

République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE**

FACULTE DES SCIENCES EXACTES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre

N° de Série

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du grade de

Magister en Sciences

En chimie organique

Option : Phytochimie

***ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT
BUTANOLIQUE DE L'ESPECE
Centaurea Maroccana***

Sous la direction du professeur :

Mr Belattar Abdelhamid

Présenté Par :

Mr Bensouici Chawki

Devant le jury :

Président Pr. Teniou Abderrahmane Univ. Constantine

Rapporteur Pr. Belattar Abdelhamid Univ. Constantine

Examineur Dr. Bentamene Ali Univ. Constantine

Examineur Dr. Mekkiou Ratiba Univ. Constantine

DEDICACE

REMERCEMENT

SOMMAIRE

<i>Nomenclature</i>	5
<i>Introduction et étude bibliographique</i>	
<i>introduction</i>	

SOMMAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE I : LES COMPOSES FLAVONIQUE

I-les composées flavoniques.....	1
I-1- Introduction.....	1
I-2- Biosynthèse.....	8
I-2-1- Biosynthèse du squelette C6-C3-C6.....	8
I-2-2- Biosynthèse des différent squelette flavonique.....	10
I-3- Substitution du squelette flavonique.....	12
I-3-1- L'hydroxylation.....	13
I-3-2- La méthylation.....	14
I-3-3- La glycosylation.....	16
I-3-3-1- La C-glycosylation.....	17
I-3-3-2- La O-Glycosylation.....	18
I-4- L'intérêt des flavonoides.....	20
I-4-1- Le rôle biologique et physiologique.....	20
I-4-2- Le rôle thérapeutique.....	23
I-4-2-a- Effets antiallergiques.....	23
I-4-2-b- Effets anticancéreux.....	24
I-4-2-c- Effets anti-inflammatoires.....	25
I-4-2-d- Effets anti-ulcèreux.....	25
I-4-2-e- D'autres effets biologiques.....	26
Références bibliographiques	

CHAPITRE II : ANALYSE STRUCTURALE DES FLAVONOIDES

II- L'étude structurale des composés flavoniques.....	28
II-1- Propriétés chromatographiques.....	28
II-1-1- Fluorescence sous lumière de Wood.....	28
II-1-2- Facteur de retardement R _f	30
II-2- La spectrophotométrie UV.....	31
Spectre d'absorption en milieu méthanolique.....	31
Spectre d'absorption en présence de NaOH ou NaOMe.....	34
Spectre d'absorption en présence de NaOAc.....	34
Spectre d'absorption en présence de H ₃ BO ₃ + NaOAc.....	34
Spectre d'absorption en présence de AlCl ₃ et AlCl ₃ +HCl.....	35
II-3- La résonance magnétique nucléaire.....	39
II-3-1- La RMN du proton (RMN-H ¹).....	39
Les protons du cycle (C).....	42
Les protons des substituant méthoxyles.....	42

Les protons des sucres.....	42
II-3-2- La RMN du carbone (RMN-C ¹³).....	43
II-4- La spectrométrie de masse.....	44
- Spectrométrie de masse à impact électronique.....	45
- Spectrométrie de masse à bombardement atomique rapide (FAB).....	45
- Spectrométrie de masse electrospray (ES).....	45
II-5- L'hydrolyse acide des hétérosides.....	48
Références bibliographiques	

CHAPITRE III :PARTIE EXPERIMENTALE

III-Plante végétal,méthodes d'extraction, séparation et purification.....	49
III-1- Principes générales d'extraction, séparation et purification.....	49
III-1-1- Extraction.....	49
III-1-2- Séparation et purification.....	50
III-1-2-1- Chromatographie sur couche mince.....	50
III-1-2-2- Chromatographie sur papier.....	53
III-1-2-3- Chromatographie sur colonne.....	54
III-2- Etude chimique de l'espèce.....	56
III-2-1- Caractéristiques communes.....	56
III-2-2- Les flavonoides isolées de la famille centaurea.....	59
III-3- Matériel végétal.....	64
III-3-1- Choix du matériel végétal.....	64
III-3-2- Description botanique.....	64
III-3-3- Place dans la systématique.....	64
III-3-4- Répartition géographique.....	65
III-4- Protocole expérimentale.....	67
III-4-1- Extraction.....	67
III-4-2- Séparation chromatographique.....	69
III-5-Séparation et purification des composants de l'extrait Butanolique.....	70
III-5-1- Séparation sur colonne.....	70
III-5-2- Séparation sur couche mince.....	72
Références bibliographiques	

CHAPITRE IV :Résultat et discussions

IV- Détermination structurale des produits isolés de l'espèce.....	74
IV-1- Le composé F2.....	74
IV-1-2- Interprétation.....	74
IV-2- Le composé Fc.....	83
IV-1-3- Interprétation.....	83
IV-3- Le composé F1.....	86
IV-1-4- Interprétation.....	86
Conclusion	
Références bibliographiques	

75
79
79
79
79
82
86
86
86
86
89
92
92
92
92
95
98
11
1
11
2

Introduction :

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les flavonoïdes qui sont présent chez toutes les plantes vasculaires ; ils se sont surtout illustrés en thérapeutique comme anticancéreux, anti-inflammatoires, antitumoraux, et antioxydants (Bahorun T., 1995).

Des travaux plus anciens (Nitsch et Nitsch 1961 ; Alibert et al. 1977) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols interviennent dans la qualité alimentaire des fruits. Les flavonoïdes et certains anthocyanes participent à la coloration des fruits mûrs. L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C.

A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour les molécules dont les propriétés antioxydantes sont très marquées. Parmi les propriétés attribuées on peut citer l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, une action antifongique et antibactérienne. Les flavonoïdes sont aussi des protecteurs contre les risques cardio-vasculaires (Remesey et al, 1998).

Les composés phénoliques déterminent également la saveur des fruits : les flavonones sont responsables de l'amertume des Citrus et peuvent donner naissance, par transformation chimique, à des dihydrochalcones à saveur sucrée (Dubois et al. 1977).

Les tanins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs. L'étude de *Centaurea maroccana* entre dans le cadre d'un programme de recherche sur les plantes médicinales algérienne. Cet intérêt est motivé, d'une part, par le fait que cette espèce n'a fait l'objet d'aucune étude chimique, au regard de la recherche bibliographique effectuée, et la richesse des Centaurées en substances naturelles d'un grand intérêt biologique d'autre part.

La famille des Centaurées est très riche en substances naturelles tel que : les sesquiterpènes, les terpènes, et les flavonoïdes.

Ce mémoire est subdivisé en quatre chapitres :

Le premier chapitre est consacré à l'étude des flavonoïdes : leur définition, leur biosynthèse et leur intérêt biologique.

Le deuxième chapitre est consacré à l'analyse structurale des flavonoïdes.

Le troisième chapitre est consacré au travail personnel qui **consiste** en l'extraction, séparation, purification et étude chimique de l'espèce.

Le quatrième chapitre est consacré à la détermination des structures des composés obtenue.

Références bibliographiques

-N.Heimeur, L.M. Idrissi, Hassani et M.Amine Serghini, Les Polyphenols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae), Rev.Biol.Biotech. Vol.1, March 2004 pp 37-42.

I- Les composés flavoniques :

I-1 - Introduction :

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuellement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont : les flavones, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavone, les isoflavonones, les chalcones, les auronnes, les anthocyanes et les tanins [1]. Parmi toutes les molécules flavoniques, les flavonols sont considérés comme l'étendue la plus ancienne [2] (Stafford 1991).

Le terme « flavone » a été utilisé pour la première fois en 1895 par Von « Kostanecki » et « Tamber » qui étaient des pionniers dans le travail structural de cette classe particulière des flavonoïdes [3].

De nos jours, plus de 8000 flavonoïdes ont été identifiés [4]. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3.

figure -1- (Bruneton, 1999) [5].

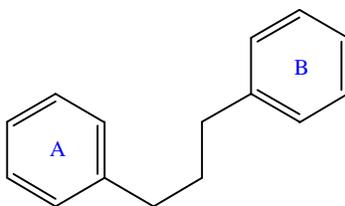


Figure-1- : Squelette de base des flavonoïdes

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoides sous forme de glycosides, une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone [5].

Les flavonoides sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, grains, et bois.

Certains flavonoides sont spécifiés à partir des tissus végétaux, les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles. Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, ce sont des pigments naturels au même titre que la chlorophylle (couleur verte) et les caroténoïdes (nuance jaune et orangée) [5].

Les flavonoides, en particulier les anthocyanes sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune orangé ou bleu, en passant par le pourpre et le rouge. Les flavones, auronnes et chalcones donnent plutôt des couleurs jaunes, beige voir blanches, en participant aux nuances produites par les anthocyanes et les caroténoïdes.

Un des rôles de la couleur chez les plantes est d'attirer les insectes et cela afin de déclencher la fécondation, les charger de pollen ou de grains de façon à en assurer la dissémination nécessaire à la reproduction de l'espèce [6].

Les flavonoides ont un impact considérable sur plusieurs aspects biologiques des plantes, ils exposent une grande gamme de fonctions dont : physiologique, biochimique et écologique, par exemple les flavonoides offrent a la plante une protection contre les rayons UV (Winkel-Shirley, 2001). En plus une des propriétés majeures des flavonoides est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs, or c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction.

On peut également noter que les flavonoides, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes.

Les flavonoides montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance, certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines ; c'est-à-dire les métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries [7].

Les composés flavoniques varient relativement au changement de la nature du cycle oxygéné non homogène (C) figure-2-, ils sont dérivés de l'un de ces composés : pyrylium, γ pyrone, pyrylium.

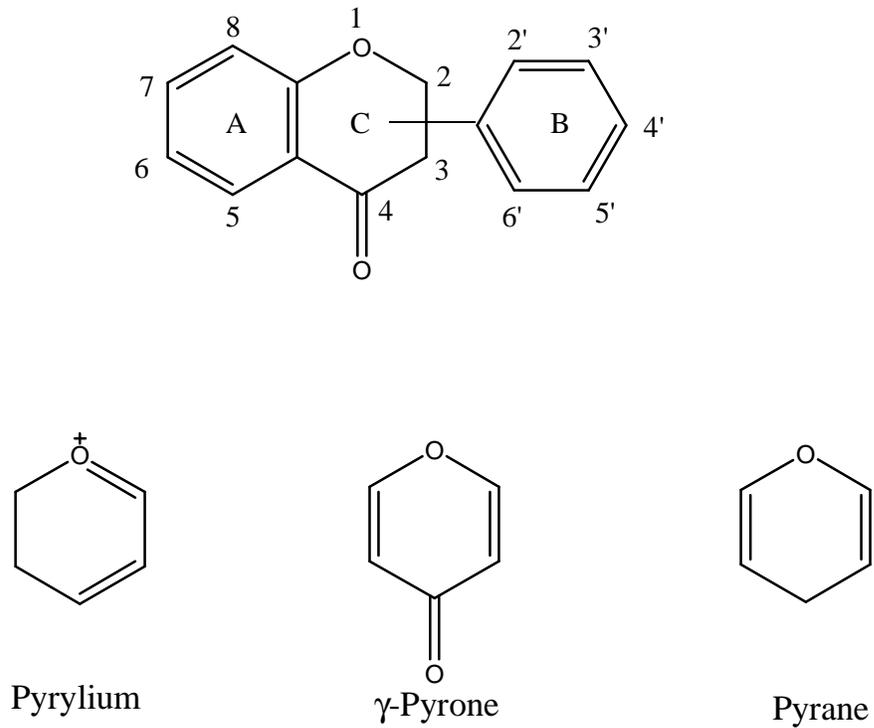
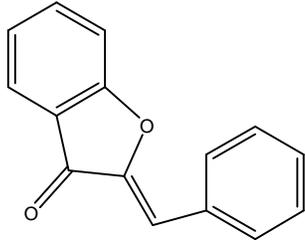
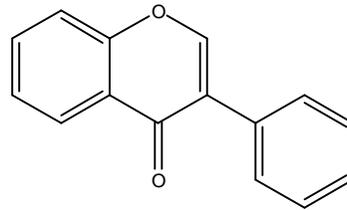


Figure-2-

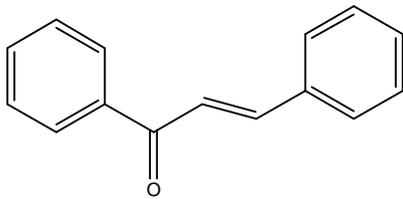
D'après le degré de l'oxydation du cycle (C), se forme le squelette flavonique qui est composé de plusieurs parties comme l'indique la figure-3- [8].



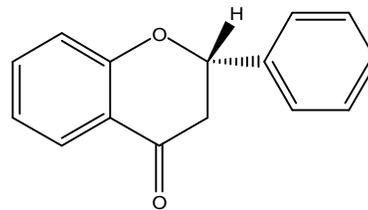
Aurone



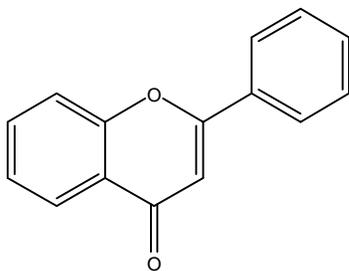
Isoflavone



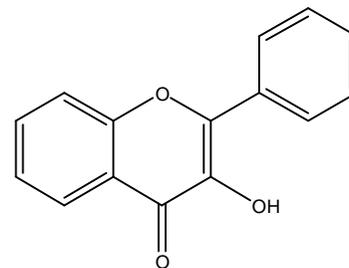
Chalcone



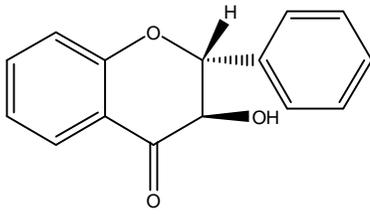
Flavanone



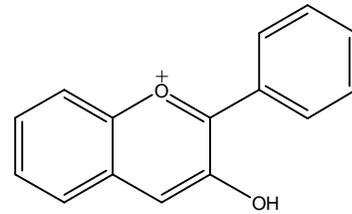
Flavone



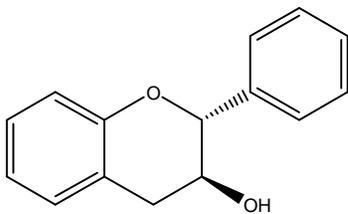
Flavonol



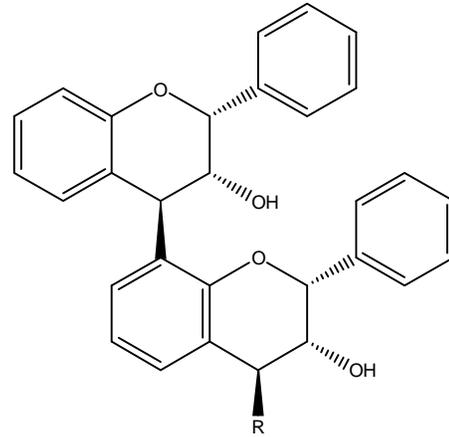
Flavanon-3-ol



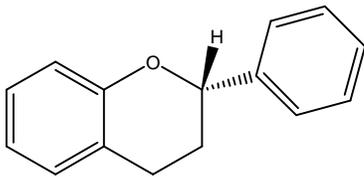
Anthocyanidin



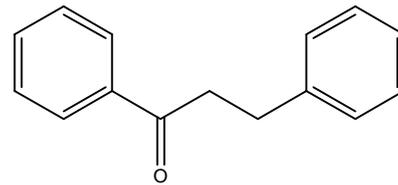
Flavan-3-ol



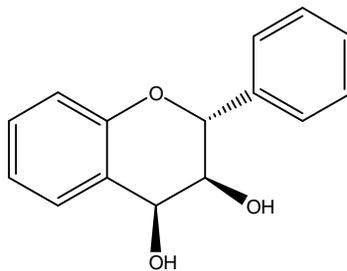
Proanthocyanidin



Flavane



Dihydrochalcone



Flavan-3,4-diol

Figure-3- : structures de base de principaux types de flavonoides

Parmi les différentes structures des flavonoides on observent une sous classe appelée les isoflavonoides. Ils forment une sous classe très large et très distinguée des flavonoides, ces composés très actifs se trouvent essentiellement chez la famille des fabales (les légumineuses) [9].

Ils jouent un rôle important sur la santé humaine (Davis et al., 1999; Dixon et Ferreira, 2002 ; Messinna, 1999), certains isoflavonoides fonctionnent comme des phytoalexines, synthétisées comme défense contre le stress (microorganisme infectieux, froid, UV), c'est aussi le seul groupe de flavonoides connus pour être hautement toxiques envers de nombreux insectes [10].

Structurellement les isoflavonoides se différencient des flavonoides par le positionnement du cycle (B) du squelette flavonique sur le carbone -3-. La figure-4- montre les principaux types d'isoflavonoides :

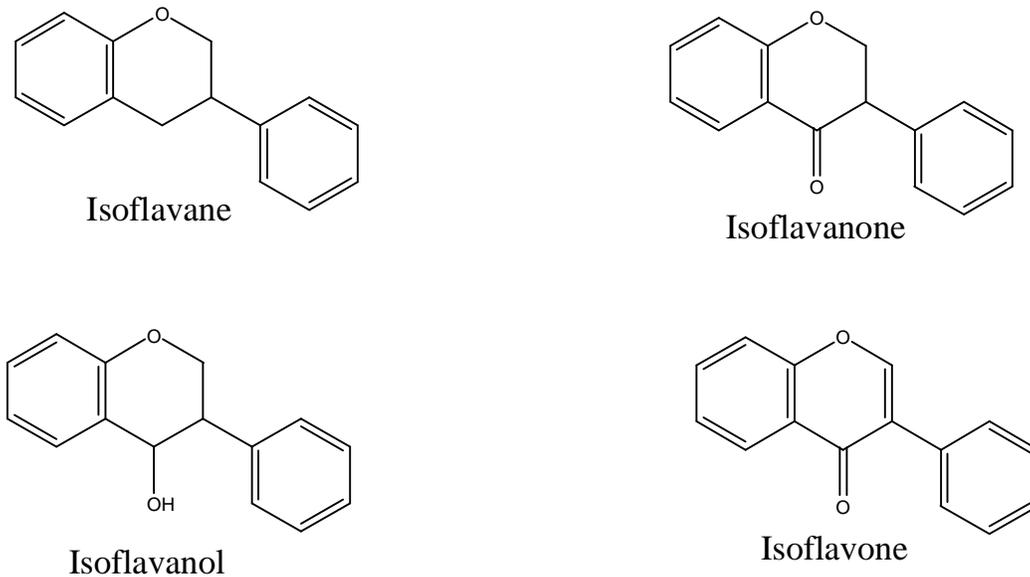


Figure-4-

I – 2 – Biosynthèse :

Vu l'importance des flavonoides et leur propagation de plus en plus étendue ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs : chimistes, biologistes et même des biogénéticiens qui ont accentué leurs recherches sur l'origine de l'évolution héréditaire de ces composés quand à leur biosynthèse dans les plantes.

I – 2-1 - Biosynthèse du squelette C6-C3-C6 :

Les études dans ce domaine ont fait des progrès , grâce à l'utilisation du C14 qui a montré que le chalcone synthase (CHS) est l'enzyme clé dans la biosynthèses des divers flavonoides [11] et que la biosynthèse passe par deux voies, la voie acétate et la voie shikimate.

Les expériences faites par le chercheur « Grisebach » en 1957 ont montré le rôle de l'acide acétique dans la formation du cycle A figure-5- et ceci dans l'étude de la biosynthèse du composé « cyanidine » dans la plante « le choux rouge » à partir de l'acétate irradié du groupe méthyle ou carbonyle[12][13].

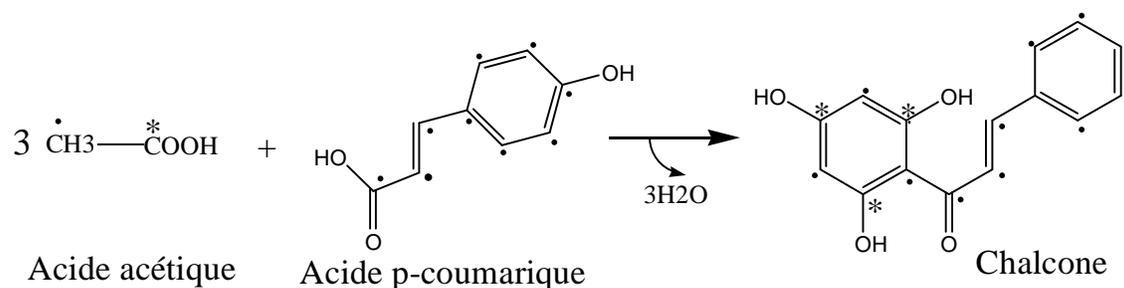


Figure-5- : formation du chalcone par la condensation de 3 molécules de l'acide acétique avec une molécule de l'acide para coumarique.

Le cycle (A) est formé par la condensation de trois unités d'acétate en forme de malonylcoA avec p-coumaroyl-coA figure-6-(Kreuzler and Hahlbrock, 1975; Heller and hahlbrock ,1980).

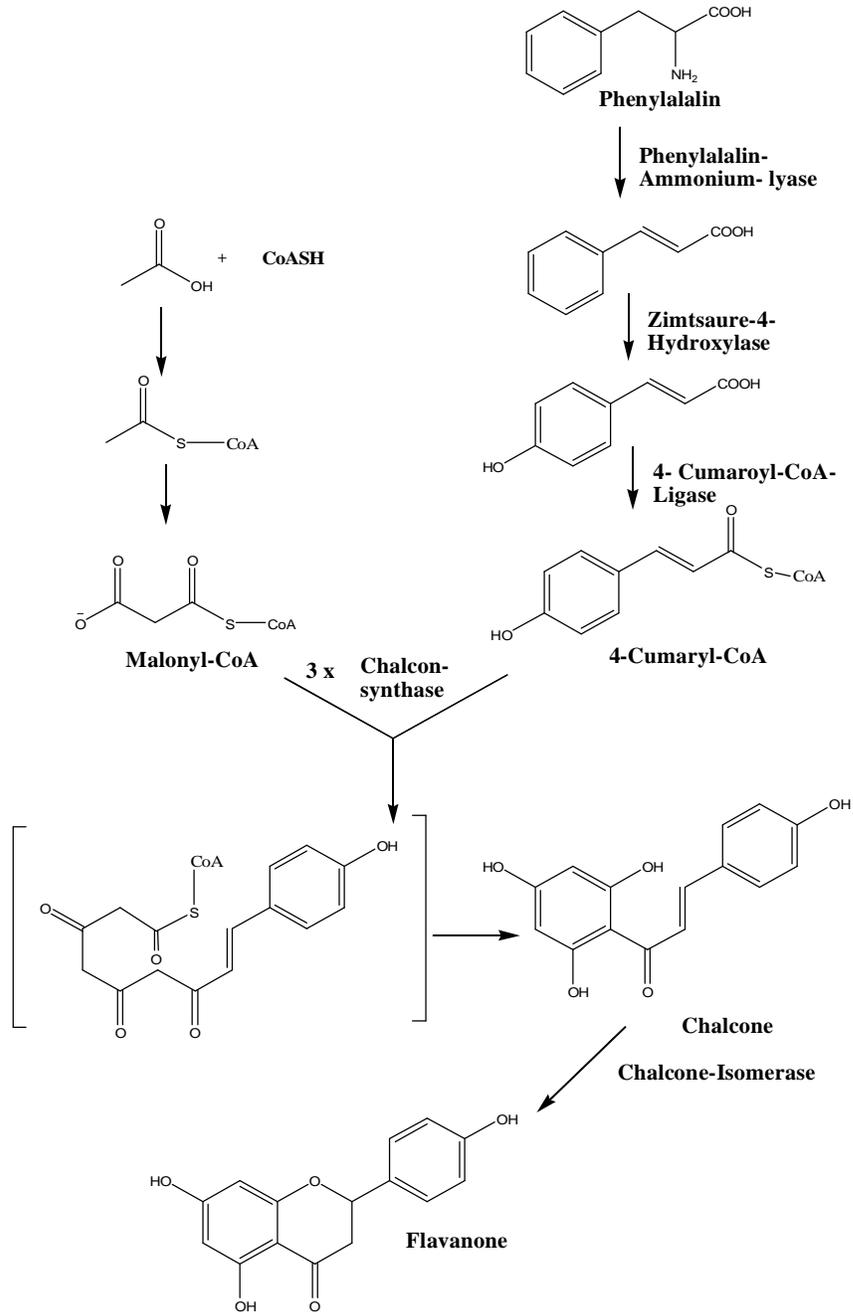


Figure-6- : condensation de trois molécules d'acétate avec le p- coumaroyl-CoA Pour la formation du chalcone et ses isomères.

Tandis que pour le cycle (B) les études faites par le chercheur « DAVIS » en 1955 sur la plante « Shikimi-no-ki » ont montré le rôle de L'acide Shikimic dans la formation du cycle (B) [14].

I- 2-2 - Biosynthèse des différents squelettes flavoniques :

Depuis la découverte de l'enzyme CHS qui a été isolée et caractérisée dans des différentes espèces de plantes, elle est devenue la cible attirante pour les généticiens qui cherchent en premier lieu à modifier la couleur des fleurs vers le blanc pur en bloquant la biosynthèse des flavonoides.

L'enzyme CHS catalyse progressivement la condensation de trois molécules de Malonyl CoA avec 4-coumaroyl en 4, 2, 4, 6 -tetrahydroxy-chalcone, cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme la chalcone isomérase, en flavone : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2S)-flavanone-3-hydroxylase pour donner la formation de la flavone apigénine ou le dihydroflavonol :(2R, 3R)-dihydrokaempférol, respectivement.

Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbone C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3. Le dihydroflavonol en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol : kaempférol ou en flavan-3,4-diol : leucoanthocyanidin, respectivement.

Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols et anthocyanidins. Cependant, les étapes ultimes de leur formation ne sont pas encore élucidées. Le pélagonidin, sous l'action de la 3-O-glycosyl-transférase se transforme en pélagonidin-3-glucoside figure-7-[15].

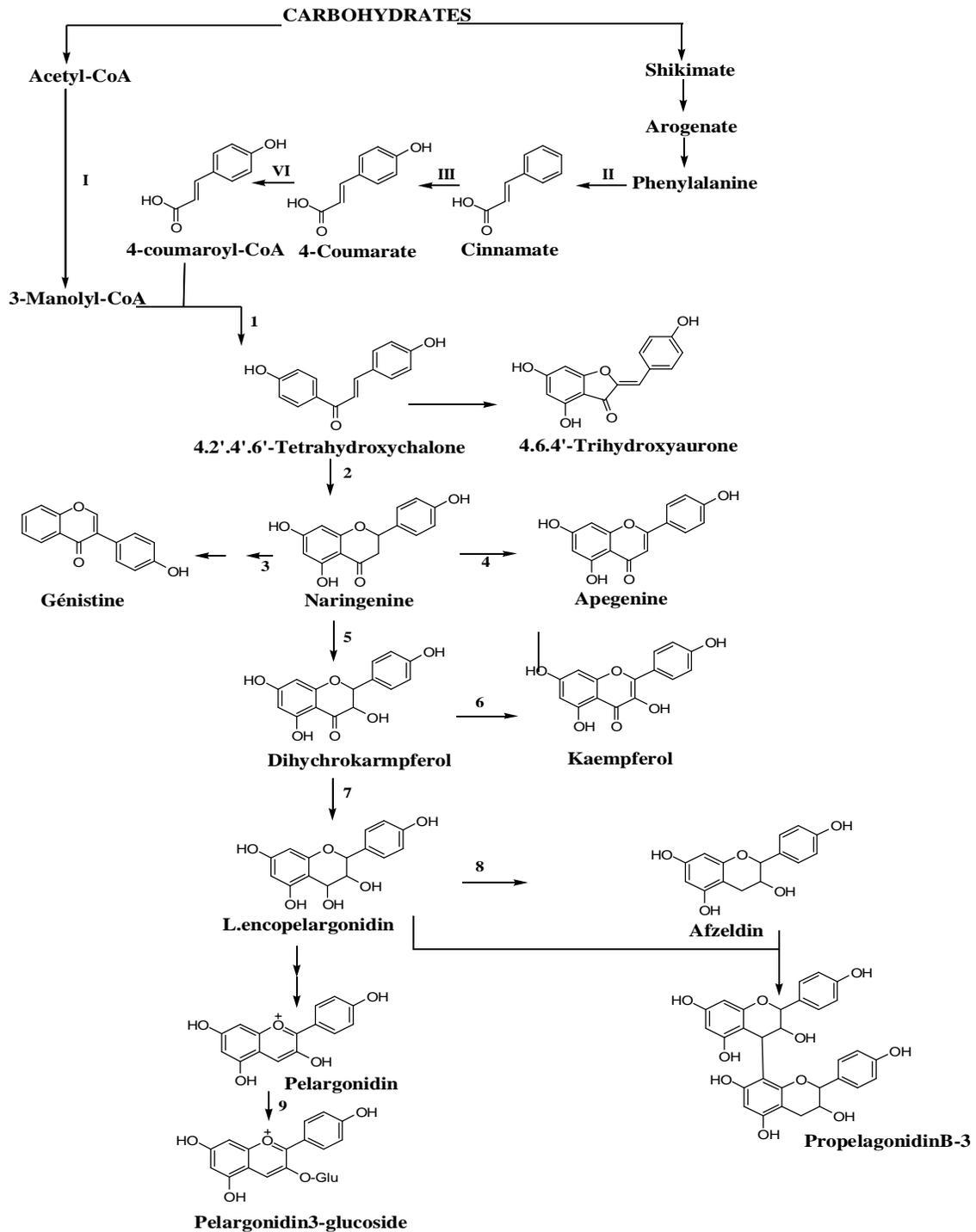


Figure -7- : Biosynthèse des différents squelettes flavoniques

Tableau-1- : Liste des enzymes rentrants dans la biosynthèse

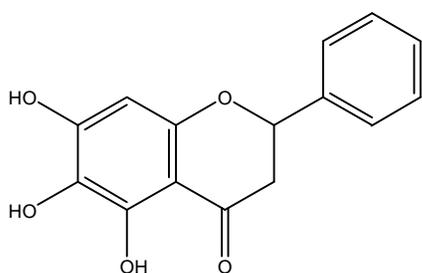
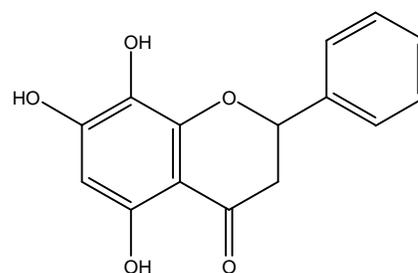
Nom des enzymes	Numéro d'enzyme
Acetyl-CoA carboxylase	I
Phenylalanine ammonia-lyase	II
Cinamate 4-hydroxylase	III
4-coumarate : CoA liase	IV
Chalcone synthase	1
Chalcone isomérase	2
2-hydroxyisoflavonesynthase	3
Flavone synthase	4
(2S) -flavone-3-hydroxylase	5
Flavonol synthase	6
Dihydroflavonol 4-reductase	7
Flavan-3 ,4-cis-diol 4-reductase	8
Anthocyanidin/ flavonol 3-O-glycosyltransferase	9

I- 3 - Substitution du squelette flavonique :

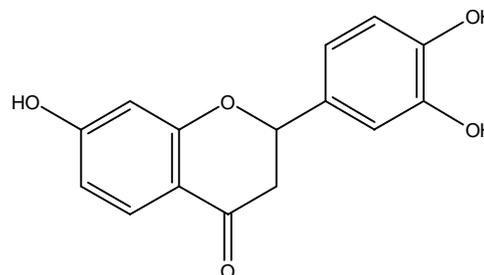
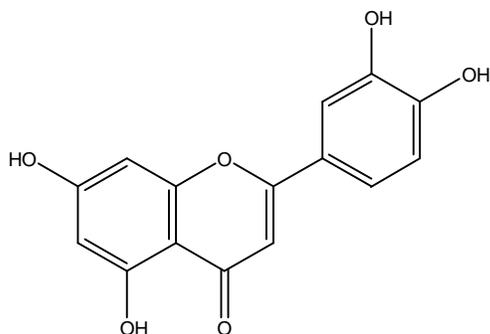
Les flavonoïdes se composent en sous classes, les composés variés de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire.

I- 3- 1- L'hydroxylation :

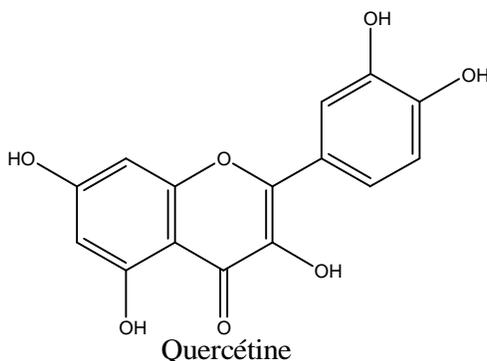
Dans plus de 90 % des cas, le cycle A des flavones et flavonols est substitué par deux hydroxyles en C5 et C7 et hydroxylé en position C'4 sur le cycle B, qui sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone [16]. D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables : hydroxyles en C6 et en C8, comme exemples les structures suivantes :

**Dihydrobaicaleine****Dihydronorwogonine**

D'autre part, dans plus de 80 % des cas, le cycle B est substitué en C'4 avant la formation du squelette chalcone ou disubstitué en C'3 et C'4, ou moins fréquemment 3', 4', 5'-trisubstitué, les autres positions C'2 et C'6 ne sont qu'exceptionnellement substituées , comme exemples les structures suivantes [17],[18]:



Pour le cycle (C) la substitution sera sur la position 3 qui donne la Quercétine comme exemple :



I- 3- 2- La méthylation :

La méthylation fait partie de la biosynthèse de plusieurs flavonoides, elle joue un rôle important dans la couleur de ces derniers, par exemple le groupe méthyle de l'anthocyanin donne la couleur des fleur (Harborne et Williams 2000).

La réaction de mythylation présente chez les plantes est catalysée par des méthyltransférases qui constituent une classe d'enzymes particulières, elles assurent la synthèse d'un grand nombre de molécules aux fonctions très variées, il existe plusieurs types de méthyltransférases. Pour les flavonoides, les O-méthyltransférases jouent le rôle de transportateur du groupe méthyle à partir de la S- adénosyl L-méthionine (SAM) comme donneur de méthyle, cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone.[19].

On note aussi les recherches faites par « Deluca » en 1984 qui a abouti à faire un schéma montrant les différentes étapes de la substitution du groupe méthyle sur le squelette flavonique figure-8-

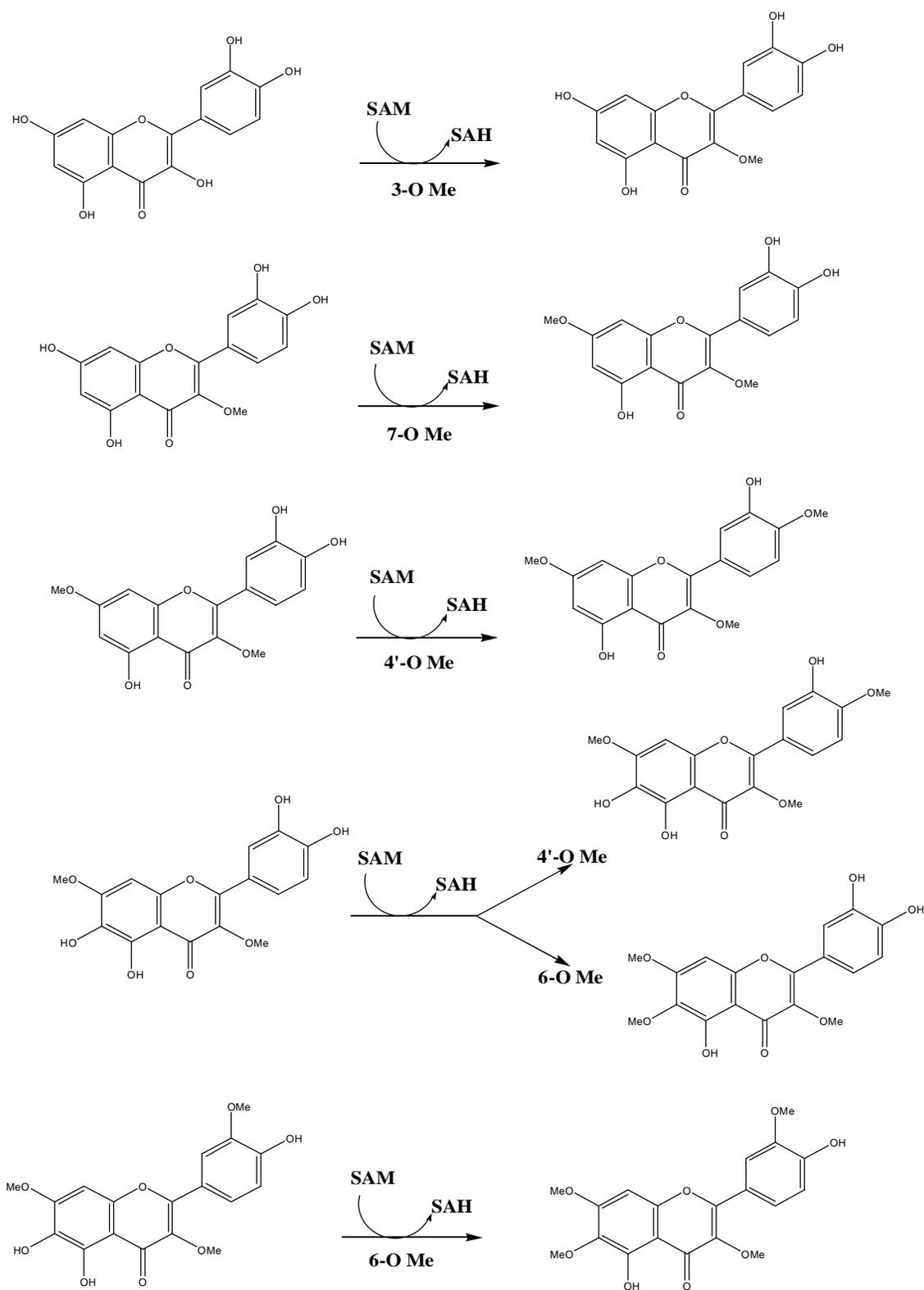


Figure-8- : substitution des groupes (OMe) d'après « DLUCA » en1984.

I- 3-3 - La glycosylation :

Par définition, c'est l'addition d'un sucre sur le squelette flavonique. Elle se fait dans la dernière phase de la biosynthèse des flavonoïdes grâce à l'enzyme O-glycosyltransférase, cet enzyme transfère le sucre de la UDP-glucose (Uridine diphosphate glucose) au groupe hydroxyl aglycone, par exemple : l'anthocyanidine avec un libre groupe hydroxyle à la position 3 est instable aux conditions physiologiques par conséquent il ne se trouve pas dans la nature sur cette forme (Forkmann and Heller 1999) .

La 3-O-glycosyl- transférase est considérée comme une enzyme indispensable dans la biosynthèse des anthocyanidins.

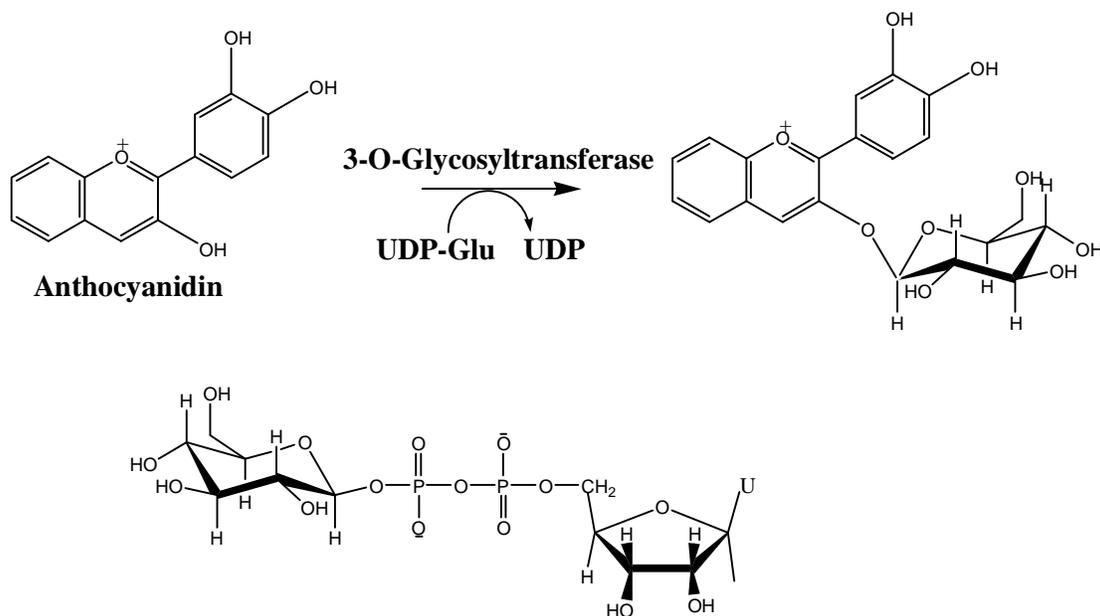


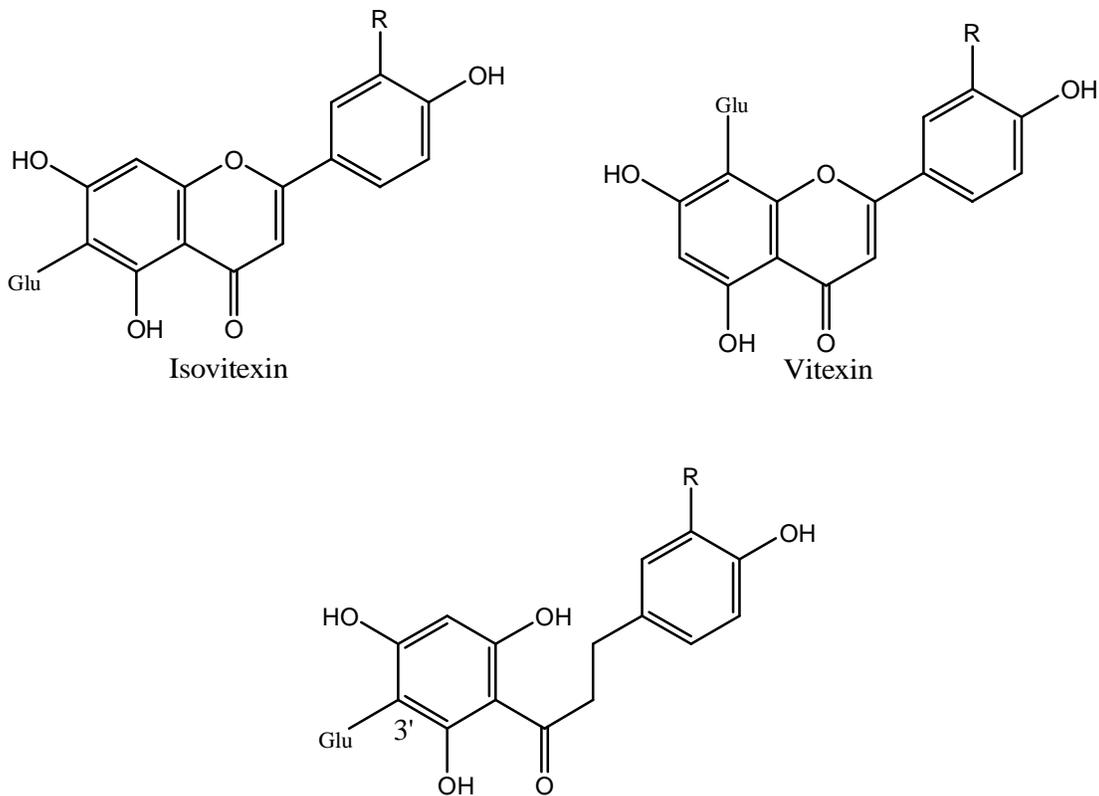
Figure-9- : substitution d'un sucre sur l'aglycone

On distingue deux types de glycosylation :

- La C- Glycosylation.
- La O- Glycosylation.

I- 3-3- 1- La C-glycosylation :

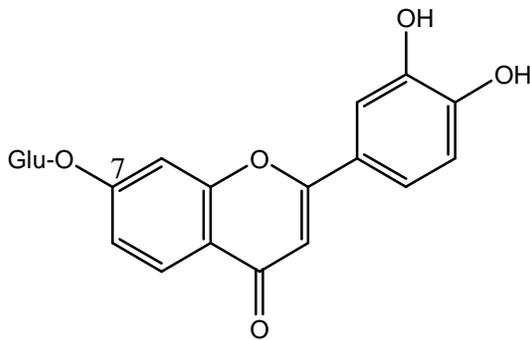
Dans ce type de composés, le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison C-C, d'une manière générale la C-glycosylation se positionne en C6 ou en C8. Pour exemple de ces composés la Isovitexin (6-C-glycosylflavone), la vitexin (8-C-glycosylflavone), Orientin et l'isoorientin [20].



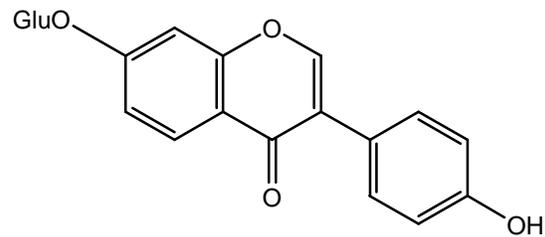
I- 3-3-2 - La O-Glycosylation :

Elle lie un hydroxyle du squelette flavonique avec un autre hydroxyle alcoolique du sucre (glucose...) en présence de l'enzyme Glycosyltransférase et la UDP-glu (Uridinediphosphateglucose)comme donneur du sucre .

Les structures suivantes montrent plusieurs positionnements de la O-glycosylation en 7-OH et 3-OH [21].



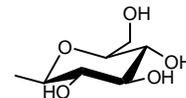
O-Glycosyl-flavone



O-Glycosyl-isoflavone

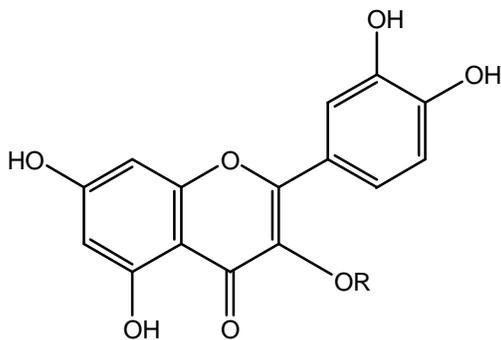
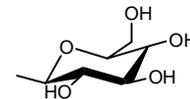
R=glucose

Isoquercitrin



R=galactose

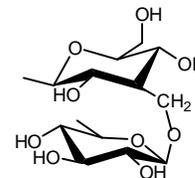
Hyperoside



O-Glycosyl-flavonol

R=rutinose

Rutin



Dans la nature on trouve souvent les flavonoïdes sous forme glycosylés avec des différents types de sucre comme : D-glucose, L-rhamnose, glucorhamnose, lignin et arabinose [22].

On peut aussi trouver des flavonoïdes biglycosylés, la figure-9- montre des exemples de ces structures [23].

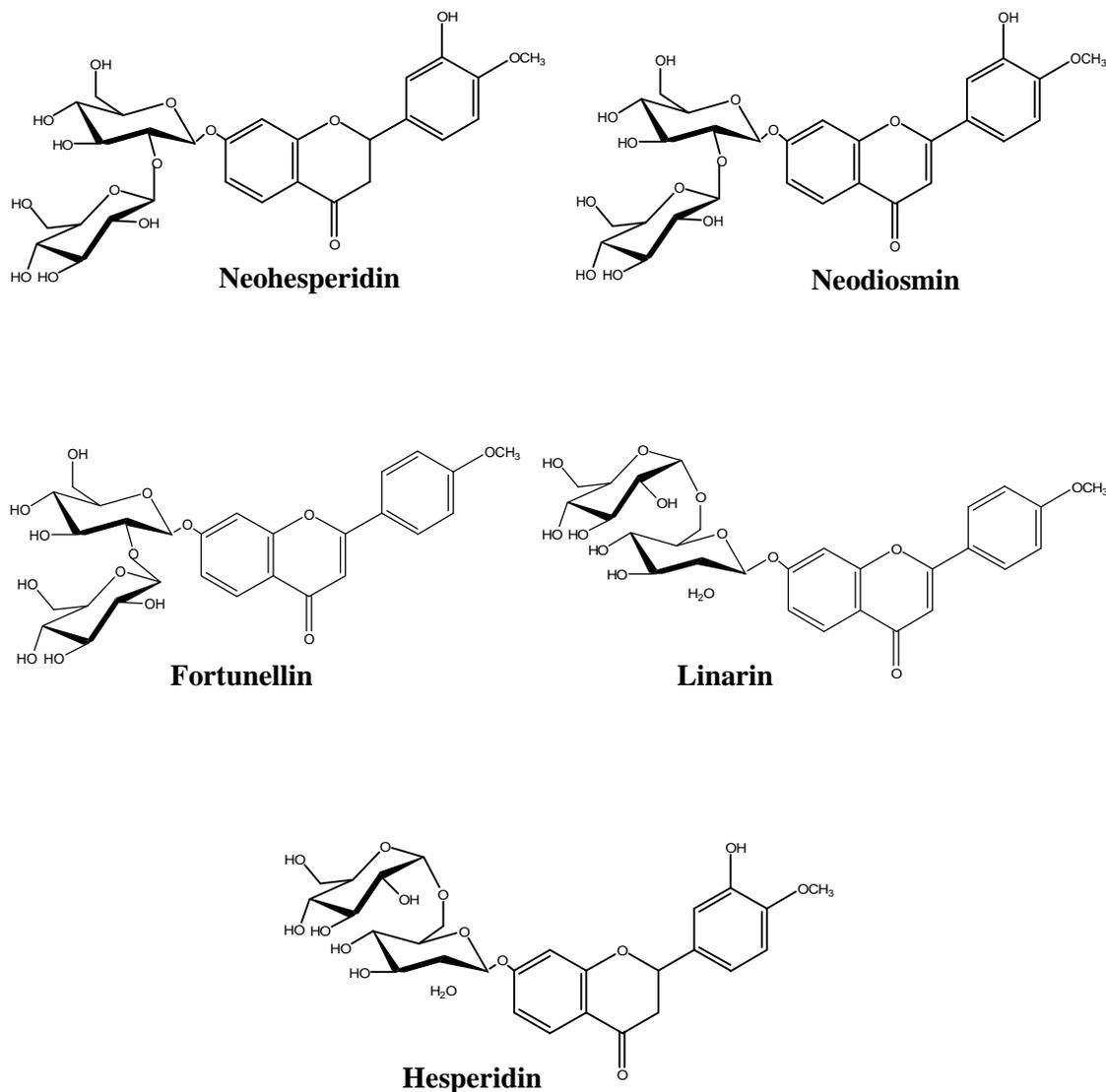


Figure-10- : structures biglycosylées

I- 4- L'intérêt des flavonoides :

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêt multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les flavonoides ; ils se sont surtout illustrés en thérapeutique comme anticancirogènes, anti-inflammatoires, antitumoraux et antioxydants (Bahorun, T 1995) [24]. On peut classer l'intérêt des flavonoides en deux rôles :

I- 4-1- Le rôle biologique et physiologique :

Des travaux plus anciens (Nitsch et Nitsch 1961 ; Alibert et al. 1977) ont montré que les flavonoides seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogène, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation.

Ils déterminent également la saveur des fruits : les flavones sont responsables de l'amertume des citrus et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée (Dubois et al, 1977), les tanins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non murs [24].

Les flavonoides jouent un rôle important dans la croissance et le développement des plantes, ils protègent les plantes contre l'attaque des micro-organismes et les parasites [25] et ceci par leur couleur et odeur qui servent comme communicateurs avec l'environnement [26], ils exercent un effet attracteur sur les oiseaux , les insectes et les animaux qui contribuent à la dispersion des grains des plantes et assurent la reproduction des plantes [24], tandis qu'ils peuvent repousser certains insectes par leur goût désagréable.

Les flavonoides offrent à la plante une protection contre les rayons ultra violets (Winkel – Shirley, 2001).

Les flavonoides sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques, par exemple : le fer (Fe^{+2}) et le cuivre (Cu^{+}) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques comme constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant par exemple le Fer pour la catalase, le Cuivre et le Zinc pour la superoxyde dismutase (Morris, 1995 ; Brown, 1998).

On peut résumer les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sur la figure suivante :

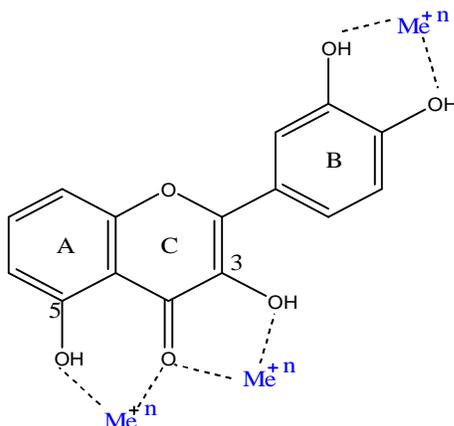


Figure-11 - sites proposés pour la chélation des ions métalliques

Piégeage des radicaux libres. De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoides et leur capacité de piéger les radicaux libres (Jovanovic , 1994 ; Van acker 1996...).

Les recherche faites par « Rice-Evans » et ses collaborateurs ont développé un test basé sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical cation chromophore, acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS*) (Rice-Evans,1996). L'activité des flavonoides est comparée avec celle du Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) et exprimée en TEAC (Trolox -EquivalentAntioxydant Capacity), il est a noter que plus la valeur de TEAC est élevée plus la molécule est active. Afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante, la figure suivante montre les sites essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoides.

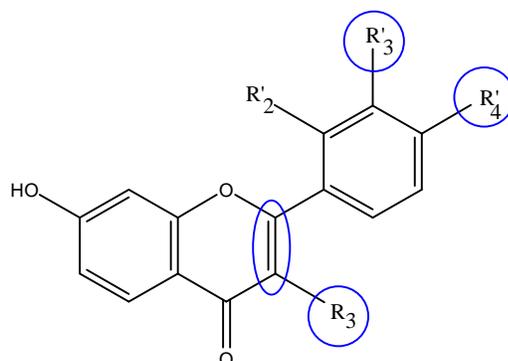


Figure-12 - Éléments essentiels pour l'activité antioxydante.

I- 4- 2- Le rôle thérapeutique :

De plus en plus, les flavonoides deviennent le principal sujet médical de recherche, ils ont été rapportés pour posséder plus d'utilité dans les activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancéreuses.

I- 4- 2 -a- Effets antiallergiques :

Les flavonoides sont aussi connus pour leurs effets anti-allergiques, ces effets sont attribués à l'influence des flavonoides sur la production d'histamine, en fait les flavonoides inhibent les enzymes qui augmentent l'apparition de l'histamine dans les cellules mastocytes et des basophites, par exemple l'ATP ase Ca⁺² dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules.

Pour exemple le flavonoïde isolé par le chercheur « Khelin » des fruits de la plante égyptienne « Amuni visnaga » a été utilisé pour le traitement d'asthme et d'autres troubles [40]. Une autre étude a montré que la quercétine a un potentiel d'action supérieur à celui du cromolycate de sodium de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme [27].

I- 4- 2 -b- Effets anticancéreux :

Beaucoup de chercheurs ont conduit dans leurs études sur l'activité de l'antitumeur potentielle des flavonoïdes pour exemple : l'activité antitumeur de la catechin, flavanol présent dans le thé vert et d'autre plante comme *l'areca catechu*, *la crataegus oxyacantha*, *la cinnamomum cassia*, *la polygonum multiflorum*, et *la rheum palmatum*.

Ce flavonoïde particulier a inhibé l'invasion de tumeur et il a été suggéré que l'activité de la catechin peut être en rapport avec sa capacité de lier le tissu type plasminogen activator (t-PA) à laminin, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important pendant l'adhésion de la cellule concérigène, mène à une inactivation partielle de La t-PA [28-29].

Quelques flavonoïdes (quercetine, epigallocatechine) et l'extrait du thé vert inhibent l'augmentation de la tumeur en stoppant quelques phases du cycle cellulaire et en bloquant le récepteur ou revalisant la place de l'hormone récepteur [30-31].

En plus des chercheurs ont montré que la tricine et le Kaempferol-3-0- β -D-glycopyrunoside qui sont isolés de la plante médicinale chinoise traditionnelle le « Wikstroemia-indica » ont une activité anti-leucémiques, en outre, les études épidémiologiques ont indiqué qu'un régime alimentaire contenant les grains de « Lin » et de « soja » (riche en isoflavonoïdes) peut protéger contre le cancer du colon, de la poitrine et de la prostate.

I- 4- 2 -c- Effets anti-inflammatoires :

Les recherches faites par « Landolfi et al » ont montré que beaucoup de flavonoïdes étudiés étaient capables de modifier le métabolisme d'acide arachidonique dans les plaquettes pour donner la prostaglandine et le leucotriènes induisant des phénomènes inflammatoires. Ce groupe a aussi montré que quelques flavonoïdes tels que la myricétine et la quercétine bloquent la cyclooxygénase et la lipooxygénase avec une forte concentration de ces deux flavonoïdes, en outre d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase [32].

I- 4- 2 -d- Effets anti-ulcéreux :

Dans des expériences réalisées sur les rats, il a été démontré que la quercétine et la nargénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques.

Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production de leucotène (Dicrlo, 1999).

I- 4- 2 -e- D'autres effets biologiques :

Les flavonoides peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase [33]. Les chercheurs « Ong » et « Khoo » ont reporté que la myricétine et d'autres flavonoides réduisent le risque des maladies cardiovasculaires [34], plusieurs flavonoides exercent des effets de l'anti-aggrégatory à travers l'inhibition de la phosphodiesterase [32]. Des propriétés antivirales et antimicrobiennes ont aussi été démontrées [35,36].

Le tableau suivant résume les effets potentiels de quelques flavonoides sur les animaux et les humains [37].

Tableau-2- : Effets potentiels de quelques flavonoides

Analgesic : Hesperidin Khellin Quercetin	Anti-inflammatoire : Apigenin Chrysin Gossypin Hibrifolin Hypolaetin-8- β -D- glucoside Luteolin Myricetin Neptine Quercetin Quercitrin Sidertoflavanone
Antianginous : Isoflavone	Antiosteoporotic : Ipriflavone
Antitherogenic : Quercetin	Antispasmodic : Apigenin Catchin Chrysin Flavone Kaempferol Quercetin
Anticancer : Bacalein Catechin Epigallocatechin Kaempferol-3-O- β -D-glucopiranoside Nobiletin Quercetin Rutin Tangeretin Tricin Woogonin	Antiulcer : Flavanone Flavone Kaempferol Quercetin Rutin
Antidibetic : Quercetin	
Vascular protection : Anthocyanidine Citrin Rutoside	

II- L'étude structurale des composés flavoniques :

L'identification des structures flavoniques est basée sur plusieurs techniques chromatographiques et spectroscopiques telles que [1] :

- La fluorescence sous lumière de Wood.
- Facteur de retardement Rf.
- La résonance magnétique nucléaire (RMN ; H¹, C¹³).
- La spectrométrie de masse (SM).
- La spectrophotométrie UV-Visible.

II- 1- Propriétés chromatographiques :

II- 1-1- Fluorescence sous lumière de Wood :

L'absorption des substances flavoniques sous lumière de Wood donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique. Le tableau suivant montre la relation fluorescence – structure [2].

Tableau-3- : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.

La fluorescence	Les structures possibles
Violette noire	Flavones avec 5, 6,7 ou 5, 7,8 trihydroxy flavone Flavonol avec 3-OR Chalcones
BLEUE	Flavone ou flavonol sans OH en5 Flavanone avec OH en3 ou flavonol Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

II- 1-2- Facteur de retardement Rf :

Ce facteur est défini par l'équation suivante [2] :

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance parcourue par le front de solvant}}$$

La valeur du Rf varie avec la nature du couple d'éluant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose, papier) et la forme du produit lui-même (aglycone ou glycosyle) ainsi que la disposition des différents substituants [3].

Le tableau suivant montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du Rf.

Tableau-4- : La relation entre le Rf et la structure flavonique

Structure flavonique	Rf
Augmentation des groupes hydroxyles	Rf diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux.
Méthylation des hydroxyles	Rf augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvants aqueux.
Glycosylation	Rf diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvants aqueux.

II-2- La spectrophotométrie UV :

C'est la méthode la plus utilisée pour l'identification des structures flavoniques. Elle est basée sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanolique) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales [4].

Le spectre sera ensuite modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que : NaOH, NaOAc, AlCl₃, H₃BO₃ et HCl. Ces derniers donnent des informations sur la structure du composé à travers leur réaction avec les groupements hydroxyles, cela se traduit sur le spectre UV par des déplacements bathocromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption.

Spectre d'absorption en milieu méthanolique :

Le spectre d'absorption UV pris dans le milieu méthanolique MeOH se compose de deux bandes d'absorption [4] :

Bande I : Ayant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoylé qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2-C3) et le noyau (B). Elle donne donc des renseignements sur la variation structurale du cycle B et l'hétérocycle C.

Bande II : Ayant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoylé qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [4],[1].

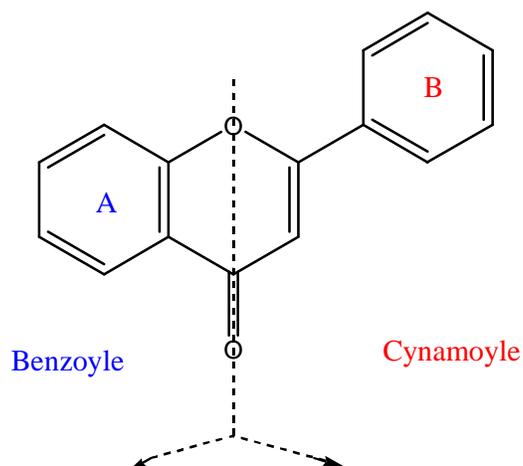


Figure-13- : Conjugaison du groupement carbonyle avec les cycles A et B.

Le maximum d'absorption des deux bandes I et II du spectre pris dans le milieu méthanolique dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles ou méthoxyles sur le squelette flavonique[5].

L'augmentation du nombre des groupements hydroxyles fait déplacer le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevés, par contre la substitution des groupements méthoxyles ou glycosyles fait déplacer ce maximum vers des longueurs d'onde plus faibles. Le tableau suivant donne la relation entre le maximum d'absorption en UV et le type des flavonoïdes.

Tableau-5- : Relation entre le maximum d'absorption
en UV et le type de flavonoïdes

Type de composé flavonique	Bande I	Bande II
Flavone	320-350	250-270
Flavonol	352-385	250-280
Flavanone	300-330	245-275
Isoflavone	300-330	245-275
Chalcone	340-390	230-270
Aurone	380-430	230-270
Anthocyanidin	465-560	270-280

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique peut être modifié par l'addition de certains réactifs tels que : NaOH, NaOAc, AlCl₃, H₃BO₃ et HCl, qui permettent la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique.

Spectre d'absorption en présence de 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 flavonoïdes ayant un hydroxyle libre en 4' [2].

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. L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH indique l'existence d'un OH libre en 7.

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

Spectre d'absorption en présence de NaOAc :

NaOAc, base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soient les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH et elle ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7. Ceci se traduit par le déplacement sur la bande II [6].

Spectre d'absorption en présence de H₃BO₃ + NaOAc :

L'acide borique (H₃BO₃) forme en présence de NaOAc un complexe avec les hydroxyles phénolique dans la position ortho du cycle B (3',4') [2].

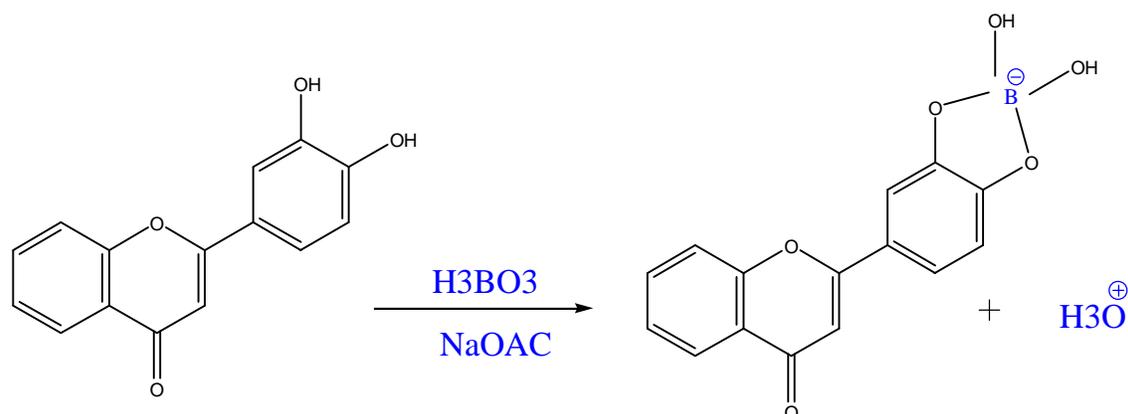


Figure-14- : le complexe formé par le flavonoïde et le mélange ($NaOAc + H_3BO_3$)

Spectre d'absorption en présence de $AlCl_3$ et $AlCl_3 + HCl$:

$AlCl_3$ forme avec le carbonyle C4 et l'hydroxyle des positions C3 ou C5 des complexes qui se traduisent par un déplacement bathochrome de la bande I. Ces complexes sont stables en présence de HCl , par contre ils forment des complexes instables avec les groupes ortho dihydroxyles des noyaux aromatiques A et B et se décomposent en présence de HCl .

La figure-14- montre l'explication précédente [7], [8].

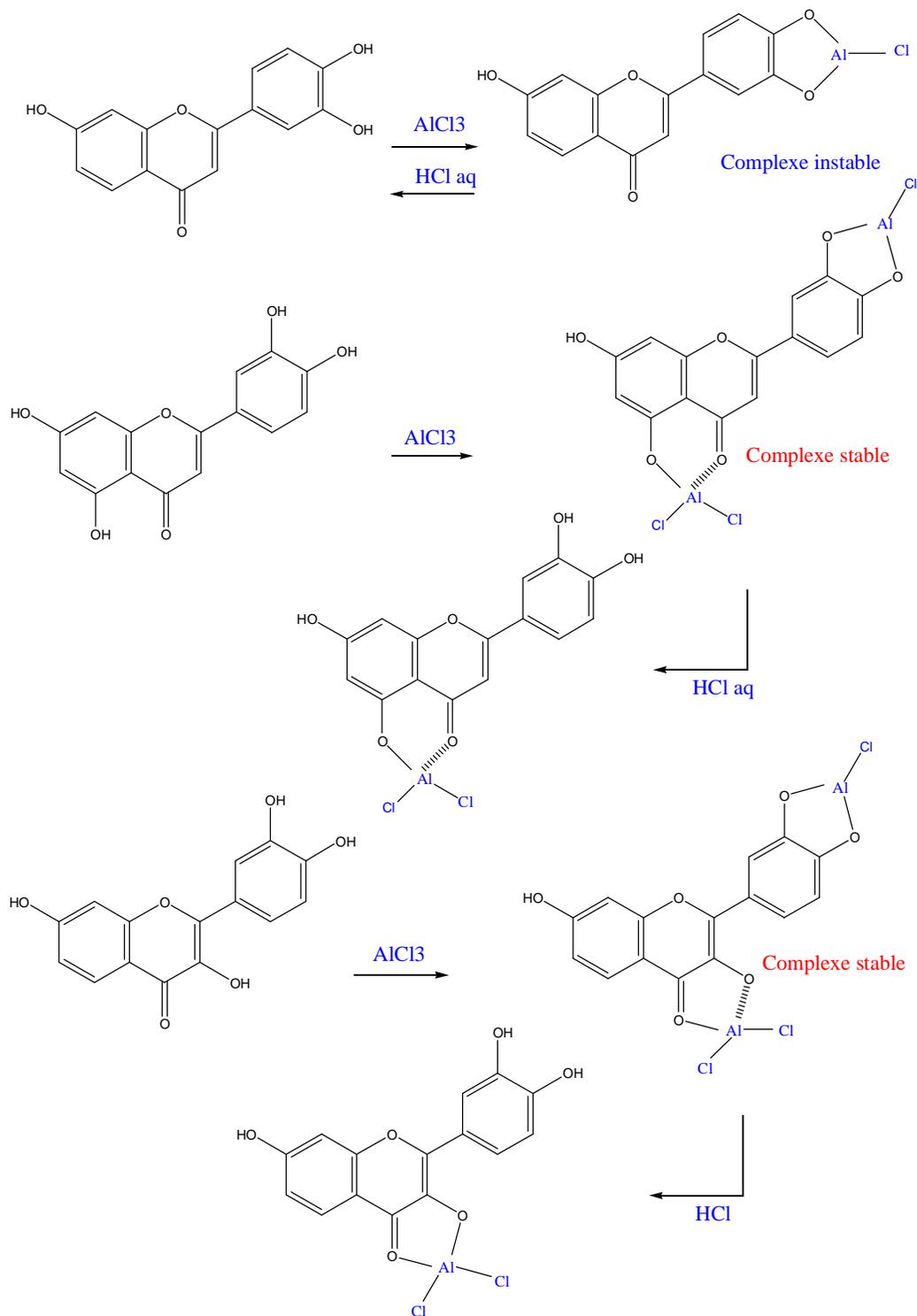


Figure-15- : formation des complexes après addition de AlCl_3 et en présence de HCl

Le tableau-6 suivant résume les effets des réactifs sur le spectre UV : [1], [4].

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		4'-OH
	+50 à 60 avec diminution d'intensité		3-OH et 4'OR
	Faible déplacement avec diminution d'intensité		4'-OR
	Apparition d'une 3ème bande entre BI et BII		7-OH
	Absence de bande entre 320-335		7-OR
	Transformation de bande I en une Inflexion.		5-OH (seul hydroxyle libre)
AlCl ₃ / MeOH	+20 à 45		5-OH
	+60		3-OH
AlCl ₃ + HCl/ AlCl ₃	-30 à -40		Ortho di OH sur le noyau B
	-20 à -25		Ortho di OH sur le noyau A (en plus ortho di OH sur le noyau B)

AlCl ₃ + HCl/ MeOH	+35 à 55	5-OH
	+17 à 20	5-OH (avec 6-oxygénation)
	+50 à 60	3-OH ou 3-OH et 5-OH
NaOAc/ MeOH	+5 à 20	7-OH
	Déplacement très faible	7-OR
	Diminution d'intensité avec le temps	6,7; 7,8 ou 3',4'di OH
	Le spectre se décompose avec le temps	5, 6,7 ; 5, 7,8 ou 3, 3',4'-tri OH
NaOAc+ H ₃ BO ₃	+12 à 36	3',4' di OH
	+5 à 10	6,7 ou 7,8 di OH

II- 3- La résonance magnétique nucléaire :

L'analyse par RMN est devenue aujourd'hui une méthode de routine pour les études de la détermination structurale des composés naturels.

De nombreux noyaux atomiques peuvent être détectés par la technique de RMN, les noyaux les plus utilisés sont le proton (H^1), le carbone (C^{13}) en plus le phosphore (P^{31}), l'azote (N^{16}), le sodium (Na^{23}), le potassium (K^{39}) et le fluor (F^{19}) (Fan 1996) [9].

II- 3- 1- La RMN du proton (RMN- H^1) :

La RMN- H^1 comparée à la RMN- C^{13} est plus sensible. Le proton est présent à 99.9 % dans la nature, tandis que l'abondance naturelle du C^{13} est seulement de 1.1 %. Tous les métabolites organiques qui contiennent des H^1 sont susceptibles de donner des signaux.

Le spectre RMN- H^1 des composés flavoniques donne des informations sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 PPM et il permet de connaître [9] :

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

Le tableau suivant montre le déplacement chimique des différents protons du cycle A et B du squelette flavonique.

Tableau-7- : déplacement chimique des protons du cycle (A) :

Type de flavonoïde	H-5 δ ,ppm (J ;Hz)	H-6 δ ,ppm (J ;Hz)	H-8 δ ,ppm (J ;Hz)
5,7-OH	-	6.0-6.2 (d ; 2.5)	6.3-6.5 (d ; 2.5)
5-OH ; 7-OR (R=Glu)	-	5.9-6.1 (d ; 2.5)	6.1-6.4 (d ; 2.5)
5, 6, 7-OR (R=H, Glu)	-	-	6.3 (S)
5, 7, 8-OR (R=H, Glu)	-	6.3(S)	-
7-OR (R=H, Glu)	8.0 (d ; 9)	6.7-7.1 (dd ; 9 ; 2.5)	6.7-7 (d ; 2.5)

Tableau-8- : déplacement chimique des protons du cycle (B) :

Type de Flavonoïde	(H-5' / H-3') δ,ppm (J ;Hz)	(H-2' / H-6') δ,ppm (J ;Hz)
Flavone (4'-OR)	6.5-7.1 (d ; 8.5)	7.7-7.9 (d ; 8.5)
Flavonol (4'-OR)	6.5-7.1 (d ; 8.5)	7.9-8.1 (d ; 8.5)

Type de Flavonoïde	H-2' δ,ppm (J ;Hz)	H-6' δ,ppm (J ;Hz)
Flavone (3',4'-OH ; 3'-OMe; 4'-OH; 3'-OH; 4'-OMe)	7.2-7.3 (d;2.5)	7.3-7.5 (dd;8.5;2.5)
Flavonol(3',4'-OH ; 2'-OH; 4'-OMe)	7.5-7.7 (d;2.5)	7.6-7.9 (dd;8.5;2.5)
Flavonol (3',4'-OH ; 3'-OH; 4'-OMe)	7.5-7.7 (d;2.5)	7.6-7.9 (dd;8.5;2.5)

Les protons du cycle (C) :

Le proton H3 des flavone donne un singulier entre 6.2 et 6.4 ppm.

Les protons des substituant méthoxyles :

Un ou plusieurs méthoxyles donnent des singuliers entre 3.8 et 4.5 ppm.

Les protons des sucres :

Le déplacement chimique du proton anomérique H^{1''} des sucres est lié à la position et la nature de la liaison entre le sucre et l'aglycone qui peut exister en deux genres : O-glycosyl ou C-glycosyl.

Le tableau suivant donne les valeurs du déplacement des protons anomériques de quelques glycosides :

Tableau-9- : Les valeurs du déplacement chimique de quelques sucres dans le DMSO :

H-1'' (δ,ppm)	Nature de sucre
5.25-5.56	3-O-β-D-Glucoside
5.60	3-O-β-D-Galactoside
5.48	3-O-β-D-Glucuronide
5.37	3-O-β-D-Xyloside
5.31	3-O-α-L-Rhamnoside
5.00	4'-O-β-D-Galactoside
4.64-4.88	8-C-β-D-Glucoside
4.85-5.26	6-C-β-D-Rhamnoside

La valeur de la constante de couplage entre les protons H-1" et H-2" des glycosides monosacarides sert à identifier la nature de la liaison α ou β entre le sucre et l'aglycone.

Par exemple pour le sucre glucose qui forme une liaison β , le H-1" donne un doublet avec une constante de couplage $J=7\text{Hz}$ due à un couplage diaxial avec le H-2".

Dans le cas du sucre Rhamnose qui forme une liaison α , la valeur de la constante de couplage $J=2\text{Hz}$ due à un couplage eq- eq entre H-1" et H-2"

Toutefois on peut l'identifier à travers le doublet du groupe méthylrhamnose qui se positionne entre 0.8-1.2 ppm avec une constante de couplage $J=6\text{Hz}$ [1].

II- 3- 2- La RMN du carbone (RMN- C^{13}) :

Elle donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telle que : [1], [10].

- Le nombre total des atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement.
- La connaissance du type des liaisons -C ou -O des sucres.

Le tableau suivant donne les plus importants déplacements de quelques atomes de carbone.

Tableau-10 : déplacements chimiques de quelques carbones :

Déplacement chimique (ppm)	Nature du carbone
7-22	Aromatique C-CH ₃
59-63	Aromatique O-CH ₃ orthodisubstitué
58-59	3-Méthoxyflavone (3-OCH ₃)
56-78	Sucre CH ₂ -OH, CH-OH, C-glycoside
90-110	5,7-Dihydroxyflavonoïde (C ₆ -C ₈)
90-135	Flavone (C-3)
135-144	Flavonol (C-3)
	3-Méthoxyflavone(C-3)
136-158	Flavonol(C-2)
	3-Méthoxyflavone(C-2)
155-168	Flavone(C-2)
172-186	Flavone(C-4)
	Flavonol(C-4)
	3-Méthoxyflavone(C-4)

II- 4- La spectrométrie de masse :

Cette technique permet la détermination du pic moléculaire des aglycones qui donne globalement le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles. Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements utiles, notamment sur les structures de substitution des noyaux A et B [11,12].

Il existe différentes techniques en spectrométrie de masse dont les plus utilisées sont :

- Spectrométrie de masse à impact électronique :

C'est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée, le principe de cette technique consiste à volatiliser la molécule par chauffage sous vide et à bombarder cette vapeur.

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

Cette technique permet de connaître la nature des sucres, des molécules hétérosidiques polaires peu volatiles.

- Spectrométrie de masse electrospray (ES) :

C'est une technique d'ionisation douce, plus récente que la FAB.

L'ionisation par ES dans le cas des flavonoïdes permet d'accéder à la masse moléculaire des molécules peu volatiles et à structure fragile.

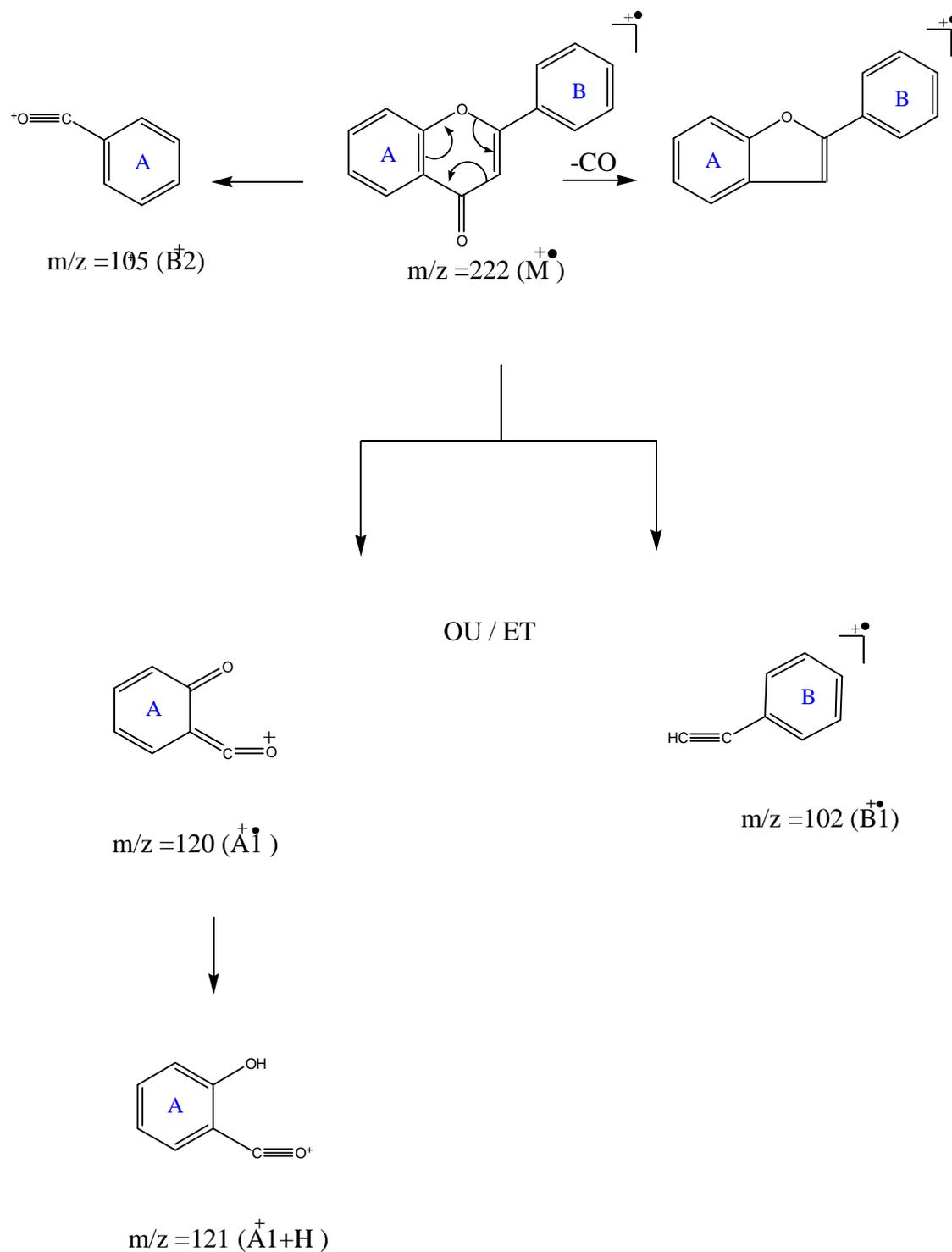


Figure -16- Principales ruptures sur le flavone.

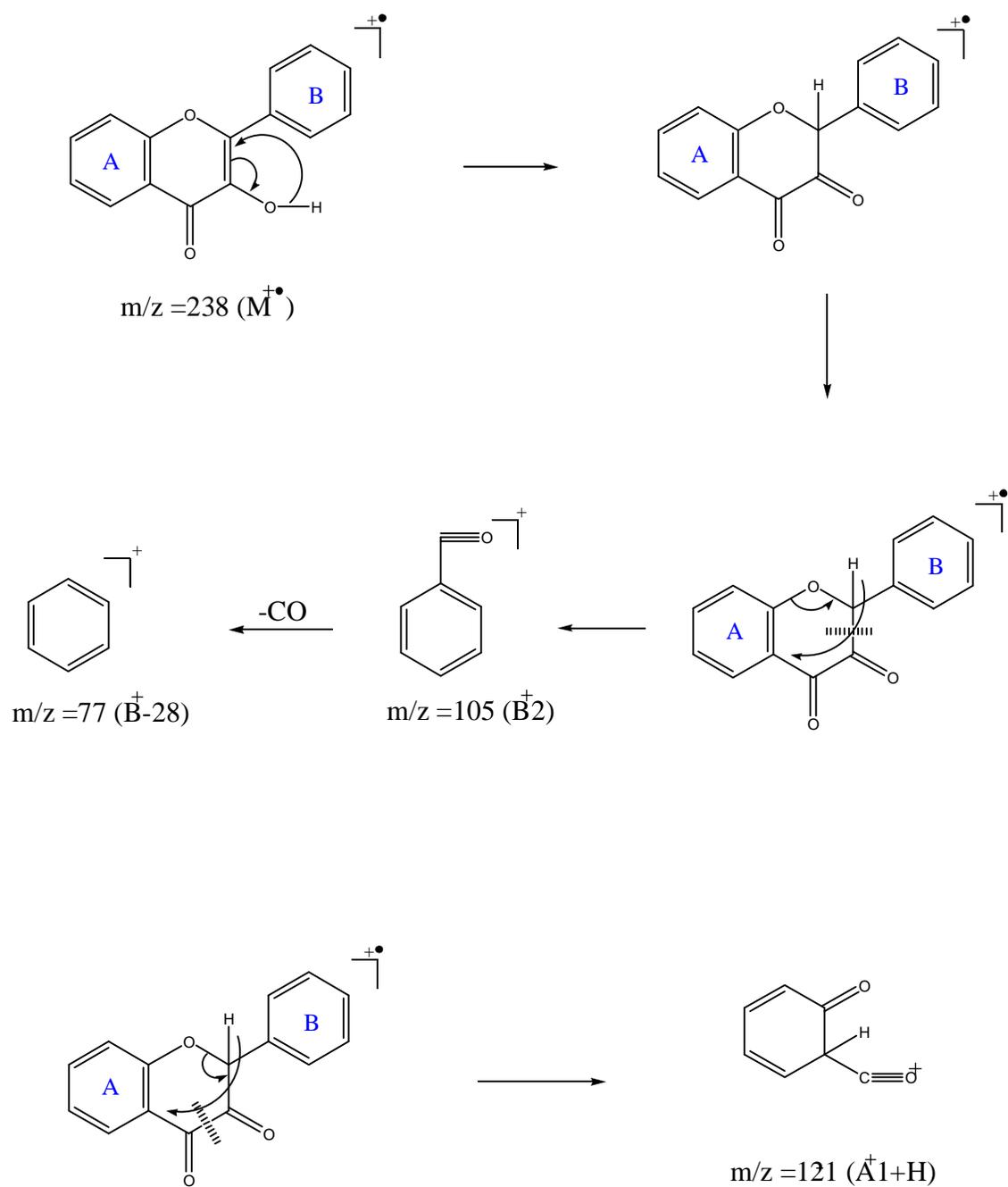


Figure -17 - Principales ruptures sur le flavonol.

II- 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 solutions authentiques.

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

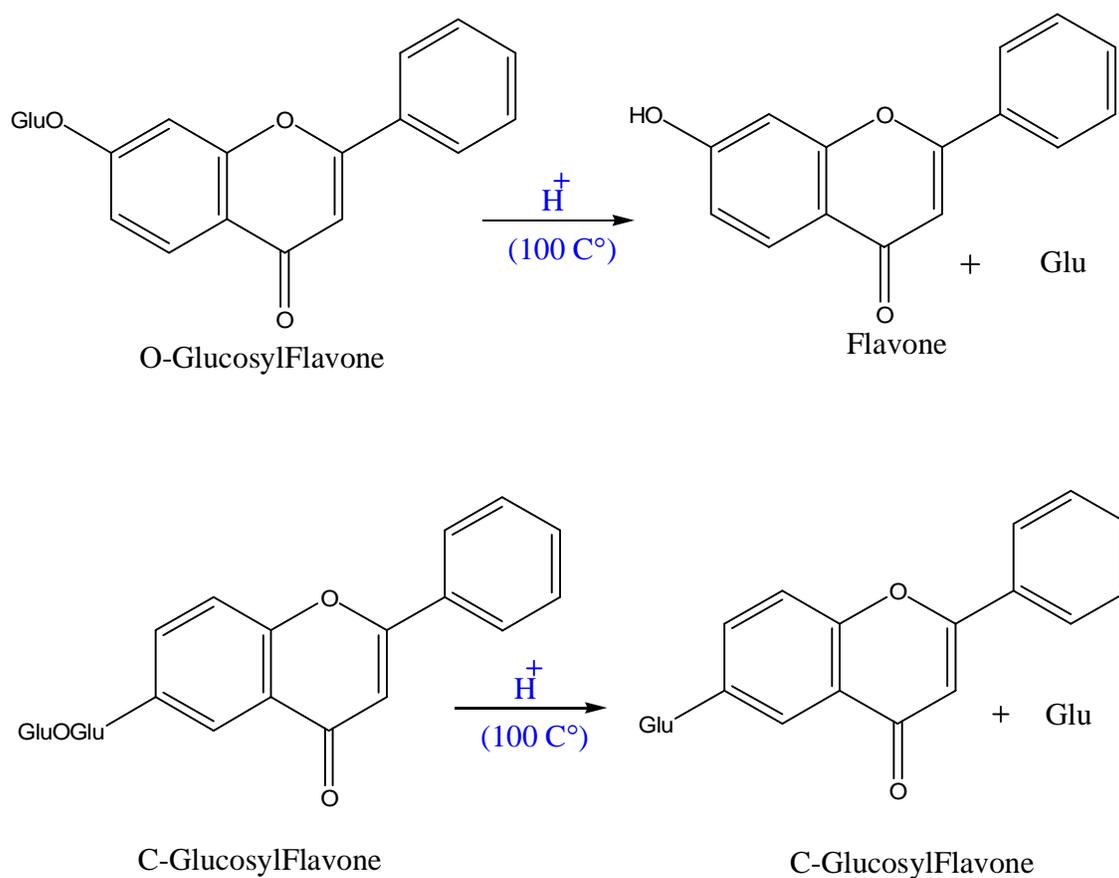


Figure-18- hydrolyse acide des composés glycosylés.

III-Plante végétale, méthodes d'extraction, séparation et purification:

III- 1 - Principes générales d'extraction, séparation et purification :

III- 1-1- Extraction :

L'extraction des flavonoides se fait selon le protocole préconisé par LEBRETON (1967) modifié par Boutard (1962), Gonnet (1973) et Jay (1975).

Dont les étapes essentielles sont [1] :

- Macération répétée du matériel végétal dans une solution hydroalcoolique (méthanol ou éthanol de pourcentage 1/1 ou 3/7).
- Extraction successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante. Les solvants les plus utilisés sont : le dichlorométhane ou le chloroforme qui permettent l'extraction des aglycones méthoxylés et hydroxylés, l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés et en dernier le n-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosyles et aussi les hétérosides de type C-glycosyle.
- Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec et pesés pour un éventuel traitement.

III- 1-2- Séparation et purification :

a- Séparation :

La séparation des composés phénoliques est fondée essentiellement sur la technique de chromatographie qui est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe et 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 de leur désorption successives sur la phase stationnaires soit de leur solubilité différente dans chaque phase [2].

Il y a plusieurs techniques chromatographiques telles que :

- Chromatographie liquide sur colonne (CC).
- Chromatographie préparative sur papier (CP).
- Chromatographie préparative sur couche mince (CCM).
- Chromatographie haute performance (HPLC).

III- 1-2-1- Chromatographie sur couche mince :

La Chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption [3] :

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 est déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont : La cuve chromatographique, la phase stationnaire (gel de silice, cellulose ou le polyamide), l'échantillon et l'éluant.

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elles permettent un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse réalisée avec divers solvants et différents adsorbants révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur.

De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

La Chromatographie sur couche mince est également la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par Chromatographie sur colonne.

L'éluant est formé d'un solvant, le tableau suivant résume les systèmes de solvant les plus utilisés pour la séparation des flavonoides :

Tableau - 11 - : les systèmes les plus utilisés pour la séparation des flavonoïdes [1].

Flavonoïdes	Systèmes de séparation
<p>Tol - Hex - MEC - MeOH (30 : 90 : 2 : 1,5) (60 : 30 : 10 : 5) Tol - MEC - MeOH (4 : 3 : 3) Tol - Ep - MEC - MeOH (60 : 26 : 10 : 10)</p>	<p>Aglycones méthoxylés</p>
<p>MeOH - AcOH - H₂O (18 : 1 : 1) H₂O - MeOH - MEC - Acac (13 : 3 : 3 : 1) H₂O - EtOH - n-BuOH - AcOH (50 : 25 : 20 : 2)</p>	<p>Aglycones polyhydroxylés et glycosylés</p>

III- 1-2-2- Chromatographie sur papier :

La technique ressemble à celle de la CCM mais le principe repose sur des phénomènes de partage. La phase mobile est le plus souvent organique et l'eau ; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même adsorbée sur la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle, comme en chromatographie sur couche mince. L'échantillon mis en solution est 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 [1].

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.

On peut utiliser du papier filtre 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 : Whatman, Schleicher et Shull, Durieux, Arches. Il existe huit catégories de papier Whatman, classés selon leur épaisseur, la texture de leur surface et la vitesse avec laquelle l'eau s'y diffuse. Par exemple le papier Whatman N° 1 est le plus utilisé, mais si on désire une grande vitesse d'écoulement, on emploiera le N°4 ; le papier N°20 est très lent, mais il permet une meilleure séparation, donnant des taches très denses et uniformes[1-3].

Les systèmes de solvants chromatographiques de bases sont :

- 1- AcOH : acide acétique à différentes concentrations.
- 2- B. A.W : [4/ 1 / 5] : n-butanol / Acide acétique / eau.
- 3- M. A.W : [4/ 1 / 5] : methanol / Acide acétique / eau.
- 4- T. B. A : [3/ 1 / 1] : tertiobutanol / Acide acétique / eau.

III- 1-2-3- Chromatographie sur colonne :

Alors que les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse et la séparation de très faibles quantités de produits, 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 [1].

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 faibles quantités de produit, lorsque les conditions opératoires sont au point. Cependant, la méthode étant très empirique, sa mise au point nécessite souvent de nombreux essais.

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide, le plus souvent la silice ou l'alumine, 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 [4].

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.

Six facteurs dont dépend la séparation :

- L'adsorbant (gel de silice, polyamide SC6).
- Eluant (mélange de solvants).
- Dimension de la colonne.
- Remplissage de la colonne.
 - a- remplissage par voie humide.
 - b- remplissage par voie sèche.
- Dépôt des produits à analyser.
- La vitesse d'élution.

III- 2- Etude chimique de l'espèce :

Les centaurees appartiennent à la vaste famille des astéracées ou composés caractérisés par la présence de nombreuses petites fleurs groupées en capitules serrés, qu'on a souvent tendance à prendre pour des fleurs simples. A l'intérieur de cette famille, elles se rapprochent des cerises et des chardons, mais leurs tiges et leurs feuilles ne portent pas d'épines.

III- 2- 1 - Caractéristiques communes :

Plantes à tiges rigides et pubescentes. Les feuilles alternes sont disposées en spirale. Les capitules sont tubuliflores avec une périphérie de fleurs stériles ayant souvent l'apparence d'étoiles.

L'involucre est composé de nombreuses bractées terminées par une écaille qui peut être épineuse.

La famille *Centaurea* comprend 700 espèces à travers le monde, elle est très répandue dans notre pays surtout dans l'est et le sud-est, il y en a 45 espèces [5].

Le tableau-12- suivant résume les principales espèces :

PRINCIPALES ESPECES	
Centaurea acaulis L	Centaurea melitensis L.
Centaurea algeriensis Coss.& Durrieu	Centaurea meryonis DC.
Centaurea alpestris Hegetschw	Centaurea microptilon Godr.
Centaurea alpina L	Centaurea mollis Waldst.
Centaurea apolepa Moretti	Centaurea montana L.
Centaurea aspera L	Centaurea napifolia L.
Centaurea bracteata Scop	Centaurea nemoralis Jord.
Centaurea calcitrapa L	Centaurea nicaeensis All.
Centaurea centorum L	Centaurea nigra L.
Centaurea cineraria L	Centaurea nigrescens Willd.
Centaurea corymbosa Pourr	Centaurea orientalis L.
Centaurea cyanus L	Centaurea paniculata L.
Centaurea debeauxii Godr.& Gren	Centaurea pannonica Heuff.
Centaurea decipiens Thuill	Centaurea pectinata L.
Centaurea depressa M. Bieb	Centaurea phrygia L.
Centaurea diffusa Lam	Centaurea pseudophrygia Meyer.
Centaurea diluta Aiton	Centaurea pullata L.
Centaurea dracunculifolia Dufour	Centaurea ragusina L.
Centaurea glaberrima Tausch	Centaurea rhaetica Moritzi.
Centaurea hanryi Jord	Centaurea salicifolia M.Bieb
Centaurea hyalolepis	Centaurea scabiosa L.
Centaurea iberica Trevir	Centaurea solstitialis L.
Centaurea jacea L	Centaurea sonchifolia L.
Centaurea jordaniana Godr	Centaurea sphaerocephala L.
Centaurea maculosa Lam	Centaurea splendens L.
Centaurea macrocephala Puschk	Centaurea stoebe L.
Centaurea lecophaea Jord	Centaurea thuillieri J.Duvign.

Son importance est due à la variété de ses espèces et à la complexité de ses composantes morphologiques et chimiques aussi à son activité biologique.

Le genre *centaurea* a souvent été utilisé dans la médecine traditionnelle comme remède à de nombreuses maladies telle que le diabète, la diarrhée, rhumatisme, malaria, hypertension etc.

Comme exemple, les recherches faites par Beltran sur l'activité hypoglycémique des quatre espèces : *C-solistitialis*, *C-aspera*, *C-mélitensis*, *C-calcitrapa* et qui ont montré qu'après l'injection de l'extrait végétal chez les lapins, on avait obtenu une diminution du niveau de sucre[6]. Le même résultat a été constaté chez les souris après avoir utilisé l'extrait de l'espèce *C-aspera* [7-8].

On peut citer aussi que les feuilles de *C- solistitialis* sont utilisées pour guérir la fièvre et l'espèce *C- mélitensis* facilite la digestion, l'espèce *C-flaccosa* est efficace contre les microbes, la partie supérieure de l'espèce *C-chilensis* est utilisé comme remède au rhumatisme [9] aussi l'espèce *C-cyanus* a un effet anti-inflammatoire [10].

III- 2- 2- Les flavonoides isolées de la famille centaurea :

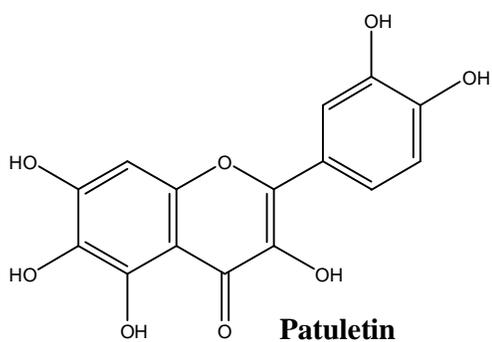
Plusieurs flavonoides ont été isolées de la famille centaurea,

le tableau-13- suivant montre quelques uns de ces structures :

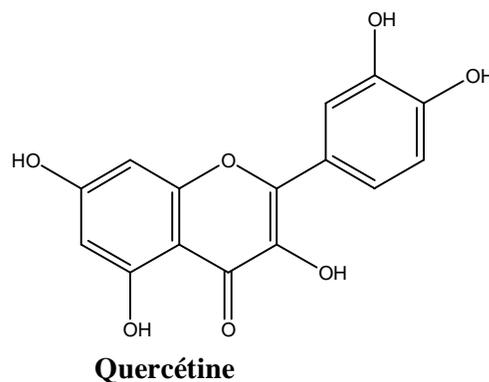
FLAVONOIDES	STRUCTURES	ESPECES
<u>Aglycone :</u> Patuletine	1	C- solstitialis[11] C-nicaensis[12] C-incana[13]
Quercétine	2	C- calcitrapa[14] C-napifolia[15]
Jaceosidine	3	C-alexandrina[16] C-arguta[17] C-cuneifolia[18] C-aspera[19] C-jacea[20] C-cineraria[21] C-pallescens[22] C-malcitana[23] C-virgata[24] C-inermis[24]

Apigenine	4	C-maroccana[5] C-furfuracea[25] C-calcitrapa[26]
Hispiduline	5	C-maroccana[5] C-incana[13] C-furfuracea[25]
Eupatiline	6	C-cineraria[27] C-cuneifolia[18]
Salvigenine	7	C-cuneifolia[28] C-cineraria[29]
Eupatorine	8	C-cuneifolia[18] C-pseudomaculosa [30]
Morine	9	C-calcitrapa[31]
Cirsilineol	10	C-bruguierana[32]
<u>Hétéroside :</u> Patuletine 7-Oglucoside	11	C-incana[13] C-solstitialis[11] C-pullata[12] C-furfuracea[33]
Neptine 7-glycoside	12	C-militensis[34]
Luteoline 7-Oglucoside	13	C-militensis[34]

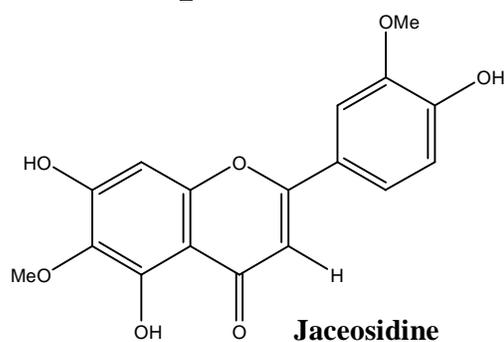
Luteoline 7-diglucoside	14	C-montana[35]
Apigenin 7-Oglucoside	15	C-furfuracea[36]
Kaempférol 7-Oglycoside	16	C-cyanus[37]
Isoorientin	17	C-montana[38]
Isovitexin	18	C-militensis[34]



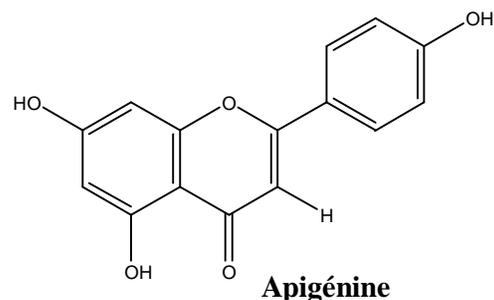
1



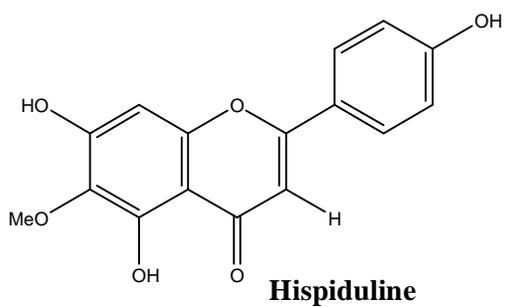
2



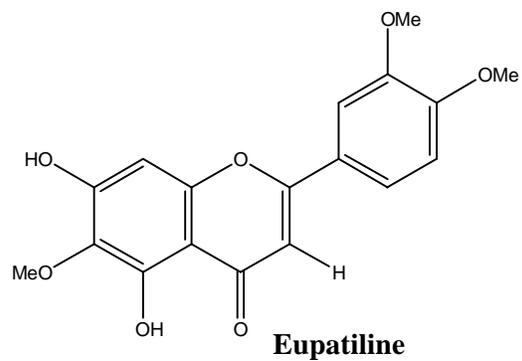
3



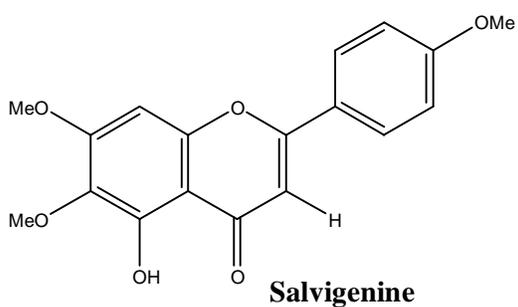
4



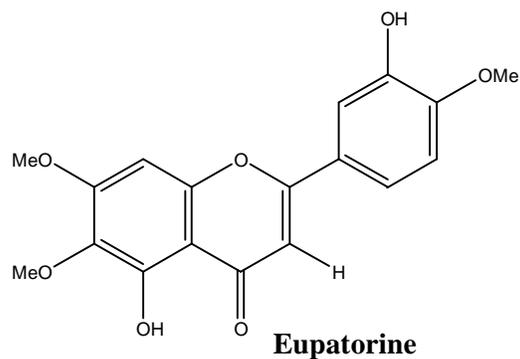
5



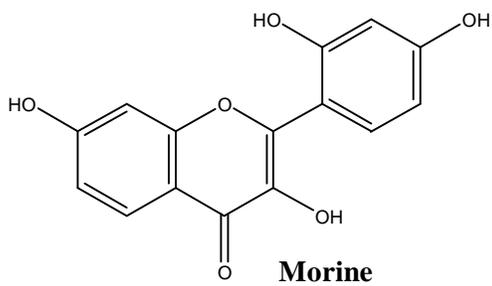
6



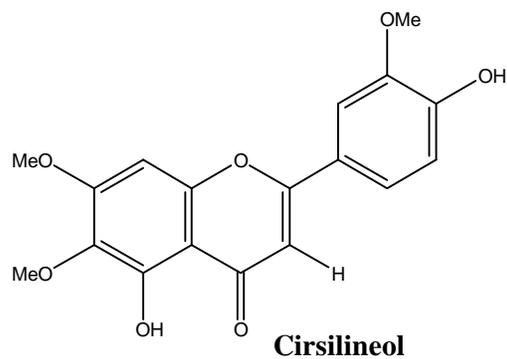
7



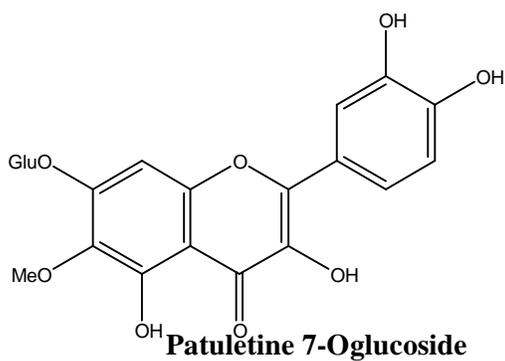
8



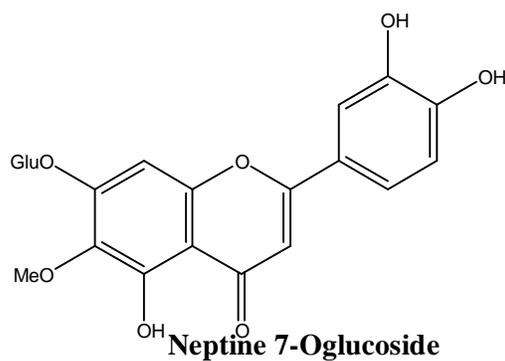
9



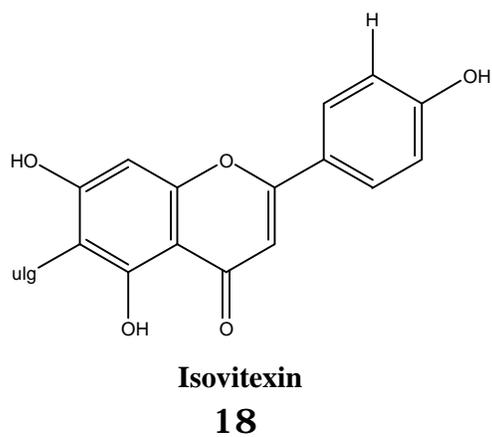
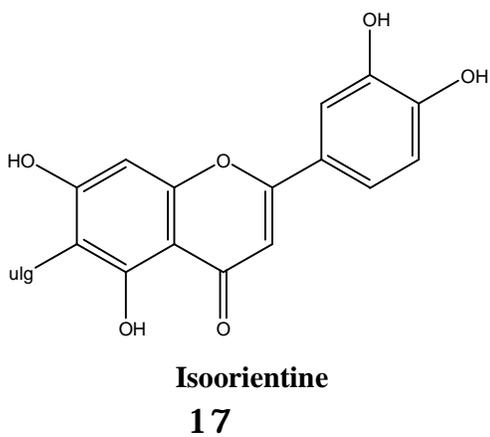
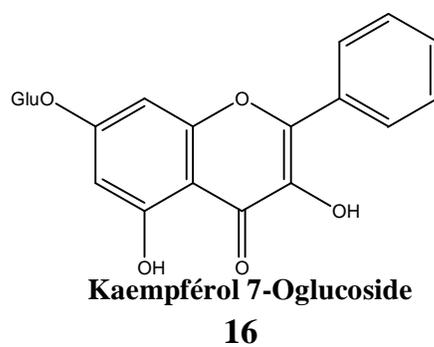
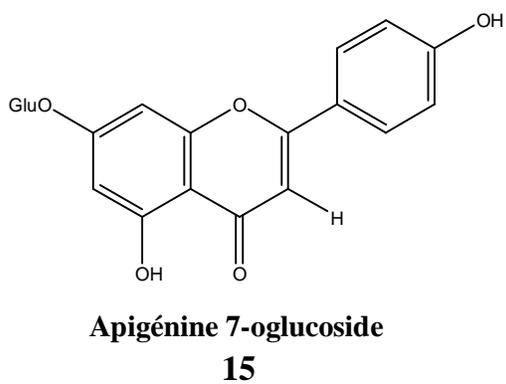
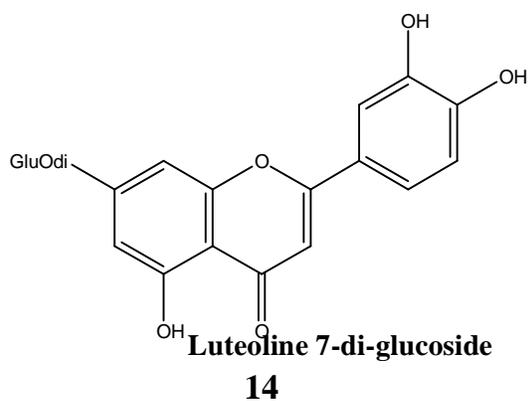
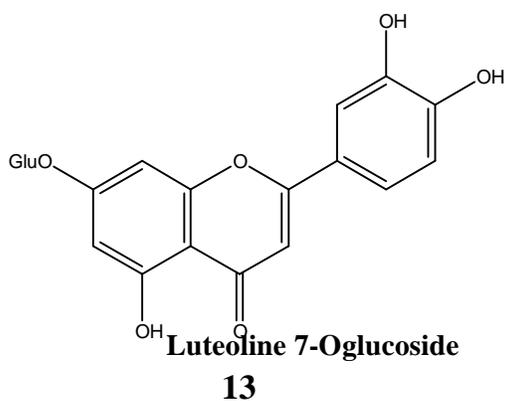
10



11



12



III- 3- Matériel végétal :

La plante a été récoltée en début d'avril 1999 aux environs de la ville de Biscra dans le sud-est algérien. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées (2,5 Kg).

III- 3-1- Choix du matériel végétal :

Plusieurs critères ont guidé notre choix, parmi lesquels :

- L'endémisme de l'espèce *C maroccana*.
- notre intérêt au genre *Centaurea* pour leur richesse en métabolites secondaires, notamment les flavonoides.

III- 3-2- Description botanique :

C'est une plante épineuse florale qui s'épanouie en fin de printemps. Ses tiges sont de longueur qui varie entre 20 et 40 cm et ses fleurs avec épines sont de couleur jaune et de taille moyenne [5].

III- 3-3- Place dans la systématique :

Embranchement	Angiospermes
Classe	Dictotyledones
Ordre	Asterales
Famille	Composées
Sous-famille	Tubiflores
Tribu	Cynarées
Genre	Centaurea
Espèce	Maroccana

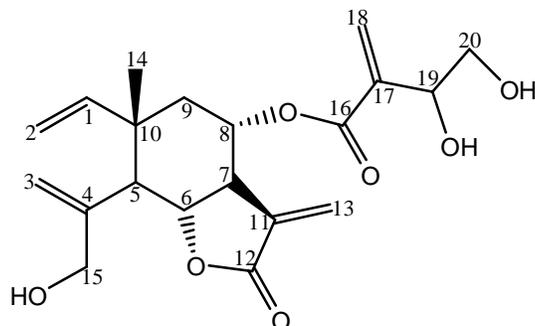
III- 3-4-Répartition géographique :

Elle est commune au Sahara de l'Algérie et du Maroc.

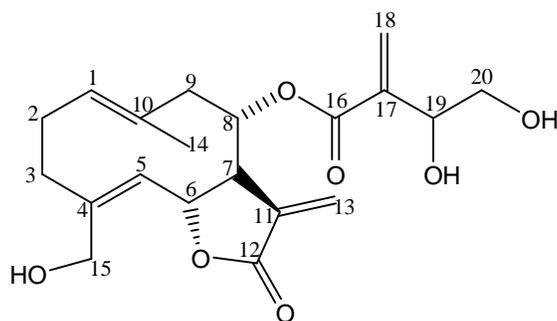


Figure -19- : photo de *Centaurea maroccana*

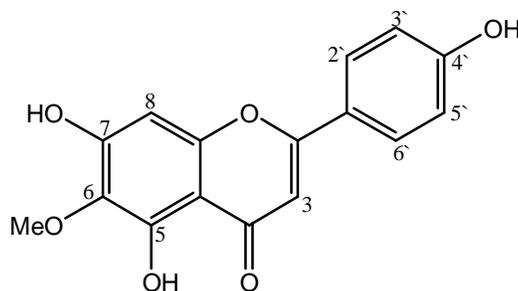
L'étude phytochimique de la plante par notre laboratoire sur la phase Acetate d'éthyle a permis d'identifier cinq produits purs dont deux flavonoïdes [5] :



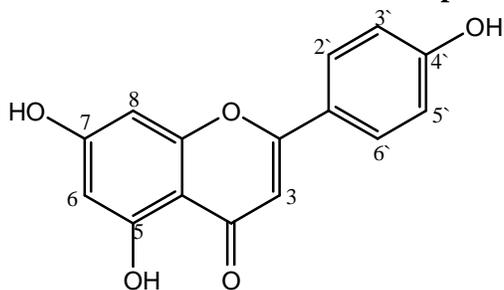
5 α ,6 β ,7 α -15-hydroxy-8 α -(1',2'-dihydroxyethyl)-acryloxy-elema-1(2),3(4),11(13)-trien-6,12-olide



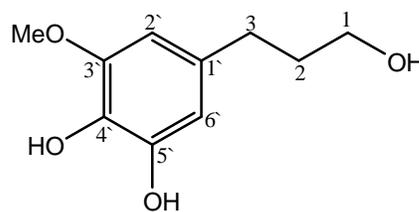
Cnicine



Hispuldine



Apigénine



3-(3-methoxy-4,5-dihydroxyphenyl)-propan-1-ol

III- 4- Protocole expérimentale :**III- 4-1- Extraction :**

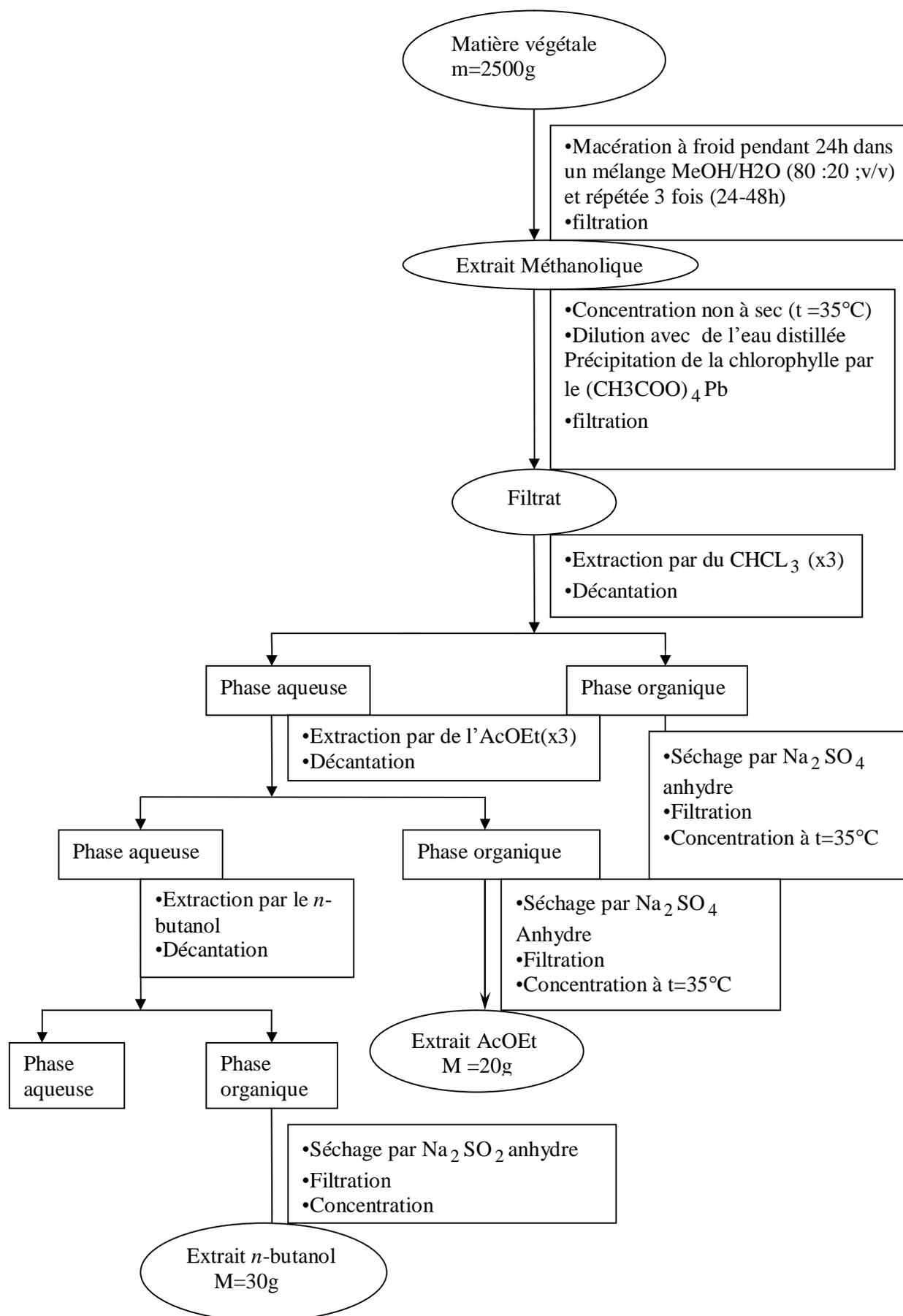
La quantité de matériel végétal obtenue (2500g) a subit une macération dans un mélange hydroalcoolique (MeOH / H₂O ; 80 : 20 ; V/V) pendant 24 heures. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite et a une température modérée (entre 35-40°C). La macération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant.

Les trois extraits hydro alcooliques récupérés sont réunis et concentrés à la solution concentrée obtenue, on ajoute de l'eau distillée et du tétra acétate de plomb Pb(OAc)₄. La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette décantation permet le dépôt de la chlorophylle.

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

Les trois phases organiques récupérées sont séchées avec du Na₂SO₄ anhydre puis filtrées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. On obtient 12g d'extrait pour la phase chloroforme, 20g d'extrait pour la phase acétate d'éthyle et 40g pour la phase n-butanol.

L'organigramme suivant montre les différentes étapes du processus d'extraction.



III- 4-2- Séparation chromatographique :

Avant d'entamer la séparation par chromatographie nous avons procédé à des tests analytiques primaires sur l'extrait butanolique en utilisant la chromatographie sur papier Wathman n=3.

- D1 : S I : (BAW 4/1/5)

D2 : S II : (AcOH 15%)

et

- (AcOH 30%)

Nous avons obtenu les chromatogrammes suivants :

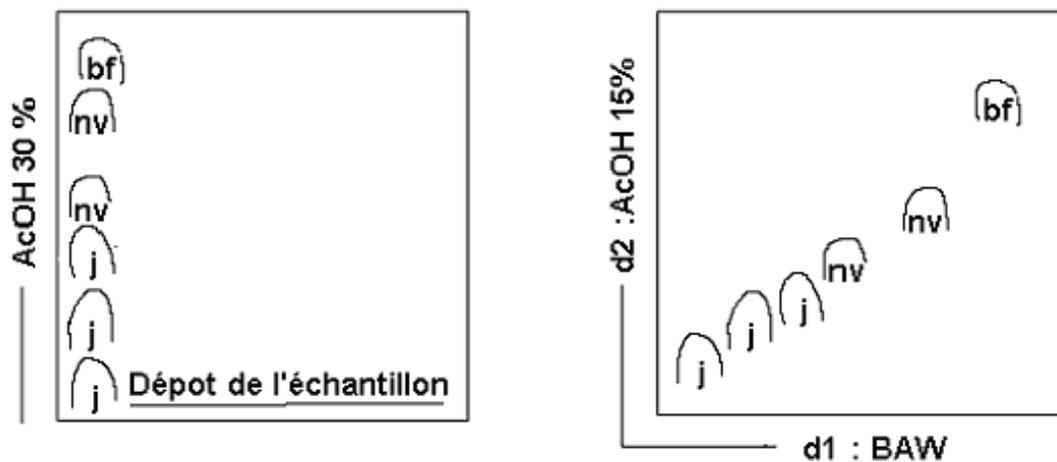


Figure-20- : chromatogramme de séparation

III- 5- Séparation et purification des composants de l'extrait butanolique :

Nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice par de multiple système de solvant polaire, apolaire et moyennement polaire qui nous ont mené au bon système de séparation.

La meilleure séparation a été obtenue avec le test chromatographique sur couche mince de gel de silice avec un système : AcOEt/MeOH/Eau (8.1.1).

III- 5-1- Séparation sur colonne :

L'extrait brut de la phase butanolique des feuilles et des fleurs 8g a été dissous dans le méthanol et mélangé avec une quantité de gel de silice puis évaporé à sec conduisant à une poudre solide qui est déposée sur une colonne de gel de silice préparé dans un système isocratique (AcOEt/MeOH/Eau 8-1-1).

Le mélange est élué par le système 8 :1 :1 en mode isocratique jusqu'à l'épuisement de l'extrait. Le suivi des fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254-365 nm). Cette colonne a permis l'obtention de 48 pots de 25 ml.

Les fractions récoltées de la colonne ont été contrôlées sur des plaques de CCM de gel de silice 60 en utilisant divers systèmes d'élution. L'examen des plaques sous UV à 254 et 365 nm a permis de réaliser un regroupement par le système (8 :1 :0.25) qui est présenté dans le tableau suivant :

Fractions	Nom de la fraction	Observations
1-10	F10	Mélange séparable
11-14	F14	Mélange séparable
15-18	F18	Mélange séparable
19-24	F24	Mélange séparable
25-28	F28	Mélange complexe
29-31	F31	Mélange complexe
32-38	F38	Mélange complexe
39-44	F44	Absence des produits
44-48	F48	Absence des produits

Tableau-14- : Regroupement des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait butanolique de *C maroccana*.

III- 5-2- Séparation sur couche mince :**Fraction F14 :**

La fraction F14 a subit une séparation sur plaque de gel de silice en utilisant comme système d'élution AcOEt /MeOH/Eau (8 :0.5 :0.25).

Les résultats obtenus sont reportés sur le tableau suivant :

Tableau -14 - : résultats de séparation de la fraction F14.

Sous fraction	Remarques
F1	produit pur (noir violet 365nm)
F2-1	Produit pur (noir violet 365nm)
F2	produit très pur (noir violet 365nm)

Fraction F18 :

La fraction F18 a subit une séparation sur plaque de gel de silice en utilisant comme système d'élution : CHCl₃/MeOH (4: 1) .

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau -15 - : résultats de séparation de la fraction F18

Sous fraction	Remarques
F5	Produit noir violet 365nm
F6	Produit noir violet 365nm
Fav	Produit pur noir violet 365nm

Fraction F24 :

La fraction F24 a subi une séparation sur plaque de gel de silice en utilisant comme système d'élution : AcOEt /MeOH/Eau (8 :0.5 :0.25).

Tableau -16 - : résultats de séparation de la fraction F24

Sous fraction	Remarques
F4	Produit vert noir violet 365nm
Fc	Produit jaune noir violet 365nm
Fb	Produit orange noir violet 365nm
F7	Produit noir violet 365nm

Fraction F31, F38, F44 et F48 :

Pour les fractions F31, F38, F44 et F48, on remarque après le test sur les plaques CCM gel de silice l'absence de la fluorescence sous lumière de Wood à 254 nm et 365 nm.

Résultats de séparation :

L'ensemble des méthodes de séparation a permis d'isolé trois produits : F2, F1, FC.

IV -Détermination structurale des produits isolés de l'espèce :**IV -1 - Le composé F2 :****IV-1-2- Interprétation :**

La fluorescence noire violette sous lumière de Wood est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.

Les données de la série spectrale UV (spectre N°-1-, tableau N° -17-) montrent :

Le maximum d'absorption de la bande I à 336 nm indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.

L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +52$ nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse indique la présence d'un OH libre en 4', l'absence d'une nouvelle bande entre 320-330 nm écarte la présence d'un OH libre en 7

L'addition de NaOAc ne provoque pas un déplacement bathochrome de la bande II (reste 267nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH qui confirme l'absence d'un OH libre en 7.

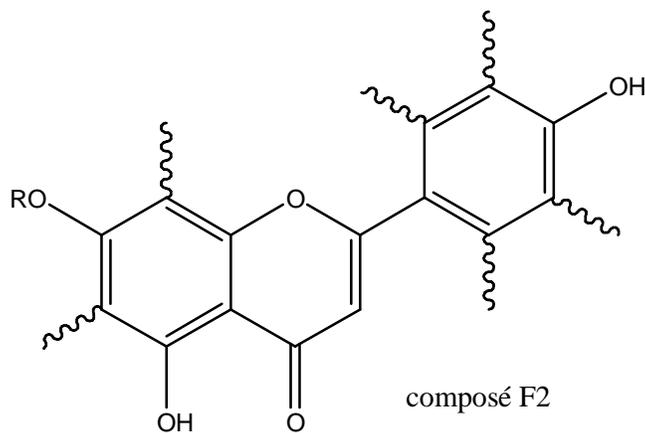
Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda = +48$ nm) révèle la présence d'un OH libre en 5.

L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant le spectre $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au spectre de AlCl_3 , laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Tableau -17 - : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaire
MeOH	336	/	268	Flavone
+NaOH	388	/	268	OH libre en 4' OH libre en 7
+ AlCl ₃	384	300-348	276	Pas de ortho di-OH sur le cycle B
+ AlCl ₃ /HCl	384	300 - 344	276	OH libre en 5
+ NaOAc	388	344	268	OR en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	340	/	268	/
Spectre stable en présence de NaOH après 5mn				

Ces données nous permettent de proposer la structure partielle suivante :



L'examen des spectres RMN protons (figure-21,22-, tableau -18-) montre :

- Un singulet à $\delta = 6,7$ ppm attribuable à H-3, ce qui confirme la structure d'une flavone.

- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,5$ ppm et le second à $\delta = 6,8$ ppm ($J = 2$ Hz) attribuables respectivement à H-6 et H-8 et confirmant l'hydroxylation des positions 5 et 7.

- Deux doublets d'intégration 2H chacun à $\delta = 7.9$ et $\delta = 6.9$ ppm, ($J = 8,7$ Hz) attribuables respectivement à H-2', H-6' et H-3', H-5' indiquant ainsi la substitution du noyau B en position 4'.

- un multiplet entre 3.5 – 4 ppm qui indique la présence d'un sucre.

- un H anomérique sous forme de doublet à 5.2 ppm, $J = 6.75$ qui oriente vers deux possibilités : un galactose ou un glucose.

- H"5 du sucre fait un couplage de $J = 9$ HZ (couplage diaxial avec le proton H"4) qui confirme que le sucre est un glucose.

- un OCH₃ a $J = 3.8$ ppm appartenant au sucre.

L'emplacement du OCH₃ sur le sucre :

L'emplacement ne peut se faire que sur le carbone 6 du glucose

On peut admettre deux possibilités :

1- un : **CH₂—OMe**

2- un : **—C=O—OMe** une fonction ester

La valeur du déplacement de H5 a 4.2 ppm montre un déblindage de ce dernier indiquant ainsi que la fonction ester est en position C6.

Donc une fonction ester substitué comme l'indique la deuxième possibilité.

-L'examen du spectre IR (figure-23-) nous donne une première série d'information concernant la structure du composé F2.

Les bandes d'absorption observées permettent de déduire la présence de fonction ou des groupements spécifiques tels que :

La fonction —C=O— de l'aglycone :

-La valeur de l'absorption du C=O dépend des effets dus aux groupes voisins, de la conjugaison et des liaisons H . Pour notre aglycone la conjugaison avec une double liaison C=C diminue la force de la liaison C=O et de la liaison C=C. Il y a effet bathochrome pour les deux absorptions $\nu_{\text{C=O}}$ et $\nu_{\text{C=C}}$ ($\nu_{\text{C=O}}$ à 1666 cm^{-1}). La bande large à 3419 cm^{-1} confirme la présence d'une fonction OH faisant une liaison H...O— Intra moléculaire.

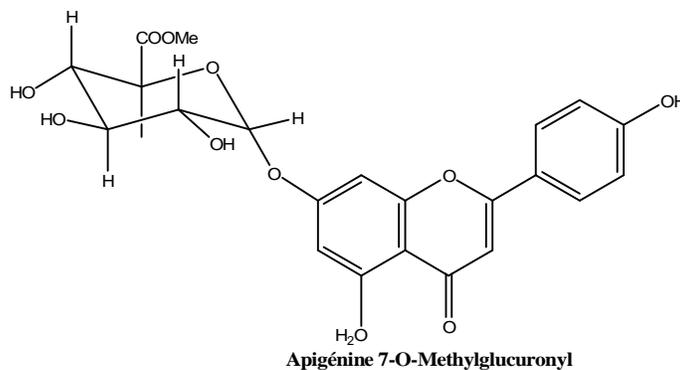
-La fonction OH présentée par une bande forte et pas trop large vers 3419.6 cm^{-1} .
- 77 - - 77 -

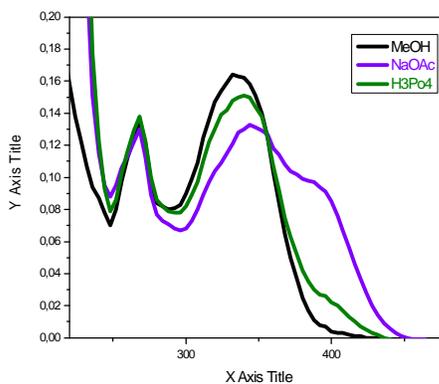
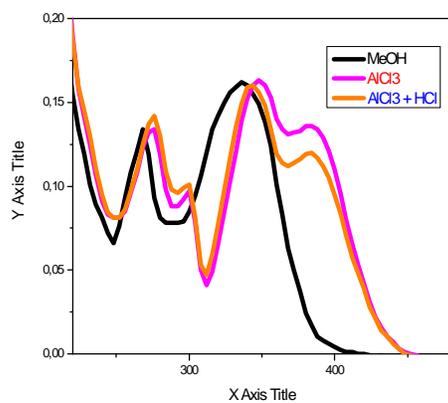
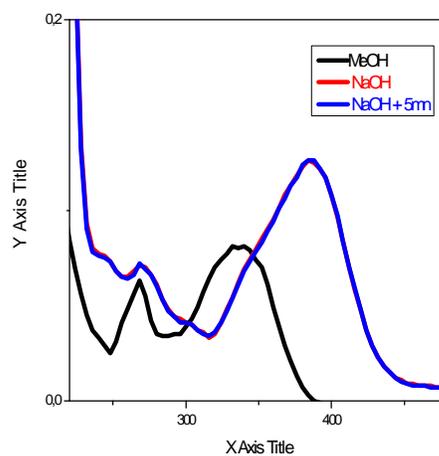
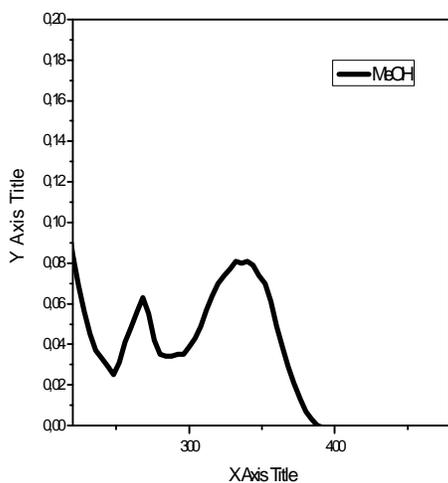
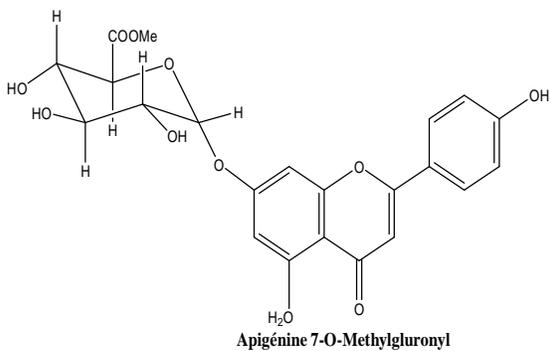
-La fonction —C=O—O—Me ester du sucre trouvée à 1741.6 cm^{-1} .

Tableau -18- : données du spectre RMN

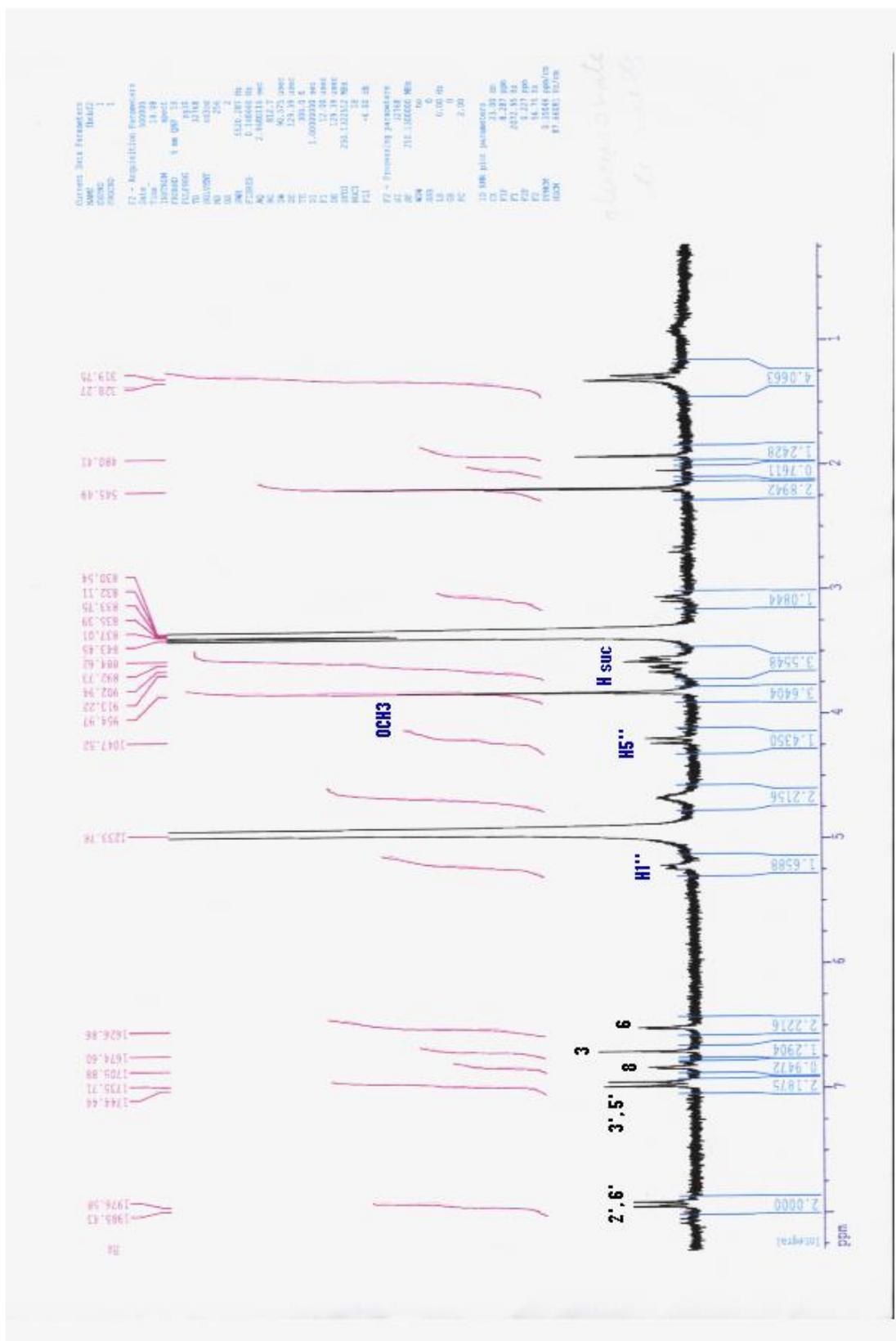
Déplacement chimiques δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attributions
7.9	2H	d (8,7)	H-2', H-6'
6.9	2H	d (8,7)	H-3', H-5'
6,7	1H	s	H-3
6,8	1H	d (2)	H-8
6.5	1H	d (2)	H-6
5.2	1H	d (6.75)	H-1" glu
3.5 - 4	m	/	Protons sucre
3.8	3H	/	OCH3 sucre
4.2	1H	d (9)	H-5 sucre

L'ensemble des données de la série spectrale UV ainsi que la RMN 1H oriente vers le composé : 7-O-Methylglucuronyl Apigénine.





Spectre-1: Série spectrale UV du composé F2



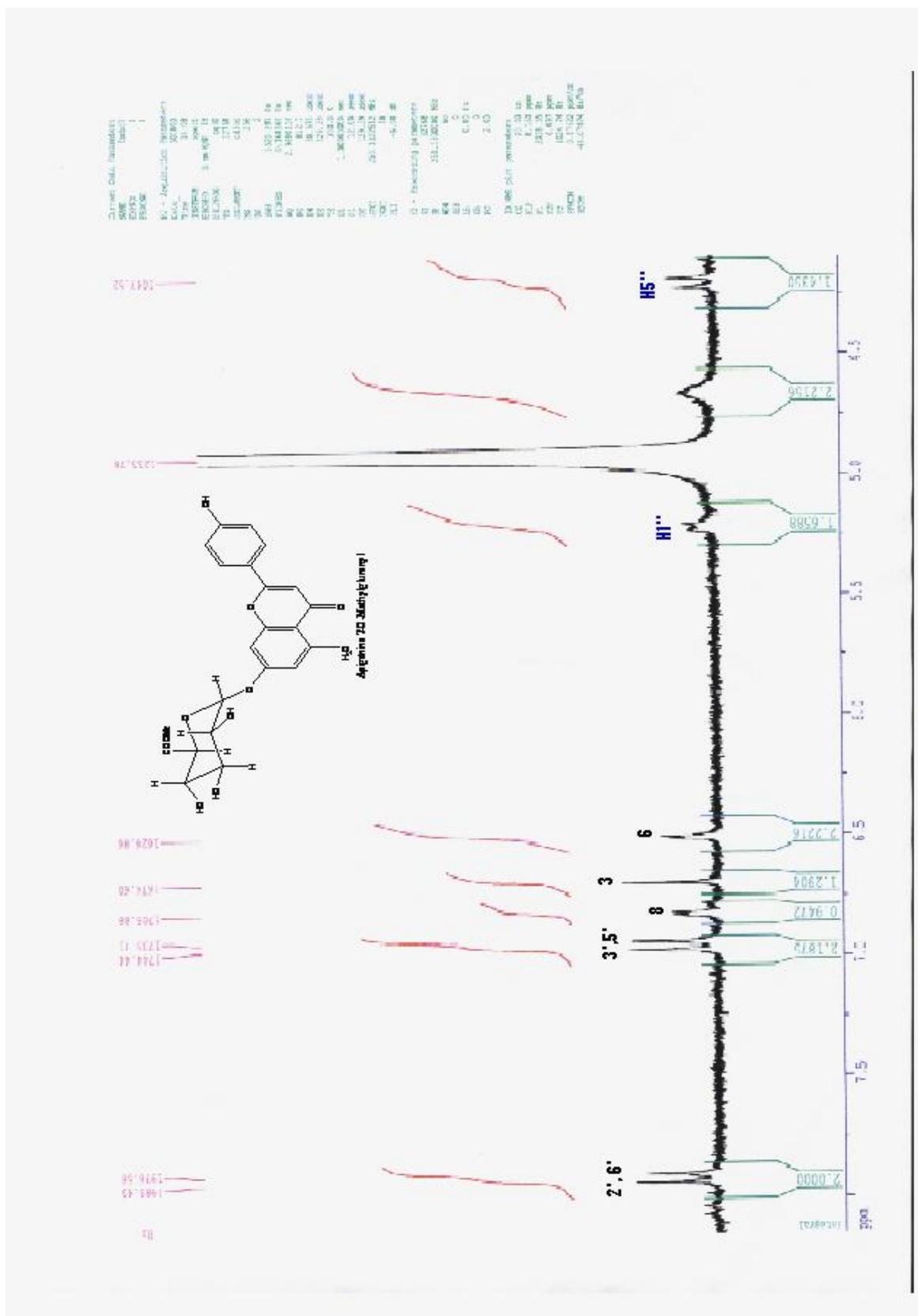


Figure-22- : Spectre RMN proton F2 dans méthanol

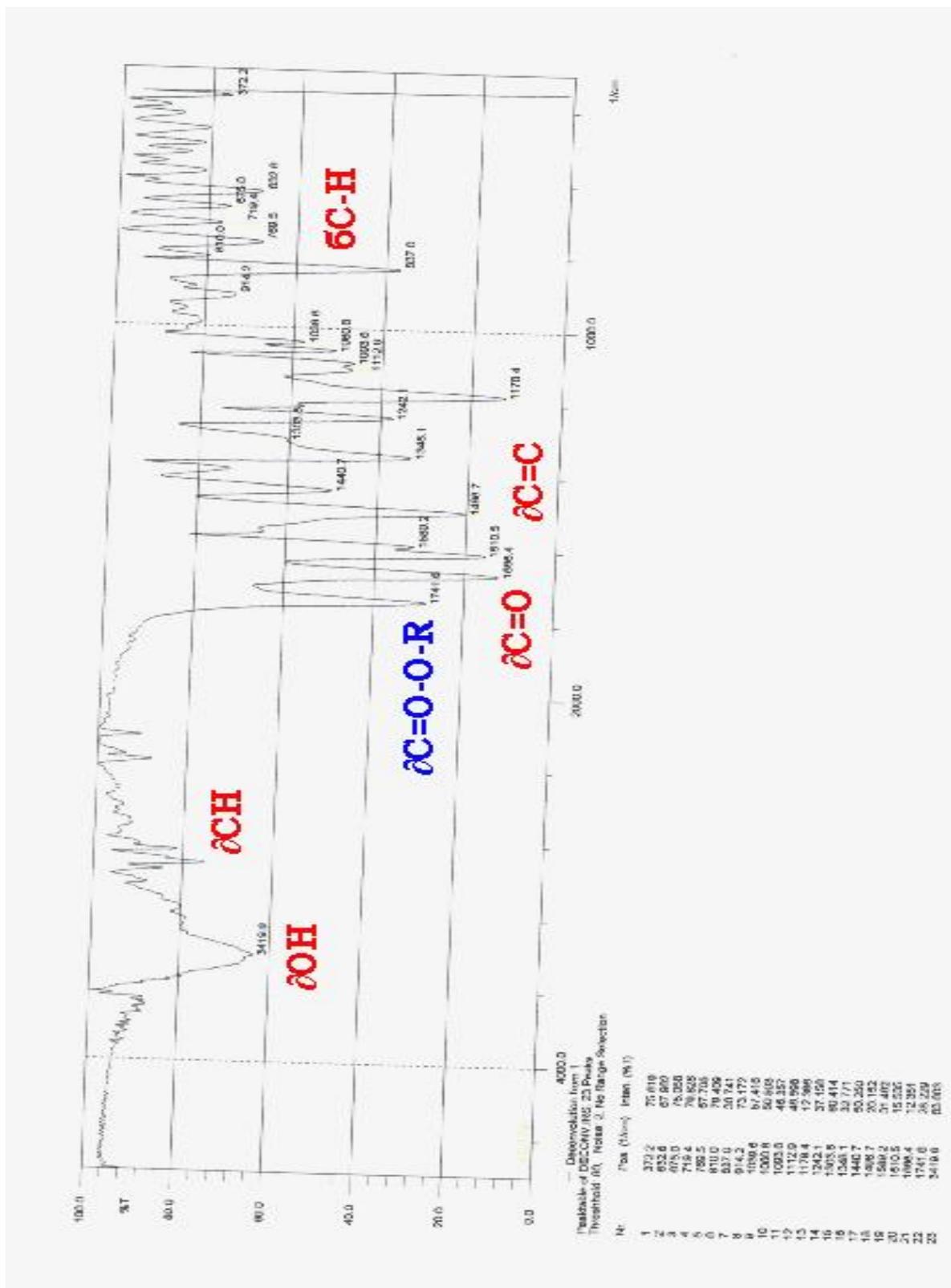


Figure-23- : Spectre IR du composé F2 dans KBr solide

IV -2 - Le composé Fc :**IV-1-3- Interprétation :**

La fluorescence noire violette sous lumière de Wood est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.

Les données de la série spectrale UV (spectre N°-2-, tableau N° -19-) montrent :

Le maximum d'absorption de la bande I à 332 nm indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.

L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +48$ nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse indique la présence d'un OH libre en 4', l'absence d'une nouvelle bande entre 320-330 nm écarte la présence d'un OH libre en 7.

L'addition de NaOAc ne provoque pas un déplacement bathochrome de la bande II (reste 276 nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH qui confirme l'absence d'un OH libre en 7.

Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda = +20$ nm) révèle la présence d'un OH libre en 5 et un OH libre en 6.

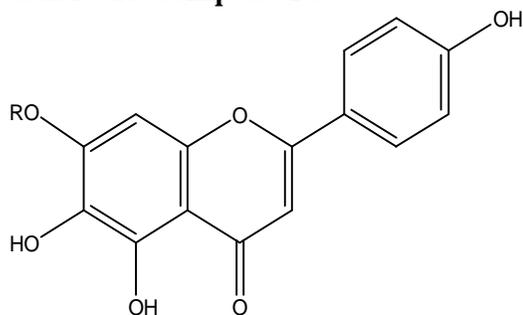
Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda = +4$ nm) révèle la présence d'un OH libre en 6

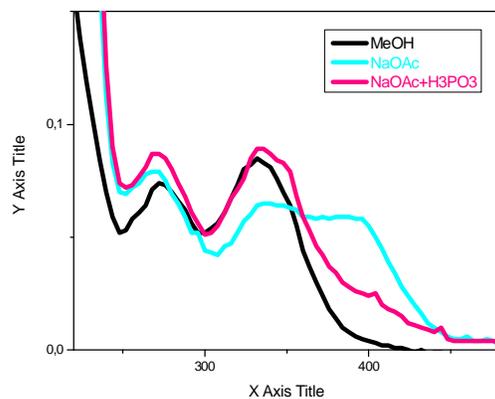
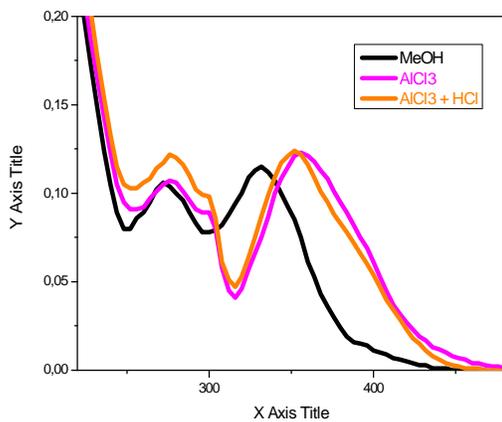
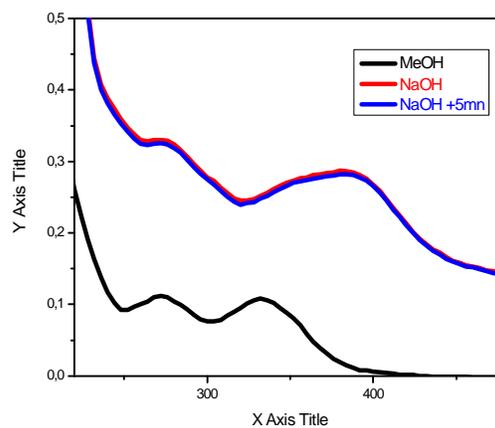
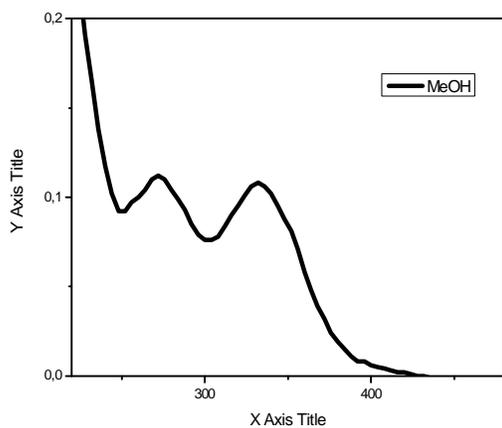
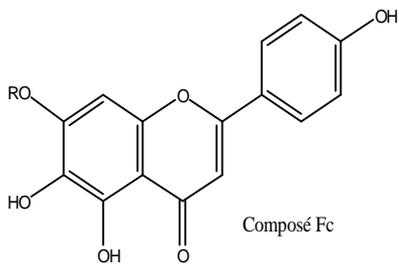
L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant le spectre $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au spectre de AlCl_3 laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Tableau -19 - : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaire
MeOH	332	/	272	Flavone
+NaOH	388	/	272	OH libre en 4'
+ AlCl ₃	356	296	276	Pas de ortho di-OH sur le cycle B
+ AlCl ₃ /HCl	352	300	276	OH libre en 5 OH libre en 6
+ NaOAc	392	336	272	OR en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	336	/	272	OH en 6
Spectre stable en présence de NaOH après 5mn				

Les différentes méthodes chromatographiques utilisées ont permis de mettre une structure probable du composé Fc.





Spectre-2: Série spectrale UV du composé Fc

IV -3 - Le composé F1 :**IV-1-4- Interprétation :**

La fluorescence noire violette sous lumière de Wood est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.

Les données de la série spectrale UV (spectre N°-3-, tableau N° -20-) montrent :

Le maximum d'absorption de la bande I à 348 nm indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.

L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +48$ nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse indique la présence d'un OH libre en 4', l'absence d'une nouvelle bande entre 320-330 nm écarte la présence d'un OH libre en 7

L'addition de NaOAc ne provoque pas un déplacement bathochrome de la bande II (reste 276nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH qui confirme l'absence d'un OH libre en 7.

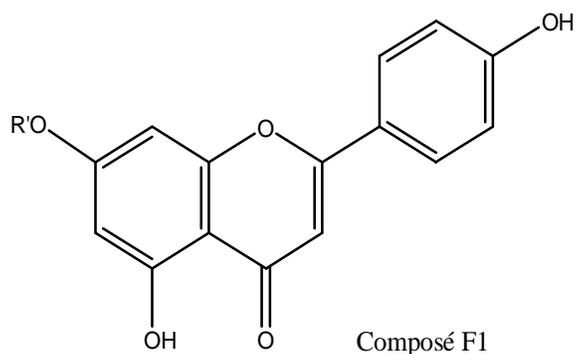
Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda = +44$ nm) révèle la présence d'un OH libre en 5.

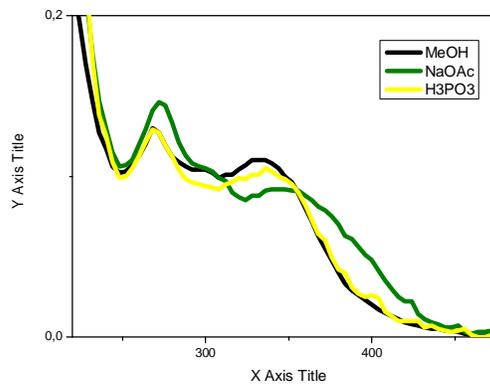
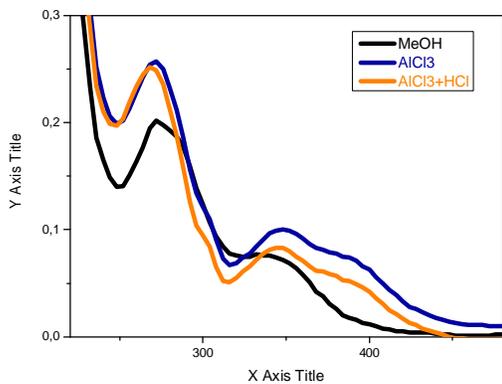
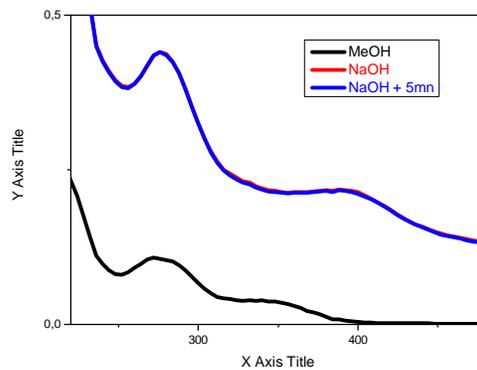
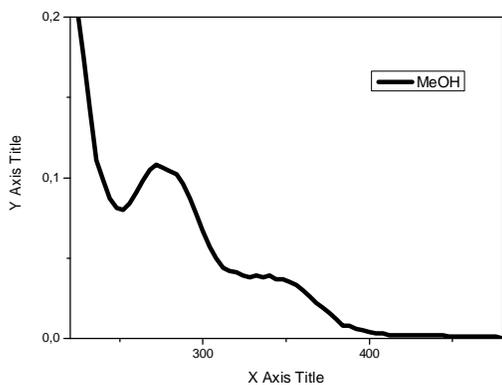
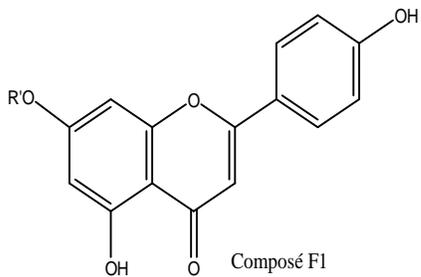
L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant le spectre $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au spectre de AlCl_3 laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Tableau -20 - : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaire
MeOH	348	/	276	Flavone
+NaOH	396	/	276	OH libre en 4' OH libre en 7
+ AlCl ₃	388	348	272	Pas de ortho di-OH sur le cycle B
+ AlCl ₃ /HCl	392	348	268	OH libre en 5
+ NaOAc	348	304	276	OR en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	336	/	268	/
Spectre stable en présence de NaOH après 5mn				

Les différentes méthodes chromatographiques utilisées ont permis de mettre une structure probable du composé F1

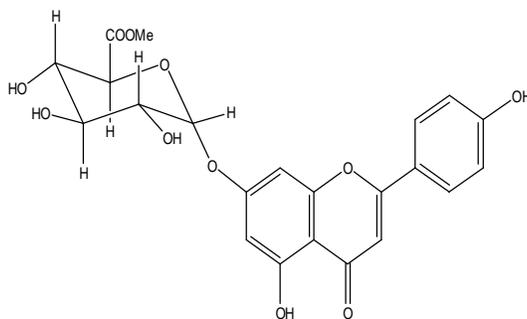




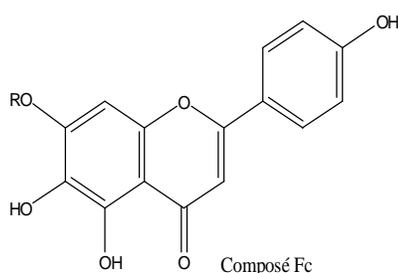
Spectre-3: Série spectrale UV du composé Fa

Le but principal de notre travail est d'étudier les métabolites secondaires de *Centaurea maroccana* récoltée au sud est de Biskra.

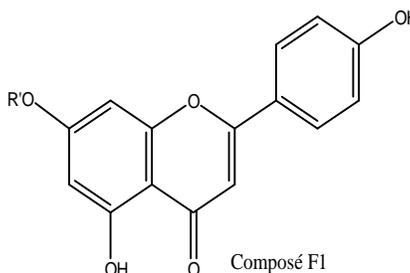
Les différentes méthodes chromatographiques utilisées ont permis l'isolement et la purification de trois produits. Nous avons pu par des méthodes de spectroscopie de résonance magnétique et de la spectrophotométrie UV d'établir la structure d'un produit isolé : qui est décrit pour la première fois pour cette espèce, il s'agit de l'Apigénine 7-O-Methylglucuronyl et de donner deux structures probables qui sont :



Apigénine 7-O-Methylglucuronyl



Composé Fc



Composé F1

L'étude phytochimique de *Centaurea maroccana* a donné d'autres composés chimiques d'après chromatogrammes des plaques CCM.

La purification de ces composés c'est avérée très difficile, voir même impossible.

Les faibles quantités d'autres composés n'ont pas permis de réaliser les analyses spectrales.

Nos perspectives de recherche pour le futur sont les suivantes :

- poursuivre l'étude phytochimique de l'espèce *Centaurea maroccana*. Afin d'isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans nos extraits.
- Etudier l'activité de ces métabolites afin de confirmer ou d'infirmier l'activité biologique attribuée à cette plante.
- Réaliser l'étude biologique des molécules actives.

Références Bibliographiques

- [1] P. Hodek et al. / *Chemico-Biological Interactions* 139 (2002) 1-21.
- [2] Effend .Leonard et al. / *Metabolic Engineering* 2005/ 1426
- [3] Stefane Martens, Axel Mithofer, *Molecules of Interest, Flavones and Flavone, synthases, Phytochemistry* 66 (2005) 2399-2407.
- [4] P.G.Pietta. Flavonoids as antioxidants, *J.Nat. Prod.*63 (2000) 1035-1042.
- [5] C. RICE-EVANS, *Biochem. Soc. Symp.*, 61 103-116 (1995)
- [6] Wollenweber, E., Dietz, V.H.(1980). *Biochemical systematics and ecology*, 8,21.
- [7] Harborne, J.B. and Smith, D.M. (1978a) anthochlor and other flavonoids as honey guides in the compositae. *Biochemical. Systematics and Ecology*, 6(4), 287-291.
- [8] T.P.T .Cushnie, A.J.Lamb/ *International of Antimicrobial Agents* 26 (2005) 343-356.
- [9] B.Klejdus et al. / *Analytica Chimica Acta* 450 (2001) 81-97.
- [10] Hyo-K youg Kim, Yun-Hee Jang and al. Isovavone Synthase from Soybean Cultivars *Mol. Cells*, Vol.19, No.1, pp.67-73
- [11] Mann, J., *Secondary métabolism*, eds clarendon press, oxford (1987).
- [12] Edwin, H., *Shikimic acid, metabolism and metabolites*, eds John Wiley and Sons (1993).
- [13] Gayon,P.R.,*Les Composés phénoliques des végétaux*, eds Dunod, Paris (1968).
- [14]Richter, G.,*Métabolism des végétaux , physiologie et biochimie , eds press polytechniques et universitaire romandes , Lausanne (1993).*
- [15] Harborne, J.B. , *The Flavonoids advances in research since 1986*, eds Chapman and Hall (1988).
- [16] Harborne, J.B. (1975), *Flavonoids in phytochemistry, Vol. II, Edition Laurence, P.L. , Vol . II. Litton Educational Publishing.*

- [17] Heller, W. and Forkmann, G (1988), in *The Flavonoids advances in research since 1980*, ed. J.B.Harborne, Chapman and al, LONDON, 399-425.
- [18] Deluca V. and Ibrahim R.K. (1985b), *Arch. Biochem, Biophysics*, P.606.
- [19] Jay, M et al., *Z. Naturforsch, V. 38c*, P.413 (1983).
- [20] Markham, K.R. *The Technique of Flavonoids Identification*, eds academic press, London, News York (1982).
- [21] Identification and Quantification of glycosyl Flavonoids/ S. Kazuno et al./ *Anal. Biochem* 347 (2005) 182-192.
- [22] *J. Nutr, Biochem*, 1996. Vol.7. February
- [23] *J Am Soc Mass Spectrom* 2001,12,537-549.
- [24] N. Heimeur, L.M.Idrissi Hassani *Rev.Biol.Biotech* Vol3, No1, March 2004. pp. 37-42
- [25] R.A. Dixon, M.J. Harrison, Activation, Structure, and organization of Genes involved in microbial
- [26] Middleton & teramura, 1993, Harborne et al., 1976, Brouillard & Cheminat, 1988, Harborne, 1986, (1988a, 1988b).
- [27] M. Amellal, C.Bronner, F.Briancon, M. Haag, R. Anton and Y.Landry. *Planta Mcdica*, 1, 16-20 (1985).
- [28] M.E.Bracke, G.De Pestel, V.Castronovo, B.Vyncke, J.M.Foidart, L.C.A.Vakalt and M.M.Marcel, *Plant Flavonoids in Biology andd Medecine II.Progress in Clinical and Biological research*,.V. Cody.E. Middleton and J.B.Liss, New York (1988)
- [29] M.Bracke, B.Vyncke and G. Opdemakker, *Clin. Exp Metastasis*, 8 13-25(1991).
- [30] A.Komori, J. Yatsunami, S. Okabe, S. ABE, K.Hara, M. Suganuma, S.JKim and H.Fujiki, *Jpn, J.Clin.Oncol*, 23. 186-90 (1993).
- [31] G. Scambia, F.O.Ranelletti, P.Benedetti, A.Panici, G.Bonanno, R.DE.Vincenzo, M.Piantelli and S.Mancuso, *Anticancer Drugs*, 1 45-48 (1990)

- [32] R.Landolfi, R.L.Mower and M.Steiner, *Biochem. Pharmacol.*, 32 1525-1530 (1983)
- [33] P.S. Chaudhry, J.Cabrera, H.R.Juliani and S.D. Varima, *Biochem. Pharmacol.*, 32 1995-1998 (1983).
- [34] M.G.Hertog., E.J.Feskens, P.C.Hollman, MB.Katan and D.Kromhont. *Lancet*, 342 1007-1011 (1993).
- [35] S.C. CHU ,Y.S. Hsieh and J.Y.Lin, *J.Nat.Prod.*,55 179-183 (1992).
- [36] A.A. El Gamma land R.M.Mansour, *Zentralbl. Mikrobiol.*, 141 561-565 (1986)
- [37] Giulia Dicarlo , Nicola . *Life Sciences*, Vol 65, No.4, PP.337-353, 1999.

Références bibliographiques

- [1] Markham, K.R. , The technique of flavonoids identification, eds academic press, london, New york (1982).
- [2] Mabry, T.J.,Thomas, M.B., The sythematic identification of flavonoids, eds Springer-Verlag, Berlin (1970).
- [3] Berthillier, A.(1972), la chromatographie et ses applications, Dunod paris.
- [4] Jurd, L.and horowitz, R. (1962), spectralproperties of flavonoids compounds, pergamon press, Oxford, 107-155.
- [5] Markham, K.R.and Mabry.T.J.(1968), Phytochemistry, 7, PP. 1197.
- [6] K.R. Markham, T.J. Mabry. Ultraviolet visible and proton magnetique resonance spectroscopy of flavonoids, in the flavonoids, 1975, P. 45-77.
- [7] Horhammer, L. and Hansel, R. (1952), Arch. Pharm, 285,438 .
- [8] Jurd, L.and Geissman, T.A. (1956), J.org. Chem,21,1395.
- [9] Markham, K.R.and Geiger, H. (1993), the Flavonoids advances in research since 1986. Edited by J.B. HARBORNE, Chapman & Hall, London.
- [10] Markham, K.R. (1976), C¹³ NMR of flavonoids-II, Flavonoids other then flavone and flavonol aglycones. Tetrahedron, 32, PP. 2607-2612
- [11] Audier, H. (1966), Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse.
- [12] Neilsen, J.G. et Moller J. (1970), Acta Chem Scand, 24, 2665.

Références bibliographiques

- [1] Thèse de magistère Benaissa Wahiba Université Constantine -Algérie.
- [2] Harborne, J.B., The Flavonoids, V.1, eds Chapman and Hall (1975).
- [3] Markham, K.R., Techniques of flavonoids identification, eds academic press (1982)
- [4] Jurd, L. and Horwitz, R.(1962). Spectral Propreties of flavonoid Compounds In Geissman, T.A. The chemistry of flavonoid compounds.107-155. Pergamon Press New-York.
- [5] thèse doctorat Bentamene Ali Université Constantine –Algérie.
- [6] Beltran.F., Viguera.J.M., Casabuena, A.(1985). Farmacognosia, 10,197-215
- [7] Villar, A., Paya,M.(1985).PL.Med phytother 19, 4-10
- [8] Coste, H.(1937). In flore descriptive et illustrée de la france. 2ed., Vol.2, P.396,Paris.
- [9] Negrette, R.E., Backhouse, N., Bravo, B., Eraso.S., Garcia, R., Avendano, S. (1987). Plantas Med et phytotherapia, XXI n°2 P 168-172.
- [10] Nancy, G., Vincent, G,Jacque, D., Patricia, B., Monique, T., Luc, A.(1999). Anti-inflammatory and immunological effect of Centaurea cyanus flowers-heads, Journal of Ethnopharmacology 68, 235-241.
- [11] Kamanzi, K., Raymond, J., and Vorin, B. (1983). Plante Med et Phytot. 17(1), 5
- [12]Athmani, G., Benayache, F., Benayache, S., Dendougui, H. And Jay, M. (1998).J. Soc. Alger. Chim., 8, 29.

- [13] Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S and Jay, M. (1997). Biochemical systematics and ecology. 361-362.
- [14] Ahmed, Z.F., Rizk, A. M, and., Hamouda, F.M, (1970). Postep Dzedzinie Leku Rosl., Pr. Ref. Dosw. Wygloszone Symp., 20-23.
- [15] Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S. Medjroubi, K. And Bentamene, A. (1999). 5éme Congres de la S.A.C Bejaia.
- [16] Gonzales, A.G.,Barera, J.B.,Garcia, T.Z, and Rosas, F.E. (1984) Phytochemistry, 2071-2072.
- [17] Gadeschi, E., Jorge, Z.D., Massanet, G.M. and Luis, F.R. (1989) Phytochemistry, 28(8), 2071-2072.
- [18] Oksuz, S., Halfon, B, and Term, B. (1988). Planta Med., 54(1), 89.
- [19] Ferreres. F., and Tomas. F, (1980). Bull. Liaison-Groupe Polyphenol, (9), 294-301.
- [20] Roesler, H., Star, AE., Mabry, T.j. (1971). Phytochemistry., 10(2), 450-451.
- [21] Bruno, M. And Herz, W. (1988). Phytochemistry, 27(6): 1837-1875.
- [22] Ali, Y.E., Omar. A.A., Sarg. T.M, and Slatkin. D.J, 1987. Planta Med., 53(5) 503-504.
- [23] Barrero, F.A., Sanchez., J.F. and Rodriguez, I. (1989). Phytochemistry, 28,1975.
- [24] Oksuz, S., Ayyilidiz, and Johansson, C, (1984). J.Nat.Prod., 47(5), 902-903.
- [25] Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S. Medjroubi, K. And Jay, M. (1996).

- [26] Ahmed, Z.F., Rimpler, H., Hamouda, F.M., and Ismail, S.I, (1970). *Phytochemistry*, 9(7), 1595-1601.
- [27] Bruno, M. And Herz, W. (1988). *Phytochemistry*, 27(6): 1837-1875.
- [28] Oksuz., S., Halfon, B, and Term, B. (1988). *Planta Med.*, 11(2), 66-71.
- [29] Oksuz., S. And Ayyilidiz, H.(1986). *Phytochemistry*, 25(2), 535-538.
- [30] Picher, M.T., Seon, E, and Tortadjada, A. (1984). *Phytochemistry*, 23(9), 1995-1998.
- [31] Ahmed, Z.F., Rimpler, H., Hamouda, F.M., Rizk, A.M, and Ismail, S.I, (1970). *Phytochemistry*, 9(7), 1595-1601.
- [32] Fathallah, H.M., Kassem, F.F., El-Shaer, N.S. (1994). *Alexendria J.Pharm. Sci.* 8(3), 219-222.
- [33] Kamanzi, K., Raymond, J., and Vorin, B. (1982). *Plante Med et Phytot.* 16(1) :30-31
- [34] Kamanzi, K., Raymond, J., and Vorin, B. (1983). *Plante Med et Phytot.* 17(1), 47-51.
- [35] Gonnet, J.F. (1989). *These Lyon I*
- [36] Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S. Medjrroubi, K. And Jay, M. (2000)....
- [37] Asen, S. Putun E,(1987). *Doga.Kim. Ser.*, 11(2), 66-71.
- [38] Gonnet, J.F. (1989). *These Lyon I*

Résumé

Ce travail fait partie de notre programme de recherche sur les plantes médicinales algériennes de la famille des composés pour obtenir des molécules « Flavonoides » actives qui peuvent contribuer dans l'industrie pharmaceutique.

L'utilisation des différentes méthodes de séparation chromatographiques (Colonne, papier et couche mince) nous ont permis d'isoler trois flavonoides issues de la plante médicinale *Centaurea maroccana*.

La structure des composés isolés a été bien établie grâce aux méthodes Spectroscopiques (UV, RMN).

Mots-clés : Composés, Flavonoides, *Centaurea maroccana*.

ملخص

يندرج هذا العمل ضمن برنامج بحث للنباتات الطبية للعائلة **composée** بغية الحصول على جزيئات فلافونيدية فعالة قد تساهم في تقديم نفع للصناعة الصيدلانية.

من خلال مختلف الطرق الكروماتوغرافية (العمود الورق و الطبقة الرقيقة) تمكنا من فصل ثلاثة مركبات فلافونيدية من نبات **Centaurea Maroccana** .

تحديد بنيات الجزيئات تم حسب التقنيات الفيزيوكيميائية : مطيافية الأشعة فوق البنفسجية **UV** مطيافية الرنين النووي المغناطيسي **RMN**.

الكلمات المفتاحية: العائلة **Composés** الفلافونويدات, نبات **Centaurea Maroccana**

Summary

This work makes part of research program on the algerian plants of the family composé which might help in the pharmaceutical industry

The use of the different chromatographic separation methods (column, paper, thin layer) permitted the isolation of three flavonoids from *Centaurea maroccana*.

The recognition of the structure of the separated and purified molecules is done according to the physico-chemical technics we usually use: Ultraviolet-visible spectroscopy, Magnetic resonance spectroscopy.

Key Words: Apiaceae, Flavonoids, *Centaurea maroccana* .