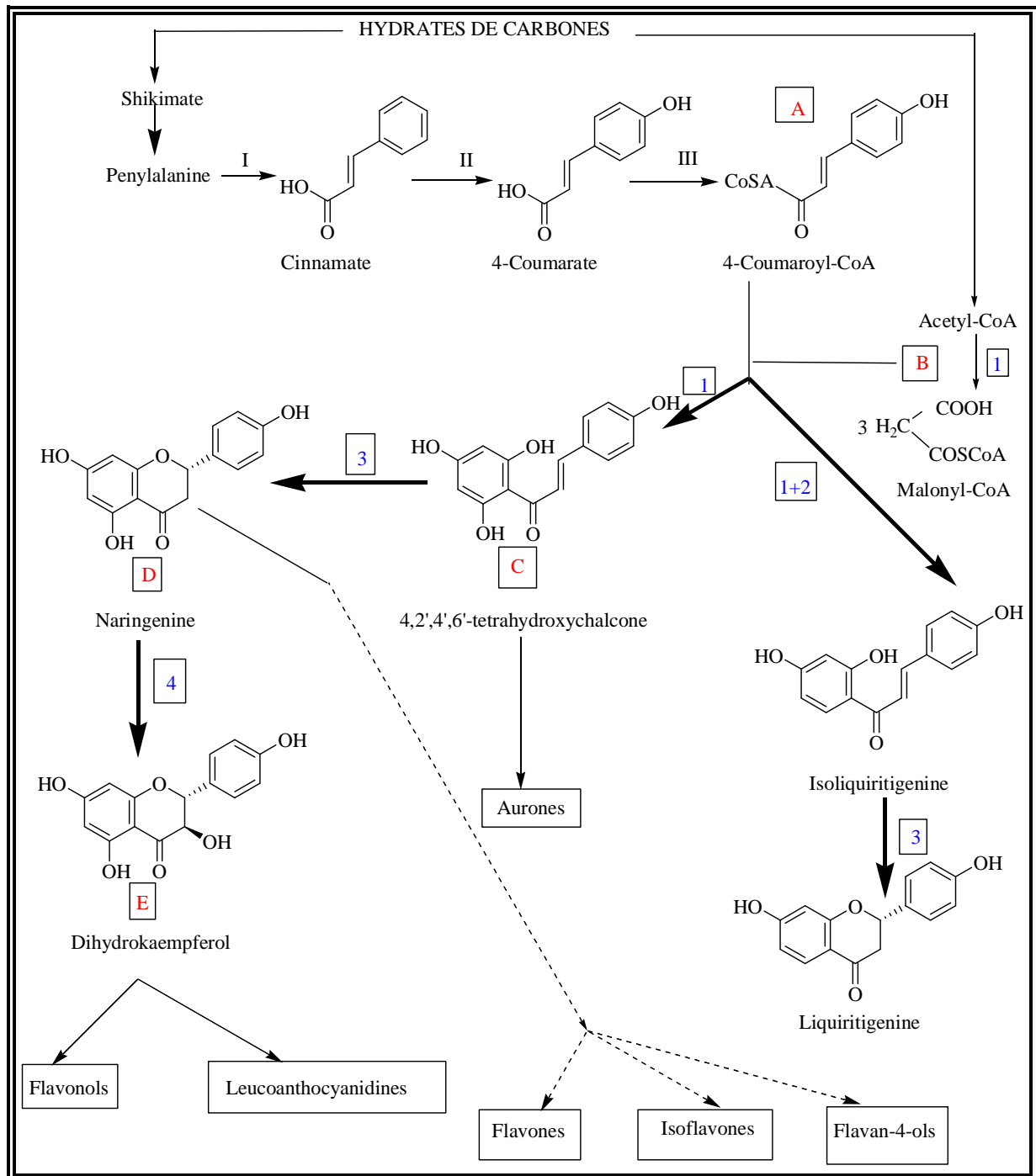


Schéma 4 : Mécanisme général de biosynthèse des flavonoïdes

I-5- Les différents types de flavonoïdes :

C'est un des groupes de substances naturelles les plus variés, contenant plus de 4000 structures, il comprend comme son nom l'indique des composés jaunes mais aussi d'autres couleurs ou incolores. Ils sont universels chez les angiospermes et les gymnospermes. Ils ont tous en commun la structure de la flavane, 3 cycles dont un hétérocycle dont la configuration variée permet la classification en sous groupe Schéma 5: flavones, flavanones et flavonols, flavanediols et la chalcone dont l'hétérocycle n'est pas formé et qui représente un intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes.

Le noyau flavonoïde est souvent lié à un sucre pour former un glycoside hydrosoluble [11].

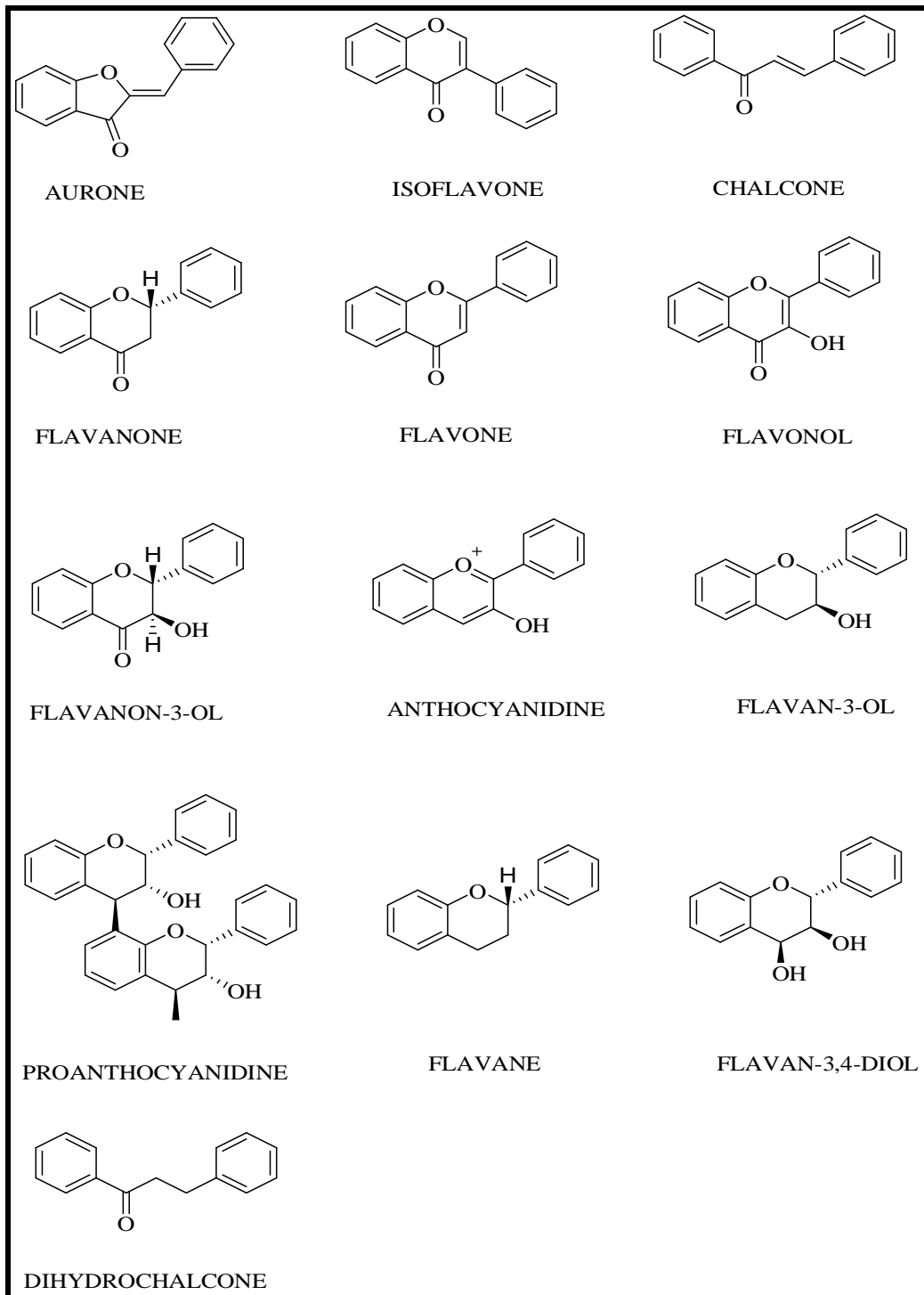


Schéma 5 : les différents types de flavonoïdes

I-5-1-Les flavonoïdes glycosylés :

Ce sont des hétérosides, c'est-à-dire des dérivés de GENINE-OSE sur lesquelles un ou plusieurs OSES sont greffés.

La liaison GENINE-OSE existe grâce à la réunion, soit d'un hydroxyle phénolique, soit d'un hydroxyle de l'hétérocycle oxygéné, soit d'un -CH avec l'hydroxyle hémiacétalique du ou des ose(s), on obtient alors des O-Hétérosides ou des C-Hétérosides (Schéma 6).

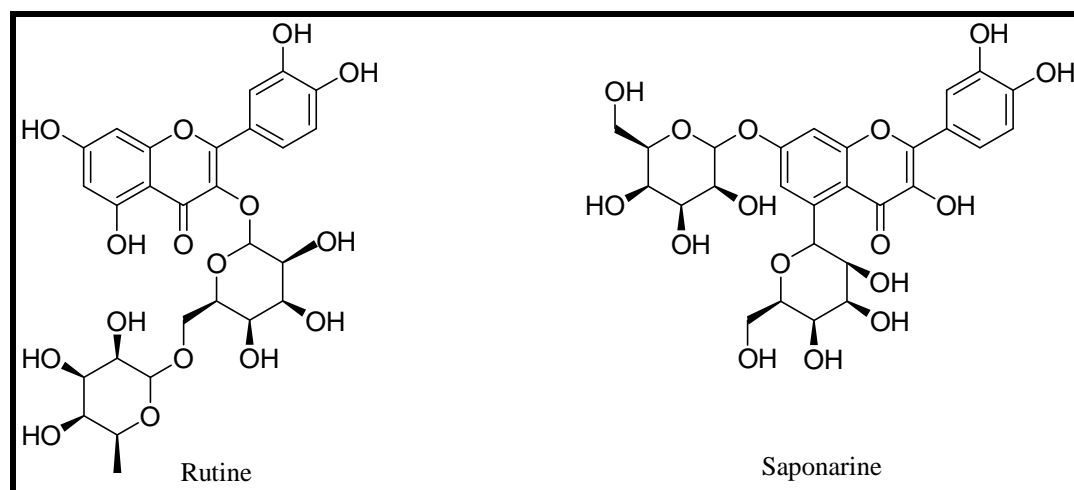


Schéma 6 : structure chimique de deux flavonoïdes glycosylés

I-5-1- 1 Nature des substituants sucres

- Classification des glucides:

Dans le schéma 7, nous reportons la classification en catégories de quelques glucides naturels.

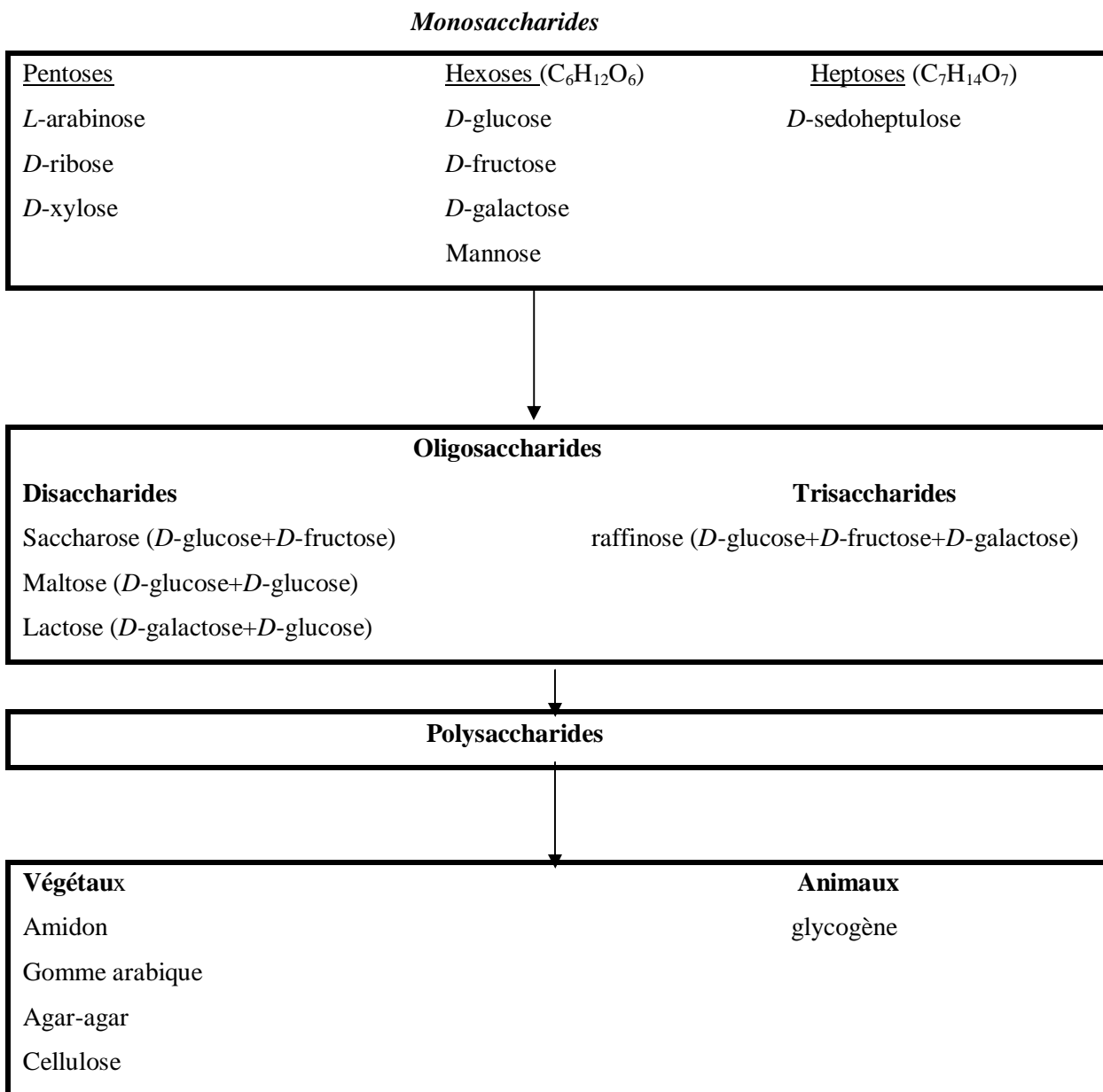


Schéma 7 : classification des glucides

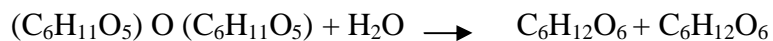
Les sucres à six atomes de carbones (hexoses) les plus communs sont le D-glucose, le D-fructose, le D-galactose et le D-mannose. Ce sont tous des aldohexoses, à l'exception du D-fructose qui est un cétohexose. La structure de ces hexoses est indiquée au tableau 2.

Hexose	Structure à chaîne ouverte	Structure cyclique hémiacétal
<i>D-glucose</i>	$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $	
<i>D-fructose</i> à l'état libre dans le miel et le jus de fruits ; à l'état combiné dans le saccharose et les polysaccharides	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $	
<i>D-mannose</i> constituant de polysaccharides	$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $	
<i>D-galactose</i> constituant d'oligosaccharides (lactone, mélibiose, raffinose) et de polysaccharides (gommages)	$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $	

Tableau 2 : Hexoses les plus communs

Le terme oligosaccharide s'applique à des polymères de condensation de bas poids moléculaires, formés de deux à neuf unités monosaccharides (le plus souvent des hexoses).

De nombreux disaccharides, qui sont formés de deux unités monosaccharides, sont connus ; l'un des plus importants est le saccharose.



Saccharose

D-glucose+ *D*-fructose

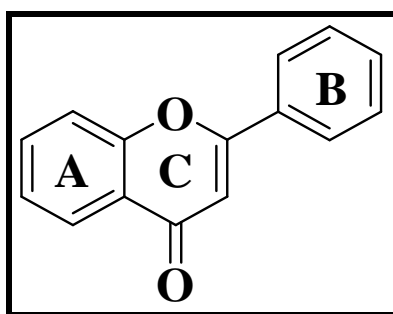
Les polysaccharides sont des polymères de haut poids moléculaire formés par la condensation répétée de monosaccharides, exemples: les amidons, le glycogène, la cellulose et certaines gommages végétales, les relations entre les diverses classes de glucosides sont résumées dans le tableau 2.

On trouve aussi dans la nature des sucres combinés avec d'autres composés tels que des produits hydroxylés ou des bases azotées, les dérivés glucidiques de ce type sont appelés glucosides [12]. Ce type de composés communément connus sous le nom d'hétérosides résulte de la combinaison Génine-Oses.

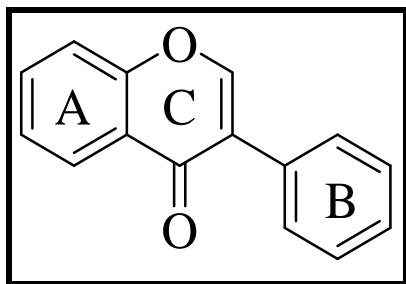
I-5-1- 2 Nature des génines

Dans la classe des flavonoïdes différents types de génines sont rencontrés, leur squelette de base peut être entre autre celui de :

- flavone (2-phényl-chromone)



- isoflavone (3-phényl-chromone)



La plupart des flavonoïdes se produisent naturellement associés à des sucres sous la forme conjuguée et dans n'importe quelle classe peut être caractérisée au tant que monoglycosidique, diglycosidique, etc.... La complexité glycosidique est considérable. Les monosaccharides liés aux flavonoïdes comme le glucose, le galactose, l'apiose, l'allose, l'arabinose, le rhamnose, le xylose, le mannose, l'acide galacturonique et l'acide glucuronique, les mono-, les di-, et les tri-saccharides peuvent être liés par un hydroxyle phénolique simple ou peuvent être différemment liés à des groupes (deux ou plus) phénoliques [9] (Schéma 8).

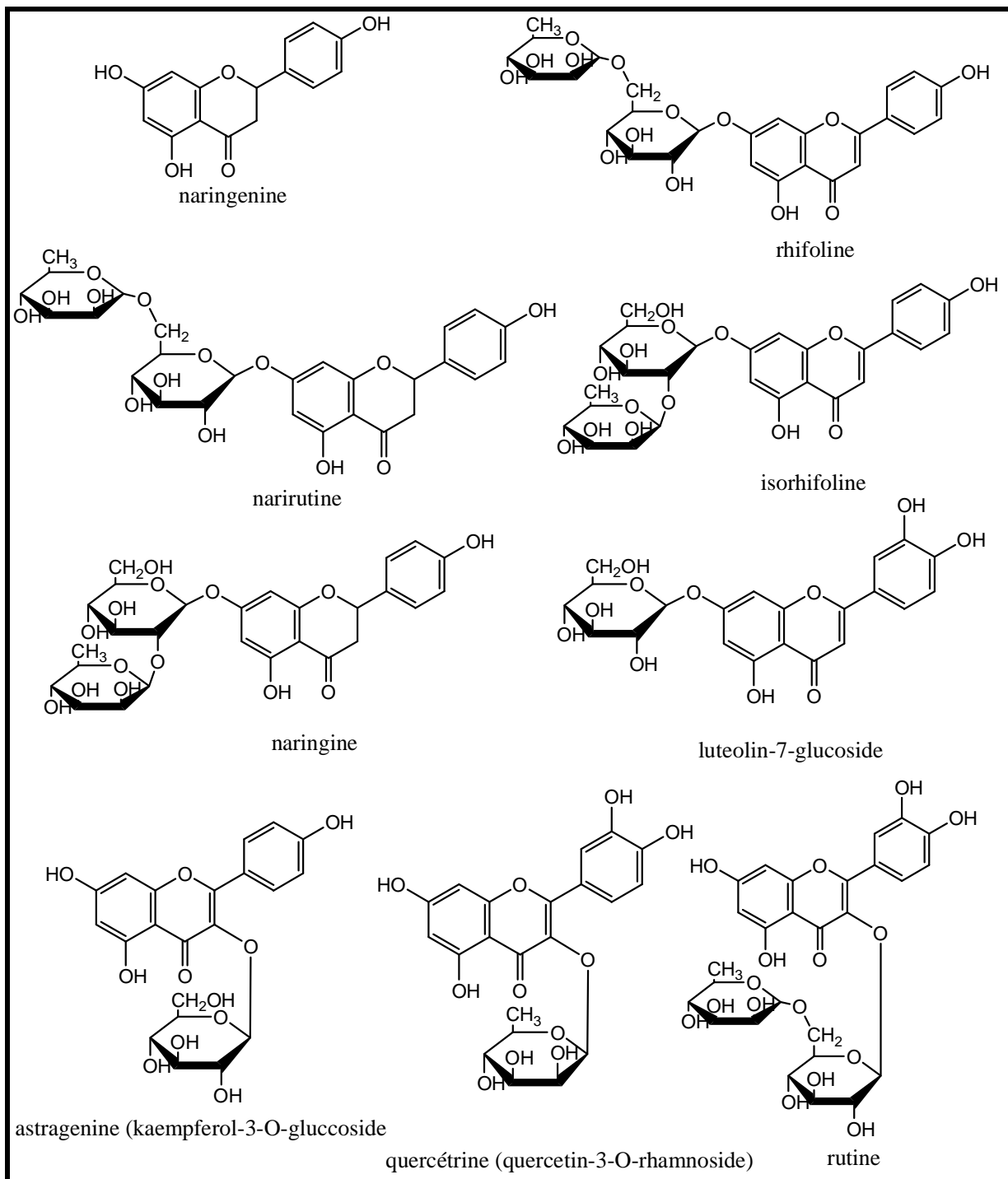


Schéma 8 : Quelques flavonoïdes glycosylés [13]

I-6-La synthèse des flavonoïdes

Les Flavonoïdes ont été un sujet de recherche pendant plus d'un siècle. De nombreuses molécules de cette famille de substances naturelles ont été isolées d'extraits de plantes grâce auxquelles de nombreuses propriétés biologiques intéressantes leur ont été attribuées. Dans ce

contexte, la synthèse organique a apporté sa contribution par notamment, la constitution du squelette flavonique [13], par deux voies de synthèse (Schéma 10). Ces chemins réactionnels consistent en :

- la substitution d'un phénol avec un chlorure de l'acyle.
- la substitution d'une acétophénone avec un benzaldéhyde, un anhydride de benzoyle, ou un chlorure de benzoyle.

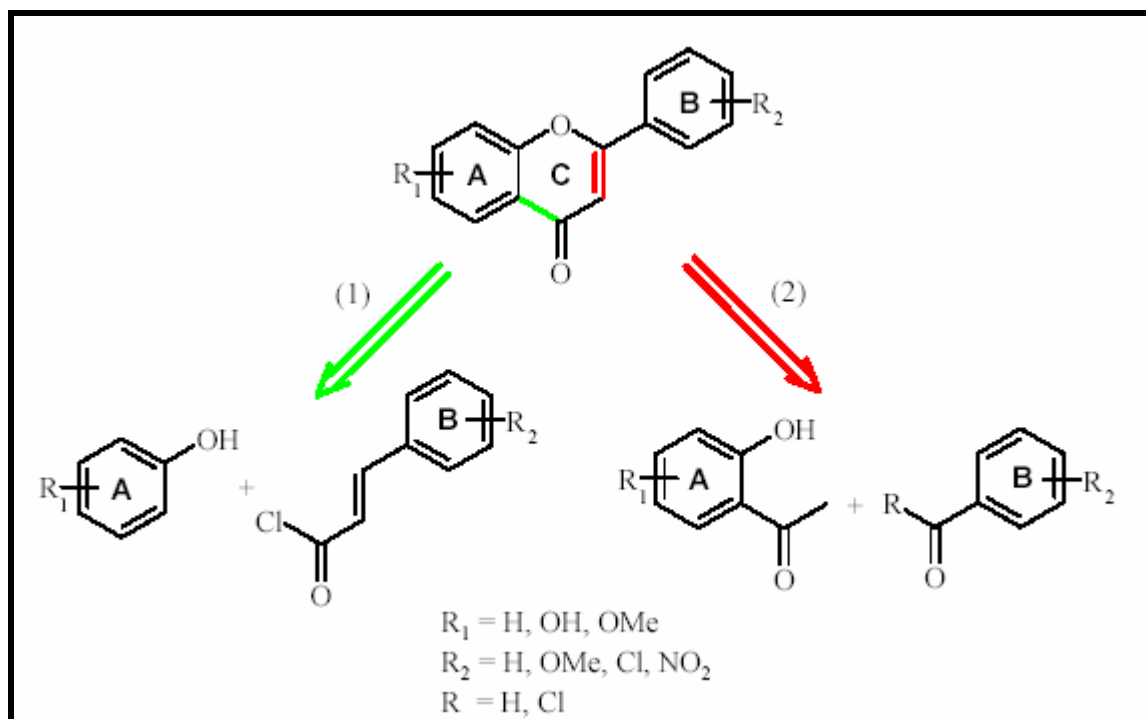


Schéma 9 : La rétro synthèse des flavonoïdes

I-7- Les activités biologiques des flavonoïdes et leurs effets sur la santé :

I-7-1- Les flavonoïdes et la santé :

Les composés phénoliques en général seraient utilisés comme composés de défense [14].

Ils sont actuellement l'objet de nombreuses études à cause de leur action bénéfique sur la santé. L'une de leurs propriétés est de former des complexes avec les protéines, la complexation tanin-protéine pouvant être à la base de nombreux effets biologiques des polyphénols [15]. Elle pourrait également être à la base du mécanisme de certaines des propriétés biologiques majeures qu'on leur découvre *in vitro* (expression génétique, inhibition

enzymatique) [16]. Des études conduites *in vitro*, révèlent les nombreuses activités biologiques des polyphénols telles que les propriétés anti inflammatoire, anti agrégante plaquettaire, vasorelaxante), antioxydante, anticancéreuse. Ces substances sont supposées exercer un effet bénéfique sur la santé humaine, et particulièrement envers les maladies cardiovasculaires [17].

Ces dernières années, les épidémiologues ont attiré l'attention sur le rôle des antioxydants présents dans l'alimentation et leur implication dans la prévention de certaines maladies telles que les maladies cardiovasculaires, et les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) ou encore certains types de cancer.

I-7-2- Activité biologique des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes dont la principale raison de leur biosynthèse est de lutter contre les agressions de leur environnement extérieur. Les propriétés antibactériennes et antifongiques de nombreux flavonoïdes sont également utilisées par les plantes pour lutter contre toute invasion par microorganisme, ils jouent également un rôle dans la protection des plantes contre les insectes et les animaux herbivores. Ils sont également utilisés dans une autre interaction entre le règne végétal et animal, cette fois pour attirer les insectes afin de réaliser la pollinisation des fleurs car leur absorption dans le visible ou dans l'ultraviolet proche du visible attire alors certains insectes tels que les abeilles qui distinguent ces longueurs d'ondes [10].

Par ailleurs, des recherches ont montré que l'oxydation incontrôlée dans les cellules joue un rôle important dans le vieillissement ainsi que dans le développement de certaines pathologies, ainsi les polyphénols, puissants anti-oxydants [1], et capteurs de radicaux libres [17], sont probablement une des familles des molécules les plus actives vis-à-vis de ces désordres physiologiques. Ils sont présents dans la plupart des fruits et légumes, et en particulier dans le thé, le vin et le cacao comme reporté dans le tableau 3 [18].

Polyphénols	Activités
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	<i>Antibactérienne</i> <i>Antifongique</i> Antioxydante
Coumarines	<i>Protectrice vasculaire et</i> anti œdémateuse
Flavonoïdes	Anti tumorale Anti carcinogène Anti-inflammatoire Hypotenseurs et diurétiques. antioxydant
Anthocyanes	Protectrice capillaro-veineux.
Pro anthocyanidines	Effet stabilisant sur le collagène. Antioxydante Anti tumorale Antifongique Anti inflammatoire
Tannins galliques et Catéchiqes	Antioxydant

Tableau 3: Quelques activités biologiques de composés phénoliques

I-8- Propriétés des flavonoïdes :

I-8-1- Propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes et effets sur le système immunitaire :

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T. Cet effet des flavonoïdes sur ces lymphocytes B et T peut être variable. En effet, les flavones

(apigénine, lutéoline et 7,3',4'-hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que la myricétine est active sur les lymphocytes B.

I-8-2- Propriétés antivirale et antibactérienne :

Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase. Une étude récente a montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur *staphylococcus aureus*.

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, il faut citer :

- l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes.
- la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer.
- l'inhibition du métabolisme microbien [3].

I-8-3- Biodisponibilité des flavonoïdes :

Les flavonoïdes présentent des propriétés bénéfiques biologiques et antioxydantes.

Cependant la qualité nutritionnelle et les effets des flavonoïdes dépendent de leur absorption au niveau du tractus digestif.

Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que leur absorption est faible et implique des mécanismes encore mal connus. Seuls les aglycones sont supposés être absorbables, alors que les glycosides, comme la rutine, doivent subir l'hydrolyse de leur liaison osidique par l'action de la microflore intestinale pour leur permettre d'être absorbés au niveau du colon [3].

CHAPITRE II

Les méthodes d'analyse physico-chimiques
D'analyse structurale des flavonoïdes

II-LES METHODES PHYSICO-CHIMIQUES D'ANALYSE STRUCTURALE DES FLAVONOIDES :

II-1- Introduction :

Pour faire une investigation phytochimique qui consiste principalement en l'isolement et l'identification structurale de produits naturels à partir de végétaux, il est nécessaire, voir même indispensable de bien choisir la partie du matériel végétal et en fonction de la nature des produits recherchés, adapter et optimiser les techniques ou les méthodes physico-chimiques nécessaires [19].

II-2-Matériel Végétal :

Le choix du matériel végétal n'est en aucun cas fait d'une manière aléatoire. Même si l'objectif est préalablement fixé, il faut toujours vérifier tout au début que le végétal choisi contient bien les produits qu'on se propose de rechercher. Ce dernier point consiste à faire des screening permettant d'évaluer et d'apprécier à sa juste valeur ou à la limite d'une manière plus ou moins qualitative que quantitative la composition du matériel végétal à étudier.

La période et le lieu des récoltes doivent être bien choisis. Les récoltes sont effectuées au moment de la floraison, et se situent en ce qui nous concerne généralement entre les mois d'avril et juillet selon le lieu de la station de récolte.

Les produits que l'on se propose d'étudier ne sont pas répartis de la même façon dans les différentes parties du végétal. Ainsi les différents organes de la plante sont souvent séparés après la récolte puis séchée à l'abri des rayons solaires et de l'humidité et pesés [19].

II-3- Extraction :

L'obtention d'une substance naturelle à partir des végétaux nécessite souvent une extraction avec des solvants appropriés. Elle peut être de nature discontinue et consiste à laisser macérer le végétal dans un solvant ou un système de solvant, à température ambiante, à chaud ou même parfois porter le tout à ébullition pour extraire les constituants solubles. Un extrait est ainsi obtenu après bien évidemment l'évaporation totale du solvant.

L'extraction est souvent suivie par une ou plusieurs autres, à la différence de la première, ce sont des extractions liquide-liquide effectuées dans des ampoules à décanter. Ces dernières consistent à transférer qualitativement et quantitativement le ou les produits recherchés en évitant au maximum d'y transférer des produits autres que ceux recherchés. Le choix du solvant d'extraction devient dès lors impératif [19].

II-4- Séparations chromatographiques :

II-4-1- Définition :

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et leur désorption sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase.

On peut classer les méthodes chromatographiques d'après la nature des phases utilisées ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation.

II-4-2- Chromatographie sur colonne :

La chromatographie sur colonne peut être une méthode préparative ; elle permet en effet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes.

Elle présente cependant plusieurs inconvénients :

- de grandes quantités de solvant sont nécessaires à l'élution
- la durée de l'élution est généralement très grande
- la détection des composés exige une attention constante

Elle est adaptée à la purification de quantités importantes de produits, lorsque les conditions opératoires sont au point. Cependant, la méthode étant très empirique, sa mise au point nécessite souvent de nombreux essais.

II-4-2-1- Description et principe :

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne de longueur et de section variables : l'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des composés.

- Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. A mesure que chaque zone s'écoule de la colonne, on la recueille.

II-4-3- Chromatographie sur papier :

II-4-3-1-Principe de la technique et applications :

La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau ; la phase stationnaire est constituée par elle-même absorbée sur la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. Comme en chromatographie sur couche mince, l'échantillon mis en solution, et déposé en un point repère du papier et le solvant, qui se déplace par capillarité, fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité.

Généralement, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement.

Lorsque l'eau est un des solvants de la phase mobile, le ou les solvants organiques doivent y être assez solubles. Des produits comme l'acide éthanoïque, le propanol, le phénol ou la pyridine sont les solvants les plus fréquemment utilisés en mélange avec de l'eau pour développer un chromatogramme.

La chromatographie sur papier est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires, tels que les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels.

Ses plus grands inconvénients par rapport à la CCM sont :

- une durée de développements beaucoup plus longue.
- une séparation généralement moins bonne.

II-4-3-2- Papier :

On peut utiliser du papier ordinaire, mais il est préférable de se procurer du papier conçu pour cet usage, ayant un faible taux d'impuretés et dont les caractéristiques sont uniformes. Les marques principales sont Wattman, Schleider et Shull, Durieux et Arches. Il existe huit Catégories de papier Wattman, classées selon leur épaisseur, la texture de leur surface et la vitesse avec laquelle l'eau y diffuse. par exemple le papier Wattman n°1 est le plus utilisé, mais si l'on désire une grande vitesse d'écoulement modérée on utilisera le n°3 ou le n°4 ; le papier n°20 est très lent, mais il permet une meilleure séparation, donnant des taches très denses et uniformes.

La description de l'analyse par chromatographie sur papier est identique à celle sur couche mince.

II-4-4- Chromatographie sur couche mince (CCM):

II-4-4-1-Définition et appareillage :

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- **la cuve chromatographique ; un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.**

- La phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris), l'amidon ou un polymère organique.
- l'échantillon : Environ un micro litre de solution diluée (2 à 5%) du mélange à analyser, est déposé en un point repère situé à un cm au moins au dessus de la surface de l'éluant.
- l'éluant : un solvant pur ou un mélange de solvants; il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

II-4-4-2- Principe de la technique :

Lorsque la plaque sur laquelle est déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant.

Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. La plaque est placée en position verticale dans la cuve et le solvant qui en recouvre le front monte par capillarité [20].

II-5- Révélation :

La révélation des substances isolées se fait selon différentes méthodes (valable également pour la chromatographie sur papier) :

- directement si les substances sont colorées.
- à l'aide de révélateurs si elles sont incolores afin de les transformer en taches colorées ; les produits sont souvent décelés par leurs réactions fonctionnelles classiques : les acides aminés par la ninhydrine qui donne avec la plupart une couleur bleu violet, les acides organiques par des indicateurs colorés, les sucres par le réactif de Molish qui utilise le pouvoir réducteur des sucres. quelques réactifs comme l'iode ou le permanganate donnent des colorations non spécifiques avec la plupart des composés organiques.
- toutes les substances ayant une absorption dans la région au dessus de 230 nm sont étudiées sur des supports additionnées de corps fluorescents par irradiation à la lumière UV (254 et 366nm) par suite de la fluorescence propre à ces composés.
- dans tous les cas, il faut noter les positions des taches colorées juste à la fin de la chromatographie en les cerclant car certains produits disparaissent avec le temps.

II-6- Calcul de R_f (retarding factor ou rapport frontal) :

Si nécessaire, les taches du chromatogramme sont révélées par pulvérisation de réactifs appropriés. On détermine alors, pour chaque constituant, le rapport frontal

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par le front de solvant}}$$

- Le R_f est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support (phase stationnaire) donné.
- Le R_f est à peu près le même, que le constituant soit pur ou dans un mélange.
- Le R_f ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange (Figure 2).

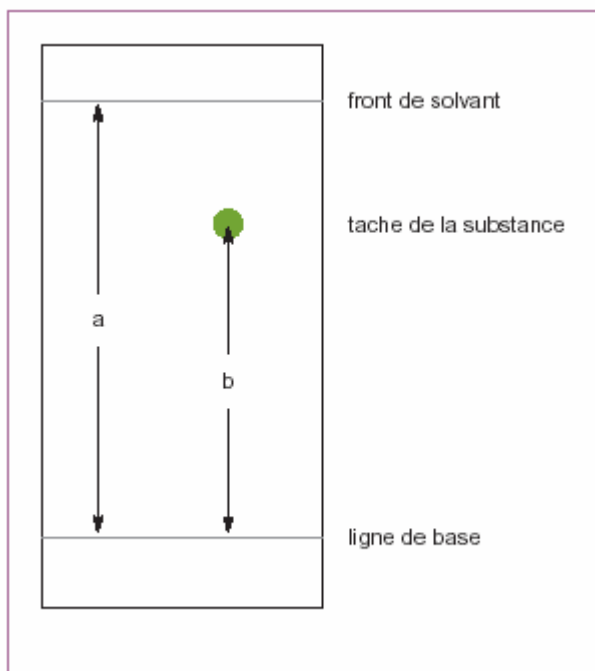


Figure 2 : Plaque chromatographique éluée permettant le calcul du R_f

II-7- Filtration et purification sur gel Sephadex LH 20

Le sephadex LH 20 est un gel de séparation qui possède des propriétés lipophile et hydrophile. Le caractère lipophile de ce gel réticulé de dextrane revient à la présence des

groupements isopropyles obtenus par hydroxypropylation du sephadex G-25. Son caractère hydrophile est dû aux nombreuses fonctions hydroxyles présentes. En raison de cette nature, le sephadex LH 20 gonfle non seulement dans les solvants de faible et moyenne polarité mais également dans les solvants très polaires. A ces deux propriétés s'ajoute la récupération presque totale des échantillons au cours des expériences de séparation.

- Selon la nature des composés à séparer et de la nature de l'éluant utilisé, différents mécanismes sont susceptibles d'intervenir en même temps tout au long du processus de séparation [21].

II-7-1-Séparation par perméation selon le poids moléculaire :

Les substances sont éluées par ordre décroissant par rapport à leur poids moléculaire. Les solvants les plus utilisés sont le méthanol et l'éthanol, associés ou non au dichlorométhane ou au chloroforme.

II-8- Les techniques d'identification structurale :

II-8-1- Définition:

L'identification des structures moléculaires organiques se fait généralement par l'utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques, la spectrométrie de masse, la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone.

Ces techniques permettent dans un temps réduit d'avoir des données importantes conduisant à la l'élucidation structurale.

Les plus utilisées au cours de notre travail ont été : La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, la spectroscopie d'absorption ultraviolette.

II-8-2- La résonance magnétique nucléaire (RMN) :

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ou ^1H , le carbone treize ou ^{13}C , le phosphore ou ^{31}P , le fluor ^{19}F , l'azote ^{15}N ...

Depuis son développement extrême durant ces dernières décennies, elle est devenue la méthode de choix de la résolution structurale, grâce notamment, aux expériences multi impulsionnelles et bidimensionnelles homo et hétéronucléaires qui permettent non seulement d'arriver à la structure mais de résoudre les problèmes de stéréochimie. Il faut également souligner un avantage précieux de cette technique même si elle n'est pas très sensible par rapport aux autres (la spectrométrie de masse par exemple et les séries spectrales UV) c'est que l'échantillon est récupéré intact après évaporation du solvant.

II-8-3- La spectroscopie UV –Vis :

Les techniques de spectroscopie UV-Vis sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés structurales et les caractéristiques optiques des composés.

C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques.

Dans les composés, chaque chromophore absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Ceci permet de caractériser les molécules.

La mesure de l'absorption UV permet également de connaître ou déterminer la composition chimique d'un mélange, par comparaison avec des témoins.

Dans notre étude, cette technique a été utilisée dans l'élucidation structurale des composés isolés par comparaison des spectres d'absorption avec des témoins disponibles au laboratoire. C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques, Elle est basée sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales (Figure 3) [22].

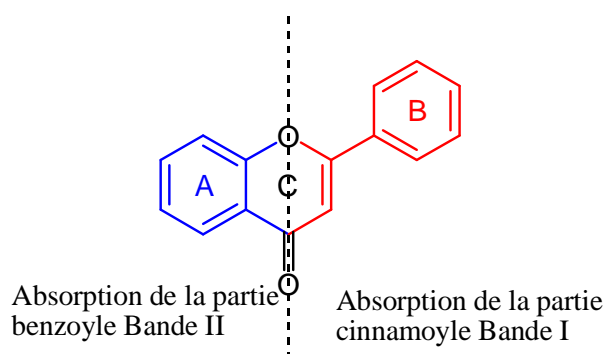


Figure 3 : Les 2 bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

Bande I: présente un maximum d'absorption entre 300-400nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison(C₂-C₃) et le noyau B, elle donne , alors des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.

Bande II: présentant un maximum d'absorption entre 240-280nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoylé qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A est nous informe sur les variations structurales du cycle A L'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes est donné sur le tableau suivant:

<i>Type de composé flavonique</i>	<i>Bande I</i>	<i>Bande II</i>
<i>Flavone</i>	320-350	250-270
<i>Flavonol</i>	352-385	250-280
<i>Flavanone</i>	300-330	245-275
<i>Isoflavone</i>	300-330	245-275

Tableau 4 : Intervalle du maximum d'absorption des bandes I et II dans le MeOH De quelques types de flavonoïde

L'interprétation des spectres dans le méthanol et/ou en présence de réactifs spécifiques s'appuie sur des règles très connues pour les flavonoïdes ; règles décrites par Jur et al, (1962) reprises par Mabry et al. (1970) et complétées par Voirin (1983) [23].

En général, une bonne exploitation des données de cette technique additionnée aux valeurs des R_f dans les systèmes de solvant appropriés conduit à une approche structurale qui pourrait être complète si l'on tient compte de la couleur de la fluorescence de ce type de composés une fois exposé à la lumière de Wood ($\lambda = 366$ nm). Cette dernière donnée est également très utile car elle permet de faire la distinction entre les différentes classes de flavonoïdes très rapidement. C'est le cas par exemple des deux aglycones de flavone de base en l'occurrence l'apigénine (5, 7,4'-trihydroxyflavone) et de la lutéoline (5, 7,3',4'-

tetrahydroxyflavone) et leurs homologues flavonols qui ont des fluorescences noir-violette et jaune respectivement. Le tableau 5 reporte la relation entre la couleur de la fluorescence sous la lumière de Wood et les structures flavoniques :

Fluorescence	Structures flavoniques
<i>Noir- violette</i>	-flavones -5, 6,7 ou 5, 7,8 trihydroxyflavone -flavonol avec 3-OH substitué
Bleu	-flavone ou flavonol sans OH en 5 -flavanone avec OH en 3 ou flavanol -flavonol avec 3-OH substitué ou sans 5-OH
<i>Jaune ou jaune terne</i>	-flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
<i>Orange fluorescente</i>	-isoflavones
<i>Jaune verte</i>	-aurones
Verte	-chalcones
<i>Bleu verte</i>	-flavanone sans 5-OH

Tableau 5: Relation entre la couleur de la fluorescence sous la lumière De Wood et les structures flavoniques

II-8-4- Spectres UV-Vis avec addition de réactifs (série spectrale UV-Vis :

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que NaOH, NaOAc, H₃BO₃ et HCl. Ces derniers réagissent avec les groupements hydroxyles en formant des complexes qui se traduiront sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique (Tableau 6).

II-8-4-1-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 [23]. L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 350 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'.

Dans le cas des isoflavones hydroxylées sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est orthodihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [24].

II-8-4-2-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 [24].

Dans le cas des isoflavones, le NaOAc ionise spécialement l'hydroxyle en position 7 [24], ceci se traduit par un déplacement bathochrome de la bande II (6-20nm).

Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné [24].

II-8-4-3-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 de chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande I [24] (Figure 5).

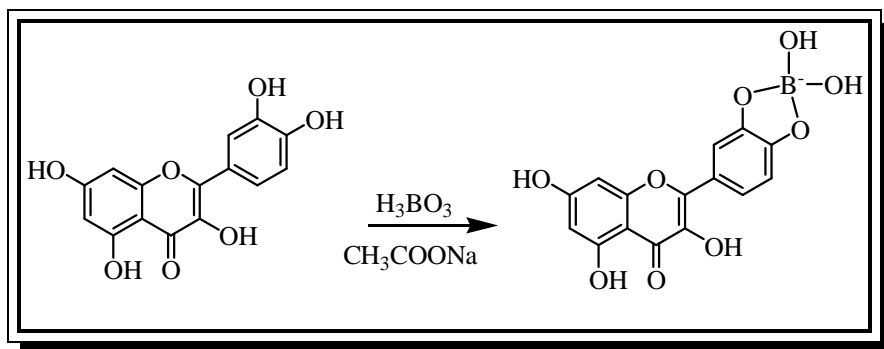


Figure 4 : Formation de complexe après addition de H_3BO_3

II-8-4-4-Spectre en présence d' AlCl_3 et AlCl_3+HCl :

La présence du chlorure d'aluminium (AlCl_3) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le MeOH. Les complexes formés entre AlCl_3 et les groupes ortho dihydroxyles des noyaux aromatiques A et B sont instables et se décomposent en présence de HCl [25], par contre, ceux formés entre AlCl_3 et les hydroxyles 5-OH ou 3-OH et la fonction carbonyle sont stables [26,27] (Schéma 10). Ces effets se manifestent par un déplacement hypsochrome de la bande I sur le spectre UV en présence d' $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au spectre après addition d' AlCl_3 et un déplacement bathochrome de la bande I du spectre en présence d' AlCl_3 moins important par rapport au spectre dans le MeOH en cas d'oxygénation de la position 6 (Tableau 6).

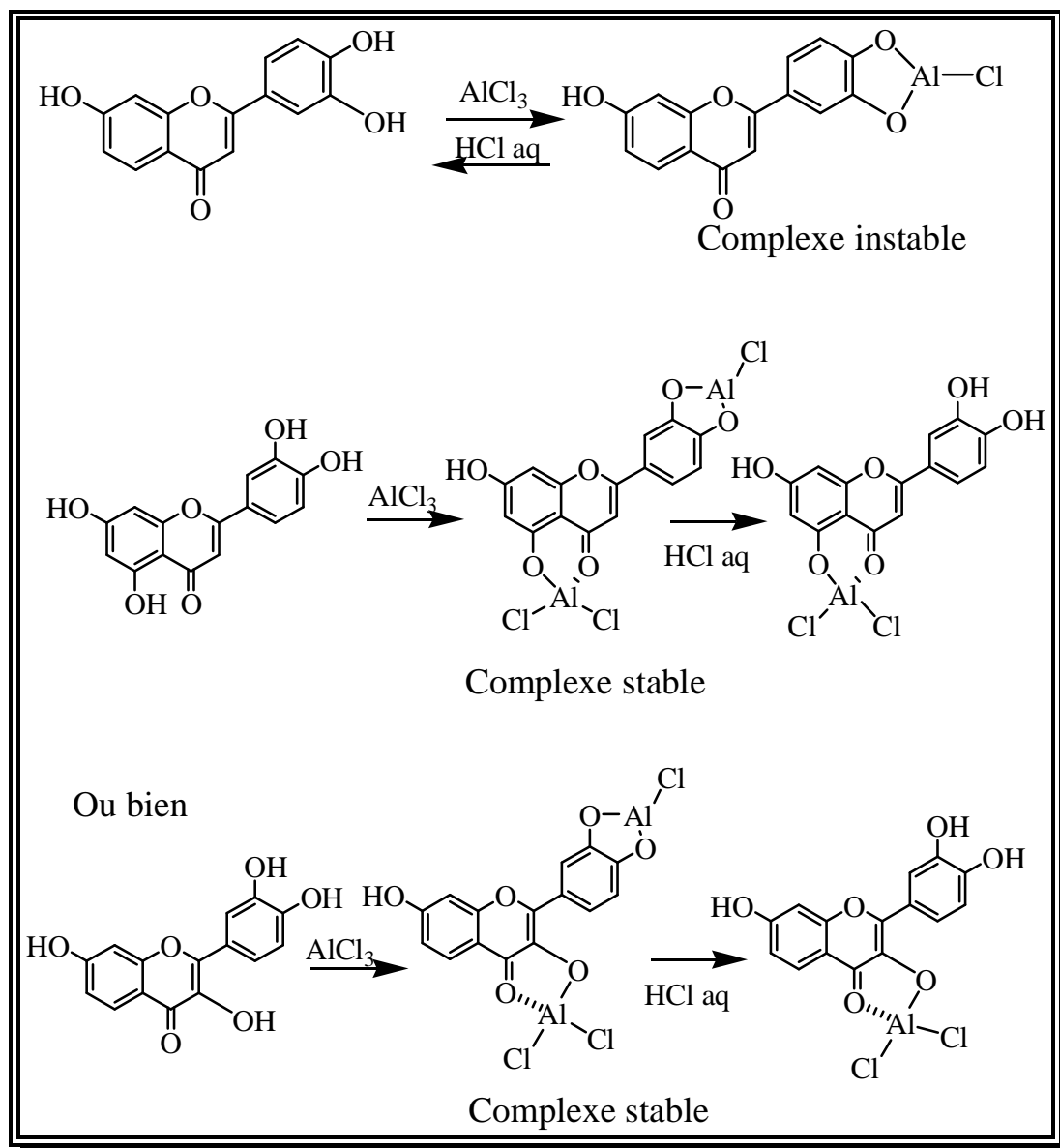


Schéma 10 : Formation des différents types de complexes après addition d' AlCl_3 et en présence d' $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$

Réactifs	Déplacement (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	310-350 330-360 350-385	250-280 250-280 250-280	Flavone Flavonol (3-OR) Flavonol (3-OH)
NaOMe (NaOH)	+40 à 60 avec stabilité d'intensité +50 à 60 avec diminution d'intensité -Faible déplacement avec diminution d'intensité -Apparition d'une nouvelle bande entre BI et BII -Absence de bande entre 320-335 -Transformation de la bande I en une Inflexion.		4'-OH 3-OH et 4'OR 4'-OR 7-OH 7-OR 5-OH (seul hydroxyle libre)
AlCl ₃ /MeOH	+20 à 45 +60		5-OH 3-OH
AlCl ₃ +HCl/AlCl ₃	-30 à -40 -20 à -25		-Ortho di OH sur le noyau B -Ortho di OH sur le noyau A (en plus ortho di OH sur le noyau B)
AlCl ₃ +HCl/MeOH	+35 à 55 +17 à 20 +50 à 60		5-OH 5-OH (avec 6-oxygénation) 3-OH ou 3-OH et 5-OH
NaOAc/MeOH	+5 à 20 -Déplacement très faible -Diminution d'intensité avec le temps -Le spectre se décompose avec le temps		7-OH 7-OR 6,7; 7,8 ou 3',4'di OH 5, 6,7 ; 5, 7,8 ou 3, 3',4' -tri OH
NaOAc+H ₃ BO ₃	+12 à 36 +5 à 10		3',4' di OH 6,7 ou 7,8 di OH

Tableau 6 : Résultats des séries spectrales UV après addition de réactifs

II-8-5-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 échantillons authentiques.

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

II-8-6- La spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer le poids moléculaire d'un produit pur ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus.

- Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduites dans l'appareillage. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir rupture de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, avec formation d'ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. L'ensemble de ces ions constituent le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire. Il existe plusieurs modes d'ionisation en spectrométrie de masse dont l'ionisation par impact électronique (IE) pour les molécules thermostables notamment les flavonoïdes aglycones. Pour les molécules thermo instables comme les glycosides des techniques d'ionisation douces sont utilisées dont l'électrospray ou ionisation par électronébulisation (ESI) et la Fast Atom Bombardment (FAB). Dans ces techniques en mode positif, l'ion moléculaire n'est pas toujours observable. On observe généralement, un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$. D'autres ions adduits peuvent se former comme $[M+Na]^+$ par addition de chlorure de sodium (NaCl). Ces informations permettent de déduire le poids moléculaire du composé étudié.

CHAPITRE III

L'étude phytochimique de *Centaurea parviflora*

III - PARTIE EXPERIMENTALE :

III-1- ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *CENTAUREA PARVIFLORA* :

III-1-1- place dans la systématique :

Embranchement	→	Angiospermes
Classe	→	<i>Dicotylédones</i>
	→	
Ordre	→	Astérales
Famille	→	Compositae
Sous-famille	→	Tubiflores
Tribus	→	Cynarées
Genre	→	<i>Centaurea</i>
Espèce		<i>parviflora</i>

III-1-2- Description de l'espèce *C. parviflora* :

Appendice des bractées sans partie scarieuse blanchâtre ou à partie scarieuse peu marquée ; 8-12 laciniures latérales. Plantes suffrutescentes à la base, de 40-60cm, très rameuses. Formant des buissons serrés intriqués.

Feuilles supérieures non décurrentes sur la tige. Petites capitules de 5mm de large sur 15mm de long, solitaires. Appendices à épine médiane fortement récurvée.

Fleurs supérieures, akènes pubescents, ventrus, noirs, à 4 stries marquées, aigrette également le 1/3 de l'akène (Figure 5).

Assez rare: en sol algérois, Oran et Tlemcen, Constantine, Hauts plateaux, elle existe en Algérie et en Tunisie [36,37]

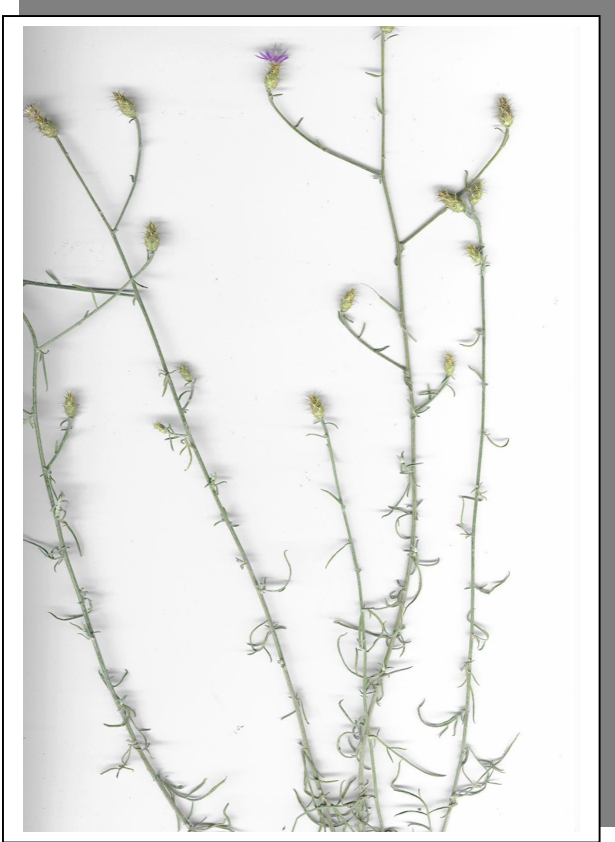
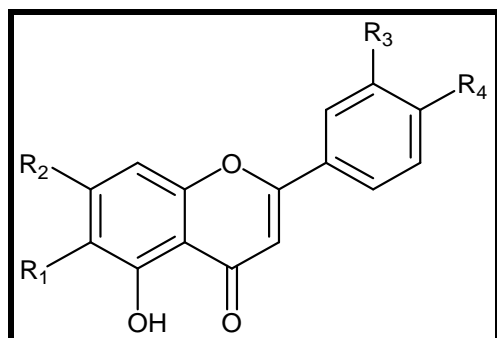


Figure 5 :
Centaurea parviflora

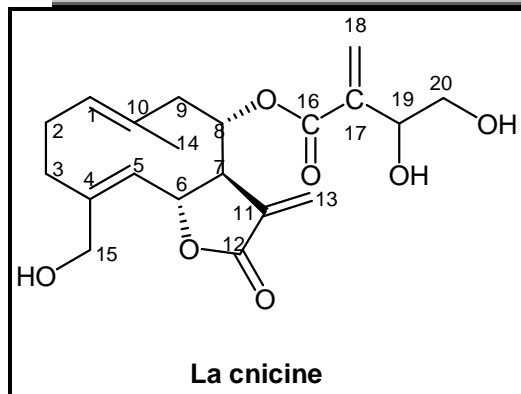
III-3-Travaux antérieurs :

Les seuls travaux effectués sur *Centaurea parviflora* l'ont été au sein de notre laboratoire. Ces travaux ont mené à l'isolement et la détermination de 7 flavonoïdes de types flavone, rassemblées dans le tableau 7 [28-35], d'une lactone sesquiterpénique, la cnicine et détecté la présence d'autres lactones sesquiterpéniques [36,37].



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	COMPOSÉS
OMe	OMe	OH	OMe	5-3'-dihydroxy-6, 7, 4'-trimethoxyflavone. Eupatorine [28].
OMe	OH	OMe	OMe	5,7-dihydroxy-6, 3',4'-trimethoxyflavone. Eupatiline [29].
OMe	OMe	OMe	OH	5,4'-dihydroxy-6, 7, 3'-trimethoxyflavone. Cirsilineol [30].
OMe	OH	OMe	OH	5, 7, 4'-trihydroxy-6, 3'-dimethoxyflavone. Jacéosidine [31].
OMe	OMe	OMe	OMe	5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tétramethoxyflavone [33].
H	OMe	H	OH	5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone. Genkwanine [34].
H	OH	H	OH	7,4'-dihydroxy-5-méthoxyflavone [35].

Tableau 7 : Flavonoïdes isolés de *Centaurea parviflora*



III-3-Travaux personnels:

III-3-1- Extraction de *Centaurea Parviflora* :

La plante a été récoltée au mois de juin de l'année 2000, de la région d'Oum el Bouaghi, après séchage dans un endroit sec et aéré à l'abri des rayons solaires, les feuilles broyées sont pesées (m=1815 g) et mises à macérer dans un mélange de (EtOH/H₂O) dans les proportions 70 :30.

Après filtration, concentration à une température n'excédant pas 35°C, cet extrait contenant toujours de l'EtOH, on ajoute H₂O distillée à raison de 400ml pour 1kg de matière sèche. L'élimination de la chlorophylle se fait par précipitation par le tétra acétate de plomb (CH₃COO)₄Pb. Après quelques heures d'agitation la solution devenue rouge-brune, est filtrée. Le filtrat est épuisé 3 fois par du chloroforme. La phase organique séchée par (NaSO₄ anhydre), filtrée et concentrée à sec à une température n'excédant pas 35°C, donnant un extrait chloroforme de 16g. La phase aqueuse est reprise et épuisée successivement avec l'acétate d'éthyle, puis trois fois au *n*-butanol. Les trois phases *n*-butanol sont rassemblées, séchées au sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄) filtrées et concentrées à sec pour donner un extrait de 28,2 g. La phase acétate également séchée filtrée et concentrée à sec, donne un extrait 6,46g.

Les fleurs d'un poids de 582,5 g subissent les étapes d'extraction au chloroforme et au *n*-butanol pour donner les extraits:

- chloroforme (9,03 g).
- *n*-butanol (17,31 g).

Ce protocole d'extraction est résumé dans la Figure 6.

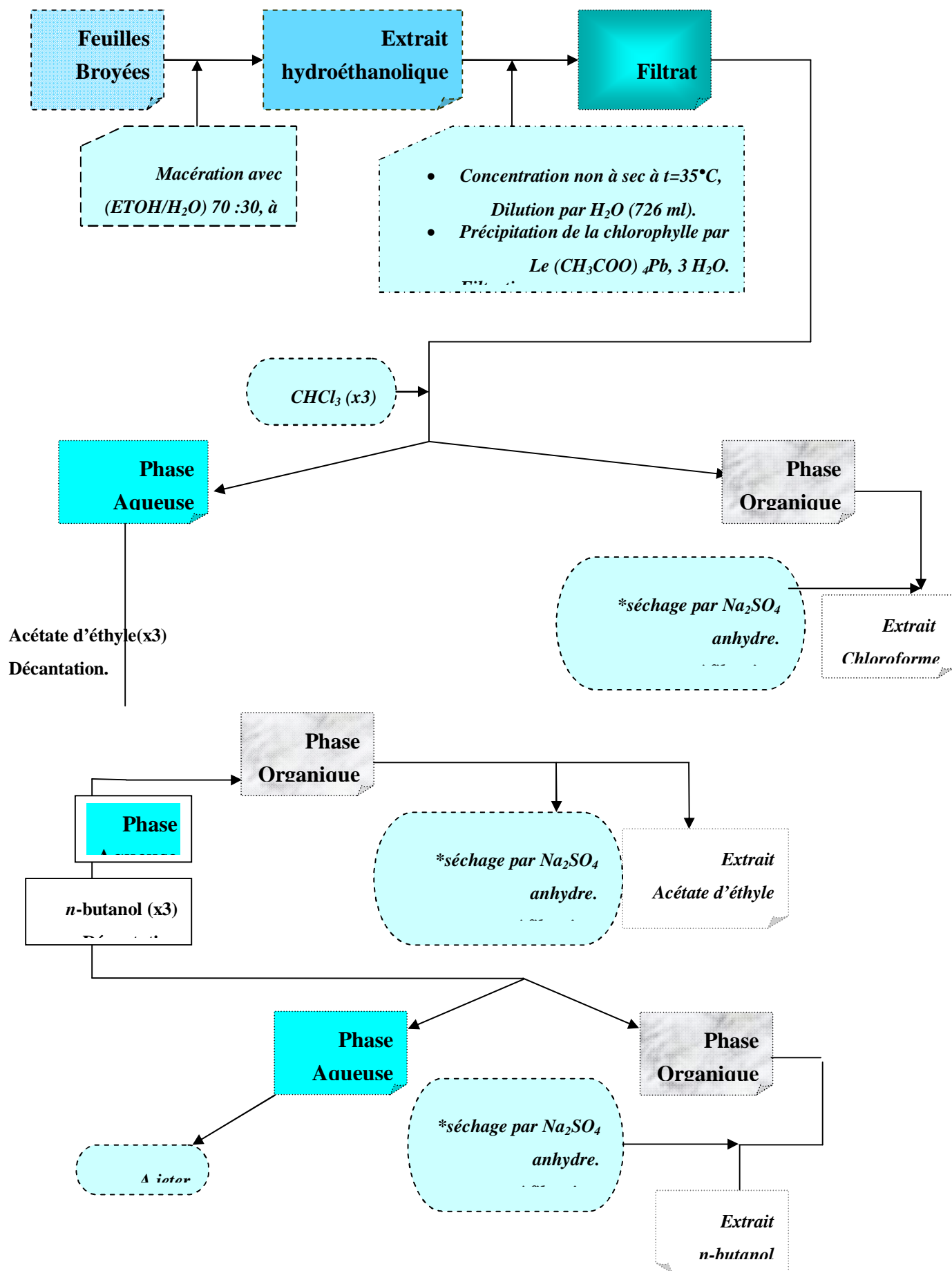


Figure 6 : Récapitulatif du protocole d'extraction des feuilles de *C. parviflora*

III-4- Les méthodes de Séparation chromatographique

III-4-1- Sur papier Wattman:

L'extrait *n*-butanol des feuilles a été soumis à une investigation chromatographique à deux dimensions sur papier Wattman n° 3 en utilisant pour la première dimension le système Butanol /Acide acétique /Eau (B A W) phase organique dans les proportions 4:1:5 et pour la deuxième dimension le système Acide acétique 15%.

Exposées à lumière UV ($\lambda = 365$ nm), cet extrait montre une carte présentant une composante riche en composés phénoliques notamment hétérosidiques (Figure 7-1).

L'extrait *n*-butanol des fleurs a été soumis à deux investigations chromatographiques monodimensionnelles sur papier Wattman n° 3. La première utilisant le système : *n*-butanol/acide acétique/eau (B. A. W.), phase organique dans les proportions 4:1:5 (Figure 7-2) et la seconde utilisant le système : acide acétique 15% (Figure 7-3). Les deux chromatogrammes obtenus montrent une richesse en composés phénoliques similaire à celle de l'extrait *n*-butanol des feuilles.

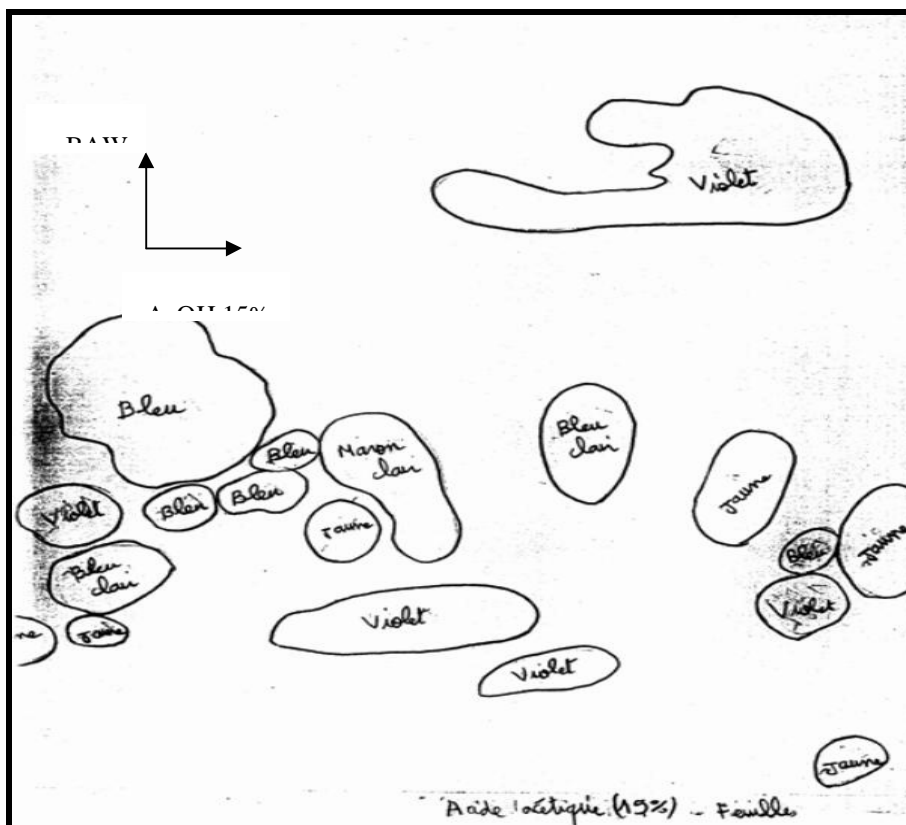


Figure 7-1 : Carte phénolique sur papier Wattman n° 3 de l'extrait *n*-butanol des feuilles

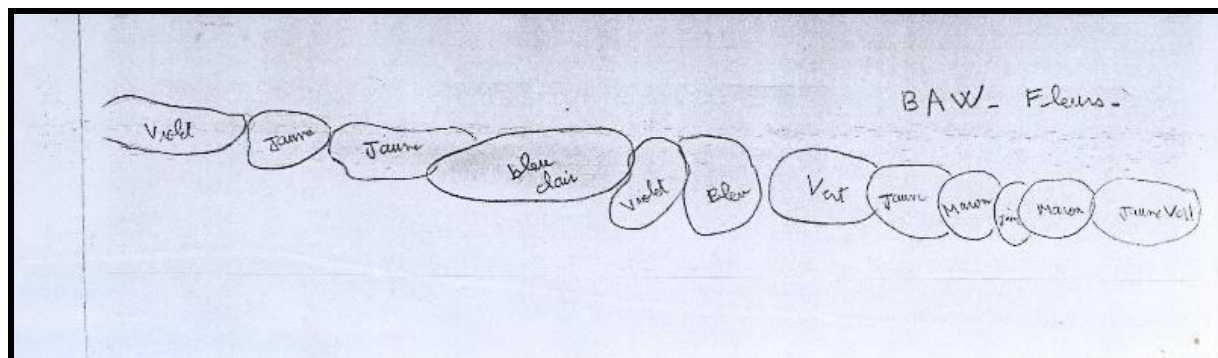


Figure 7-2 : Chromatogramme sur papier Wattman n° 3 dans le système (B. A. W) de l'extrait *n*-butanol des fleurs

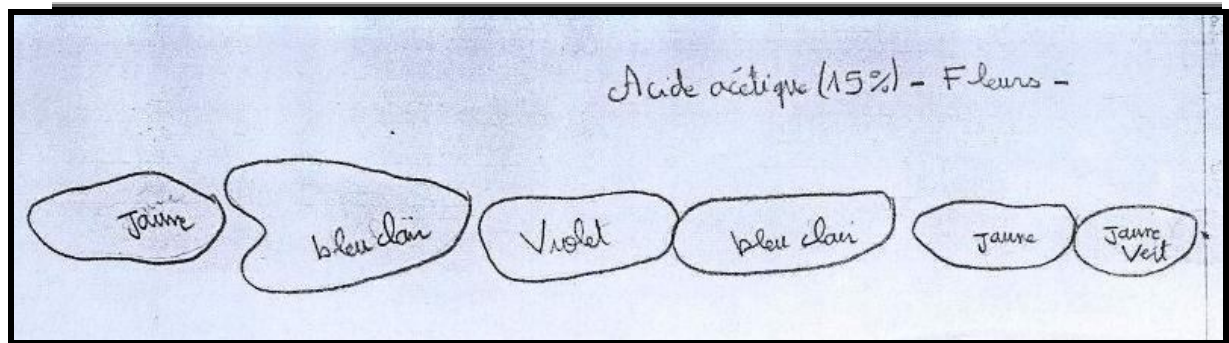


Figure 7-3 : Chromatogramme sur papier Wattman n° 3 dans le système acide acétique 15% de l'extrait *n*-butanol des fleurs

III-4-2- Séparation par chromatographie sur colonne :

Plusieurs systèmes de solvants ont été essayés sur l'extrait brut des phases *n*-butanol en utilisant des plaques analytiques recouvertes de gel de silice 60 F254. La meilleure séparation a été obtenue avec le système: CHCl_3 / MeOH / H_2O dans les proportions 6,5 / 4,5 / 1,2 (Figure 7-4). Cette analyse confirme la similitude de ces deux extraits *n*-butanol des feuilles et des fleurs et confirme également leur richesse en composés phénoliques en montrant sous lumière de Wood des spots de couleur jaunes, bleus et noir-violet (Figure 7-4).



Figure 7-4 : Chromatogramme de comparaison des extraits *n*-butanol des feuilles et des fleurs dans le système CHCl_3 / MeOH / H_2O (6,5 / 4,5 / 1,2) obtenu après révélation

Sur la base des résultats de ces tests, nous avons opté pour l'étude de la composante chimique

de l'extrait *n*-butanol des feuilles d'où 23g ont été déposés sur une colonne de gel de silice 60 préparée dans le chloroforme. L'élution a été faite par du chloroforme avec un gradient de méthanol, introduction d'eau vers la fin de l'élution et un fractionnement tous les 25ml.

Le suivi de la composition des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV visible (254 et 365 nm), puis révélées par une solution d'acide sulfurique ($\text{H}_2\text{O} / \text{ACO}_2\text{H} / \text{H}_2\text{SO}_4$: 8/1/1) et chauffées à 100 °C pendant 3min. Les pots de même composition sont rassemblés, donnant ainsi 31 fractions. Le tableau 8 rassemble les résultats de cette colonne.

Pots	Fractions	Eluant	Observations
1-48	F1	CHCl ₃ 100%	Graisses
49-75	F2	CHCl ₃ /MeOH 98 / 2	Graisses
76-93	F3		1 tache majoritaire
94-96	F4		Mélange complexe
97-100	F5	CHCl ₃ /MeOH 95 / 5	1 tache majoritaire
101-110	F6		1 tache majoritaire
111-141	F7	CHCl ₃ /MeOH 93 / 7	2 taches séparées
142-147	F8		2 taches majoritaires
148-188	F9	CHCl ₃ /MeOH 92 / 8	3 taches majoritaires
189-190	F10		1 tache majoritaire
191-196	F11		Mélange complexe
197-232	F12		Produit pur
233-244	F13	CHCl ₃ /MeOH 90 / 10	3 taches majoritaires.
245-276	F14	CHCl ₃ /MeOH 88 / 12	3 taches majoritaires
277-296	F15		5 taches majoritaires
297-324	F16	CHCl ₃ /MeOH 85 / 15	Mélange complexe
325-375	F17		
376-383	F18	CHCl ₃ /MeOH 80 / 20	3 taches majoritaires
384-398	F19	CHCl ₃ /MeOH 75 / 25	3 taches majoritaires
399-423	F20		
424-438	F21		
439-449	F22		

Tableau 8 : Les résultats de la colonne

Pots	Fractions	Eluant	Observations
450-476	F23	CHCl ₃ /MeOH 70 / 30	3 taches majoritaires
477-504	F24		
505-517	F25		Mélange complexe
518-546	F26		Mélange complexe
547-594	F27	CHCl ₃ /MeOH 70 / 30	Mélange complexe
595-642	F28	CHCl ₃ /MeOH 65 / 35	2 taches majoritaires
643-662	F29	CHCl ₃ /MeOH 60 / 40	Des traces de produits
663-702	F30	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 60 / 40 / 10	2 taches majoritaires
703-776	F31		Des traces

Tableau 8 : Les résultats de la colonne (suite)

III-4-3- Séparation chromatographique sur plaques préparatives :

-Les fractions F6 et F12

Les tests préliminaires des fractions issues directement de la colonne de gel de silice 60, ont montré que ces fractions montraient un spot unique après dépôt et élution sur plaque analytique de gel de silice 60. Ainsi après purification sur colonnes de gel de Sephadex LH 20 éluées par du méthanol, les produits F6 (8 ,4mg) et F12 (30,9mg) ont été obtenus de ces deux fractions.

-Les fractions F14 et F15

Ces deux fractions ont été soumises à des séparations par chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice 60 éluées par le système Ether de pétrole/AcOEt/MeOH dans les proportions 2 : 7 :1. Après purifications sur gel de Sephadex LH20, ces deux fractions ont mené à: F14-1, lequel après une autre purification sur gel de Sephadex LH20 a donné le

composé F03 (57,8mg) ; F14-2 (23,2mg) et F14-3 (52,2mg) pour F14 et F15-1 (31,4mg) ; F15-2 (29,7mg) ; F15-3 (22,1mg) et F15-4 (3,8mg). Soit trois produits pour F14 et 4 produits pour F15.

-Les fractions F18 à F22 :

Etant donnée la similitude des profils chromatographiques de ces cinq fractions sur plaque analytique de gel de silice 60 (3 taches), nous avons procédé à une analyse sur une plaque de polyamide éluée par le système H₂O / EtOH / Méthyléthylcétone / Acétylacétone dans les proportions 13 / 3 / 3 / 1. Cette étude a également donné des profils très similaires, ce qui nous permis de les rassembler et de les chromatographier sur plaques préparatives de gel de silice éluées par le système Ether de pétrole / AcOEt / MeOH dans les proportions 2: 7: 1. Les trois produits ainsi obtenus ont subi une purification sur colonne de gel de Sephadex LH20 pour donner les trois composés: F20-1 (10,2mg); F20-1' (3,4mg) et F20-2 (22,6mg).

Conclusion :

Ainsi la mise à profit des techniques chromatographiques sur les fractions les moins complexes issues de la colonne de gel de silice 60, de la phase *n*-butanol de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de *Centaurea parviflora* Desf. a mené à la séparation et la purification de 12 produits. Tous ces produits ont été co-chromatographiés sur plaque analytique de gel de silice éluée par plusieurs systèmes. Cette analyse ainsi que les spectres enregistrés plus tard et que nous développerons au cours du 4^{ème} chapitre, ont montré que certains produits étaient les mêmes, notamment F14-3 ≡ F15-3 et F15-1 ≡ F03. Ce travail de co-chromatographie a mené à ce stade de nos séparations, à l'isolement et la purification à l'état natif de 10 composés (Figure 8).

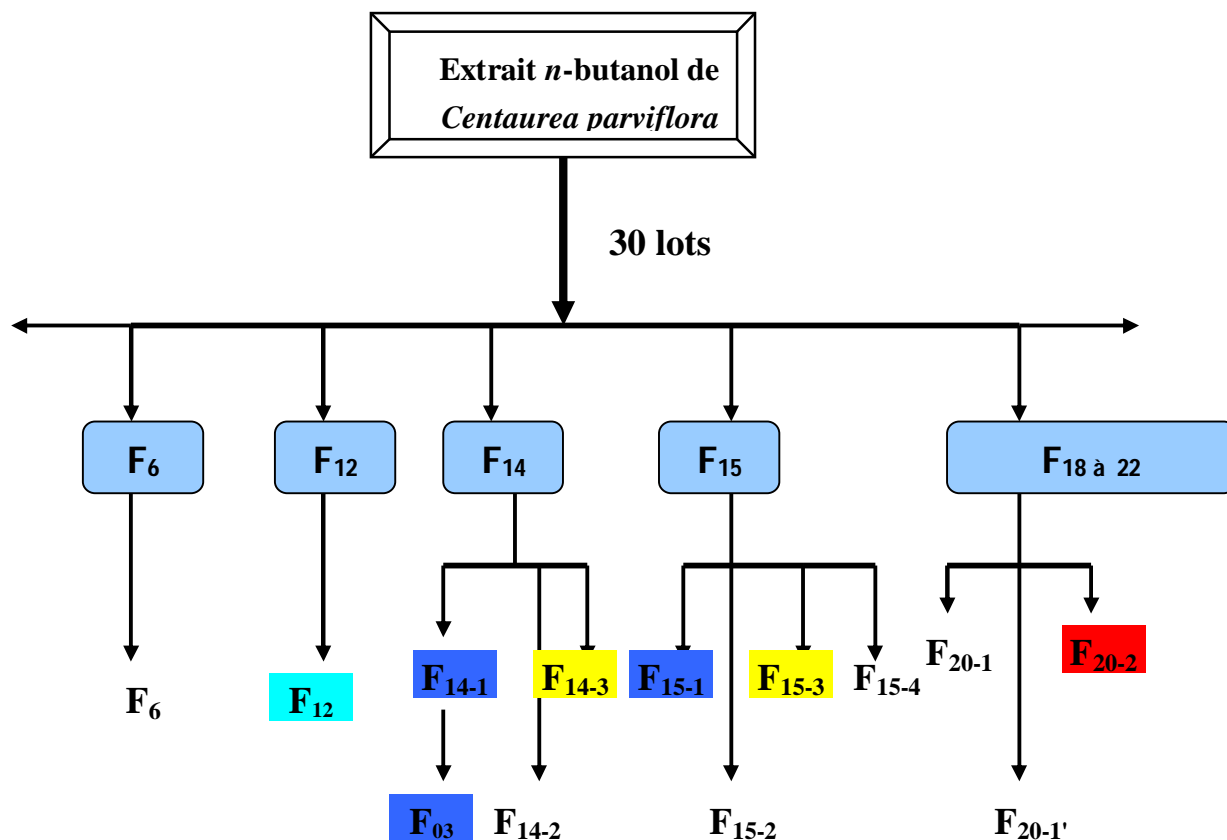


Figure 8 : Résumé des travaux chromatographiques effectués

A ce stade de nos travaux, nous n'avons soumis à l'analyse structurale que quatre composés. Il s'agit de : F₁₂, F₁₄₋₃, F₂₀₋₂ et F₀₃ (Chapitre 4). Les structures des autres produits, actuellement en cours d'établissement feront l'objet de résultats à part.

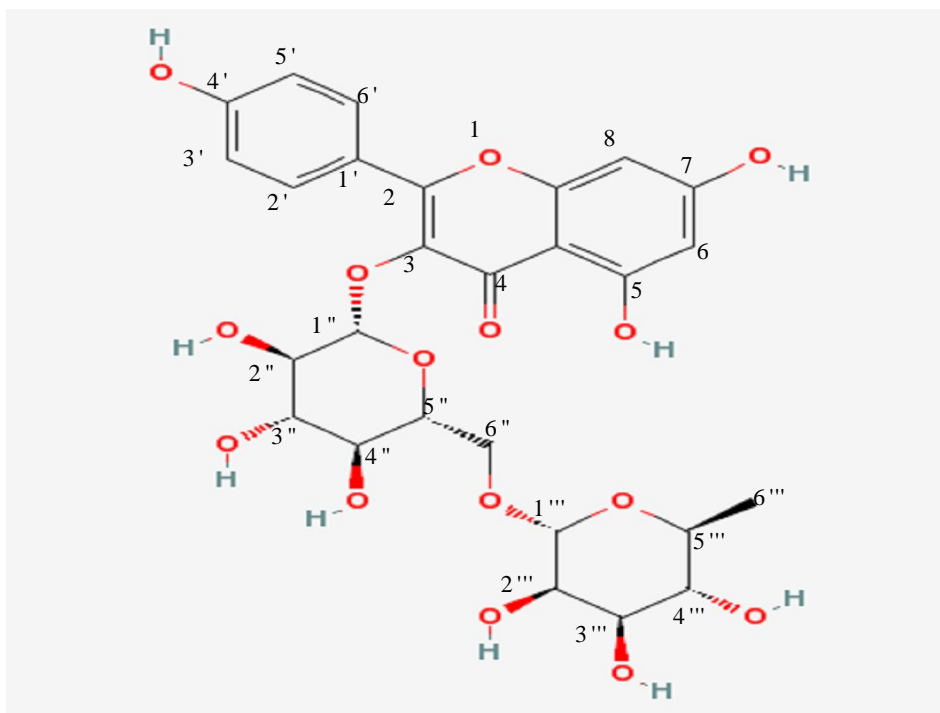
CHAPITRE IV

Résultats et discussion

RESULTATS ET DISCUSSIONS

IDENTIFICATIONS STRUCTURALES DES COMPOSES ISOLES

IV-1- Identification du composé F₂₀₋₂ :



a) Fluorescence sous lumière de Wood :

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

b) Résultats de l'analyse par spectrophotométrie UV-Vis :

Enregistré dans le méthanol, le spectre de ce composé (spectre 1) montre les deux bandes caractéristiques des flavonoïdes. La bande II à $\lambda_{\max} = 267$ nm et la bande I à $\lambda_{\max} = 351$ nm. La valeur de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I confirme la nature flavone ou flavonol 3-OR de cette molécule.

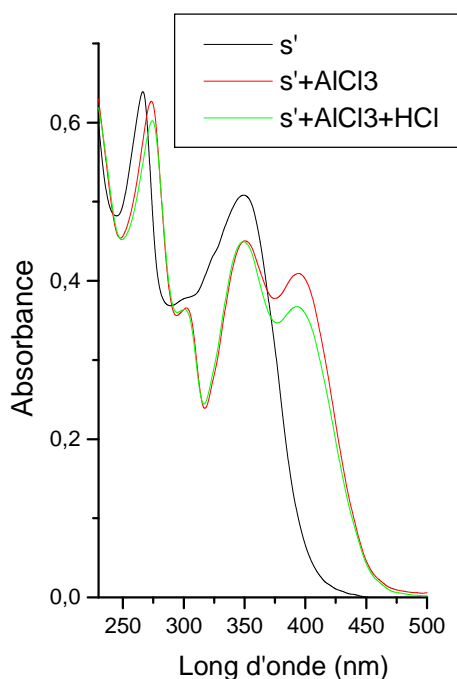
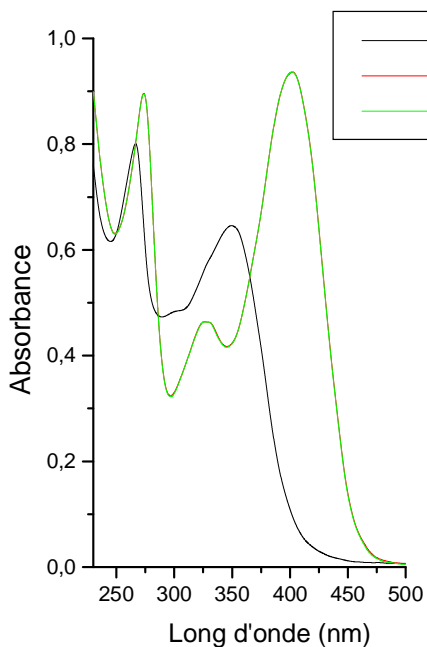
L'addition du réactif NaOH (spectre 2-1), conduit à un déplacement bathochrome (+53nm) de la bande I avec un effet hyperchrome (augmentation de l'intensité), indiquant que la position

4' est occupée par un OH libre, de plus l'apparition d'une nouvelle bande à $\lambda_{\max} = 327$ nm oriente vers la présence d'un OH libre en position 7. Le spectre réenregistré après 5 minutes (spectre 2-2) reste stable, ce qui indique vu la présence du OH en position 4', que la position 3 comporte soit un H, soit un OR.

La comparaison des spectres enregistrés dans le méthanol en présence de AlCl_3 (spectre 3) et en présence de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ (spectre 4), ne montre aucun changement notable (pas de déplacement hypsochrome de la bande I) ce qui suppose l'absence de système ortho dihydroxyle sur le noyau B.

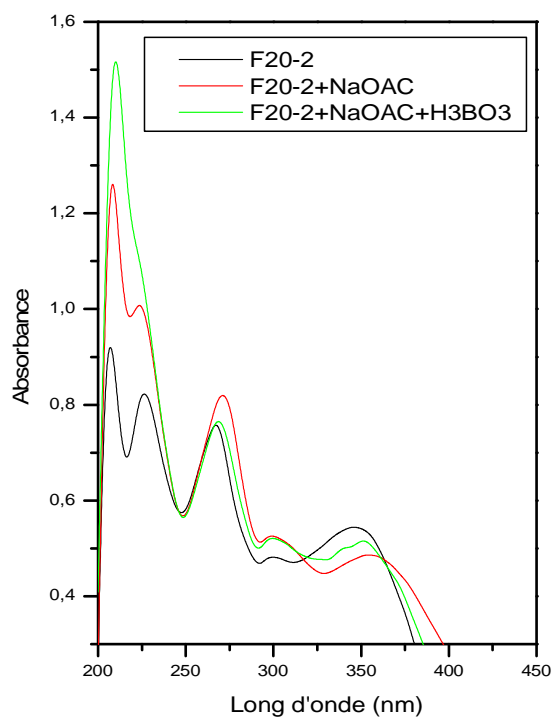
Comparé au spectre enregistré dans le méthanol, le spectre enregistré en présence de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ montre un déplacement bathochrome de +45 nm de la bande I. Cette observation oriente vers un OH libre en position 5.

Le spectre enregistré dans le méthanol en présence de NaOAc (spectre 5) montre un déplacement bathochrome de +13 nm de la bande II confirmant ainsi la présence du OH libre en position 7.



Spectres 1, 2-1 et 2-2 : Spectres d'absorption ultraviolette du composé F_{20-2} dans le MeOH et en présence de NaOH

Spectres 3 et 4 : Spectres d'absorption ultraviolette du composé F_{20-2} dans le MeOH et en présence de AlCl_3 et $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$



Spectre 5: Spectres d'absorption ultraviolette
du composé F₂₀₋₂ dans le MeOH et
en présence de NaOAc

Les résultats de la série spectrale UV-Vis du composé F₂₀₋₂ rassemblés dans le tableau 9 permettent à ce stade de proposer la structure partielle reportée dans la figure 9.

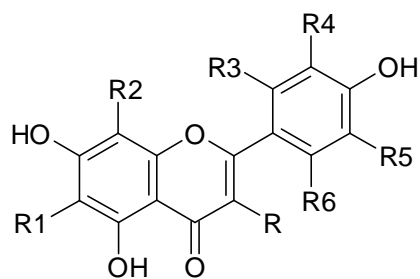


Figure 9: Structure partielle du composé F₂₀₋₂

réactifs	bande I (nm)	bande II (nm)	autres bandes	observations
MeOH	351	267		Flavone ou flavonol 3-OR
NaOH	402	274	327	4'-OH, 7-OH
NaOH après 5 mn	402	274	327	Pas de OH en C-3
NaOAc	360	272	299	7-OH
NaOAc+H ₃ BO ₃	350	271	299	Absence de système ortho di-OH.
AlCl ₃	350	273	397	5-OH
AlCl ₃ +HCl	350	273	327	Absence de système ortho di-OH

Tableau 9 : Données de la série spectrale UV (λ_{\max} nm) du composé F₂₀₋₂

L'examen du spectre de RMN ¹H (Spectre 6) enregistré dans le MeOH-d₄, montre la présence de:

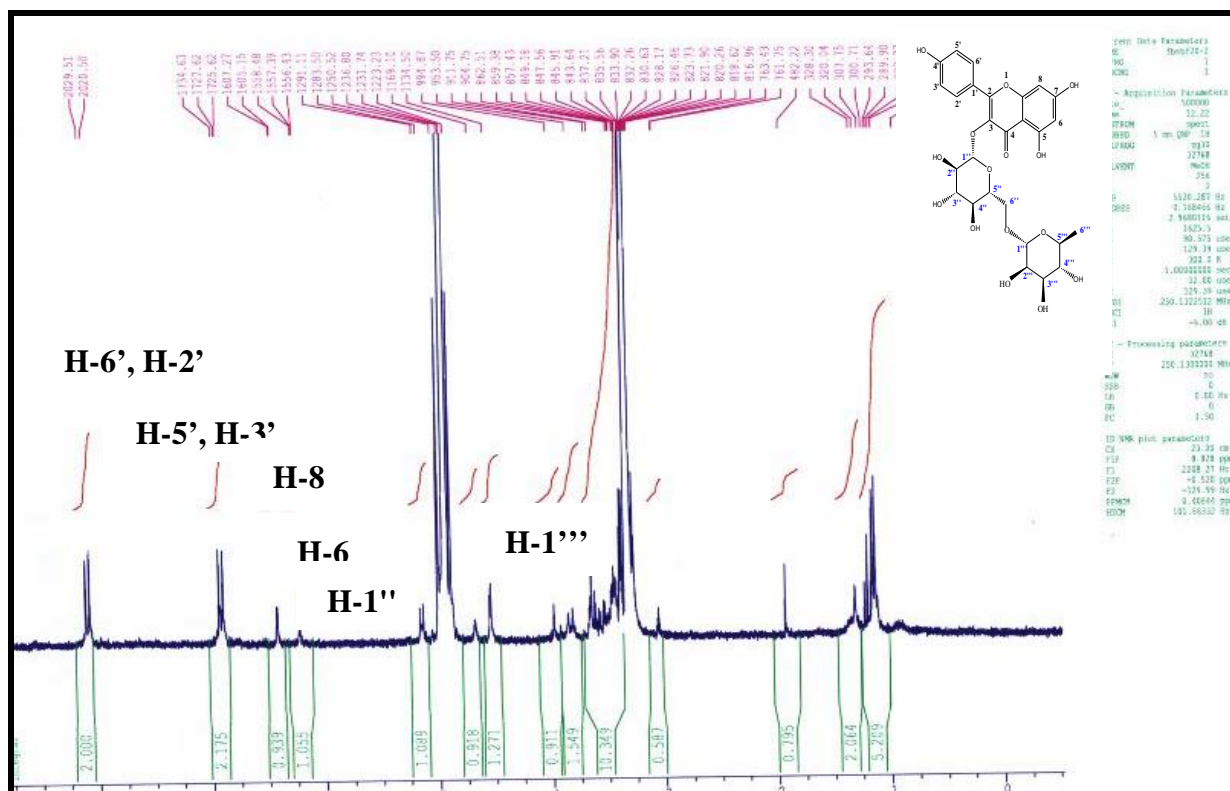
-Deux doublets d'intégration 2H chacun, formant un système AM à $\delta = 8,15$ et $\delta = 6,85$ ppm, $J = 9,0$ Hz caractéristiques des protons H-6', H-2' et H-5', H-3' respectivement, du noyau B parasubstitué d'un flavonoïde.

-Deux doublets formant un système AB à $\delta = 6,41$ et $\delta = 6,22$ ppm, $J = 2,0$ Hz caractéristiques des protons H-8 et H-6 respectivement, du noyau A d'un flavonoïde.

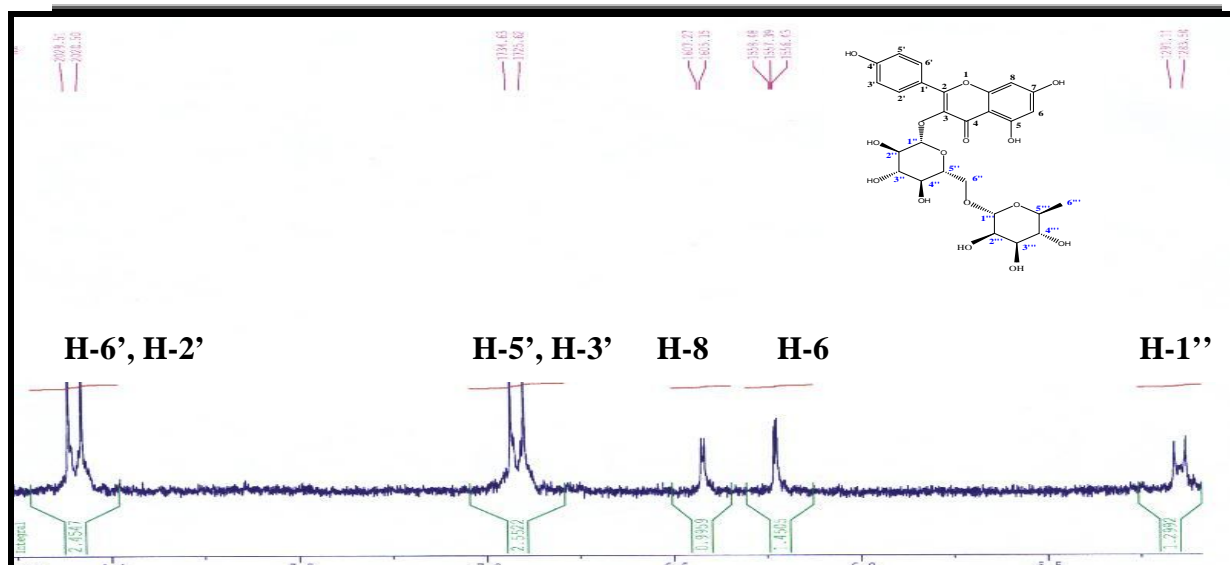
-Un doublet à $\delta = 5,25$ ppm, $J = 7,5$ Hz, attribuable au proton anomérique d'un sucre relié à l'aglycone par un pont oxygène vu la valeur de son déplacement chimique. La valeur de la constante de couplage de ce proton anomérique en faveur d'une interaction 1-2 diaxiale entre ce proton anomérique et le proton en C-2 du sucre, indique que le carbone anomérique de cette entité sucre admet une configuration β et exclut la possibilité que cette entité soit un mannose ou un rhamnose.

-Un doublet à $\delta = 4,52$ ppm ($J = 1,7$ Hz) et un doublet à $\delta = 1,10$ ppm ($J = 6,2$ Hz) caractéristiques du proton anomérique et du CH₃-6 d'un groupement rhamnosyle de configuration α .

-Un ensemble de multiplets dans l'intervalle 3,1 – 3,8 attribuables par conséquent, aux autres protons des deux glycosyles.



Spectre 6 : RMN ¹H (MeOH-d₄, 250 MHz) du composé F₂₀₋₂



Spectre 6-1 : RMN ^1H (MeOH- d_4 , 250 MHz) du composé F₂₀₋₂, étalement

L'ensemble de ces données reporté dans le tableau 10, montre que dans la structure partielle précédemment signalée figure 9 : $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$ et que R est soit un groupement rhamnoglucosyle soit un groupement rhamnogalactosyle.

Attributions des protons	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage (Hz)	Déplacement chimique (ppm)
H-6', H-2'	H	doublet	9,0	8,15
H-5', H-3'	H	doublet	9,0	6,85
H-1'' glucose	H	doublet	7,5	5,25
H-1''' rhamnose	H	doublet	1,7	4,52
H-6	H	doublet	2	6,22
H-8	H	doublet	2	6,41
CH ₃ -6	3H	doublet	6,2	1,10

Tableau 10 : Données du spectre de RMN ^1H (MeOH- d_4 , 250 MHz) du composé F₂₀₋₂

Pour trouver la nature exacte du 2^{ème} sucre et confirmer la position en C-3 du groupement

dioside, nous avons procédé à l'hydrolyse acide de ce composé. En effet, après chauffage de l'échantillon à 100°C en présence de HCl, la solution refroidie est extraite par de l'acétate d'éthyle. Après séchage au sulfate de Sodium anhydre et filtration, la phase organique concentrée et déposée sur une plaque recouverte de polyamide, montre une fluorescence jaune sous lumière de Wood. Cette observation oriente vers une structure de type flavonol de l'aglycone et par conséquent confirme la position du groupement dioside en C-3.

La phase aqueuse est également concentrée sous vide et co-chromatographiée sur une plaque de gel de terre siliceuse Merck F₂₅₄ éluée par le système acétone-eau (9 :1) avec des sucres de référence. Après révélation et chauffage, cette plaque, représentée sur la figure 10, montre clairement la présence du glucose et du rhamnose.

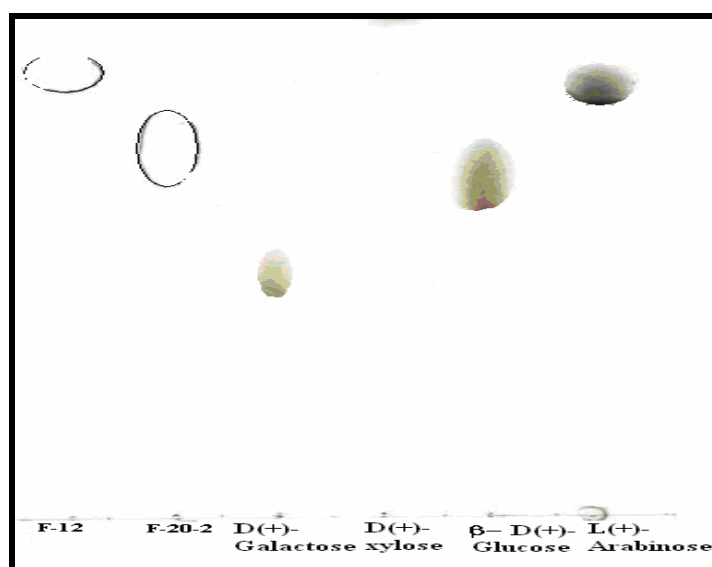


Figure 10 : Co-chromatographie de la phase aqueuse avec des échantillons de référence après hydrolyse acide du composé F₂₀₋₂

Le fait que les deux sucres se soient détachés de l'aglycone et se soient séparés confirme que l'aglycone est relié au substituant sucre par un pont oxygène d'une part et qu'ils sont reliés entre eux également par le biais d'un atome d'oxygène.

La jonction entre le glucose et le rhamnose est en faveur du type 1(rhamnose)→ 6(glucose) suite aux valeurs des déplacements chimiques des deux protons anomériques [38]. Cette observation mène à un groupement rutinosyle.

Toutes ces observations mènent à la structure du 3-rutinosylkaempférol connue sous le nom de nicotiflorine, reportée dans la figure 11. Cette molécule a été isolée d'espèces des genres *Nicotiana*, *Physalis* et *Leucophysalis* (Solonaceae) ; *Cassia* (Leguminosae) ; *Desmanthodium*, *Clibadium*, *Carthamus* et *Montana* (Compositae) ; *Pitcairnia* (Bromiliaceae) et de *Calystegia japonica* (Convovulaceae), *Leptarrhena pyrolifolia* (Saxifragaceae), *Limnanthes douglasii* (Limnanthaceae), *Fumaria parviflora* (Papaveraceae), *Cistus ladadifer* (Cistaceae), *Abies amabilis* (Pinaceae), *Equisetum silvaticum* (Equisetaceae), *Adiantum capillus-veneris* (Adiantaceae), *Acalypha indica* (Euphorbiaceae) et *Paesia anfractuosa* (Pteridaceae) [39, 40] mais, à notre connaissance concernant le genre *Centaurea* (Compositae), elle n'a été isolée que de *Centaurea lippii* dans notre laboratoire.

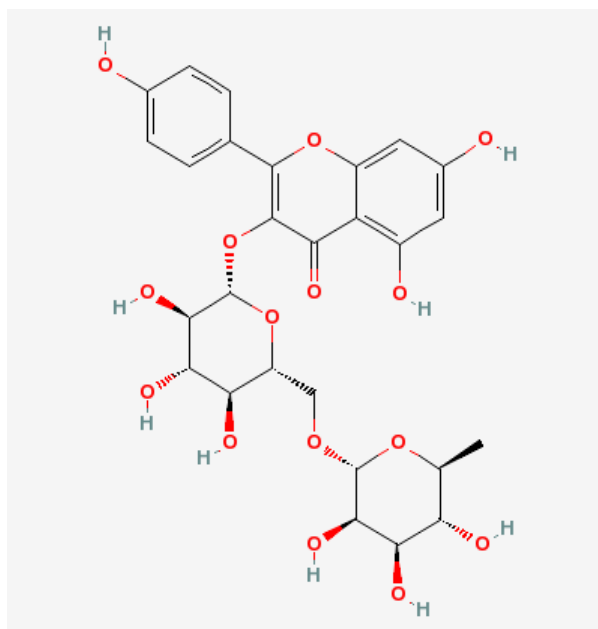
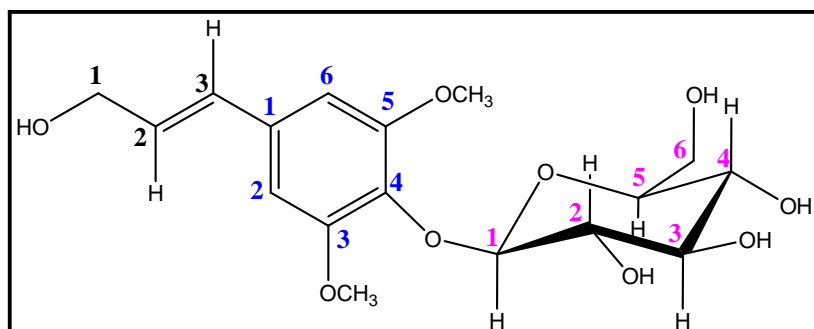


Figure 11 : Structure finale du composé F₂₀₋₂, la nicotiflorine

IV-2- Identification du composé F₁₄₋₃



2-a) Aspect chromatographique :

Déposé sur une plaque de polyamide DC-6-6, ce composé n'absorbe pas la lumière UV à $\lambda = 365$ nm mais absorbe à $\lambda = 254$ nm. De cette observation, on en déduit que F₁₄₋₃ n'est pas un flavonoïde.

2-b) Analyse structurale

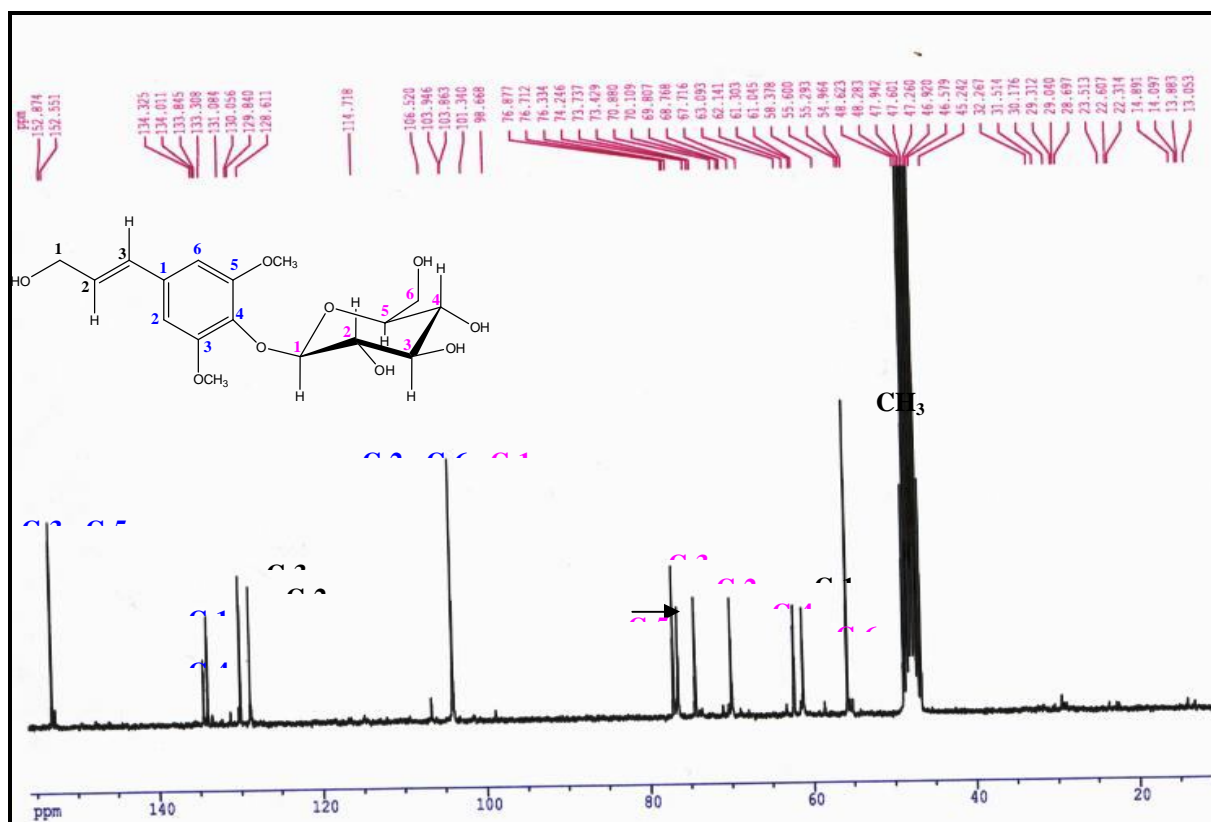
2-b-1) RMN :

Le spectre RMN ¹³C (spectre 7) enregistré dans le MeOH-d₄ dont les données sont reportées dans le tableau 11 montre la présence de signaux relatifs à un noyau aromatique, 2 CH éthyléniques et une entité sucre de type hexose où la présence d'un groupement CH₂OH exclut le rhamnose. Le spectre RMN ¹H (spectre 8) enregistré dans le MeOH-d₄ dont les données sont reportées dans le tableau 12, confirme ces données par la présence des signaux :

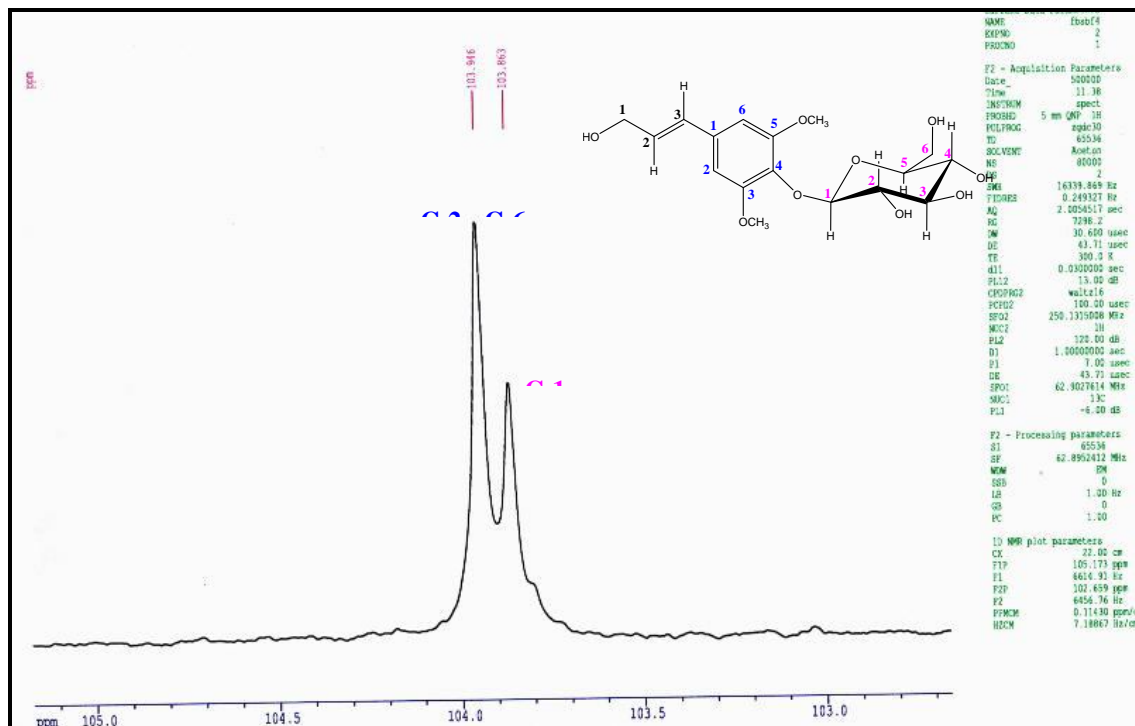
- Un singulet à $\delta=6,7$ ppm d'intégration 2H attribuable à deux protons équivalents du noyau aromatique ($\delta_C=104,0$) ce qui oriente vers une tétrasubstitution de ce cycle.
- Un doublet à $\delta=6,56$ ppm ($J = 15,5$ Hz) d'intégration 1H ($\delta_C=129,8$). Les valeurs du déplacement chimique et de la constante de couplage orientent vers la présence d'une double liaison éthylénique de configuration *trans* dans cette molécule.
- Un doublet de triplet à $\delta=6,30$ ppm ($J = 15,5 ; 5,5$ Hz) d'intégration 1H ($\delta_C=128,6$). La multiplicité de ce signal et les valeurs du déplacement chimique et des constantes de couplage confirment la présence d'une double liaison éthylénique de configuration *trans* dans cette molécule et placent un groupement CH₂ en position vicinale par rapport à ce CH éthylénique (spectre 8-1.).
- Un doublet de doublets à $\delta=4,25$ ppm ($J = 5,5 ; 1,1$ Hz). Les valeurs des constantes de couplage indiquent que ce groupement est voisin du CH éthylénique précédent. La valeur du déplacement chimique indique que ce groupement CH₂ est oxygéné ($\delta_C=62,1$) spectre (8-2).
- Un singulet à $\delta=3,87$ ppm d'intégration 6H ($\delta_C=55,6$) attribuables à deux groupements méthoxyles équivalents portés par conséquent par deux carbones du noyau aromatique ($\delta_C=152,9$), vu le nombre de carbones oxygénés de ce noyau.

-Un retour vers le spectre de RMN ^{13}C permet de localiser un signal à $\delta_c=103,9$ ppm attribuable au carbone anomérique du sucre. La valeur du déplacement chimique de ce carbone indique que ce sucre ne peut être qu'un glucopyranose ou un galactopyranose de configuration β [42] relié par une jonction oxygène à l'aglycone.

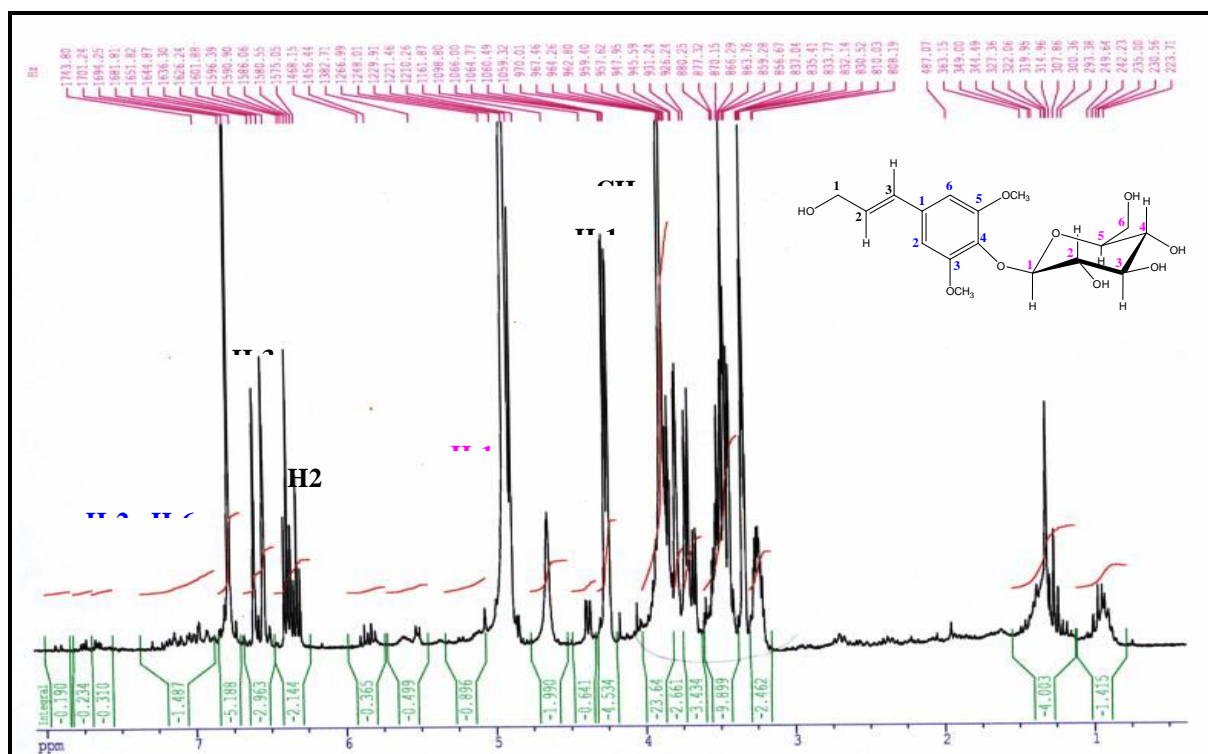
D'après l'ensemble de ces données avec en particulier la valeur déplacement chimique du $6^{\text{ème}}$ atome de carbone du noyau aromatique (134,3ppm) qui oriente vers une oxygénation à ce niveau, l'aglycone ne peut être que l'alcool synapylique.



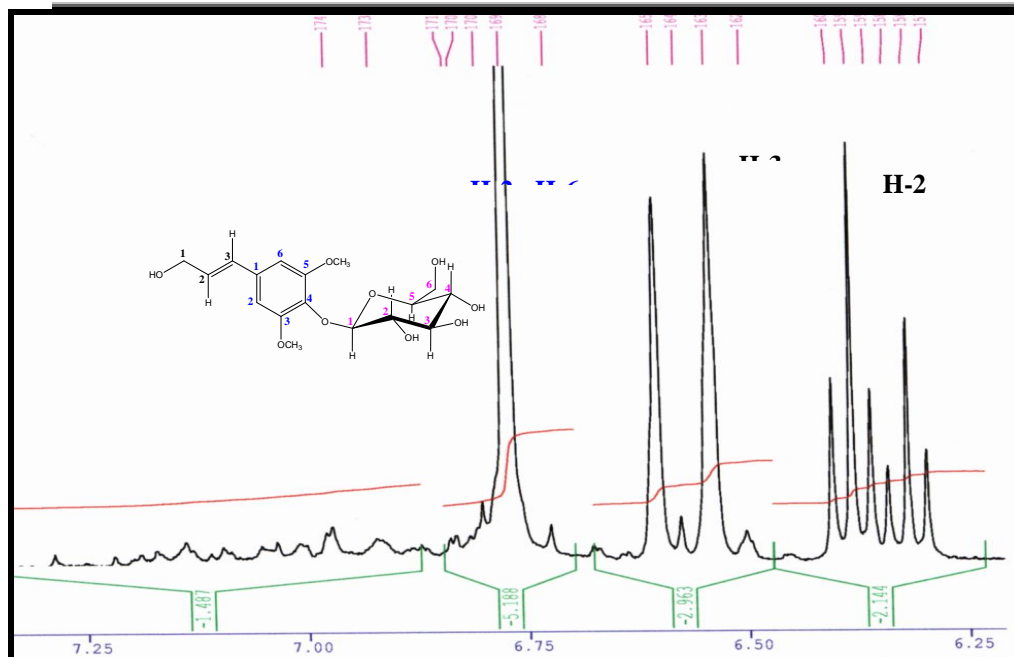
Spectre 7: RMN ^{13}C (MeOH-d_4 , 62,9 MHz) du composé F_{14-3}



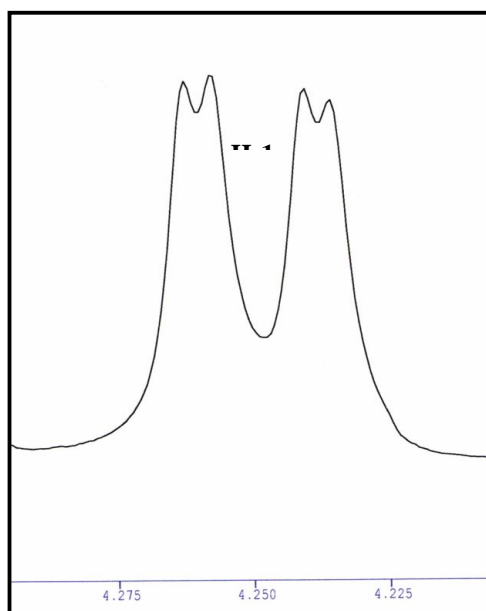
Spectre 7-1: RMN ^{13}C (MeOH- d_4 , 62,9 MHz) du composé F $_{14-3}$ étalé



Spectre 8: RMN ^1H (MeOH- d_4 , 250 MHz) du composé F $_{14-3}$



Spectre 8-1: RMN ^1H (MeOH- d_4 , 250 MHz) du composé F₁₄₋₃ étalement



Spectre 8-2: RMN ^1H (MeOH- d_4 , 250 MHz) du composé F₁₄₋₃ étalement

2-b-2) Hydrolyse acide:

Pour trouver la nature exacte du sucre, nous avons procédé à l'hydrolyse acide de ce composé.

En effet, après chauffage de l'échantillon à 100°C en présence de HCl 2N, la solution refroidie est extraite par de l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est concentrée sous vide et co-chromatographiée sur une plaque de gel de terre siliceuse F₂₅₄ éluée par le système acétone-eau (9 :1), avec des sucres de références. Après révélation et chauffage, cette plaque représentée sur la figure 12 montre clairement la présence du glucose.

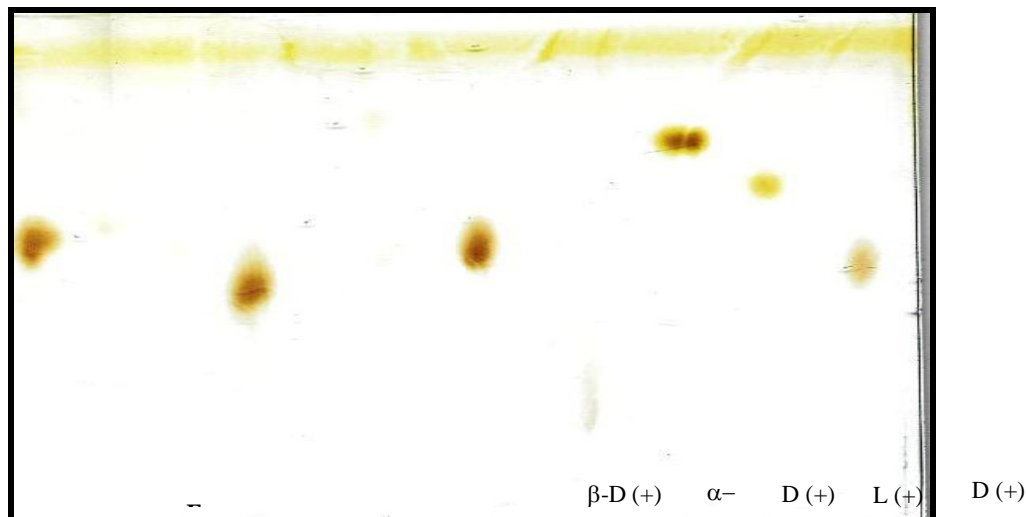


Figure 12: Co-chromatographie de la phase aqueuse avec des échantillons de référence après hydrolyse acide du composé F₁₄₋₃

Pour placer le groupement *O*-glucosyle sur l'alcool sinapylique (sur le groupement CH₂ ou sur le C-4 du noyau aromatique), nous avons fait appel aux résultats de la littérature qui montrent en effet, un déplacement chimique du carbone du groupement CH₂ à 70,7 ppm dans le cas où il porte le *O*-glucosyle. Dans le cas où le *O*-glucosyle est porté par le C-4 du noyau aromatique, le déplacement chimique du carbone du CH₂ qui, par conséquent est porteur d'un groupement hydroxyle résonne à 63,8 ppm. Dans notre cas, le déplacement chimique du carbone du CH₂ est de 62,1 ppm. Cette valeur nous rapproche beaucoup plus de la position du glucosyle en C-4 du noyau aromatique ($\delta_C=134,3$) [41]. L'ensemble des données spectroscopiques relatives à ce composé, mène à la structure représentée dans la figure 13 soit le 3-(4-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-3,5-dimethoxy)-phenyl-2 *E*-propénol. Cette molécule isolée de *Zantedeschia aethiopica* (Araceae) [41] est à notre connaissance nouvelle pour le genre *Centaurea* (Compositae).

	Déplacements chimiques δ_C (ppm)
Carbones du noyau aromatique	
C-1	133,8
C-2 & C-6	104,0
C-3 & C-5	152,9
C-4	134,3
Carbones du glucosyle	
C-1	103,9
C-2	74,2
C-3	76,9
C-4	70,1
C-5	76,7
C-6	61,0
Carbones de la chaîne	
C-3	129,8
C-2	128,6
C-1	62,1

Tableau 11 : Données du spectre de RMN ^{13}C (MeOH-d₄, 62,9 MHz) du composé F₁₄₋₃.

ATTRIBUTION DES PROTONS	INTÉGRATION	MULTIPLICITÉ	CONSTANTE DE COUPLAGE (HZ)	DÉPLACEMENT CHIMIQUE (PPM)
H-2 & H-6	2H	singulet	/	6,70
H-3	H	doublet	15,50	6,56
H-2	H	doublet de triplet	(15,50; 5,50)	6,30
H-1	2H	doublet de doublet	(5,50; 1,10)	4,25
2CH ₃	6H	singulet	/	3,87
H-1	H	Recouvert par le signal de l'eau de contamination du MeOH-d ₄	/	4,75-5,00

Tableau 12 : Données du spectre de RMN 1H (MeOH-d₄, 250 MHz) du composé F₁₄₋₃.

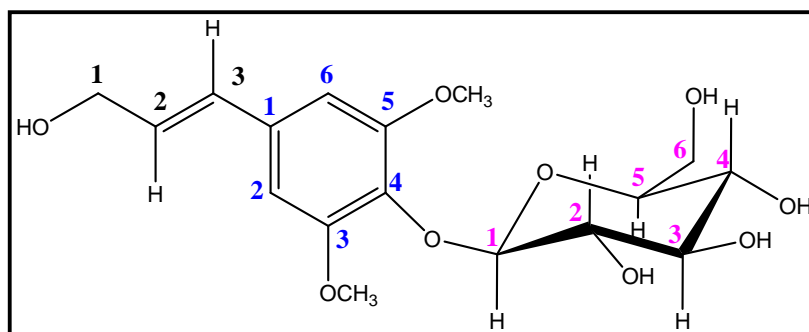
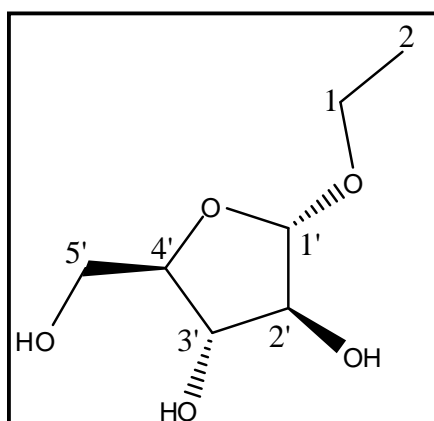


Figure 13 : Structure du composé F₁₄₋₃, 3-(4-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-3,5-diméthoxy)-phenyl-2-*E*-propenol

IV-3-Identification du composé F₁₂:



Le spectre proton (spectre 9) enregistré dans le méthanol deutérié montre un signal d'intégration 3H à $\delta = 1,23$ ppm sous forme d'un triplet ($J = 7,1$ Hz), attribuable à un méthyle voisin d'un groupement CH₂. Ce groupement CH₂ apparaît sous forme d'un doublet de quadruplets à $\delta = 3,50$ ppm ($J = 9,7 ; 7,1$ Hz) signifiant que les deux protons qu'il renferme sont diastéréotopiques et admettent fortuitement le même déplacement chimique. La valeur du déplacement chimique de ce groupement suppose son oxygénation.

-Ces données mènent à l'enchaînement CH₃-CH₂-O substituant une entité chirale.

-L'examen du spectre J_{mod} (spectre 10) confirme la présence des groupements CH₃ et CH₂

précédents à $\delta=14,0$ ppm et $\delta=61,6$ ppm respectivement et montre par ailleurs un autre groupement CH_2 oxygéné à $\delta=62,9$ ppm et 4 groupements CH à $\delta=83,7$; $82,1$; $77,2$ et $107,8$ ppm. La valeur du déplacement chimique du dernier groupement CH indique qu'il est doublement oxygéné. Cette observation additionnée à la présence des trois autres CH oxygénés, d'après la valeur de leur déplacement chimique, oriente vers la présence d'un sucre de type pentose substitué par un groupement éthyle attaché par un pont oxygène à la position anomérique.

-La comparaison des déplacements chimiques de l'ensemble des atomes de carbone du sucre avec les résultats de la bibliographie oriente vers un pentose de type furanose. L'hydrolyse acide de ce composé libère l'arabinose que nous avons identifié par co-chromatographie avec des échantillons de référence (Figure 14). La configuration du carbone anomérique a été établie α par rapport à la valeur du déplacement chimique du carbone anomérique [42]. L'ensemble de ces résultats mène à la structure représentée dans la figure 15, soit l'*O*- α -*D*-arabinofuranosyl éthane. Il est à noter qu'à notre connaissance, cette molécule n'est pas décrite dans la littérature [42, 43]. Les données spectroscopiques de ce composé sont reportées dans le tableau 13.

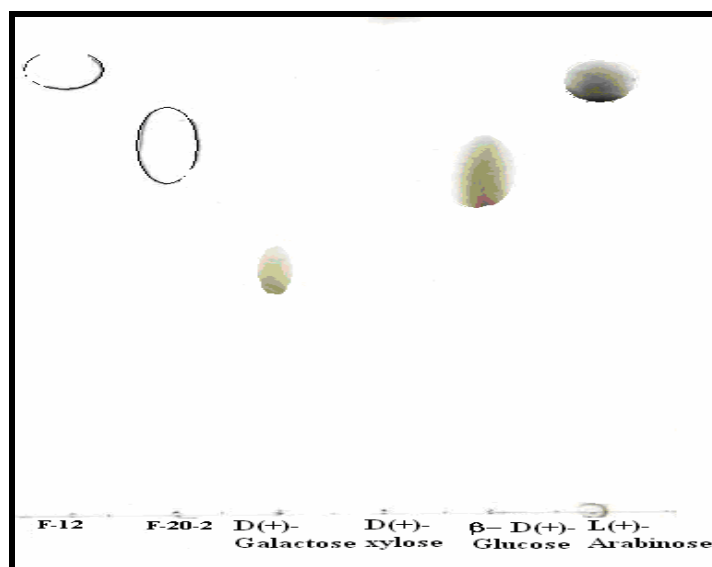
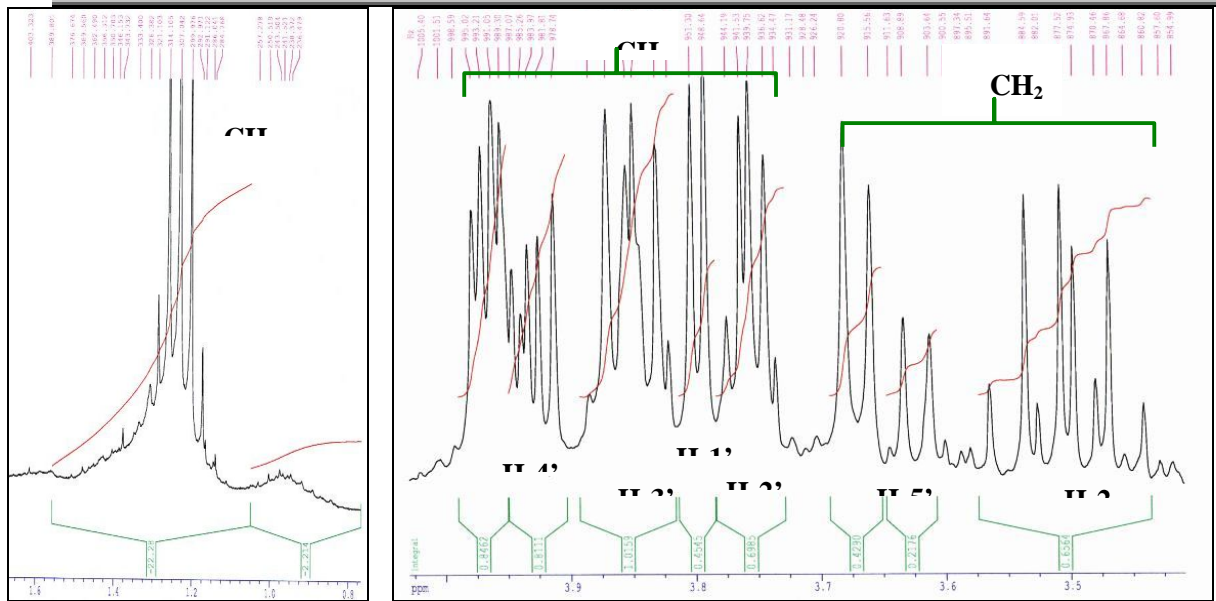
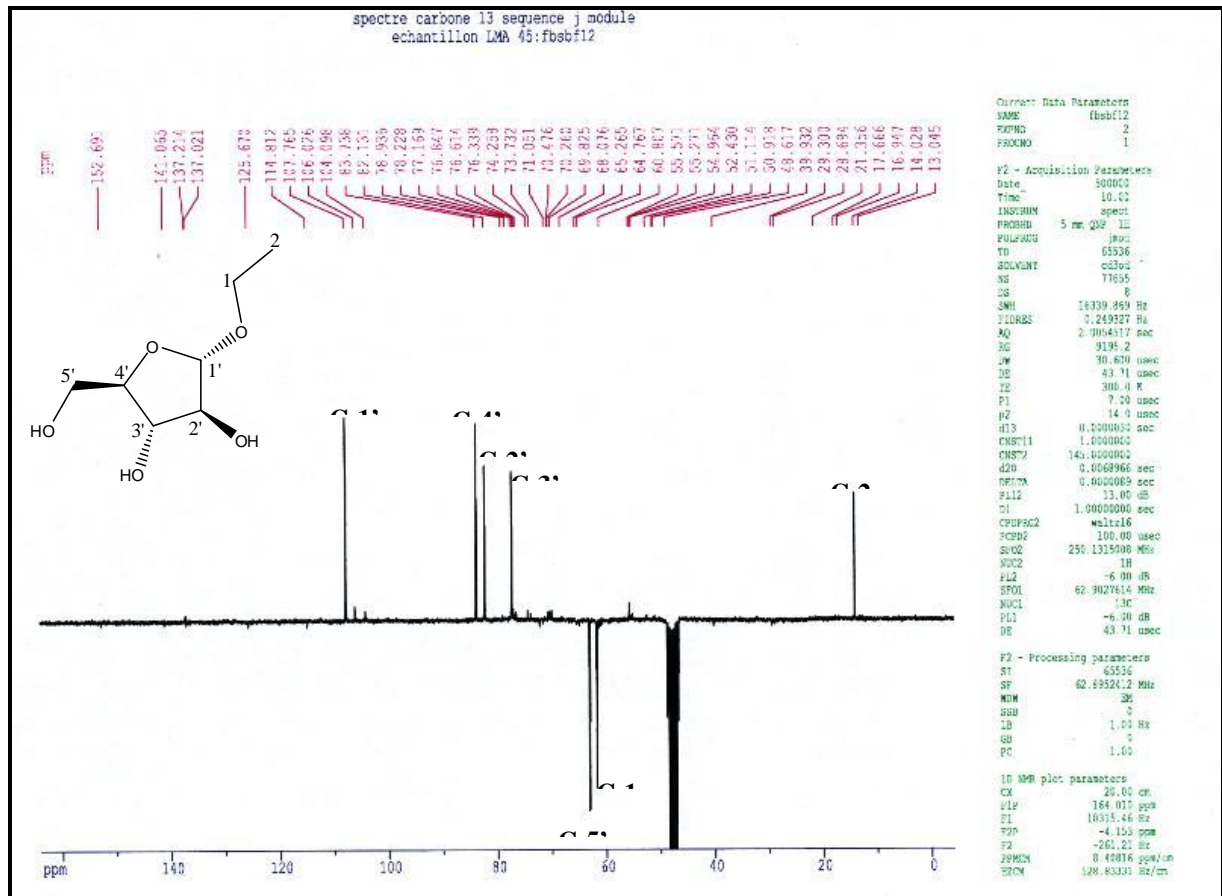


Figure 14 : Co-chromatographie de la phase aqueuse avec des échantillons de référence après hydrolyse acide du composé F_{12} .



Spectre 9-1 et 9-2: RMN ¹H (MeOH-d₄, 250 MHz) du composé F₁₂, étalés



Spectre 10: Jmod (MeOH-d₄, 62,9 MHz) du composé F₁₂

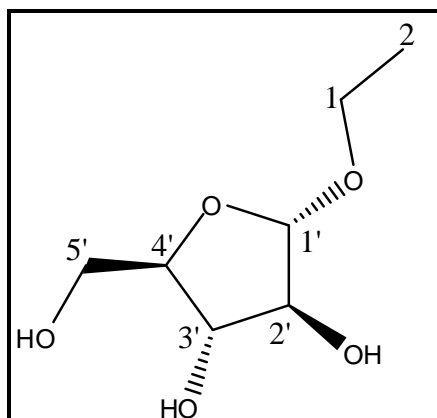
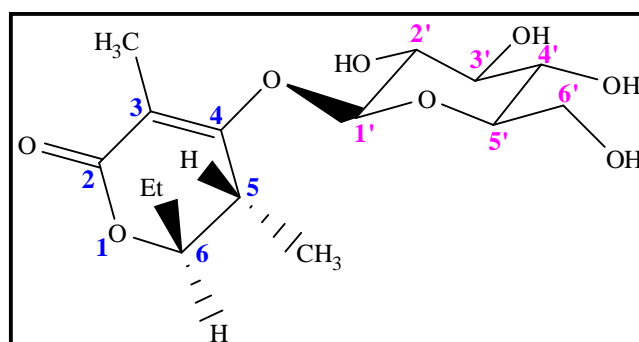


Figure 15 : Structure du composé F₁₂, *O*- α -*D*-arabinofuranosyl éthane

IV-4- Identification du composé F₀₃ :

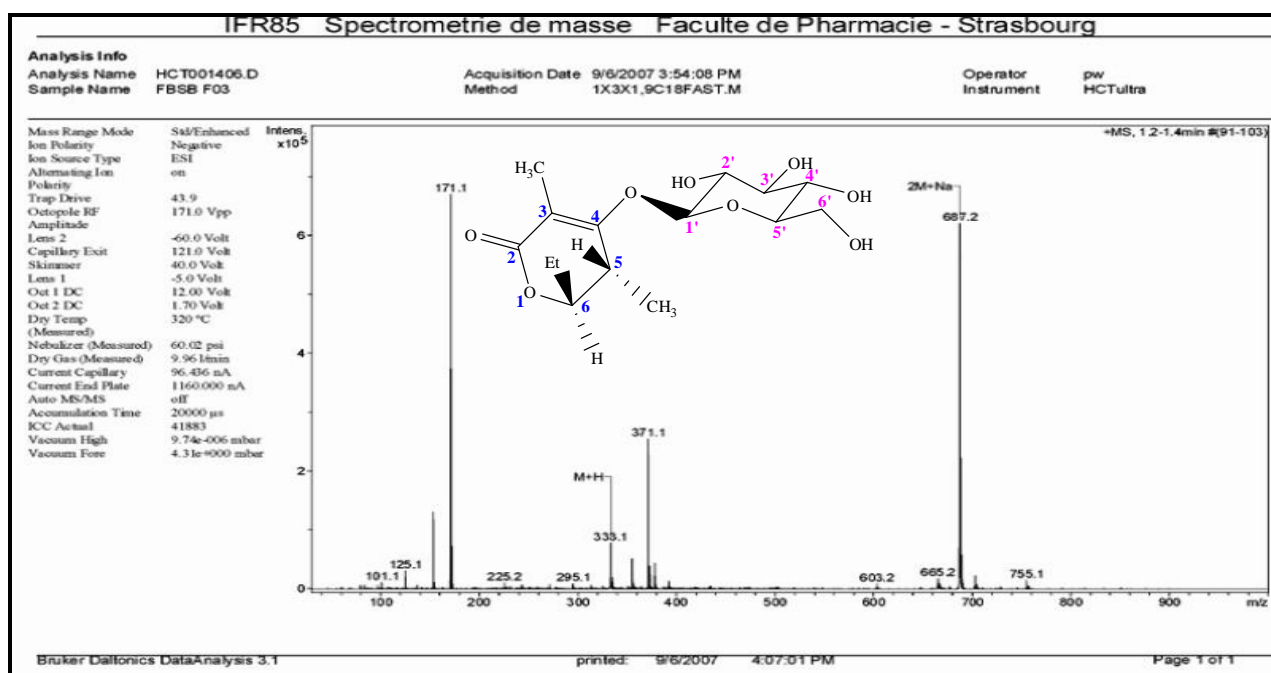


La détermination de la structure du composé F₀₃, a été effectuée sur la base des spectres RMN ¹H, RMN ¹³C avec sa séquence DEPT-135, la RMN bidimensionnelle homonucléaire et hétéronucléaire (¹H, ¹³C) COSY, NOESY, HMBC, et la spectroscopie de masse ESI.

Données de la spectrométrie de masse ESI :

-Le spectre ESI MS (spectre 11) montre des ions quasi-moléculaires à $m/z=687,2$; $371,1$ et $333,1$ correspondant à $[2M+Na]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+H]^+$ et montre également un ion à

$m/z=171,1$ correspondant à $[M-162]^+$. Ses résultats orientent vers une molécule de masse 332 Da, de formule brute de $C_{15}H_{24}O_8$ et comportant un groupement glycosyle de type hexose. De ce fait l'aglycone admet comme formule brute $C_9H_{14}O_3$ et renferme par conséquent, trois insaturations.



Spectre 11 : Spectre ESIMS du composé F₀₃

Données de spectres de RMN :

L'examen des spectres de RMN ^{13}C (spectre 12), 1H (spectre 13), DEPT-135° (spectre 14), COSY (spectre 15), HSQC (spectre 16), HMBC (spectre 17) et NOESY (spectre 18) permet de localiser les signaux relatifs au glycosyle notamment le groupement CH_2OH à $\delta_C = 61,6$ ppm, ($\delta_{H-6'a}=3,87$; dd ; $J = 12,3$; 2,1 Hz) $\delta_{H-6'b}=3,63$; dd ; $J = 12,3$; 6,3 Hz) ppm, les groupements CH à $\delta_C=70,1$; 73,7; 76,8; 77,4; 98,6 ppm Ce dernier, vu son déplacement chimique est attribuable au carbone anomérique C-1' ($\delta_H=4,96$ ppm ; $J = 7,2$ Hz) relié à l'aglycone par un pont oxygène. La valeur de la constante de couplage du proton anomérique indiquant une interaction diaxiale avec le proton en C-2 de ce sucre est en faveur d'un galactosyle ou un glucosyle avec une configuration β du carbone anomérique.

Les déplacements chimiques de l'ensemble des atomes de carbone des groupements CH

relatifs à ce sucre comparés à ceux de la littérature [42], orientent vers un glucosyle tableau 14.

-Le spectre de RMN ^{13}C (Spectre 12), montre en plus des signaux relatifs au groupement glucosyle, 9 autres signaux confirmant ainsi, les données de la spectrométrie de masse concernant l'aglycone. Associés aux données des spectres relatifs aux expériences DEPT (spectre14, 14-1) et HSQC (spectre16) et à celles du spectre proton, les noyaux correspondant à ces signaux relatifs à l'aglycone, peuvent être répartis comme suit :

-Trois carbones quaternaires dont :

*Un carbonyle d'ester ou de lactone α,β -insaturée à $\delta_{\text{C}}=171,2$ ppm

*Un carbone éthylénique quaternaire à $\delta_{\text{C}}=104,7$ ppm.

*Un carbone hybridé sp^2 quaternaire à $\delta_{\text{C}}=170,2$ ppm. Ce carbone ne peut être que celui formant une double liaison avec le précédent. Vu la valeur de son déplacement chimique et la formule brute de cette molécule, il doit être oxygéné.

-2 groupements CH hybridés sp^3 dont :

*Un CH oxygéné à $\delta_{\text{C}}=80,2$ ppm ($\delta_{\text{H}}=4,32$; ddd ; $J=8,7$; $5,7$; $2,7\text{Hz}$), ce carbone ne peut être que celui relié à l'oxygène de la fonction ester précédemment signalée. La valeur de son déplacement chimique oriente vers un carbone de fermeture d'un cycle lactonique. A ce stade de notre analyse, les trois insaturations que renferme l'aglycone de cette molécule sont donc un cycle lactonique comportant une double liaison dont l'un des carbones est oxygéné (spectre 12-1).

*Un CH à $\delta_{\text{C}}=31,8$ ppm ($\delta_{\text{H}}=2,81$; m)

-1 groupement CH_2 à $\delta_{\text{C}}=24,2$ ppm ($\delta_{\text{H}}=1,64$; m ; et $1,78$; m, partiellement recouvert par le signal d'un CH_3), Cette inéquivalence magnétique de ces deux protons indique qu'ils sont voisins d'un centre asymétrique.

-3 groupements CH_3 , dont :

*Un CH_3 à $\delta_{\text{C}}=9,1$ ppm ($\delta_{\text{H}}=1,04$ ppm ; triplet ; $J=7,2$ Hz) ; la multiplicité du signal des

protons de ce CH₃ indique qu'il est relié au groupement CH₂ précédemment signalé.

*Un CH₃ à $\delta_C = 10,0$ ppm ($\delta_H = 1,12$ ppm ; doublet ; $J = 7,0$ Hz) ; la multiplicité du signal des protons de ce CH₃ indique qu'il est relié à un groupement CH et qui ne peut être que le CH résonant à $\delta_H = 2,81$ ppm ($\delta_C = 31,8$ ppm) précédemment signalé.

*Un CH₃ à $\delta_C = 8,4$ ppm ($\delta_H = 1,78$ ppm ; singulet) ; la multiplicité du signal des protons de ce CH₃ indique qu'il est relié à un carbone quaternaire qui ne peut que le carbone éthylénique à $\delta_C = 104,7$ ppm. Spectres (13,13-1, 14,14-1)

L'examen du spectre COSY (Spectre 15), confirme la présence du groupement éthyle par une tache de corrélation entre les protons du groupement CH₂ et ceux du groupement CH₃ à $\delta_H = 1,04$ ppm ($\delta_C = 9,1$ ppm) et montre également une corrélation entre le proton du CH oxygéné (CH de fermeture de la lactone) et ce groupement CH₂. Cette donnée permet de relier ce CH au groupement éthyle. Ce spectre qui, confirme la corrélation entre les protons du méthyle à $\delta_H = 1,12$ ppm et le proton du groupement CH à $\delta_H = 2,81$ ppm, montre également une corrélation entre ce dernier proton et celui du CH de fermeture de la lactone. Ces données mènent à l'enchaînement : CH₃-CH₂-CH-CH-CH₃ dans cette molécule.

L'examen du spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 17), confirme la jonction du groupement méthyle à $\delta_C = 8,4$ ppm ($\delta_H = 1,78$ ppm) au carbone éthylénique quaternaire à $\delta_C = 104,7$ ppm par une tache de corrélation entre les protons de ce groupement et cet atome de carbone et montre une tache de corrélation entre les protons de ce même méthyle et le carbone du carbonyle de la lactone. Cette observation permet de placer la double liaison en α du carbonyle. Ce spectre (HMBC) montre également des taches de corrélation entre les protons du méthyle à $\delta_C = 10,0$ ppm ($\delta_H = 1,12$ ppm), le proton du groupement CH à $\delta_C = 31,8$ ppm ($\delta_H = 2,81$ ppm), le proton anomérique du sucre à $\delta_C = 98,6$ ppm ($\delta_H = 4,96$ ppm) et le carbone éthylénique oxygéné à $\delta_C = 170,2$ ppm. Ces observations permettent de placer, d'une part le groupement *O*-glucosyle sur ce carbone éthylénique et d'autre part de relier ce dernier au carbone porteur du méthyle à $\delta_H = 1,12$ ppm et du proton à $\delta_H = 2,81$ ppm.

La combinaison de l'ensemble de ces données montre que le composé F₀₃ est une δ -lactone α,β -insaturée, substituée par un groupement éthyle, un groupement méthyle et un groupement *O*-glucosyle comme reporté dans la figure 16.

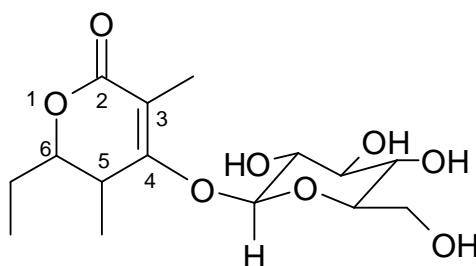
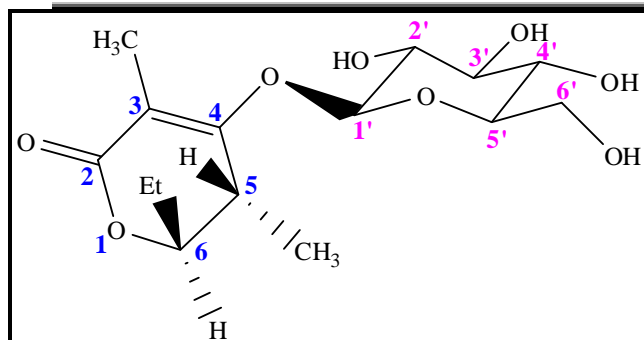


Figure 16 : Structure du composé F₀₃ (aglycone plane)

L'examen du spectre NOESY (Spectre 18) montre une tache de corrélation entre les protons du groupement méthyle en C-5 et le proton H-6, cette observation indique que les groupements éthyle et méthyle admettent une disposition *trans*. Ce spectre montre également une corrélation entre le proton anomérique du glucosyle et le proton H-5 ce qui leur confère une disposition *cis* et les placerait d'après les modèles moléculaires comme représenté dans la figure 17.

Ainsi le composé F₀₃ est une delta lactone glucosylée connue sous le nom de cornicinine. Elle a été isolée de *Nephrotoma cornicina* (Linnaeus, 1758), un insecte où elle est présente chez les deux sexes, dans la tête, le thorax, l'abdomen, les pattes et les ailes. Elle a été également synthétisée ainsi que plusieurs de ses dérivés car elle est douée d'activités biologiques remarquables. Ces travaux ont fait l'objet d'un brevet déposé en 2003 par une équipe de chercheurs belges [44]. Il est à noter que cette molécule n'a jamais été décrite à partir d'une espèce végétale. Par ailleurs, l'espèce *Nephrotoma cornicina* (Linnaeus, 1758), très distribuée en Europe et en Asie n'est nullement signalée en Afrique du Nord. Cette donnée atténue l'éventualité d'un artefact introduit par la présence éventuelle de cet insecte dans notre matériel végétal qui est d'ailleurs très peu probable. Les données spectroscopiques relatives à cette molécule sont reportées dans les tableaux 14 et 15.

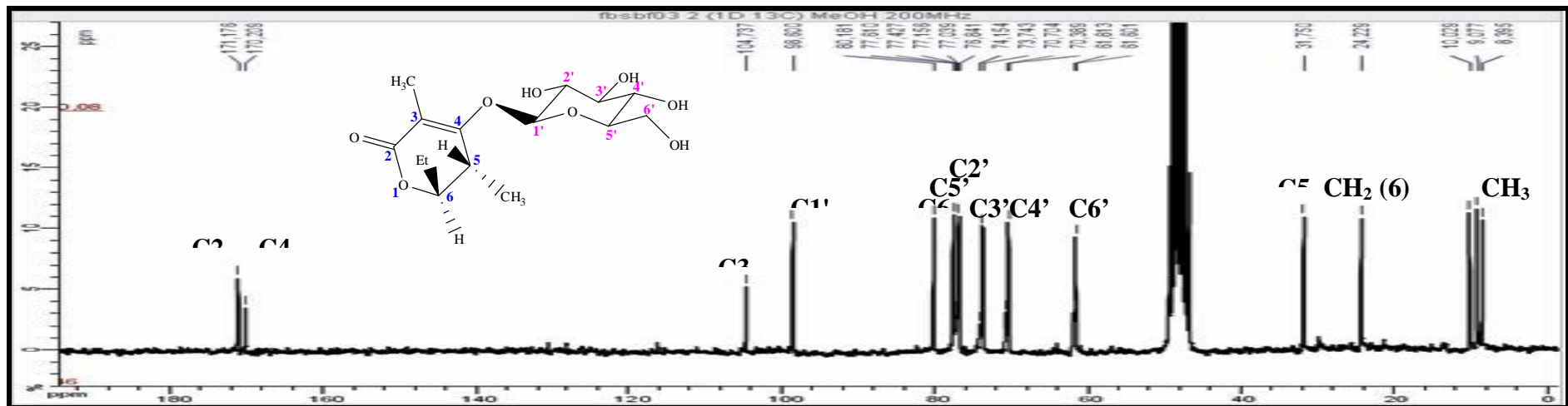
Figure 17 : Structure finale du composé F₀₃ (cornicinine)

CARBONES	Δ PPM (cd ₃ od, 75 MHz)
CH ₃ (3)	9,1
CH ₃ (6)	8,4
CH ₃ (5)	10,0
CH ₂ (éthyle)	24,2
C-5	31,8
CH ₂ (sucre)	61,6
C-4'	70,1
C-3'	73,7
C-5'	77,4
C-2'	76,8
C-6	80,2
C-1'	98,6
C-3	104,7
C-4	170,2
C-2	171,2

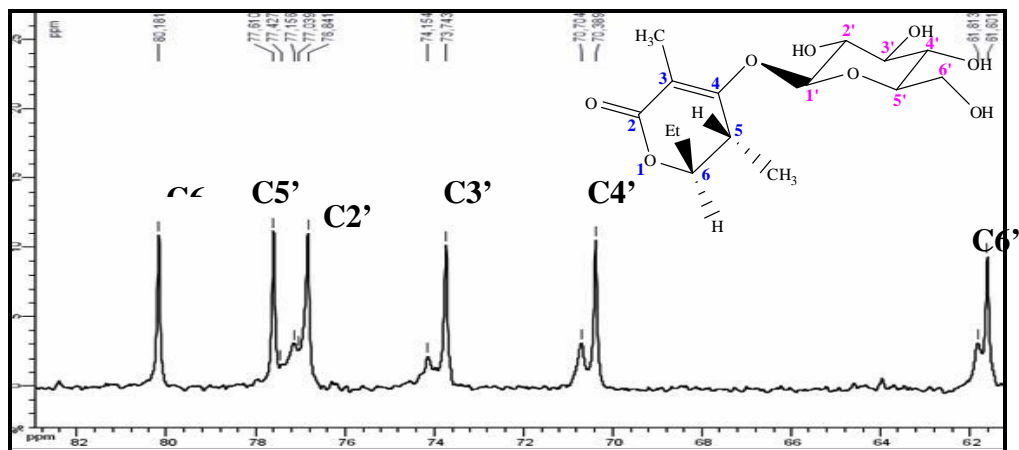
Tableau 14: Données du spectre de RMN ¹³C (MeOH-d₄, 75 MHz) du composé F₀₃

PROTONS	δ PPM	MULTIPLICITÉ	J (HZ)
CH ₃ (6)	1,04	t	³ $J_{\text{CH}_2\text{-CH}_3}=7,2$
CH ₃ (5)	1,12	d	³ $J_{\text{CH-CH}_3}=7,0$
CH ₂ (éthyle)	1,64	m	
	1,78	m	
CH ₃ (3)	1,78	s	
H-5	2,81	m	
H-2'+H-4'	3,40	m	
H-3'+H-5'	3,45	m	
H-6'a	3,87	dd	² $J_{6'a-6'b}=12,3$; ³ $J_{6'a-5'}=2,1$
H-6'b	3,63	dd	² $J_{6'b-6'a}=12,3$; ³ $J_{6'b-5'}=6,3$
H-6	4,32	ddd	³ $J_{6\text{-CH}_2a}=8,7$; ³ $J_{6\text{-CH}_2b}=5,7$; ³ $J_{6-5}=2,7$
H-1'	4,96	d	³ $J_{1'-2'}=7,2$

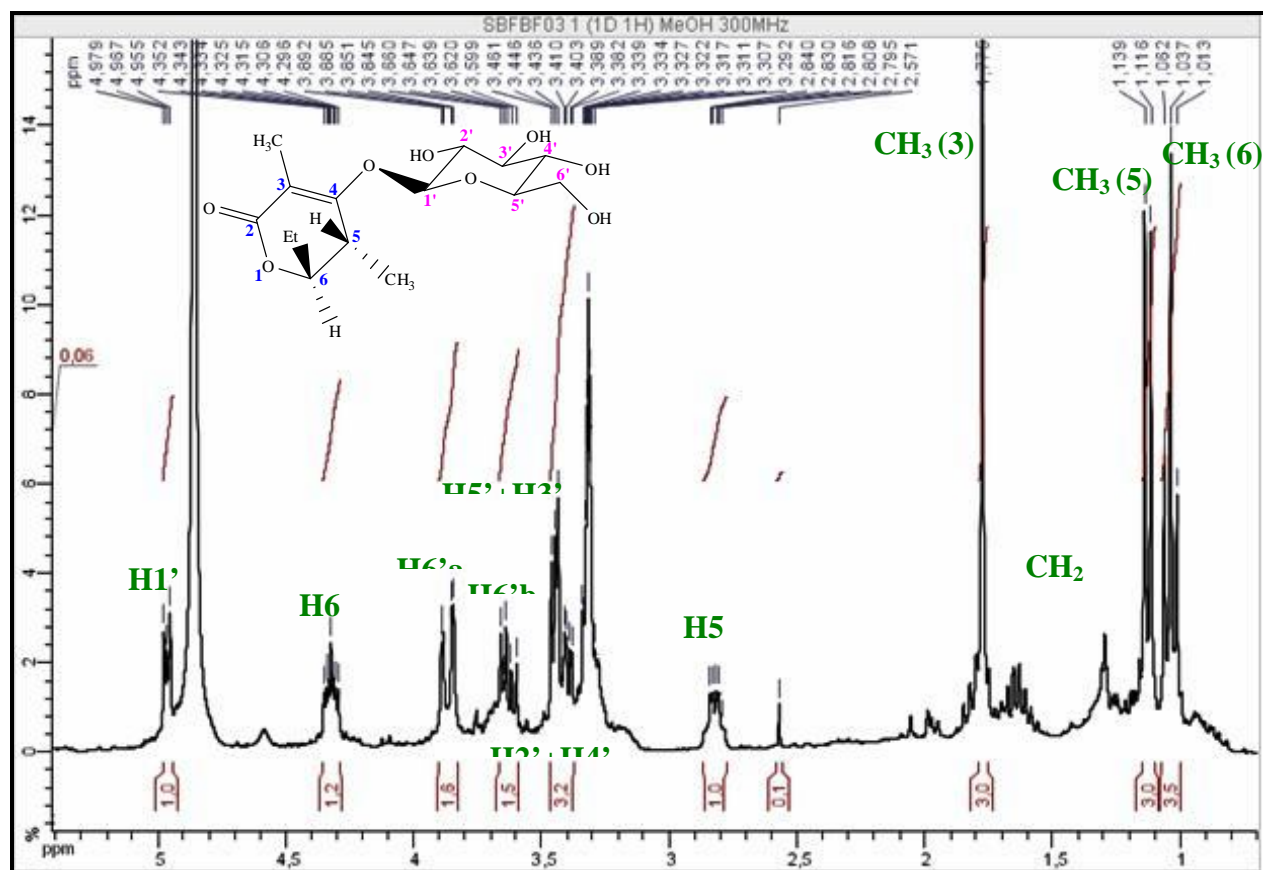
Tableau 15: Données du spectre de RMN ¹H (MeOH-d₄, 300 MHz) du composé F₀₃



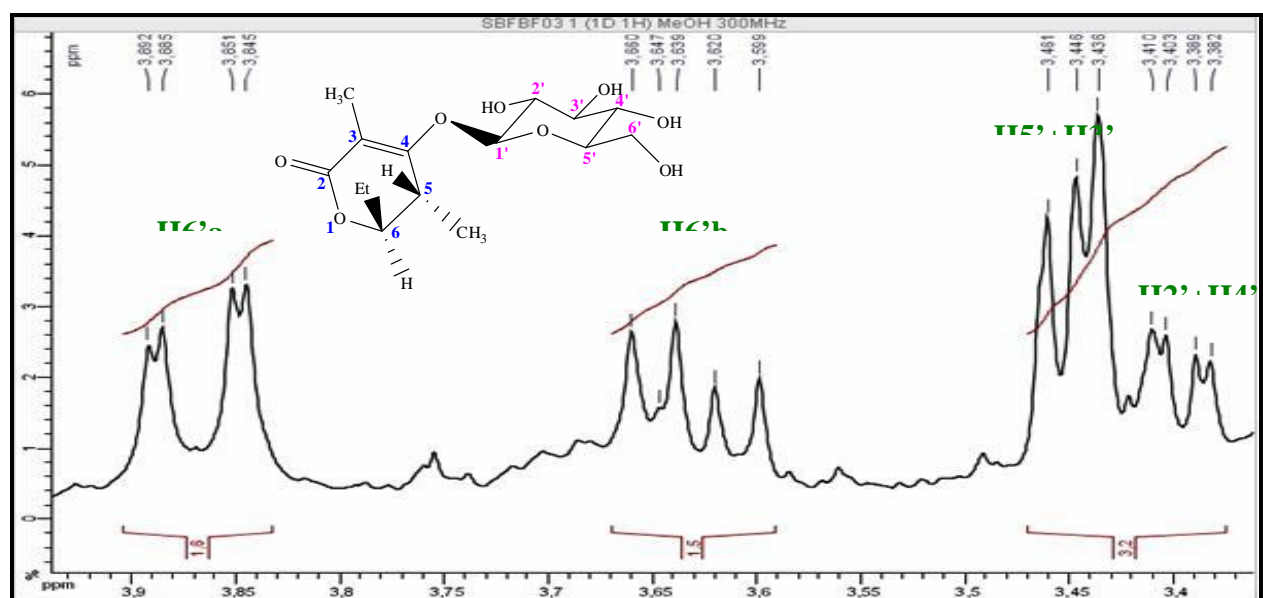
Spectre12: RMN ^{13}C (MeOH-d₄, 75 MHz) du composé F₀₃



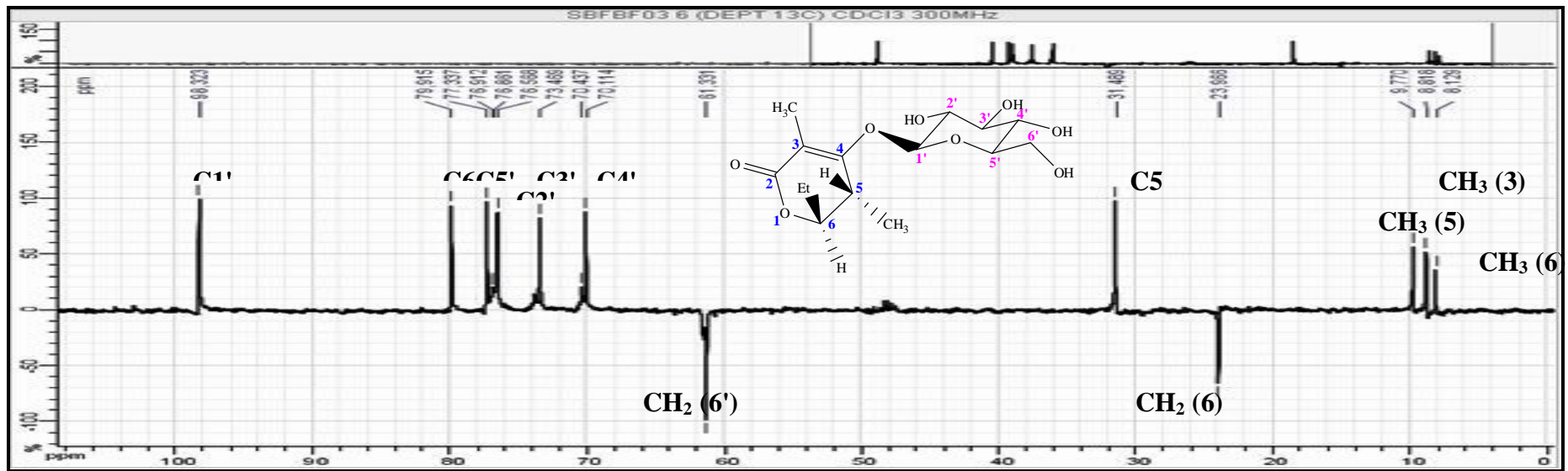
Spectre 12-1: RMN ^{13}C (MeOH-d₄, 75 MHz) du composé F₀₃ étalé



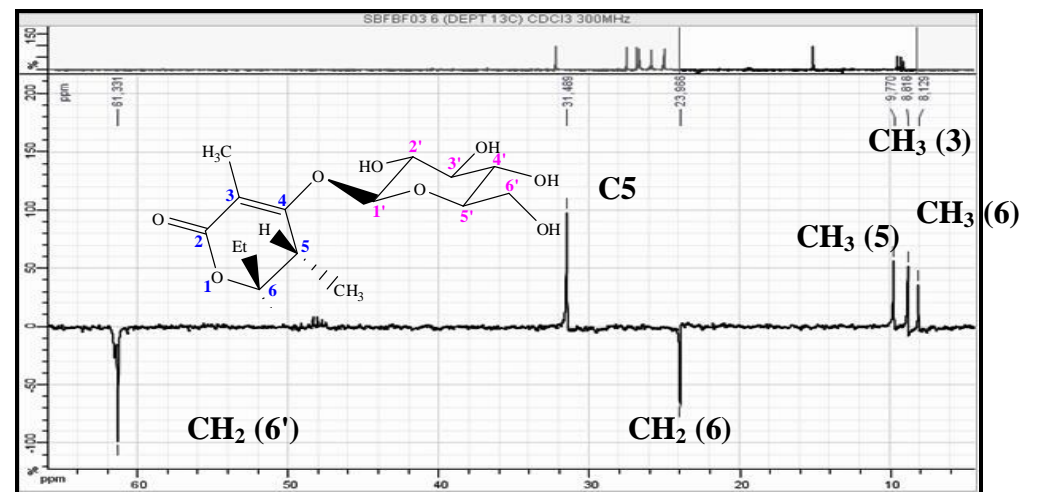
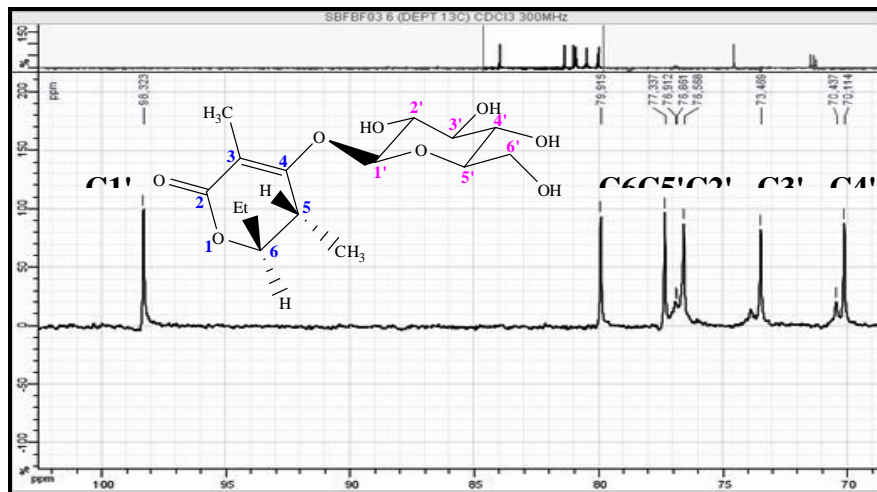
Spectre 13: RMN ^1H (MeOH- d_4 , 300 MHz) du composé F₀₃



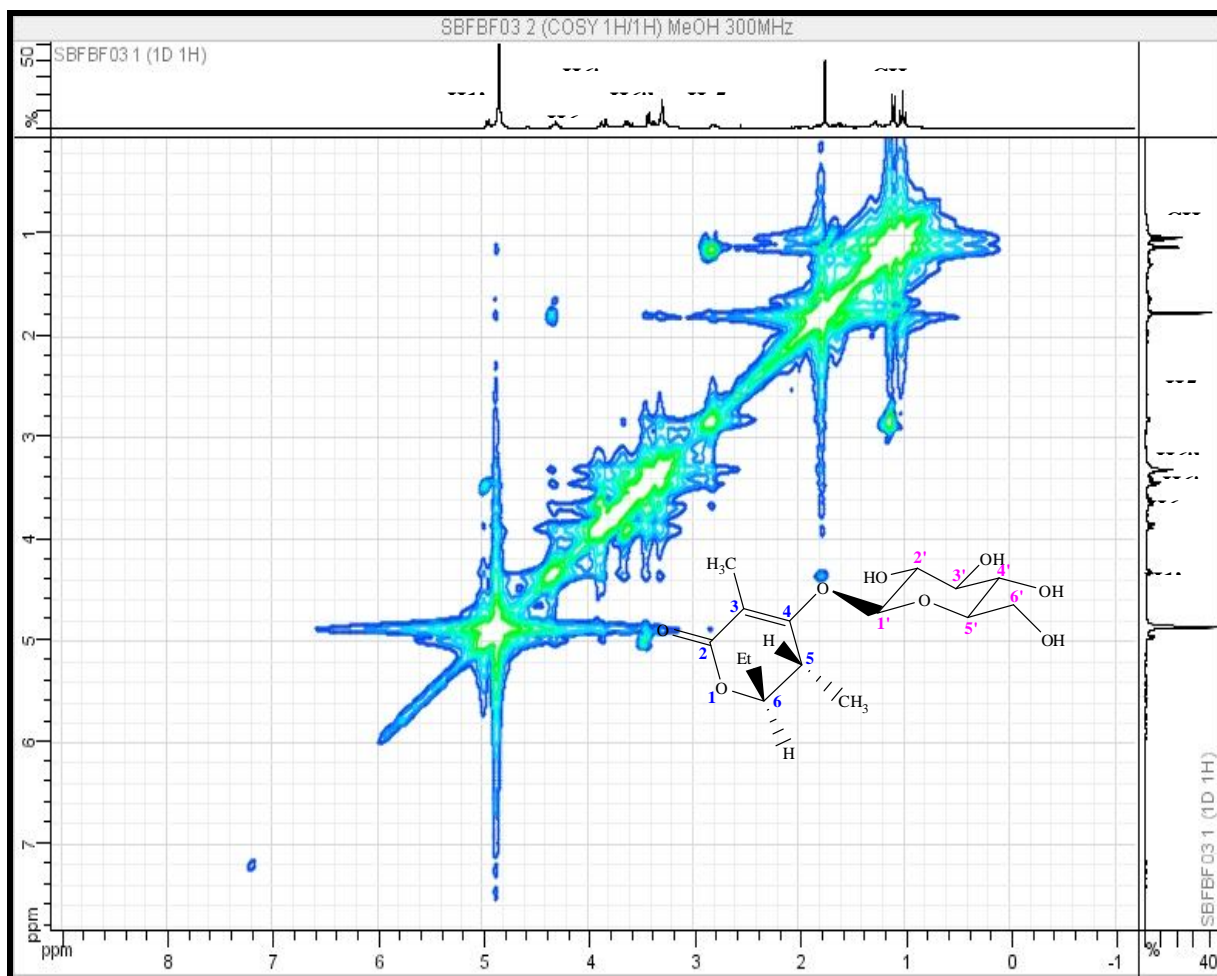
Spectre 13-1: RMN ^1H (MeOH- d_4 , 300 MHz) du composé F₀₃ étalé



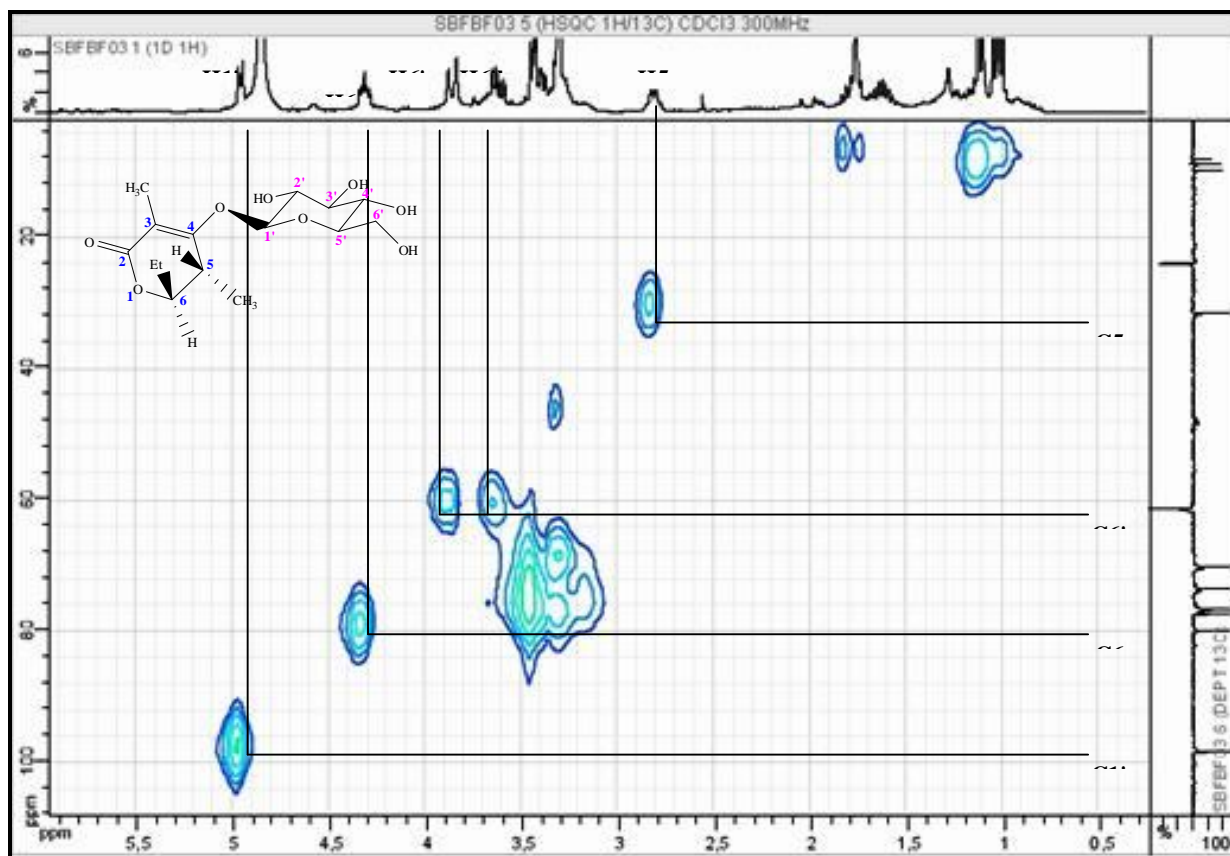
Spectre 14: DEPT-135° (MeOH-d₄, 300 MHz) du composé F₀₃



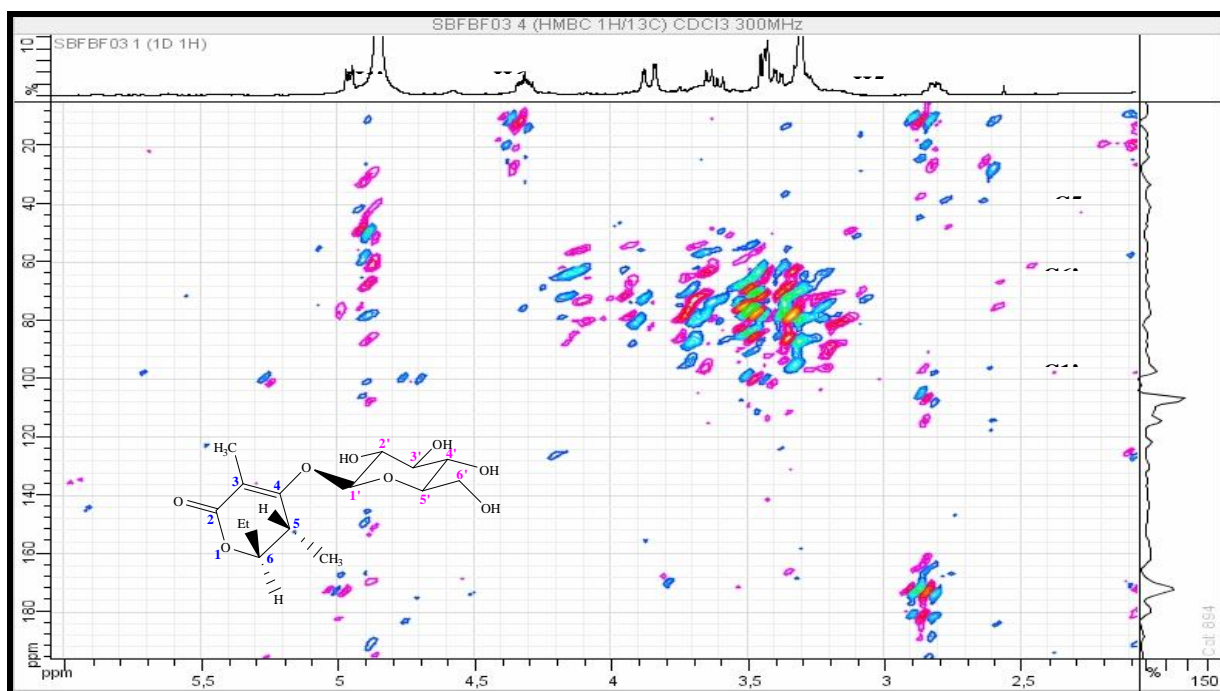
Spectre 14-1: DEPT-135° ¹³C (MeOH-d₄, 300 MHz) du composé F₀₃ étalé

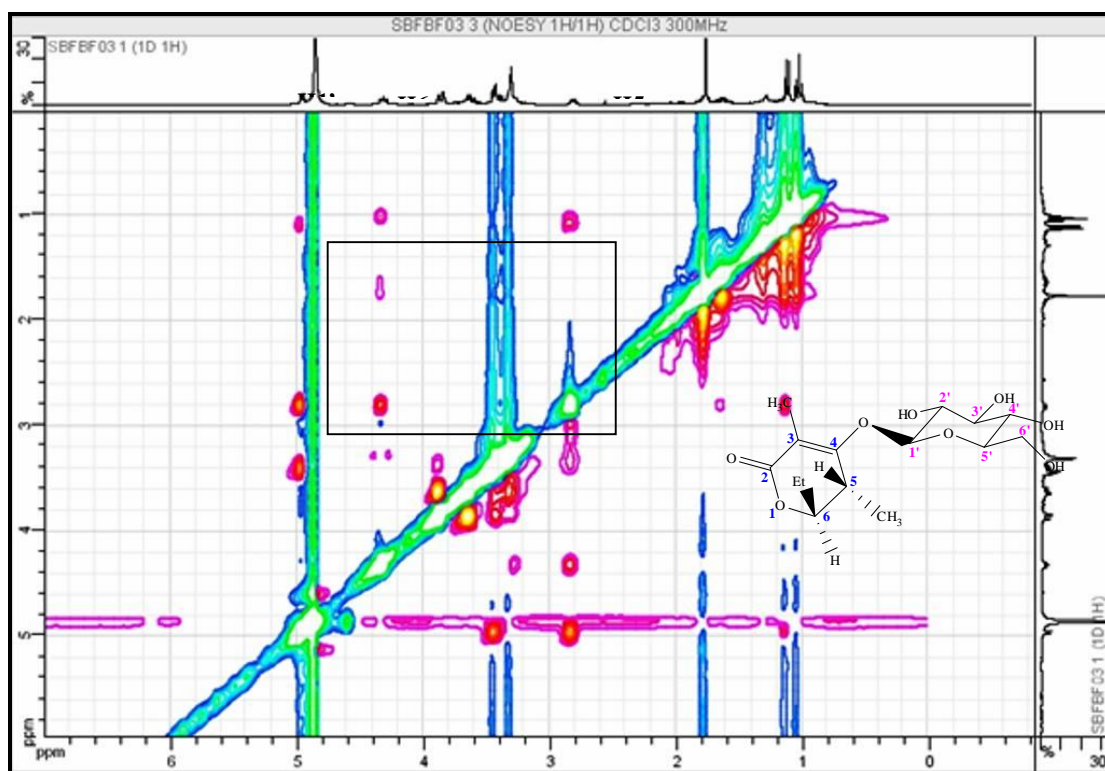


Spectre 15: Spectre COSY (MeOH-d₄, 300 MHz) du composé F₀₃



Spectre 16: Spectre HSQC(MeOH-d₄, 300 MHz) du composé F₀₃



Spectre 17: Spectre HMBC (MeOH-d₄, 300 MHz) du composé F₀₃Spectre 18: Spectre NOESY (MeOH-d₄, 300 MHz) du composé F₀₃

Conclusion

Ainsi cette étude phytochimique, que nous avons menée sur l'isolement et la détermination des métabolites secondaires de la phase *n*-butanol des parties aériennes de *Centaurea parviflora* a permis l'obtention et la détermination structurale de quatre composés natifs dont :

- un flavonoïde diglycosylé de type flavonol isolé du genre *Centaurea* uniquement dans notre laboratoire : la nicotiflorine ou 3-rutinosyl kaempférol
- un composé phénolique glucosylé dérivé de l'alcool sinapylique nouveau pour le genre *Centaurea* : le 3- (4- *O*- β - *D*- glucopyranosyl- 3,5- dimethoxy)- phenyl- 2 *E*-propenol)
- un hydrocarbure glycosylé que nous reportons pour la première fois dans la littérature : le *O*- α -*D*-arabinofuranosyl éthane
- une δ -lactone α,β -insaturée glucosylée nouvelle pour le règne végétal : la cornicinine

Conclusion Générale

Ce travail à caractère phytochimique et structural portant sur l'investigation de la phase *n*-butanol de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de *Centaurea parviflora* Desf. (Compositae) effectué en complément d'une étude réalisée dans notre laboratoire sur la phase chloroforme, a permis l'isolement et l'établissement des structures de 4 composés dont :

- un nouveau pour le règne végétal (la cornicinine)
- un que nous décrivons pour la première fois dans la littérature (*O*- α -*D*-arabinofuranosyl ethane)
- deux nouveaux pour le genre *Centaurea* (la nicotiflorine ou 3-rutinosyl kaempferol et le 3-(4-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-3,5-dimethoxy)-phenyl-2*E*-propenol)

Les structures ont été établies par la combinaison des données de RMN¹H, RMN¹³C, des expériences de RMN bidimensionnelles, de la spectroscopie d'absorption ultraviolette et de la spectrométrie de masse.

Références bibliographiques :

- [1]. **M.S. Jang, L.N. Cai**; Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. 1997. *Science* **275**, 218-220.
- [2]. **L. Hoffmann**; Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg, 2003.
- [3]. **H. Milane**; Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur 1, 2004.
- [4]. **S. Kitanaka, T. Ikezawa, K. Yasukawa, S. Yamanouchi, M. Takido and H.K. Sung**; An anti-inflammatory compound from *Caragana chamlagu root*. 1990. *Chem Pharm Bull* **38(2)**, 432-435.
- [5]. **C.R. Pace-Asciak**; Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. 1996. *Clin.Chim.Acta* **246(1-2)**, 163-182.
- [6]. **U. Jager, H. Nguyen-Duong**; Relaxant effect of trans-resveratrol on isolated *Porcine coronary arteries* *arzneimittelforschung*. 1999. **49(3)**, 207-211.
- [7]. **E.N. Frankel**; Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine *lancet*. 1993. **341(8843)**, 454-457.
- [8]. **V. David, A. Valerie, K. Stephanie, C. Cheze, J. Vercauteren**; Thèse de doctorat. Université Segalen Bordeaux.
- [9]. **Ibn elBitar**, Mofradat al Adwiah wa el Agzia, *Al Zahria Press*, Cairo, 1980, 148.
- [10]. **M. Monya, and G. Racz**; *Plant Medicin and Phytotherapy*, 1974, **8**, 126.
- [11]. **M. Kaij-A-Kamb, M. Amoros and, L. Girrel**; *Pharma Acta Helvitia*, 1992, **67**, 178.
- [12]. **J. F. Kennedy, and C.A. White**; (1983) in *Bioactive Carbohydrates Chemistry, Biochemistry and Biology*. Ellis Horwood.
- [13]. **J. Zhang and J. S-Brodbelt**; Threshold dissociation and molecular modeling of transition metal complexes of flavonoïds. Texas. 2005. *J An Soc Mass Spectrom* **16**, 139-151.
- [14]. **R. E. Negrette, I. Latorre, N. Backhouse and C. Delpote**; *Plant Medicin and Phytotherapy*, 1988, **53**, 503.
- [15]. **T. Richard, S. Verge, J. Vercauteren, J.P. Monti** ; 2^{ème} *journée scientifique des sciences pharmaceutiques*, Bordeaux, 2001.
- [16]. **B. Nay, J.F. Peyrat, C. Cheze, J. Vercauteren**; Couplages C-O et C-C de phénols a des complexes pi-allyliques du palladium; applications a la synthèse de flavonoïdes naturels.
- [17]. **S. Renaud, M. De Lorgeril**; Wine alcohol platelets and the french paradox for coronary heart disease *lancet*. 1992. **39(8808)**, 1523-1526.

-
- [18]. **S. Soulet, J.P. Lecoupeau, J. Vercauteren**, Implications chimique et biologique de la présence de polyphenols dans le *cacao*.
- [19]. **J. Loisseur**, (1973), Techniques de laboratoire, Chimie physique, *Chimie Biologique*, Tome 1, Editeurs Masson et CIE.
- [20]. Stage Mafpen. Des cours en chromatographie. Lycée Louis Vincent Metz.1998.
- [21]. **G. Vernin**; (1970), La chromatographie en couche mince, *Techniques et application en chimie organiques*, Dunod, Paris.
- [22]. **L. Jurd, and R. Hovowitz**; spectral properties of flavonoïd compounds. 1962. *Peragamon Press*, Oxford, **107**, 2055.
- [23]. **K.R. Markham**; technique of flavonoïds identification. *Academy Press*, London.1982.
- [24]. **T.J. Mabry, K.R. Markham and M.B. Thomas**; (1970), the systematic identification of flavonoïds. *Springer-Verlag* New York, Heidelberg.254p.
- [25]. **K.R. Markham, and T.J. Mabry**; (1968), *phytochemistry*, **7**, pp.1197.
- [26]. **L. Horhammer and R. Hansel**; (1952), *Arch.Pharm.*, **285**, 438.
- [27]. **L. Jurd, and T.A. Geissman**; (1956), *J.Org.Chem.*, **21**, 1395.
- [28]. **B. A. Bohm**; (1965), in Encyclopadia of Plant Physiology. W. Rehland Editeur *Springer Verlag Berlin*.
- [29]. **B. D. Davis**, (1955), *Advanced In Enzymology*, **16**, 247.
- [30]. **H. Grisebah**, (1965), chemistry and biochemistry of plant pigments T.W. Goodwin, *Academic Press*, New-York.
- [31]. **R.A. Anderson and J.A. Sowers**, (1968), *Phytochemistry*, **7**, 115-126.
- [32]. **J.B. Harborne**, (1973), phytochemical methods, *Chapman and Hall*, London.
- [33]. **J. Loiseleur**, (1973), techniques de laboratoire, chimie physique, *Chimie Biologique*, Tome1, Editeurs Masson et CIE.
- [34]. **G. Vernin**, (1970), La chromatographie en couche mince, *Techniques et Application En Chimie Organiques*, Dunod, Paris.
- [35]. **H. Endres and H. Hormann**, *Angew. Chem.* (1963).**2**, 254, Ed. Internet.
- [36]. **H. Belbache** ; Thèse de Magister. Université Mentouri de Constantine, 2007.
- [37]. **C. Boubekri**; Thèse de Magister. Université Mentouri de Constantine, 2005.
- [38]. **T. J. Mabry, k. R. Markham and m. B. Thomas**. The systematic identification of flavonoïds, 1970, *Springer-Verlag*, Newyork, Heidelberg, Berlin.

- [39]. **C. Remond, M. Ferchichi, N. Aubry, R. Plantier-Royon, C. Portella and M. J. O'donolve.** Laboratoire reactions selectives et application, *Tetrahedron Letters* **43**(2002). 9653-9655, france.
- [40]. **K. Kazuma, N. Noda, M. Suzuki.** Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. 2003. *Phytochemistry* **62**, 229]
- [41]. **M. D. Greca, M. Ferrara, A. Fiorentino, P. Monaco and L. Previtera.** *Phytochemistry*, **49**(5), 1299-1304, 1998, Italy.
- [42]. **P. K. Agrawal.** *Phytochemistry*, 31(10), 3307-3330, 1992, India.
- [43]. **A. Nahrstedt, M. Hungeling, F. Petereit.** Flavonoids from *Acalypha indica*. 2006. *Fitoterapia* **77**, 484
- [44]. International application published under the patent cooperation treaty (PTC). An agency of industry Canada.CA 02547229 2006-05-24.

Résumé

Notre but dans ce travail consiste en l'isolement et la détermination des métabolites secondaires contenus dans la phase *n*-butanol de l'extrait hydroéthanolique de des parties aériennes de *Centaurea parviflora* (Compositae), une espèce endémique de l'Algérie et de la Tunisie.

Notre choix repose sur le fait que le genre *Centaurea* a montré d'une part qu'il est doué d'activités biologiques et d'autre part que c'est un excellent accumulateur de molécules de type lactone sesquiterpénique et flavonique, des classes de substances naturelles qui ont montré des activités biologiques diverses notamment cytotoxique pour la première et antioxydante pour la seconde.

Après macération du matériel végétal dans une solution éthanol-eau (7 :3 v/v), filtration et concentration, la solution additionnée d'eau distillée subit des affrontements successifs par des solvants de polarité croissante : chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol menant aux trois respectives. La phase *n*-butanol est soumise à la séparation et à la purification par diverses méthodes de chromatographie liquide (colonne, papier, couche mince) conduisant à l'isolement et la purification de 4 composés natifs qui sont:

- 1) La nicotiflorine (3-rutinosyl kaempférol)
- 2) Le 3- (4- *O*- β - *D*- glucopyranosyl- 3,5- dimethoxy)- phenyl- 2 *E*-propenol.
- 3) Le *O*- α -*D*-arabinofuranosyl éthane
- 4) La cornicinine

L'établissement des structures de ces composés a été réalisé par la combinaison de leurs données spectroscopiques, notamment les résultats des études de leurs spectres UV, RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT, HSQC, NOESY, HMBC et de l'analyse des spectres de masse en mode ESI.

A notre meilleure connaissance tous ces produits sont nouveaux pour le genre *Centaurea* dans la littérature. Le premier composé n'a été isolé de ce genre que dans notre laboratoire. Le dernier composé (la cornicinine) est nouveau pour tout le règne végétal. Il est à noter également, que le troisième composé (*O*- α -*D*-arabinofuranosyl éthane) n'est pas signalé dans la littérature.

Mots clés : flavonoïdes, Composés phénoliques, δ -lactone glucosylée, *Centaurea parviflora*, Compositae.

Abstract

The aim of this work is to isolate and determine secondary metabolites present in the *n*-butanol soluble part of the aqueous-ethanol extract of the aerial parts of *Centaurea parviflora* (Compositae). *Centaurea parviflora* is an endemic species to Algeria and Tunisia.

Our choice for this subject was guided by the fact that genus *Centaurea* shows various biological activities and is an excellent accumulator of sesquiterpene lactones and flavonoids. These classes of natural substances are well known for their various biological activities, in particular cytotoxic and antioxidant, respectively.

After maceration of the plant parts with EtOH-H₂O (7:3 v/v), filtration then concentration, the remaining solution was diluted with distilled water and extracted repeatedly with CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH, to give the 3 respective extracts. The *n*-BuOH extract was separated the following by various methods of liquid chromatography (column, paper, TLC) to give 4 pure and native compounds:

- 1) nicotiflorin (kaempferol 3-rutinoside)
- 2) 3- (4- *O*- β- *D*- glucopyranosyl- 3,5- dimethoxy)- phenyl- 2 *E*-propenol.
- 3) ethane *O*-α-*D*-arabinofuranoside
- 4) cornicin

The structures of these compounds were established by the combination of their spectroscopic data, notably the analysis of UV, RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT, HSQC, NOESY, HMBC spectra as well as by ESIMS.

To the best of our knowledge, all these compounds are new for the genus *Centaurea*. The first compound was isolated from this genus only in our laboratory. The last compound cornicin is new for all the reign plant. It is also important to note that the third compound ethane *O*-α-*D*-arabinofuranoside has not been described in the literature.

Keywords: flavonoids, phenolic compounds, δ-lactone glucoside, *Centaurea parviflora*,
Compositae.

()

Centaurea parviflora

(Cytotoxique)

(Antioxydante)

00 0

(7 :3 v/v)

0

:0

0

(*n*-BuOH)

(AcOEt)

(CHCl₃)

0

0.(

)

04

1) La nicotiflorine (3-rutinosyl kaempférol)

2) Le 3- (4- *O*- β - *D*- glucopyranosyl- 3,5- dimethoxy)- phenyl- 2 E-propenol.

3) Le *O*- α -*D*-arabinofuranosyl éthane

4) La cornicine

, RMN-:

UV

)

.ESIMS

¹H, RMN-¹³C, DEPT, HSQC, NOESY, HMBC

0

00

00

00

00

0

0

0

(La Cornicine)

0

0

0

0

0

Centaurea

(*O*- α -*D*-arabinofuranosyl

00

00

0

0

0

0

0

éthane)

Centaurea parviflora -γ :