

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mentouri - Constantine
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :

Série :

THESE
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat d'Etat
En Chimie Organique - Option Phytochimie

Thème

**Recherche et Détermination Structurale
des Métabolites Secondaires du Genre
Centaurea : *C. africana*, *C. nicaensis***

Par :
SEGHIRI Ramdane

Sous la direction du Professeur :
BENAYACHE Fadila

Devant le jury :

Mr. BENAYACHE Samir	Professeur,	Univ. Mentouri Constantine	Président
Mme. BENAYACHE Fadila	Professeur,	Univ. Mentouri Constantine	Directrice de thèse, Rapporteur
Mr. LAABASSI Mohamed	Professeur,	Univ. El Hadj Lakhdar Batna	Examineur
Mr. BENKHALED Mohamed	Professeur,	Univ. El Hadj Lakhdar Batna	Examineur
Mr. EN NAHAR Said	M.C,	Univ. Louis Pasteur- Strasbourg,, France	Examineur
Mr. DENDOUGUI Houcine	M.C,	Univ. Ouargla	Examineur

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
Références bibliographiques	3

PARTIE SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Les Métabolites secondaires les plus courant chez le genre

Centaurea

I. Introduction	5
I.1. Les terpènes	5
I.1.1. Les monoterpènes et les Sesquiterpène	6
I.1.2. Les diterpènes.....	7
I.1.3. Les triterpènes	8
I.2. Les alcaloïdes.....	10
I.3. Les composés phénolique.....	11
I.4 Les métabolites secondaires chez le genre <i>Centaurea</i>	14
I.4.1. Les flavonoïdes isolés du genre <i>Centaurea</i>	14
Références bibliographiques	39

Chapitre II : Les flavonoïdes

II.1. Introduction	44
II.2. Origine des flavonoïdes	45
II.2.1. Biosynthèse des flavonoïdes	45
II.2.2 Synthèse organique des flavonoïdes.....	47
II.3. Structure chimique et classification	49
II.3.1. Flavones et flavonols	50
II.3.2. Flavanones et dihydroflavonols.....	51

II.3.3 Flavan-3-ol, flavan-3,4-diols et Anthocyanidols	51
II.3.4. Chalcones et Aurones.....	51
II.4. Substitution du squelette Flavonique	52
II.4.1. L'hydroxylation	52
II.4.2. La méthylation	52
II.4.3. La O-glycosylation	52
II.4.4. La C-glycosylation	53
II.5. Distribution et localisation.....	53
II.6. Propriétés des flavonoïdes	55
II.6.1. Activité antioxydante.....	56
II.6.2. Les activités biologiques des flavonoïdes.....	58
II.7. Extraction, Isolement, Purifications et analyses structurales	
des flavonoïdes.....	60
II.7.1. Récolte des plantes.....	60
II.7.2.Extraction des flavonoïdes	60
II.7.3. Méthodes des séparations et de purification	60
II.7.3.1. La chromatographie sur couche mince	61
II.7.3.2. La chromatographie sur couche mince préparative	62
II.7.3.3. La chromatographie d'adsorption sur colonne.....	62
II.7.4. Les techniques d'identification des flavonoïdes	62
II.7.4.1. Effet du rapport frontal.....	63
II.7.4.2. La fluorescence sous lumière de wood	63
II.7.4.3. La spectrophotométrie UV-Vis.....	64
II.7.4.3.1 Addition de réactifs	65
II.7.4.4. Hydrolyse acide des hétérosides	70
II.7.4.5. La spectrométrie de masse.....	70
II.7.4.6 La résonance magnétique nucléaire	74
Références bibliographiques	76

Chapitre III
PARTIE EXPERIMENTALE

III.1. Critères de choix des deux espèces	81
III.2. Place dans la systématique.....	81
III.3. Description des espèces	82
III.4. Récolte de matière végétale	83
III.5. Extraction de <i>Centaurea africana</i>	83
III.5.1. Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme de <i>C. africana</i>	86
III.5.1.1. Fractionnement de l'extrait chloroforme.....	86
III.5.1.2. Etude des fraction F9, F17 et F24	87
III.5.1.3. Etude des fraction F7 et F8	88
III.5.2. Séparation et purification des composés de l'extrait acétate d'éthyle	89
III.5.2.1. Etude de la fraction AC4	91
III.5.2.2. Etude de la fraction AC6	91
III.5.2.3. Etude de la fraction AC8	91
III.5.2.4. Etude de la fraction AC9	92
III.5.2.5. Etude de la fraction AC11	92
III.5.2.6. Etude de la fraction AC20	92
III.5.2.7. Etude de la fraction AC19	93
III.6. Extraction de <i>Centaurea nicaensis</i>	95
III.6.1. Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme	97
III.6.1.1. Fractionnement de l'extrait chloroforme.....	97
III.6.1.2. Etude de la fraction F7.....	99
III.6.1.3. Etude de la fraction F11	99
Références bibliographiques	99

Chapitre IV : Résultats et Discussions

IV.1. Identification des produits isolés de l'espèce <i>C. africana</i>	100
IV.1.A. Identification des produits isolés de la phase chloroformique	100
IV.1.A1. Elucidation structurale du composé A52	100
IV.1.A2. Elucidation structurale du composé F9	105
IV.1.A3. Elucidation structurale du composé F17.....	110
IV.1.A4. Elucidation structurale du composé F24.....	119
IV.1.B. Produits isolés de la phase acétate d'éthyle.....	131
IV.1.B1. Elucidation structurale du composé AC41.....	131
IV.1.B2. Elucidation structurale du composé AC62.....	134
IV.1.B3. Elucidation structurale du composé AC82.....	137
IV.1.B4. Elucidation structurale du composé AC833.....	141
IV.1.B5. Elucidation structurale du composé AC841.....	144
IV.1.B6. Elucidation structurale du composé AC843.....	147
IV.1.B7. Elucidation structurale du composé AC844.....	151
IV.1.B8. Elucidation structurale du composé AC86.....	155
IV.1.B9. Elucidation structurale du composé AC91.....	160
IV.1.B10. Elucidation structurale du composé AC92.....	169
IV.1.B11. Elucidation structurale du composé AC11	177
IV.1.B12. Elucidation structurale du composé AC116.....	182
IV.1.B13. Elucidation structurale du composé L10-4	186
IV.1.B14. Elucidation structurale du composé AC202.....	202
IV.1.B15. Elucidation structurale du composé AC203.....	208
IV-2- Identification des produits isolés de l'espèce <i>C. nicaensis</i>	217
IV.2.1. Elucidation structurale du composé F7	217
IV.2.2. Elucidation structurale du composé F11	224

Références bibliographiques	229
Conclusion générale	231

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

Personne n'ignore aujourd'hui la richesse et la diversité des plantes médicinales utilisées par 80 % des habitants de notre planète qui ne se soignent que par les médecines traditionnelles de leur pays, car ils n'ont pas accès à la médecine moderne [1]. Parmi les milliers de plantes médicinales recensées à ce jour, ceux de la famille des astéracées (composées) l'une des plus grandes famille des angiospermes, avec environ 1100 genres et 25000 espèces sont présentes dans pratiquement toutes les régions du globe.

Le genre *Centaurea* fait partie de la famille des astéracées, compte environ 700 espèces. En Algérie, il est représenté par 45 espèces dont 7 au sud [2,3]. Les espèces de ce genre sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs activités stimulante, tonique [4,5], antidiabétique [6,7], diurétique [8] et antirhumatismale [9]. Des tests de recherche d'activité biologique des extraits chloroformes des espèces algériennes *C. musimomum*, *C. furfuracea*, *C. granata* et *C. maroccana* ont montré des activités cytotoxique et antiparasitaire [10].

Les études chimiques des espèces du genre *Centaurea*, ont montré leur richesse en, sesquiterpènes [11-16], triterpènes [17], stéroïdes [18], alcaloïdes [19], lactones sesquiterpènes [20,21] et en composés phénoliques notamment les flavonoïdes [22-24]. Ces derniers sont largement présents dans le règne végétal et représentent une catégorie très importante aux propriétés biologiques multiples. Ces composés sont répartis dans tous les organes des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois...). Faisant objet de nombreuses études pendant ces dernières décennies, le nombre des flavonoïdes connus a varié de 800 en 1976 [25] à 4000 au début des années 90 [26], pour atteindre 6500 ces dernières années [27].

Dans ce contexte et vu l'importance de l'utilisation des espèces du genre *Centaurea* en médecine traditionnelle et les résultats significatifs des tests biologiques obtenus dans notre laboratoire, nous avons sélectionné deux espèces : *Centaurea africana* (variété Bonnet) et *Centaurea nicaensis* (sous espèce *williana*) pour étude dans le cadre de notre travail. La première espèce endémique pour l'Algérie et la Tunisie n'a jamais fait l'objet d'étude auparavant [27].

Etant donné la richesse du métabolisme secondaire du genre *Centaurea*, ce travail a débuté par une synthèse bibliographique portant sur les diverses familles de substances naturelles issues de ce genre notamment les terpénoïdes en général et les flavonoïdes en particulier. La deuxième partie de ce travail renferme la biosynthèse, la classification, les techniques de séparation et de purification et les méthodes d'identification structurale. La troisième partie rassemble le travail expérimental réalisé dans cette étude. La dernière partie, reporte les élucidations structurales des différents composés isolés, suivie d'une conclusion générale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Kühnau, J. (1976). *Wld. Rev.Nutr. Diet.* **24**: 117-191.
- [2] Harborne, J.B. (1994). *The flavonoids: Advances in research since 1986.* Chapman & Hall, Cambridge
- [3] Harborne, J.B. and Williams, C.A. (2000). *Phytochemistry* **55**(6): 481-504.
- [4] Ibn-el bitar (1980). *Mofradat Al-Adwiah Wa Al-Agzia, Al-Zharia,* Press Cairo, 148.
- [5] Wai, J.M. and Breyer-Brandwijk M.G. (1962). *The Medicinal and Poisonous Plants of Souiherm and Easter Africa,* Livingtone, Edinburgh, 210.
- [6] Monya, M. and RACZ, G. (1974). *Plantes Médicinales et Phytothérapie,* **8**,126.
- [7] Kaij-A-Kamb, M., Amoros, M. and Girrel, L. (1992). *Pharma. Acta. Helvena,* **67**, 178.
- [8] Gonzalez, A.G., Bermejo, J., Caberar, J., Gahido, A. and Massnet,G.N. **1977**). *Ann.Quim.,***73**,86.
- [9] Teresa, J.P., Caballero, E., Anaya, J., Caballero, M.C. and Gonzalez, M.S. (1986). *Phytochemistry,* **25**, 1365.
- [10] Medjroubi, K. (1999). *Thèse de doctorat d'état,* Université Mentouri-Constantine.
- [11] Massiot, G., Morfaux, A., Le Men-olivier, L., Bouquant, J., MadaciA., Mahmod, A., Chopova, M. and Aclinou, P. (1986). *Phytochemistry,* **25**, 258
- [12] Bentame, A., Benayache S., Creche, J., Petit, G., Bermejo, B. J., Leon, F. and Benayache, F. (2005). *Biochemical Systematics and Ecology,* **33**, 1061-1065.
- [13] Christensen, L. P. and Lam, J. (1990). *Phytochemistry,* **29** , 2753.
- [14] Benayache, F., Benayache, S., Medjroubi, K., Massiot, G., Aclinou, P., Drozd., B. and Nowak, G. (1992). *Phytochemistry,* **31**, 4360.
- [15] Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Khalfallah, N. and Aclinou, P., (1997). *Phytochemistry,* **45**, 1449.
- [16] Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Kaabeche, M., Tillequin, F. and Seguin, E. (1998). *Phytochemistry,* **49**(8), 2425.
- [17] Öksuz, S. and Serin, M. (1997). *Phytochemistry,* **46**, 545-548.
- [18] Ahmed, Z. F., Rimpler, H., Hamouda, F. M., Rizk, A. M., and Ismail, S. I. (1971). *Planta Med.,* **19**-3, 264-269.
- [19] Kurmaz, B. V. (1962). *Farmatry, Zh.* **17**(2), 40-44.
- [20] Bohlman, F., Burkhardt, T. and Zdero, C. (1973). *Naturally Occurring Acetylene,* Academic Press London.
- [21] Chritensen, L. P. and Lam, J. (1991). *Phytochemistry,* **30**, 2663.
- [22] Kamanzi, K., Raynaud, J. and Voirin, B. (1982). *Plantes Medicinales et phytothérapie,* **16**, 30

- [23] Kamanzi, K., Raynaud, J. and Voirin, B. (1982). *Pharmazie*, **37**, 454
- [24] Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S., and Jay, M. (1997).
Biochemical Systematics and Ecology, **25**, 361.
- [25] Fleurentin J., Pelt J.M., (1990) *Les plantes médicinales La Recherche*, **21**, 222, 810-818.
- [26] Trease, G.E. and Evans, W.C. (1983): *Pharmacognosy*, **225**, 514, 12th Edition Baillière, Tindall, London, Philadelphia, Toronto, Mexico City, Rio De Janero, Tokyo, Hong Kong.
- [27] Quezel, P. et Santa, S. (1963): *Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*, Tome II, Edition CNRS, Paris.

CHAPITRE I

LES METABOLITES SECONDAIRES

LES PLUS COURANTS CHEZ LE

GENRE CENTAUREA

I. INTRODUCTION

Les plantes produisent un grand nombre de composés, dont, jusqu'à il n'y a pas très longtemps, on ne connaissait pas le rôle pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires. Des découvertes récentes ont montré que bon nombre d'entre eux ont un rôle défensif pour les plantes. Ils ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Ils se sont surtout illustrés en thérapeutique et dépassent actuellement 100 000 substances identifiées. Parmi eux : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes. Ces composés se trouvent dans toutes les parties des plantes mais ils sont distribués selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une plante à l'autre.

I.1. Les terpènes

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable, très diversifiés. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones. Extraites ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Ils ont un caractère commun, formés d'**unités isopréniques** (C_5H_8). Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isopréniques (C_5H_8)_n. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des anneaux. De ce fait une classification rationnelle, basée sur ce nombre qu'ils renferment, est possible [1,2] tableau I.1:

Tableau I.1 : Classification des triterpènes

Monoterpènes	C_{10}
Sesquiterpènes	C_{15}
Diterpènes	C_{20}
Sesterpènes	C_{25}
Triterpènes et Stéroïdes	C_{30}
Tetraterpènes	C_{40}
Polyterpènes	$(C_{10})_n$ avec $n > 8$

1.1.1. Les monoterpènes et les sesquiterpènes

Issus du couplage de deux unités isopréniques pour les monoterpènes et trois unités pour les sesquiterpènes et existent dans les huiles essentielles et sont largement distribués chez les végétaux supérieurs. On les retrouve sous les formes : Acycliques, Monocyclique, Aldéhydes le plus souvent acycliques, Alcools monocycliques, Alcool bicyclique, Alcools acycliques.

a) Les monoterpènes comportent 10 atomes de carbone, et sont issus des couplages de deux *unités isopréniques* « tête à queue ». Ils sont pourvus d'une grande diversité structurale, on peut citer quelques structures à titre d'exemple :

- acyclique (myrte **1**, sécoïdane **2**...)
- monocyclique (**p**-menthane **3**, iridane **4** etc)
- bi et tricyclique (carane **5**, pinane **6**, bornane **7**...)

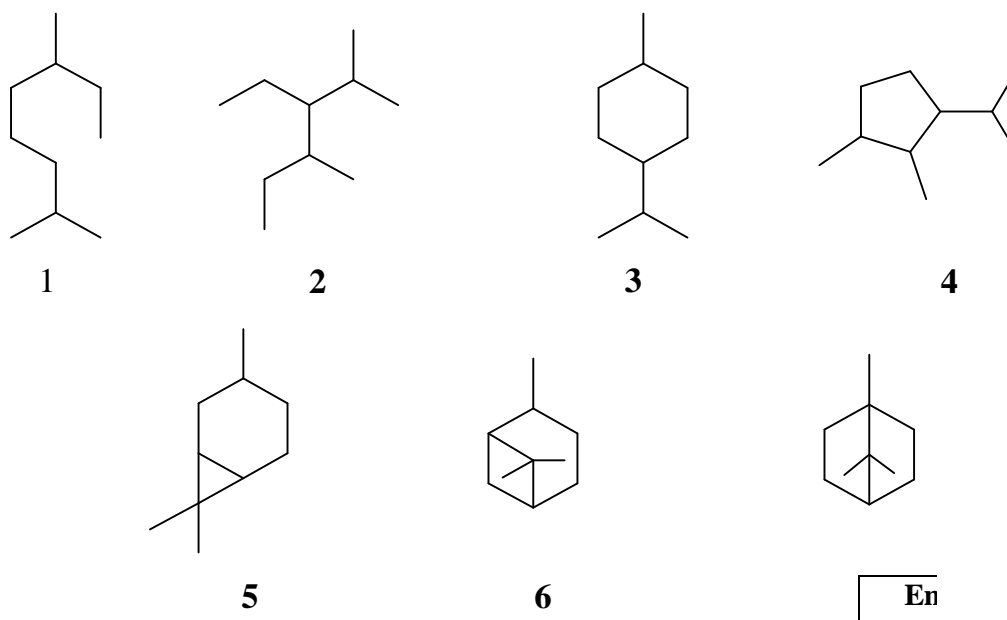


Figure I.1 : Exemple de quelques monoterpènes cycliques et acycliques

A côté de ces monoterpènes réguliers, il existe un nombre non négligeable de structures irrégulières qui proviennent d'un réarrangement de précurseurs réguliers.

b) Les sesquiterpènes Constituent un groupe de structures très diversifiées, plus de 200 squelettes carbonés ont été identifiés. Les structures carbonées de ces composés sont constituées de farnésyl di-P (assemblage de trois unités isoprènes).

Ø *Sesquiterpènes acycliques* : constituent un groupe relativement le moins abondant dans la nature. Ils dérivent tous du farnésol, nérolidol et leurs esters pyrophosphates. La plupart des sesquiterpènes acycliques ont un noyau furane ou tétrahydrofuranyl. Le farnésol **8** se forme par déphosphorylation de son précurseur le farnésyl di-P.

Ø *Sesquiterpènes monocycliques* : l'acide S (+)-abscissique **9** : une phytohormone présente dans les bourgeons, les feuilles et les fruits de nombreuses plantes.

Ø *Bicycliques* : l' α -cadinène **10**, l'alcool carotol **11**, guaiazulène **12**, l'humulène **13**, cédrol **14**.

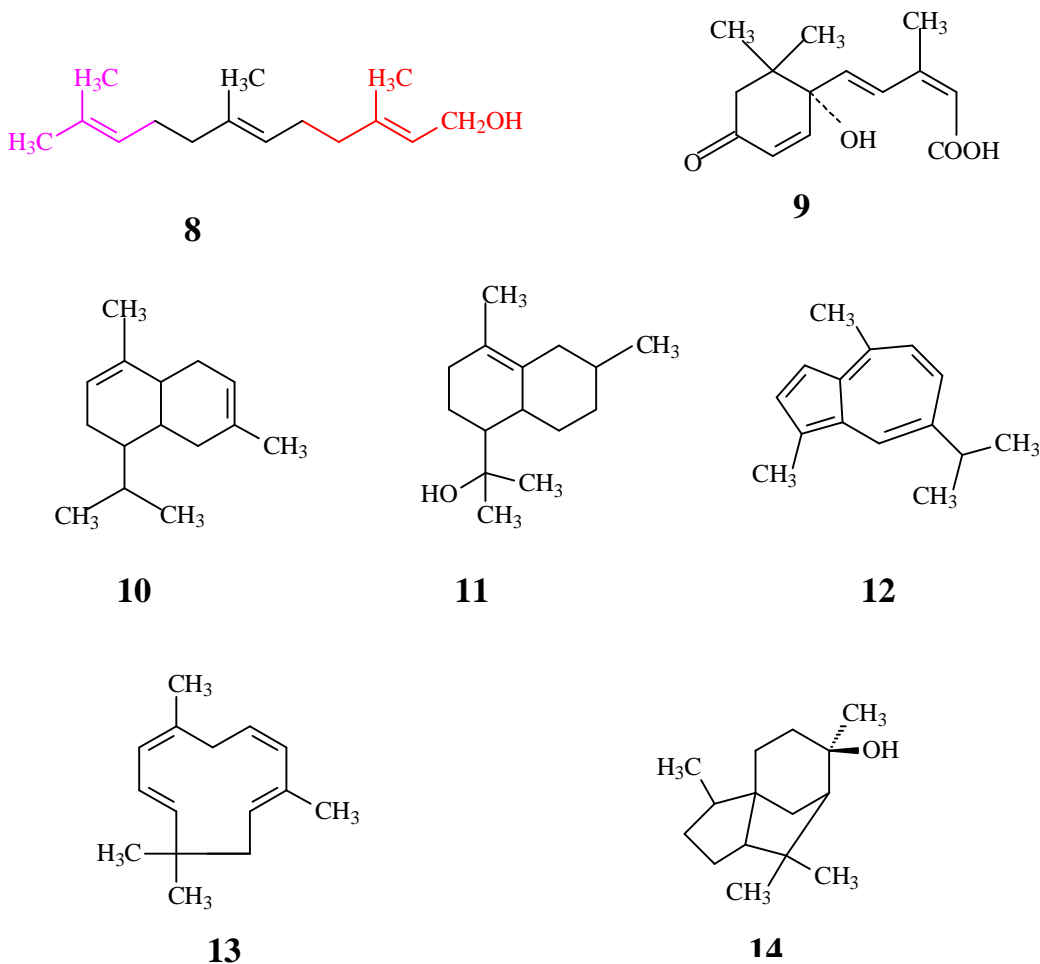


Figure I.2 : Structures des sesquiterpènes acycliques, mono et bi-cycliques

1.1.2. Les diterpènes

Ce sont des dérivés des hydrocarbures en $C_{20}H_{32}$, Issus du couplage de quatre unités isopréniques ($n = 4$). Ces composés, à point d'ébullition élevé, se rencontrent surtout dans les résines, ils sont particulièrement abondants chez les Lamiaceae et les Asteraceae. Ils peuvent être acycliques ou bi- ou tri-cycliques. Les plus intéressants sur le plan pharmacologique sont les diterpènes tricycliques à

noyau taxane tel que le taxol et le taxotère qui sont utilisés dans le traitement des tumeurs de l’ovaire, du poumon et du sein.

Ils sont surtout répandus chez les végétaux supérieurs et classés en fonction de leur diversité structurale.

- Ø Acycliques : tel que le phytol, un alcool non saturé, estérifié dans les chlorophylles, la vitamine K1.
- Ø bi et Tri-cycliques : tel que le taxane, tiglane, manool, forskoline.

1.1.3. Les triterpènes et stéroïdes

Les triterpènes sont des composés en C₃₀, ils sont très répandus, notamment dans les résines, à l’état libre, estérifié, ou sous forme hétérosidique. Ils peuvent être (figure I.3):

- Ø Composés aliphatiques : tel que Le squalène, surtout rencontré dans le règne animal, se trouve également dans l'insaponifiable d'huiles végétales (Olive, Lin, Arachide). C'est un intermédiaire dans la biogenèse des triterpènes cycliques et des stéroïdes.
- Ø Composés tétracycliques tel que les stéroïdes et les phytostérols.
- Ø Composés pentacycliques sont très fréquents chez les plantes tel que α-amyrine et β-Amyrine

Ils sont issus de la cyclisation de l'époxy-squalène ou du squalène. Les stéroïdes peuvent être considérés comme des triterpènes tétracycliques ayant perdu au moins trois méthyles.

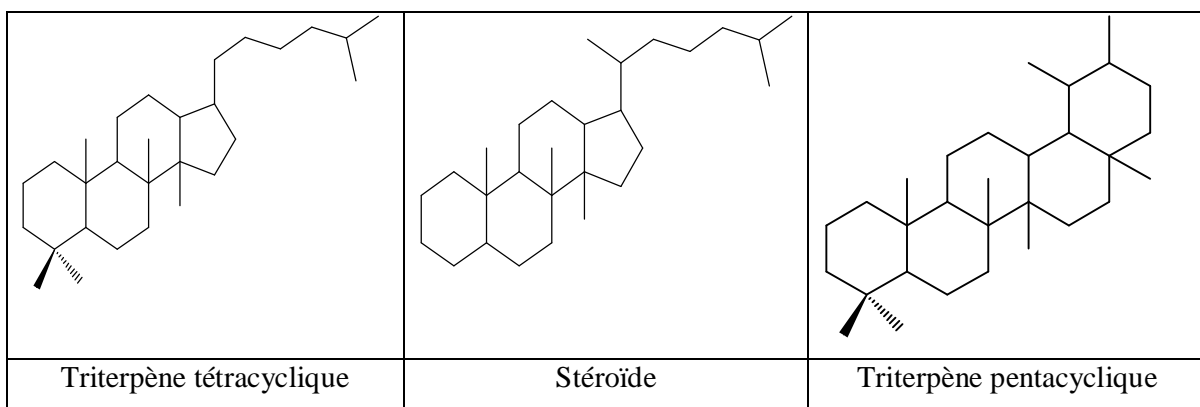


Figure I.3 : Squelettes de base des triterpènes

Abondant dans les végétaux et les animaux, les stéroïdes ont en commun une structure chimique comportant un squelette de base perhydrocyclopentanophenanthrène (figure I.4).

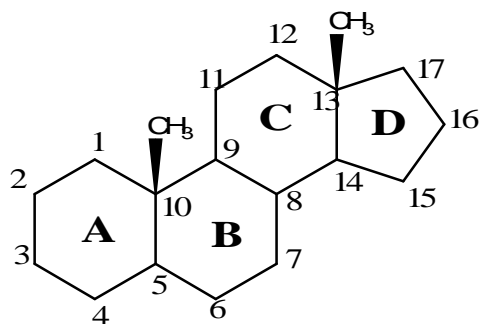


Figure I.4. Noyau perhydrocyclopentanophenanthrène

Parmi ces composés, les stérols très largement répandus dans le monde vivant (Figure I.5), se rencontrent aussi bien chez les bactéries, les champignons, les plantes supérieures, les protozoaires, les métazoaires (spongiaires, madrépores, vers, mollusques...) que chez les algues (figure I.5).

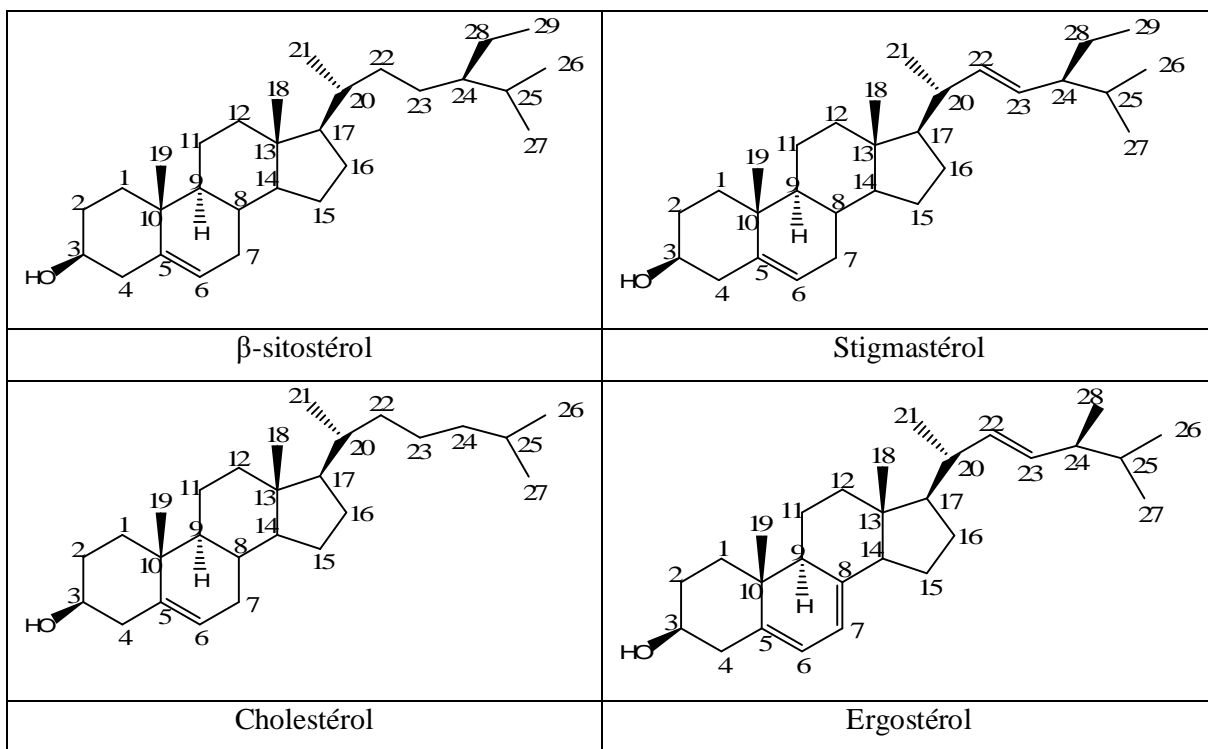


Figure 1.5 Exemple de stérols rencontrés chez le règne végétal et animal

Du point de vue structural, les stérols se caractérisent en général par la présence en position 3 β du squelette, d'un hydroxyle libre, étherifié (glycosides) ou estérifié (stérides : sans intérêt pharmacologique connu), de deux méthyles en position 10 β, 13 β et d'une chaîne carbonée en 17 β [3].

Parmi ces stérols, le plus important du point de vue activité biologique, est le β -sitostérol présent dans toutes les plantes y compris les fruits et les légumes. On les retrouve également dans des aliments comme les germes de blé ou de soja, les huiles végétales comestibles telles que l'huile de graines de tournesol ou de maïs. Des études faites sur des animaux ont montré que le béta sitostérol, comme son glucoside, possèdent des propriétés anti-inflammatoire, antipyrétique, antinéoplasique et immuno-modulatrice [4], il a des effets antitumoraux, observés sur les cellules de cancer humain de la prostate [5]. L'administration des stérols et stanols végétaux, par voie orale ou parentérale, entraîne une diminution des concentrations plasmatiques de cholestérol total (réduit les niveaux sanguins de cholestérol) cela est dû à son étroite ressemblance chimique avec le cholestérol qui lui permet d'être incorporé dans les membranes cellulaires et de bloquer l'absorption du cholestérol par inhibition compétitive [6-7]. D'autres études ont rapporté des effets bénéfiques du β -sitostérol *in vitro* sur des cellules de cancer du côlon ou du sein [8-10].

I.2. Les alcaloïdes

En général, ces composés possèdent au moins un atome d'azote **hétérocyclique**. Actuellement, la structure chimique d'environ 16 000 alcaloïdes est connue. Environ 20 % des espèces de plantes produisent des alcaloïdes. Ils ont une nature basique, présentant généralement de puissants effets physiologiques. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique. La médecine les emploie le plus souvent à l'état pur et leur véritable valeur ne s'affirme qu'entre les mains du médecin car ils entrent dans la composition de nombreux médicaments comme principe actif. Les plantes les utilisent pour la plupart d'entre eux dans leur système de défense contre les herbivores et les pathogènes car ces composés sont toxiques.

Selon leur composition chimique et surtout leur structure moléculaire, les alcaloïdes peuvent être divisé en plusieurs groupes.

- ✓ des phénylalanines: capsaïcine du piment, colchicine du colchique;
- ✓ des alcaloïdes isoquinoléiques : morphine, éthylmorphine, codéine et papavérine contenues dans l'opium du pavot; et des alcaloïdes indoliques: ergométrine, ergotamine, ergotoxine de l'ergot des céréales;
- ✓ des alcaloïdes quinoléiques : tige feuillée de la rue commune;
- ✓ des alcaloïdes pyridiques et pipéridiques : ricinine du ricin, trigonelline du fenugrec, conine (poison violent) de la ciguë;
- ✓ des alcaloïdes dérivés du tropane : scopolamine et atropine de la belladone;
- ✓ des alcaloïdes stéroïdes: racine de vétrate, douce-amère ou aconite (aconitine) par exemple.

Les principaux cycles azotés des alcaloïdes sont de type (figure I.6): Indole (a), Quinoline (b), Isoquinoline (c), Tropane (d), Pyridine (e), quinolizidine (f), la morphine (g) et solanidine (h) (stéroïde)

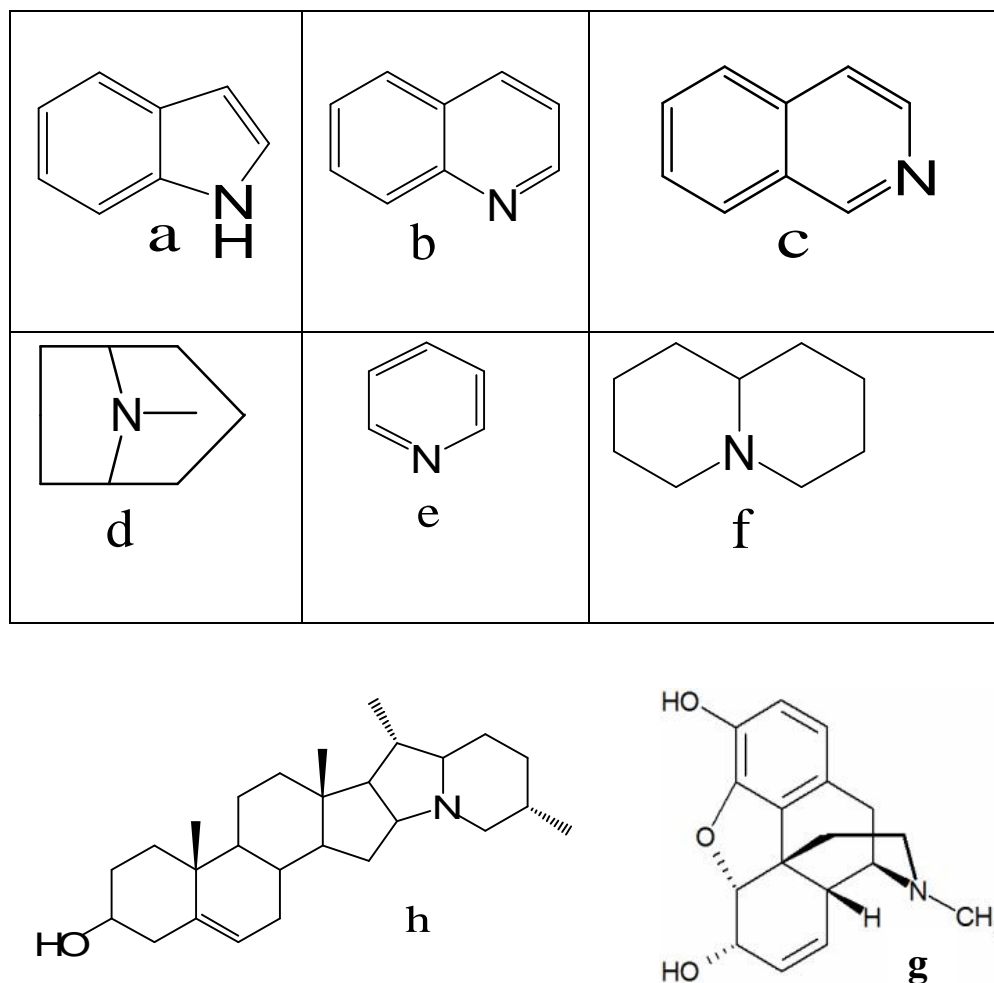


Figure I.6 : les principaux cycles azotés des alcaloïdes

I.3. Les Composés phénoliques

Les Composés phénoliques correspondent à une grande variété de substances possédant un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle. Dans cette catégorie, on trouve de nombreuses substances: les noyaux simples en C_6-C_1 , les phénylpropanoïdes (C_6-C_3) (figure I.7), les noyaux dérivant de l'extension du phényle propane, en $C_6-C_3-C_6$, comme les chalcones, les flavones, les flavonols ou les dérivés du flavane ou du flavane-3-ol (catéchines et

proanthocyanidines). Cela est récapitulé dans le tableau I.2 présentant les différentes classes de composés phénoliques, les structures de ces composés sont illustrées dans la figure I.7.

Tableau I.2 : Les classes les plus importantes des composés phénoliques dans les plantes

nombre d'atomes de carbone	squelette de base	classe
6	C6	phénols simples, benzoquinones
7	C6 - C1	acides phénoliques
8	C6 - C2	acétophénone, acide phénylacétique
9	C6 - C3	acide hydroxycinnamique, polypropène, coumarine, isocoumarine
10	C6 - C4	naphthoquinone
13	C6 - C1 - C6	xanthone
14	C6 - C2 - C6	stilbène, anthraquinone
15	C6 - C3 - C6	flavonoïdes, isoflavonoïdes
18	(C6 - C3) ₂	lignanes, neolignanes
30	(C6 - C3 - C6) ₂	biflavonoïdes
n	(C6 - C3) _n (C6) _n (C6 - C3 - C6) _n	lignines catecholmelanine (tannins condensés)

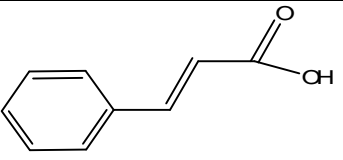
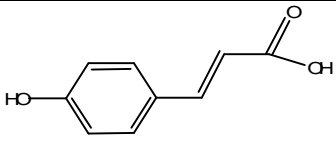
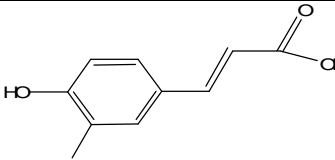
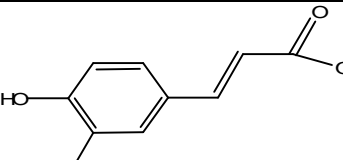
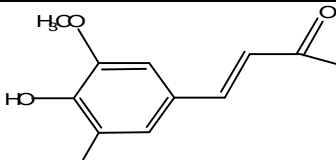
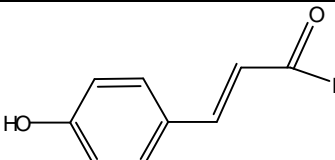
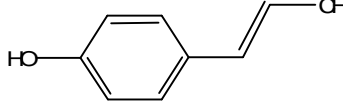
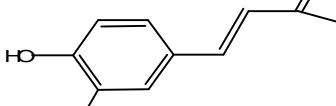
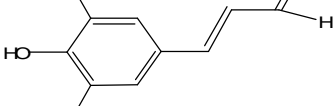
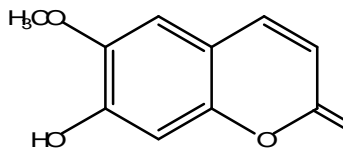
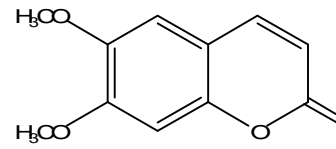
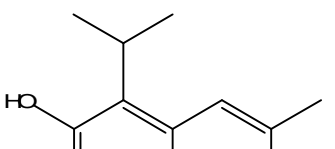
		
acide t-cinnamique	acide p-coumarique	acide caféique
		
acide férulique	acide sinapique	p-coumaraldéhyde
		
alcool p-coumarylique	coniferaldéhyde	sinapaldéhyde
		
scopolétine (coumarine)	scoparone	3,8-diméthyl-5-isopropyl-6-hydroxycoumarine

Figure I.7 : structures de quelques composés phénylpropanoïdes et coumarines

I.4. Les métabolites secondaires chez le genre *centaurea*

Les études phytochimiques effectuées sur les espèces du genre *centaurea* ont révélé leur richesse en métabolites secondaires tel que les lactones sesquiterpéniques [11-21], les stéroïdes (stérols) [22-26], en composés phénoliques de type flavonique et un degré moindre les alcaloïdes [27].

Dans notre laboratoire, plus d'une vingtaine de lactones sesquiterpéniques ont été isolées des espèces du genre *Centaurea* poussant en Algérie de type germacranolide, élémanolide, eudesmanolide et guaianolide [18-21].

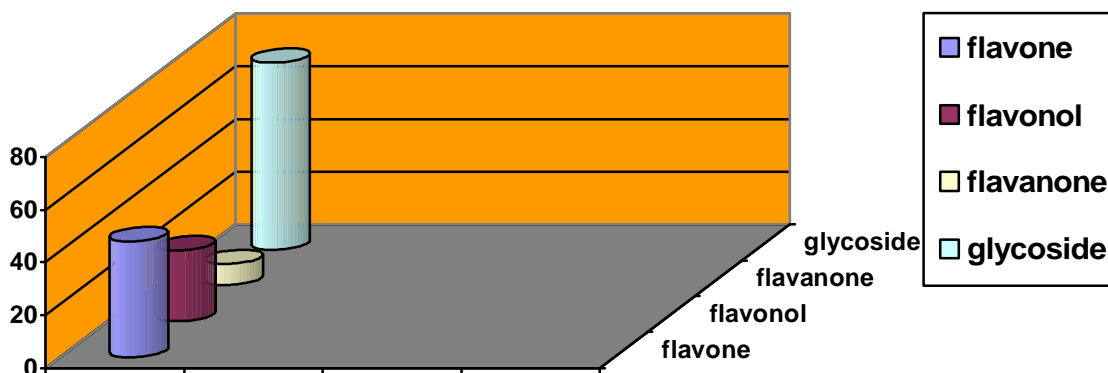
I.4.1. Les flavonoïdes isolés du genre *Centaurea*

Les espèces du genre *Centaurea* sont riches en flavonoïdes, plus de 160 flavonoïdes ont été isolés de 74 espèces du genre *Centaurea* (tableau I.3).

Une étude bibliographique présentant les différentes classes de flavonoïdes isolés dans les espèces du genre *Centaurea* a montré une nette domination des composés glycosylés (histogramme I.1).

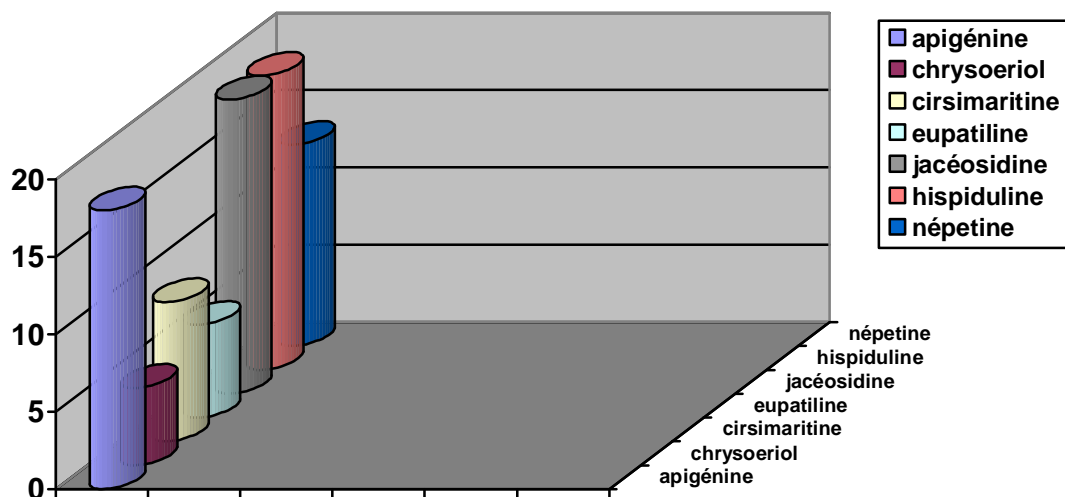
Ainsi les résultats obtenus sont :

- Ø 71 glycosyles
- Ø 44 flavones
- Ø 27 flavonols
- Ø 8 flavanones



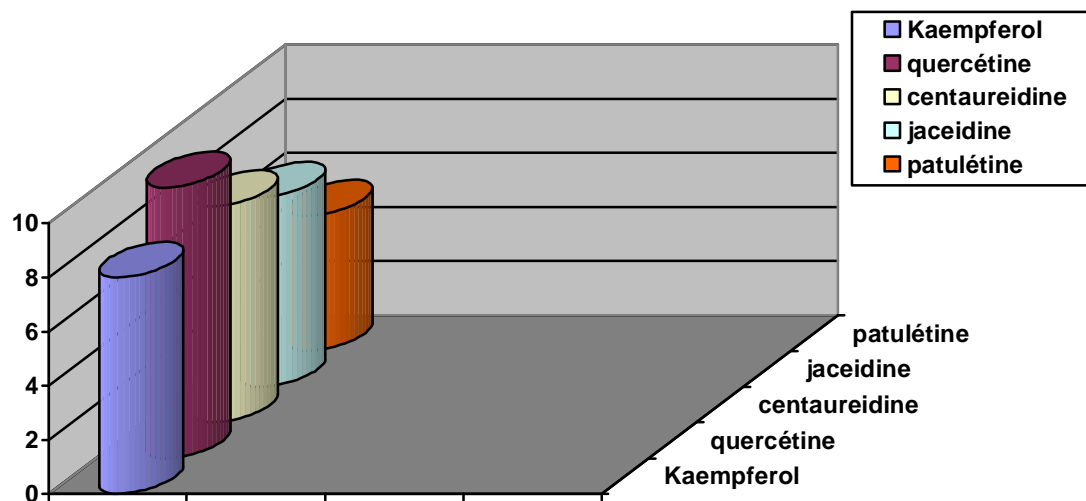
Histogramme 1 : Les différentes classes de flavonoïdes isolés du genre *Centaurea*

Cette étude montre également que parmi les flavones, l'hispiduline et la jaceosidine sont très répandues dans ce genre (19 espèces chacune), suivies de l'apiginine (18 espèces) (Histogramme I.2).



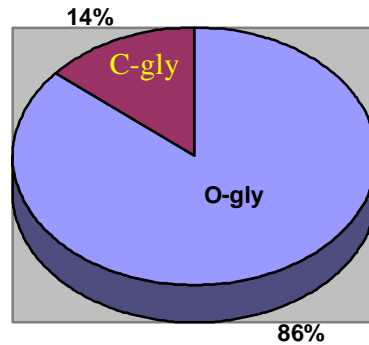
Histogramme I.2 : Répartition des flavones isolés des espèces du genre *Centaurea*

Concernant les flavonols, c'est la quercétine qui est la plus accumulée par ce genre (10 espèces) suivie du kaempférol et de la centaureidine (8 espèces) (Histogramme I.3).



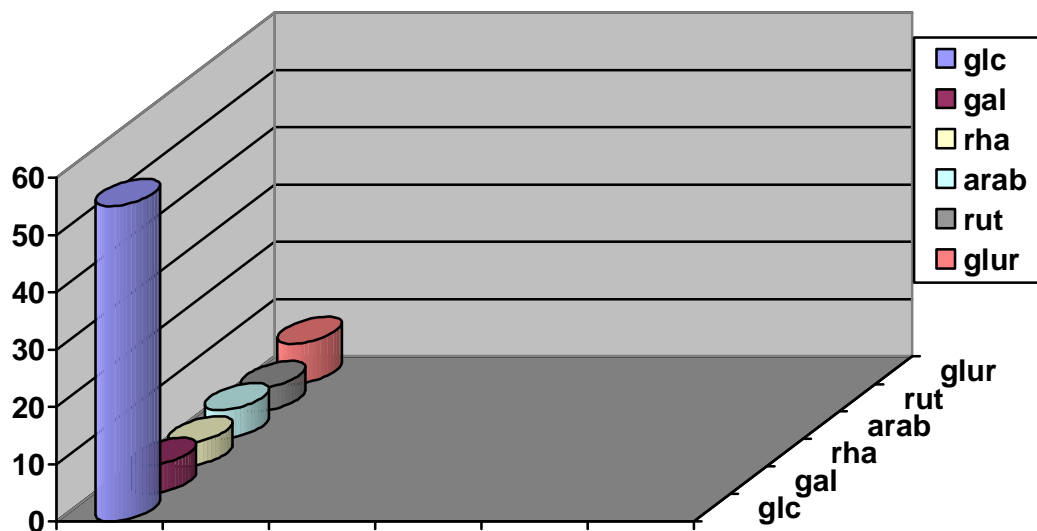
Histogramme I.3 : Répartition des flavonols isolés des espèces du genre *Centaurea*

Notant que les flavonoïdes O-glycosylés sont les plus rencontrés dans ces espèces (84%), à l'inverse les C-glycosylés sont moins abondants dans ce genre (Histogramme II.4).



Histogramme I.4 : L'abondance des flavonoïdes O-glycosylés et C-glycosylés isolés des espèces du genre *Centaurea*

Une étude plus détaillée sur l'abondance des différents sucres chez ces espèces a montré que les flavonoïdes glucosylés sont très majoritaires par rapport aux autres (Histogramme II.5).



Histogramme I.5 : L'abondance des différents flavonoïdes glycosylés isolés des espèces du genre *Centaurea*

Tableau I.3: *Les flavonoïdes isolés des centaurées*

<i>Les flavonoïdes isolés</i>	<i>Les structures</i>	<i>Les centaurées</i>	<i>Réf.</i>
Acacetin	1a	<i>C. cuneifolia</i>	28
		<i>C. pallescens</i>	29
Acacetin 6-methylether	7s	<i>C. aspera</i>	30
Apigenin	1b	<i>C. alexandrina</i>	31
		<i>C. affinis</i>	32
		<i>C. aspera</i>	33
		<i>C. calcitrapa</i>	31
		<i>C. depressa</i>	34
		<i>C. furfuracea</i>	35
		<i>C. glomerata</i>	31
		<i>C. horrida</i>	22
		<i>C. inermis</i>	36
		<i>C. kilea</i>	36
		<i>C. kotschy</i>	36
		<i>C. pallescens</i>	29, 37
		<i>C. orphanida</i>	38
		<i>C. schischkinii</i>	39
		<i>C. scoparia</i>	40
<i>C. urvillei</i>	36		
<i>C. virgata</i>	36		
Apigenin-7-O-ethylglucuronide	1n	<i>C. aspera</i>	41
Apigenin-7-O-methylglucuronide	1e	<i>C. alexandrina</i>	42
		<i>C. calcitrapa</i>	42
		<i>C. furfuracea</i>	35
		<i>C. glomerta</i>	42
		<i>C. incana</i>	43
		<i>C. pallescens</i>	31
		<i>C. triumfe</i>	89
Apigenin 3-O-β-D-glucuronide	8t	<i>C. horrida</i>	22
Apigenin-7-O-glucoside	1d	<i>C. alexandrina</i>	31, 44
		<i>C. chilensis</i>	45
		<i>C. furfuracea</i>	35
		<i>C. horrida</i>	22
		<i>C. montana</i>	46
		<i>C. pallescens</i>	31
Apigenin 6-hydroxy 7-O-glucuronide	4m	<i>C. urvillei</i>	47
		<i>C. triumfe</i>	89
		<i>C. montana</i>	48
Apigenin-4'-O-β-D-glucoside7- O-β-D-glucuronide	1f	<i>C. cyanus</i>	29,49,50
		<i>C. horrida</i>	22

Tableau I.3: *Les flavonoïdes isolés des centaurées (suite)*

<i>les flavonoïdes isolés</i>	Les structures	<i>les centaurées</i>	<i>ref.</i>
Apigenin-4'-O-glucuronide	1g	<i>C. cyanus</i>	51,52
Apigenin 7-O-glucuronide	1j	<i>C. aspera</i> <i>C. bracteata</i> <i>C. horrida</i>	51,52 25 22
Apigenin 4'-O(6-O-malonylglucoside) 7-O-glucuronide	1k	<i>C. cyanus</i>	50,53
Apigenin 4'-O(6-O-malonyl-8-glucoside)7-O-glucuronide	1l	<i>C. cyanus</i>	53
Apigenin 8-methylether	4j	<i>C. chilensis</i>	45
Apigenin 4'-O-glucoside	1h	<i>C. montana</i> <i>C. triumfe</i>	46 89
Apigenin 7-O-di-glucoside	1i	<i>C. montana</i>	46
Apigenin 6-C-arabinoside	4k	<i>C. horrida</i>	22
Apigenin 8-C-arabinoside	4l	<i>C. horrida</i> <i>C. macrocephala</i>	22 54
Apigenin 6-C-glucoside	6d	<i>C. montana</i> <i>C. triumfe</i>	46 89
Apigenin 6,8-di-C-glucoside (vicenin-2)	4e	<i>C. horrida</i> <i>C. incana</i> <i>C. militensis</i> <i>C. montana</i> <i>C. nicaensis</i> <i>C. triumfe</i>	22 43 55 46,48 56 89
Apiin	1m	<i>C. cyanus</i> <i>C. scabiosa</i>	31 31
Astragalin	8s	<i>C. alexandrina</i> <i>C. calcitrapa</i> <i>C. glomerata</i> <i>C. pallescens</i> <i>C. schischkinii</i> <i>C. ruthenica</i>	42 42 42 42 39 57
Axillarin	7k	<i>C. bracteata</i>	24
Axillarin 7-O-galactoside	7n	<i>C. ruthenica</i>	57
Axillarin 7-O-glucoside	7o	<i>C. bracteata</i>	24

Tableau I.3: Les flavonoïdes isolés des centaurees (suite)

<i>les flavonoïdes isolés</i>	Les structures	<i>les centaurees</i>	<i>ref.</i>
Beicalein	2a	<i>C. scabiosa</i>	31
Beicalein-7- O-glucoside	2f	<i>C. scabiosa</i>	31
Baicalein 6-methylether-7-O-β-galgalactopyranoside	6a1	<i>C. pseudoscabiosa</i>	58
Bracteoside	20	<i>C. bracteata</i>	25
Centaflavona A	2d	<i>C. senegalensis</i>	59
Centaflavona B	2e	<i>C. senegalensis</i>	59
Centaureidin	7c	<i>C. bracteata</i>	25
		<i>C. corenbionensis</i>	31
		<i>C. glomerata</i>	60
		<i>C. jacea</i>	25
		<i>C. nigrescens</i>	60
		<i>C. phrygia</i>	61
Centaurein	7e	<i>C. alexandrina</i>	31
		<i>C. calcitrapa</i>	31
		<i>C. corenbionensis</i>	62
		<i>C. isaurica</i>	23
		<i>C. glomerata</i>	31
		<i>C. jacea</i>	31,63,61,6
		<i>C. pallescens</i>	31
Centabracein	21	<i>C. bracteata</i>	25
Centradixin	22	<i>C. bracteata</i>	25
Chrysin	23a	<i>C. pseudoscabiosa</i>	59
Chrysin 7-O-glucuronide	23b	<i>C. pseudoscabiosa</i>	59
Chrysin 7-O-glucuronide Methylester	23c	<i>C. pseudoscabiosa</i>	59
Chrysin 6-C-glucoside	23d	<i>C. pseudoscabiosa</i>	59
Chrysin 8-C-glucoside	23e	<i>C. pseudoscabiosa</i>	59
Chrysin 7-O-β-actopyranuronoside	23f	<i>C. pseudoscabiosa</i>	59

Tableau I.3: Les flavonoïdes isolés des centaurees (suite)

<i>Les flavonoïdes isolés</i>	<i>Les structures</i>	<i>Les centaurees</i>	<i>Réf.</i>
Chrysoeriol	3b	<i>C. arbutifolia</i>	31,65
		<i>C. chilensis</i>	66
		<i>C. floccosa</i>	67
		<i>C. glomerata</i>	67
		<i>C. regia</i>	68
Chrysoeriol 7-O-glucoside	3d	<i>C. chilensis</i>	66
		<i>C. montana</i>	48
Chrysoeriol 6-C-glucoside (Isoscoparine)	6y	<i>C. montana</i>	48
		<i>C. triumfe</i>	89
Cirsilinéol	6f	<i>C. bruguierana</i>	69
		<i>C. napifolia</i>	70
		<i>C. nicaensis</i>	56
Cirsiliol	5d	<i>C. nicaensis</i>	56
		<i>C. phyllocephala</i>	71,72
		<i>C. sinaica</i>	73
		<i>C. urivillei</i>	47
Cirsimaritin	4b	<i>C. bruguierana</i>	69
		<i>C. behen</i>	74
		<i>C. furfuracea</i>	35
		<i>C. kotschy</i>	37
		<i>C. napifolia</i>	70
		<i>C. pullata</i>	75
		<i>C. orphanidea</i>	76
		<i>C. scoparia</i>	40
		<i>C. urivillei</i>	47
Corymbosin	2b	<i>C. incana</i>	43
Dihydroquercetin	12	<i>C. alexandrina</i>	31
		<i>C. calcitrapa</i>	31
		<i>C. glomerata</i>	31
		<i>C. pallescens</i>	31
Eriodictyol	11	<i>C. floccosa</i>	67
		<i>C. glomerata</i>	67
Eupafolin	7p	<i>C. arguta</i>	77
		<i>C. aspera</i>	30

Tableau I.3: Les flavonoïdes isolés des centaurées (suite)

<i>Les flavonoïdes isolés</i>	Les structures	<i>Les centaurées</i>	<i>Réf.</i>
Eupatilin	6h	<i>C. alexandrina</i>	42
		<i>C. arguta</i>	77
		<i>C. cineraria</i>	78
		<i>C. cuneifolia</i>	79
		<i>C. rothmalerana</i>	80
		<i>C. virgata</i>	36
Eupatorin	6c	<i>C. affinis</i>	32
		<i>C. aggregata</i>	81
		<i>C. cuneifolia</i>	79
		<i>C. inermis</i>	36
		<i>C. pseudomaculosa</i>	31,33
		<i>C. virgata</i>	36
Fisetin	9	<i>C. alexandrina</i>	31
		<i>C. calcitrapa</i>	31
		<i>C. glomerata</i>	67
		<i>C. pallescens</i>	31
Genkawanin	1c	<i>C. cyanus</i>	82
		<i>C. urvillei</i>	47
Helichrysin	35	<i>C. alexandrina</i>	31
		<i>C. calcitrapa</i>	31
		<i>C. glomerata</i>	67
		<i>C. pallescens</i>	31
Hesperidin	6g	<i>C. alexandrina</i>	31
		<i>C. calcitrapa</i>	31
		<i>C. glomerata</i>	67
		<i>C. pallescens</i>	31
Hispidulin	4a	<i>C. arguta</i>	31,35,65
		<i>C. aspera</i>	51
		<i>C. bracteata</i>	25
		<i>C. calcitrapa</i>	31
		<i>C. chilensis</i>	45
		<i>C. clementei</i>	83,84
		<i>C. coronopifolia</i>	85
		<i>C. floccosa</i>	67
		<i>C. furfuracea</i>	70,35
		<i>C. glomerata</i>	67
		<i>C. inermis</i>	36
		<i>C. incana</i>	43
		<i>C. napifolia</i>	70
		<i>C. pullata</i>	75
		<i>C. phyllocephala</i>	72
		<i>C. scoparia</i>	86,87
<i>C. thessala</i>	88		
<i>C. urvillei</i>	47		
<i>C. virgata</i>	36		

Tableau I.3: Les flavonoïdes isolés des centaurées (suite)

<i>Les flavonoïdes isolés</i>	Les structures	<i>Les centaurées</i>	<i>Réf.</i>
Hispidulin 7-O-glucoside	4c	<i>C. furfuracea</i>	35
		<i>C. incana</i>	43
		<i>C. napifolia</i>	70
		<i>C. nicaensis</i>	56
		<i>C. pullata</i>	75
Hispidulin 7-O-methylglucuronoside	4h	<i>C. furfuracea</i>	90
Hispidulin 7-O-rutinoside	4i	<i>C. bruguierana</i>	69
		<i>C. militensis</i>	55
Hispidulin 7-sulphate		<i>C. bracteata</i>	24
Homoorientin	5c	<i>C. solistitialis</i>	91
Horridin	8h	<i>C. horrida</i>	92
Isokaempferide	8d	<i>C. arbutifolia</i>	65
		<i>C. arguta</i>	77
		<i>C. clementei</i>	83,84
		<i>C. nervosa</i>	93
		<i>C. nigrensis</i>	94
		<i>C. phrygia</i>	61
		<i>C. bracteata</i>	25
Isorientin	6q	<i>C. montana</i>	46
Isorientin 6-C-diglucoside	5e	<i>C. niceansis</i>	56
Isorientine 7-O-glucoside	5g	<i>C. niceansis</i>	56
Isoquercetin	15	<i>C. deperssa</i>	95
Isorhamnetin	8c	<i>C. kotschyi</i>	37
		<i>C. sinaica</i>	73
Isoquercitrin	8q	<i>C. macrocephala</i>	96
Isorhamnetin 3-O-galactoside	8n	<i>C. kotschyi</i>	37
		<i>C. macrocephala</i>	96
Isorhamnetin 7-O-glucoside	8o	<i>C. kotschyi</i>	37
Isorhamnetine 3-O-methylether	8p	<i>C. sinaica</i>	73
Isoschaftoside	6z	<i>C. virgata</i>	36
Isoscoparin	6n	<i>C. montana</i>	46

Tableau I.3: Les flavonoïdes isolés des centaurées (suite)

<i>Les flavonoïdes isolés</i>	Les structures	<i>Les centaurées</i>	<i>Réf.</i>
Isovitexin 4'-O-rhamnosyl	6d	<i>C. inermis</i>	36
		<i>C. thracica</i>	97
Isovitexin 2''-O-caffeoyl-O-glucoside	6v	<i>C. montana</i>	48
Jaceidin	7b	<i>C. amara</i>	98
		<i>C. bracteata</i>	25
		<i>C. hyssopifolia</i>	62
		<i>C. kotschy</i>	36
		<i>C. nigrescens</i>	60
		<i>C. pallescens</i>	29
		<i>C. phrygia</i>	60
Jacein	7d	<i>C. calcitrapa</i>	31
		<i>C. hyssopifolia</i>	62
		<i>C. jacea</i>	31,62,63,64
		<i>C. pallescens</i>	31
		<i>C. isaurica</i>	23
Jaceoside	6e	<i>C. jacea</i>	61,64
		<i>C. ruthenica</i>	58
Jaceosidin	6i	<i>C. alexandrina</i>	31
		<i>C. arguta</i>	77
		<i>C. aspera</i>	51,30
		<i>C. behen</i>	36
		<i>C. calcitrapa</i>	42,3
		<i>C. cineraria</i>	98
		<i>C. cuneifolia</i>	78
		<i>C. inermis</i>	6
		<i>C. jacea</i>	36
		<i>C. kilea</i>	62
		<i>C. malcitana</i>	99
		<i>C. pallescens</i>	29
		<i>C. phyllocephala</i>	100
		<i>C. rothmalerana</i>	36
		<i>C. ruthenica</i>	57
		<i>C. senegalensis</i>	60
		<i>C. thessala</i>	88
<i>C. urvillei</i>	36		
<i>C. virgata</i>	36		

Tableau I.3: Les flavonoïdes isolés des centaurées (suite)

<i>Les flavonoïdes isolés</i>	Les structures	<i>Les centaurées</i>	<i>Réf.</i>
Kaempferol	8a	<i>C. alexandrina</i> <i>C. pallescens</i> <i>C. calcitrapa</i> <i>C. collina</i> <i>C. chilensis</i> <i>C. floccosa</i> <i>C. glomerata</i> <i>C. pullata</i>	42 31,42 31,42 101 44 67 67 75
Kaempferol-7-O-glucoside	24a	<i>C. cyanus</i>	29,49,50
Kaempferol-3-O-glucoside	24b	<i>C. calcitrapa</i> <i>C. isaurica</i>	42,31,102 23
Kaempferol 6-methylether 7-O-glucoside	24c	<i>C. calcitrapa</i>	42,31
Kaempferol 6-methylether 3-O-glucoside	24d	<i>C. calcitrapa</i> <i>C. pullata</i>	102 75
Kaempferol 3-O-rutinoside	24e	<i>C. calcitrapa</i> <i>C. lippii</i>	102 103
Kaempferol 6-methylether	7h	<i>C. incana</i> <i>C. senegalensis</i> <i>C. ruthenica</i> <i>C. orphanide</i> <i>C. calcitrapa</i>	43 59 57 38 102
Kaempferol 3-methylether	24f	<i>C. furfuracea</i>	75
Kaempferol 4'-methylether	24g	<i>C. acaulis</i>	56
Kaempferol 3,6-dimethylether	24g	<i>C. collina</i> <i>C. inermis</i> <i>C. jacea</i> <i>C. nervosa</i> <i>C. solistitialis</i> <i>C. vitgata</i>	78 36 93 93 91 36
Kaempferol-3-methylether 7-O-rutinoside	8j	<i>C. arbutifolia</i> <i>C. arguta</i>	65 77

Tableau I.3: Les flavonoïdes isolés des centaurées (suite)

<i>Les flavonoïdes isolés</i>	Les structures	<i>Les centaurées</i>	<i>Réf.</i>
Ladaneïn	6l	<i>C. clementei</i> <i>C. pseudoscabiosa</i>	83,84 59
Luteolin	3a	<i>C. alexandrina</i> <i>C. bracteata</i> <i>C. calcitrapa</i> <i>C. cheirantifolia</i> <i>C. glomerata</i> <i>C. pallescens</i> <i>C. scoparia</i> <i>C. orphanidea</i>	31,42 25 31,42 84 31,42 31,42 86,87 38
Luteolin 6-methylether	3f	<i>C. bracteata</i>	25
Luteolin 7-O-glucoside	3c	<i>C. militensis</i> <i>C. montana</i> <i>C. pseudoscabiosa</i>	55 48 58
Luteolin 4'-O-arbinoside	6v	<i>C. militensis</i> <i>C. montana</i>	55 48
Luteolin 4'-O-glucoside	6w	<i>C. montana</i> <i>C. triumfe</i>	48 89
Luteolin 7-di-O-glucoside	3e	<i>C. montana</i> <i>C. triumfe</i>	48 89
Luteolin 8-C-glucoside	6x	<i>C. militensis</i> <i>C. macrocephala</i>	55 54
Luteolin 6-C-glucoside (Isoorientin)	4d	<i>C. lippii</i> <i>C. macrocephala</i> <i>C. militensis</i> <i>C. montana</i> <i>C. virgata</i> <i>C. triumfe</i>	55 95 55 48 36 89
Morin	9	<i>C. calcitrapa</i> <i>C. pallescens</i>	102 31

Tableau I.3: Les flavonoïdes isolés des centaurées (suite)

<i>Les flavonoïdes isolés</i>	Les structures	<i>Les centaurées</i>	<i>Réf.</i>
Myrecetin 3-methylether 7-O-glucoside	25	<i>C. incana</i>	43
Naringenin	11	<i>C. alexandria</i> <i>C. arguta</i> <i>C. behen</i> <i>C. calcitrapa</i> <i>C. glometaria</i> <i>C. pallescens</i>	31 77 36 31,42 31,42 31
Negletein	6j	<i>C. clementei</i>	83,84
Népetin	5a	<i>C. aspera</i> <i>C. bruguierana</i> <i>C. bracteata</i> <i>C. cineraria</i> <i>C. niceansis</i> <i>C. iberia</i> <i>C. incana</i> <i>C. inermis</i> <i>C. malcitana</i> <i>C. phyllocephala</i> <i>C. pseudmaculosa</i> <i>C. urvillei</i> <i>C. virgata</i>	51,52 69 24 85 56 105,106,107 43 36 99 47,108 31,33 47 36
Nepetin 7-O-glucoside	5b	<i>C. militensis</i> <i>C. bracteata</i>	55 25
Nepetin 7-sulphate	5h	<i>C. bracteata</i>	24
Nepetin 3',4',7-trimethylether	2c	<i>C. brugurana</i> <i>C. granata</i> <i>C. napifolia</i> <i>C. nicaensis</i> <i>C. kilae</i>	69 20 70 56 36
Onopordin	6t	<i>C. chilensis</i>	108,109
Myrecetin 3,5'-dimethylether 7-glucoside	16	<i>C. incana</i>	43
Myrecetin 3-methylether 7-glucoside	17	<i>C. incana</i>	43
Orientin	6a	<i>C. militensis</i> <i>C. solistialis</i>	55 91

Tableau I.3: Les flavonoïdes isolés des centaurées (suite)

<i>Les flavonoïdes isolés</i>	Les structures	<i>Les centaurées</i>	<i>Réf.</i>
Patuletin	7a	<i>C. colina</i>	109
		<i>C. incana</i>	43
		<i>C. nicaensis</i>	56
		<i>C. ruthenica</i>	57
		<i>C. solistitialis</i>	103
Patuletin 7-O-glucoside	7f	<i>C. colina</i>	109
		<i>C. furfuracea</i>	70
		<i>C. incana</i>	110
		<i>C. nicaensis</i>	56
		<i>C. pullata</i>	75
		<i>C. ruthenica</i>	57
		<i>C. solistitialis</i>	91
Patuletin 3,7-di-O-glucoside	7q	<i>C. ruthenica</i>	57
Patuletin 7-sulphate	7r	<i>C. bracteata</i>	24
Pectolinargenin	6p	<i>C. calcitrapa</i>	102
Pinocembrin 7-di-O-glucoside	34	<i>C. ragusina</i>	111
Quercimeritrin	8f	<i>C. cheiranthefolia</i>	31,111
		<i>C. ciscausiea</i>	111
		<i>C. cyanus</i>	31,111
		<i>C. deperssa</i>	95
		<i>C. micranthos</i>	111
		<i>C. nigrifimbria</i>	111
		<i>C. ruthenica</i>	57
		<i>C. solistitialis</i>	91
		<i>C. sumensis</i>	111
<i>C. apiin</i>	112		
Quercetagetin	24j	<i>C. ruthenica</i>	57
Quercetagetin-6-methylether 7-glucoside	7f	<i>C. kotschyi</i>	37
Quercetagetin-3',6-dimethylether	7g	<i>C. cornopifolia</i>	74
Quercetagetin-3',6-dimethylether 7-O-glucoside	7j	<i>C. cornopifolia</i>	74
		<i>C. kotschyi</i>	37
		<i>C. nicaensis</i>	56
Quercetagetin-3 ,6-dimethylether 7-glucoside	7i	<i>C. cornopifolia</i>	74

Tableau I.3: Les flavonoïdes isolés des centaurees (suite)

<i>Les flavonoïdes isolés</i>	Les structures	<i>Les centaurees</i>	Réf.
Quercetagein-3'-methylether 7-O-glucoside	24k	<i>C. kotschy</i> <i>C. ruthenica</i>	37 57
Quercetagein 7-O-glucoside	24l	<i>C. kotschy</i> <i>C. ruthenica</i>	37 57
Quercetin	8b	<i>C. alexandrina</i> <i>C. calcitrapa</i> <i>C. chilensis</i> <i>C. collina</i> <i>C. floccosa</i> <i>C. furfuracea</i> <i>C. napifolia</i> <i>C. glomerata</i> <i>C. kotschy</i> <i>C. solistitialis</i>	31 42 66 101 66 90 70 31,42 37 91
Quercetin 3,7-disulfate	8r	<i>C. alexandrina</i>	44
Quercetin 3,3'-disulfate	8s	<i>C. bracteata</i>	24
Quercetin 3-glucoside 3'-sulfate	8v	<i>C. bracteata</i>	24
Quercetin 7-O-β-D-glucopyranoside	8x	<i>C. aspera</i> <i>C. montana</i> <i>C. napifolia</i>	51,52 46 70
Quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside	8w	<i>C. isaurica</i> <i>C. ruthenica</i>	23 57
Quercetin 3-O-glucoside		<i>C. calcitrapa</i>	95
Quercetin 3-O-rhamnoside	8y	<i>C. lippii</i> <i>C. horrida</i>	55 22
Rhamnetin	8e	<i>C. collina</i>	101
Rutine	8g	<i>C. alexandrina</i> <i>C. calcitrapa</i> <i>C. glomerata</i> <i>C. incana</i> <i>C. napifolia</i> <i>C. pallescens</i> <i>C. semperverins</i>	31,42 31,42 31,42 110 70 31 113

Tableau I.3: Les flavonoïdes isolés des centaurées (suite)

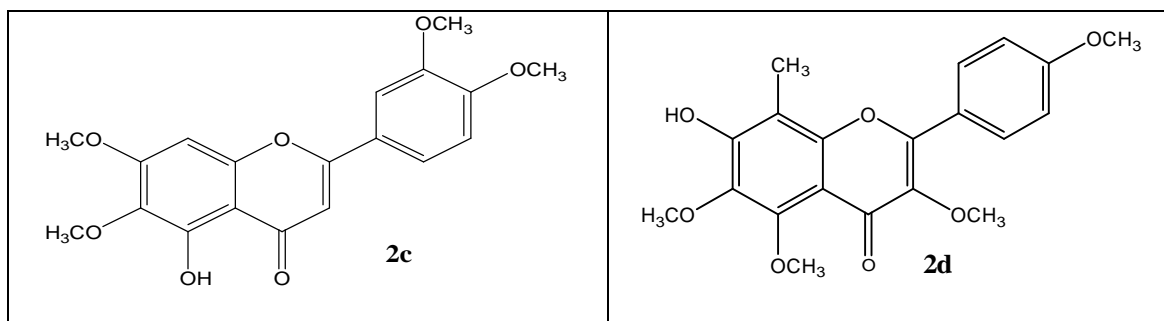
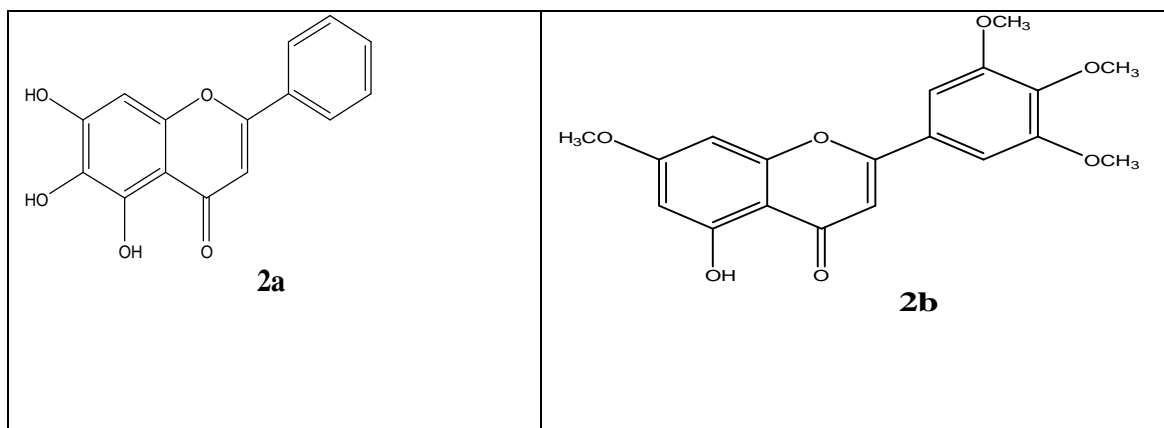
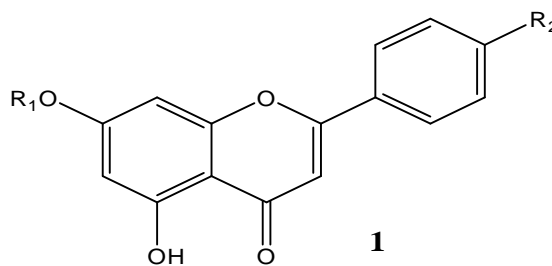
<i>Les flavonoïdes isolés</i>	Les structures	<i>Les centaurées</i>	<i>Réf.</i>
Salvigenin	6k	<i>C. affinis</i>	32
		<i>C. cineraria</i>	85
		<i>C. cuneifolia</i>	28
		<i>C. scoparia</i>	114
		<i>C. sinaica</i>	47
		<i>C. urvillei</i>	115
Salvigenin 3'-ethylether	6b1	<i>C. granata L.</i>	90
		<i>C. napifolia</i>	70
Salvigenin 3'-hydroxy	6c1	<i>C. granata L.</i>	90
Schaftoside	4n	<i>C. militensis</i>	55
		<i>C. solistialis</i>	91
Scoparin	6o	<i>C. montana</i>	48
Scutellarein	4f	<i>C. apiin</i>	116
		<i>C. deperssa</i>	95
		<i>C. scabiosa</i>	31
Scutellarin 4',7-dimethylether	6y	<i>C. clementei</i>	83,84
		<i>C. cunefolia</i>	28
Scutellarin-5-O-β-D-glucuronide	16	<i>C. deperssa</i>	95
Scutellarin-7-O-β-D-glucuronide	4k	<i>C. deperssa</i>	95
Scutellarin-7-O-glucoside	4o	<i>C. horrida</i>	22
Spinacetin	7g	<i>C. kotschyi</i>	37
Spinacetin-7-glucoside	7l	<i>C. solistialis</i>	91
Swertisin	4g	<i>C. Montana</i>	48

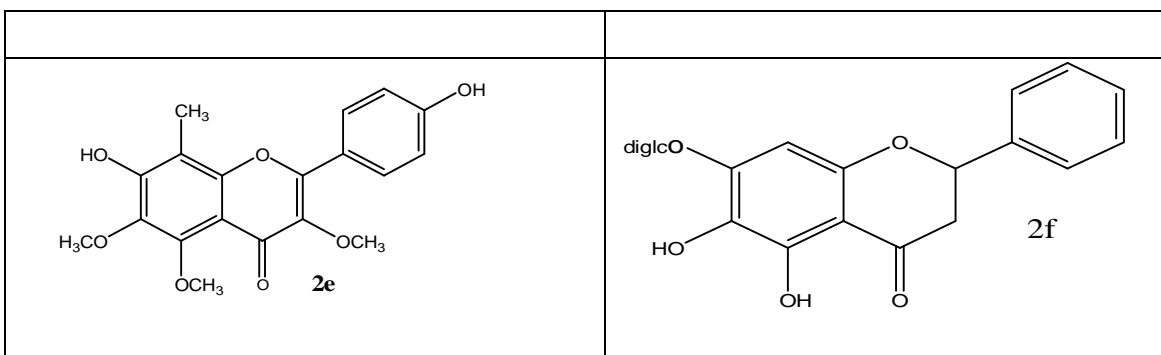
Tableau I.3: Les flavonoïdes isolés des centaurées (suite)

<i>Les flavonoïdes isolés</i>	Les structures	<i>Les centaurées</i>	<i>Réf.</i>
3',5,7-trihydroxy-4',6-dimethoxyflavone	6r	<i>C. nigrescens</i> <i>C. phrygia</i>	31 61
3',4',7-tetrahydroxy-3,6-dimethoxyflavone	7k	<i>C. jacea</i>	25,62,63,64
4',5,7-trihydroxy-3',6-dimethoxyflavone	6s	<i>C. arguta</i> <i>C. aspera</i> <i>C. jacea</i>	31,33 51,52 25,62,63,64
4',5,7-trihydroxy-3,6-dimethoxyflavone 7-O-β-D-glucoside	7m	<i>C. jacea</i>	25,62
Tamarixetin 7-O-glucoside	8l	<i>C. montana</i>	48
Taxifoline	10	<i>C. chilensis</i> <i>C. floccosa</i> <i>C. glomerata</i>	66 67 31
Tricétine 7,3',5'-triméthylether	49	<i>C. incana</i>	110
Vitexin	6b	<i>C. alexandrin</i> <i>C. calcitrapa</i> <i>C. cyanus</i> <i>C. glomerata</i> <i>C. montana</i> <i>C. pallescens</i> <i>C. ragusina</i> <i>C. regia</i> <i>C. thracica</i> <i>C. triumfe</i>	31 31 51,52 31 48 31 111 68 117 89

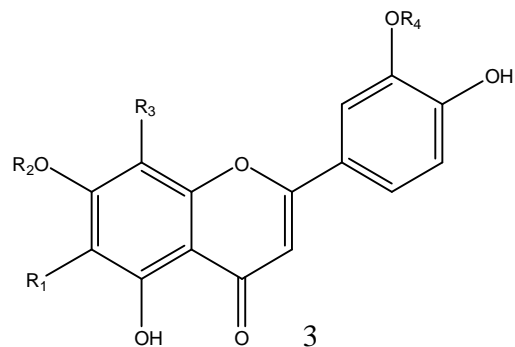
Les structures des différents flavonoïdes isolés des espèces du genre *Centaurea* cités dans le tableau I.3 sont présentées dans les figures suivantes :

	R1	R2
a	H	OCH ₃
b	H	OH
c	CH ₃	OH
d	glc	OH
e	met-glur	OH
f	glur	O-glc
g	H	O-glur
h	H	O-glc
i	di-glc	OH
j	glur	OH
k	glur	6-mal-glc
l	glur	6-O-malonyl-8-glc
m	apioglc	H
n	ethylglur	OH

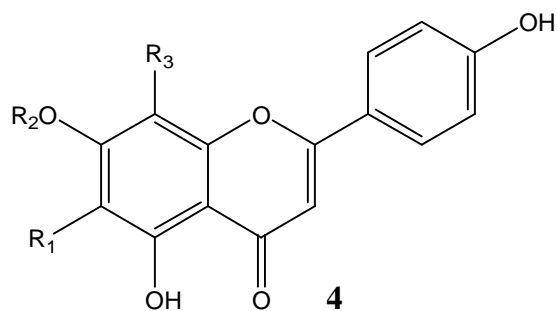




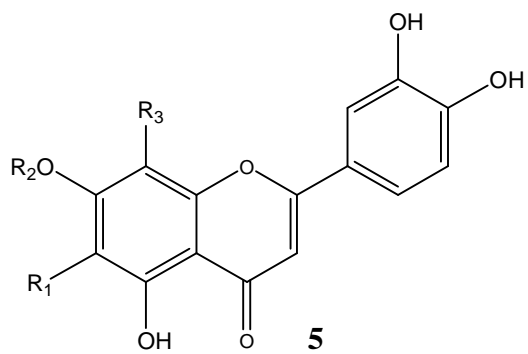
	R1	R2	R3	R4
a	H	H	H	H
b	H	H	H	CH ₃
c	H	glc	H	H
d	H	glc	H	CH ₃
e	H	diglc	H	H
f	OH	H	H	H
g	OCH ₃	H	H	H

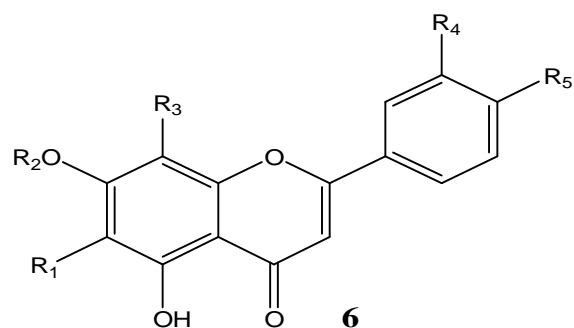


	R1	R2	R3
a	OCH ₃	H	H
b	OCH ₃	CH ₃	H
c	OCH ₃	glc	H
d	C-glc	H	H
e	C-glc	H	C-glc
f	OH	H	H
g	C-glc	CH ₃	H
h	OCH ₃	meglur	H
i	OCH ₃	rut	H
j	H	H	OCH ₃
k	C-arab	H	H
l	H	H	C-arab
m	OH	glur	H

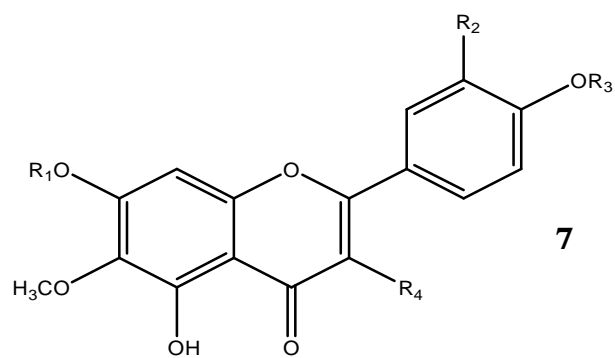


	R1	R2	R3
a	OCH ₃	H	H
b	OCH ₃	glc	H
c	glc	H	H
d	OCH ₃	CH ₃	H
e	di-glc	H	H
f	glc	H	arab
g	glc	glc	H
h	OCH ₃	HSO ₃	H

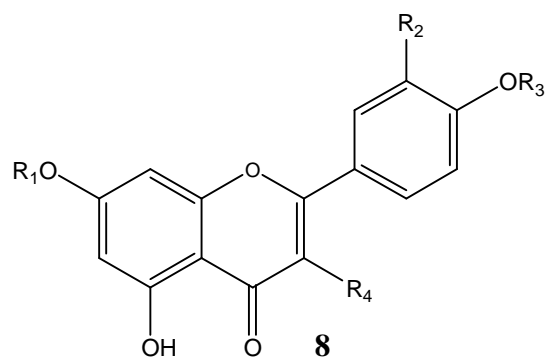




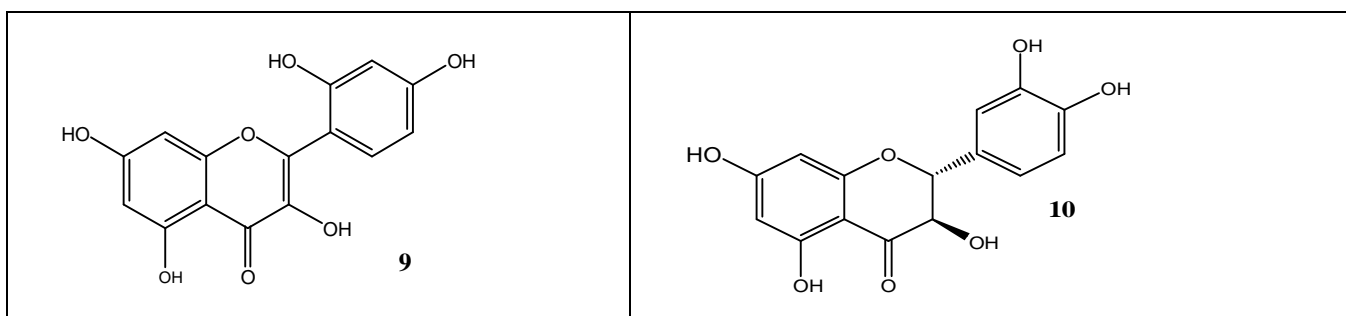
	R1	R2	R3	R4	R5
a	H	H	glc	OH	OH
b	H	H	glc	H	OH
c	OCH ₃	CH ₃	H	OH	OCH ₃
d	Oglc	H	H	H	OH
e	OCH ₃	glc	H	OCH ₃	OH
f	OCH ₃	CH ₃	H	OCH ₃	OH
g	H	rha-glc	H	OH	OCH ₃
h	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃
i	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH
j	OH	CH ₃	H	H	H
k	OCH ₃	CH ₃	H	H	OCH ₃
l	OH	CH ₃	H	H	OCH ₃
m	C-glc	glc	H	OH	OH
n	C-glc	H	H	OCH ₃	OH
o	H	H	C-glc	OCH ₃	OH
p	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃
q	C-glc	H	H	OH	OH
r	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃
s	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH
t	H	H	OCH ₃	OH	OH
u	glc	H	H	H	Orha
v	H	H	H	OH	Oarab
w	H	H	H	OH	Oglc
x	H	H	glc	OH	OH
y	glc	H	H	OCH ₃	OH
z	arab	H	glc	H	OH
a1	OCH ₃	gal	H	H	H
b1	OCH ₃	CH ₃	H	OEt	OCH ₃
c1	OCH ₃	CH ₃	H	OH	OCH ₃

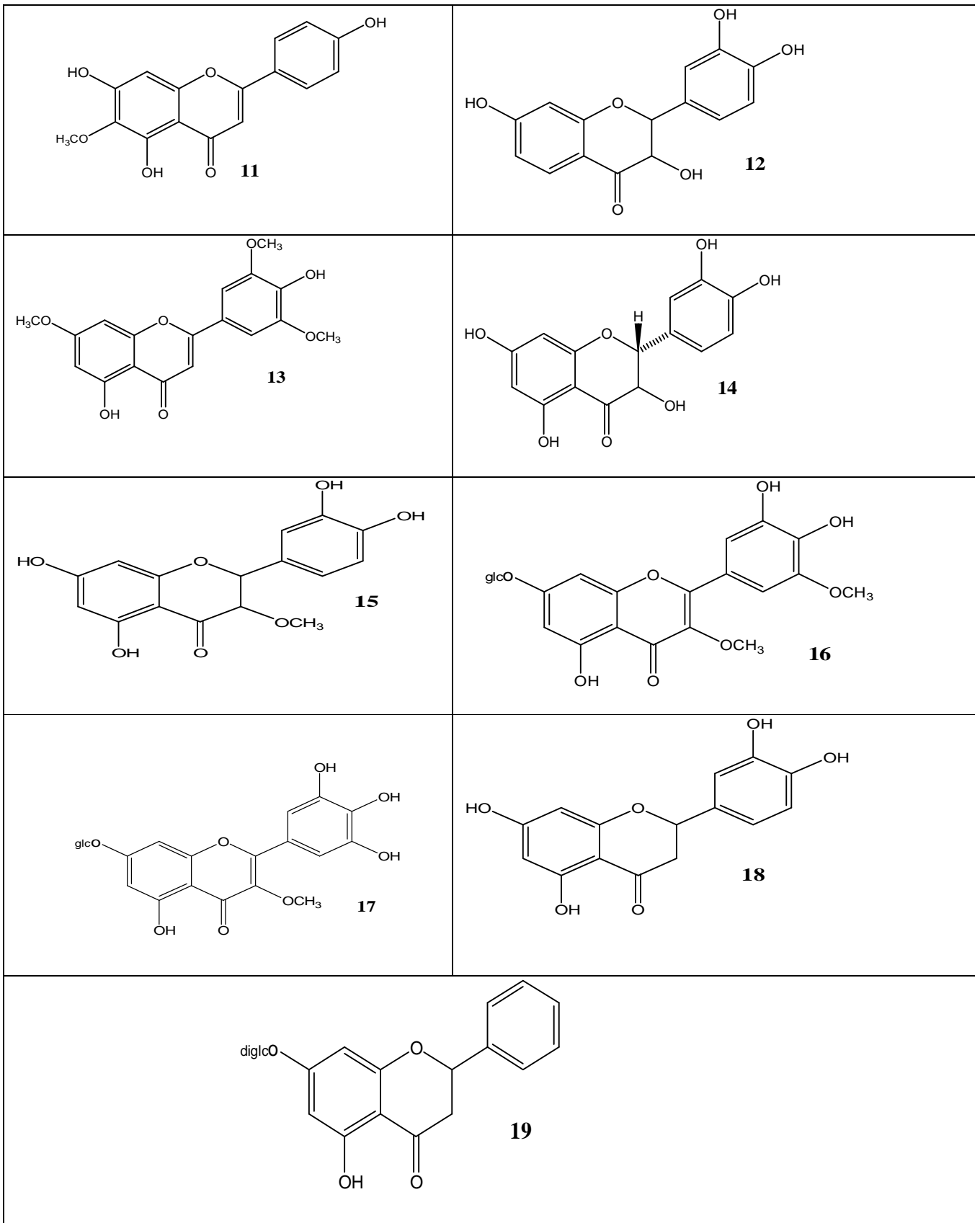


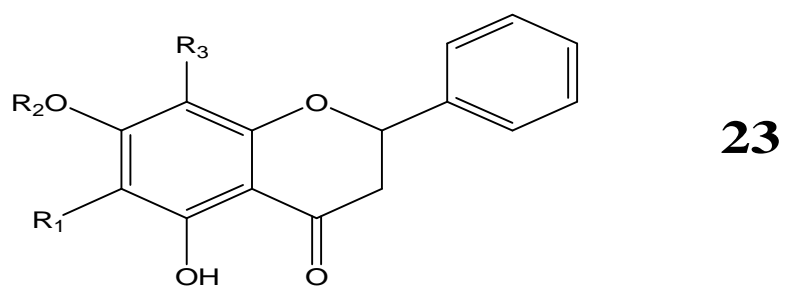
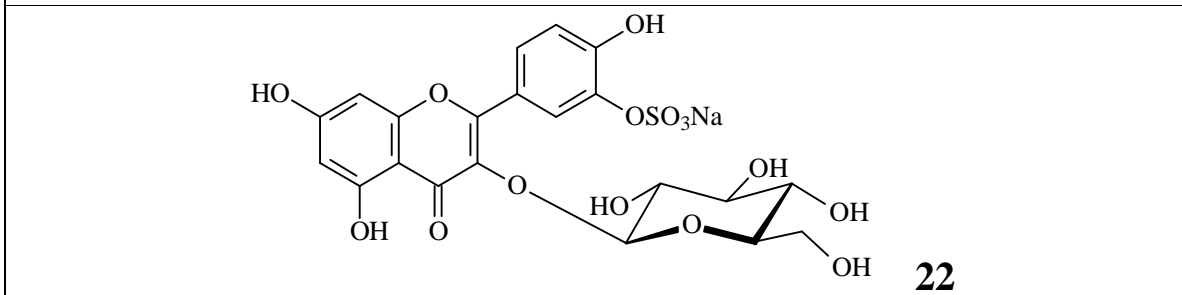
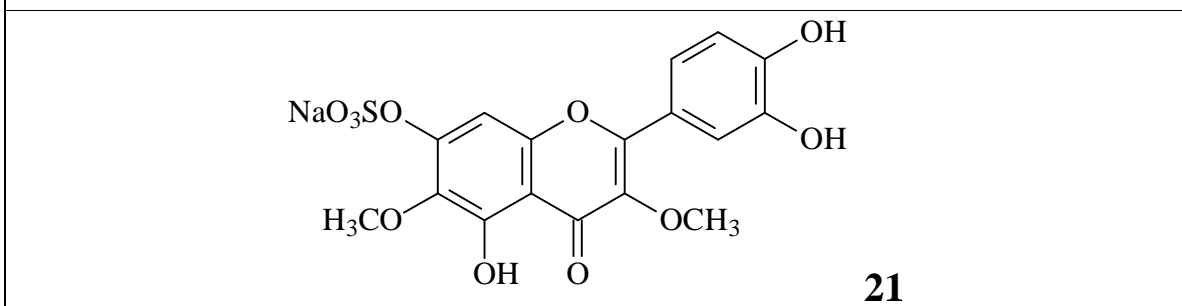
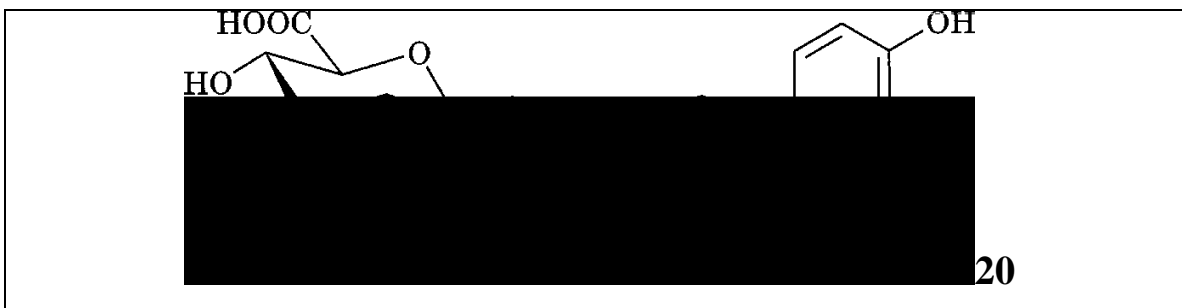
	R1	R2	R3	R4
a	H	OH	H	OH
b	H	OCH ₃	H	OCH ₃
c	H	OH	CH ₃	OCH ₃
d	glc	OCH ₃	H	OCH ₃
e	glc	OH	CH ₃	OCH ₃
f	glc	OH	H	OH
g	H	OCH ₃	H	OH
h	H	H	H	OH
i	glc	OH	H	OCH ₃
j	glc	OCH ₃	H	OH
k	H	OH	H	OCH ₃
l	glc	OCH ₃	H	OH
m	glc	H	H	OCH ₃
n	H	OH	H	O-gal
o	H	OH	H	O-glc
p	H	H	H	H
q	glc	OH	H	Oglc
r	HSO ₃	OH	H	OH
s	H	H	CH ₃	H



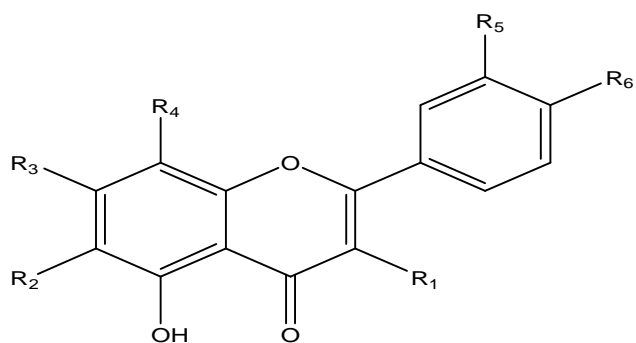
	R1	R2	R3	R4
a	H	H	H	OH
b	H	OH	H	OH
c	H	OCH ₃	H	OH
d	H	H	H	OCH ₃
e	CH ₃	OH	H	OH
f	glc	OH	H	OH
g	H	OH	H	Orut
h	H	OH	H	Orha-rha
i	glc	H	H	OCH ₃
j	rut	H	H	OCH ₃
k	rha	OH	H	Oglc
l	glc	OH	CH ₃	OH
m	H	OH	CH ₃	Oglc
n	H	OCH ₃	H	Ogal
o	glc	OCH ₃	H	OH
p	H	OCH ₃	H	OCH ₃
q	H	OH	H	Oglc
r	HSO ₃	OH	H	OHSO ₃
s	OH	OHSO ₃	H	OHSO ₃
t	H	glur	H	OH
u	H	H	H	Oglc
v	H	OHSO ₃	H	Oglc
w	glc	OH	H	OH
x	H	OH	H	Oglc
y	H	OH	H	Orha





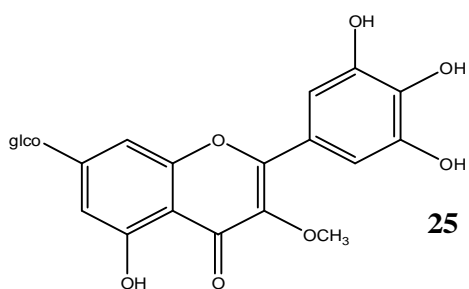


	a	b	c	d	e	f
R1	H	H	H	glc	H	H
R2	H	glur	meglur	H	H	gal
R3	H	H	H	H	glc	H

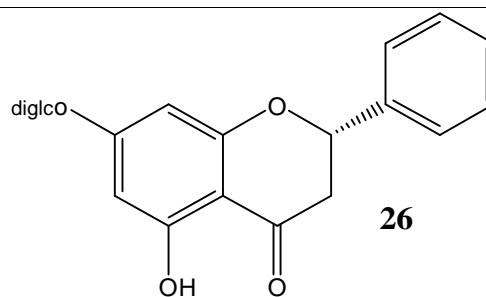


24

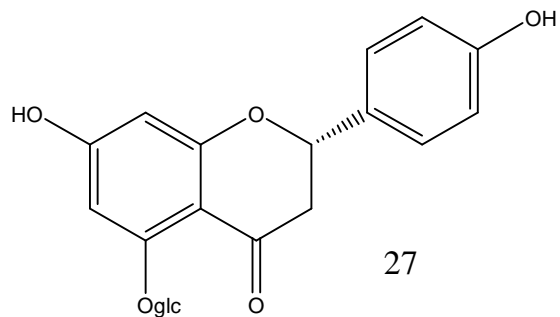
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
a	OH	H	Oglc	H	H	OH
b	Oglc	H	OH	H	H	OH
c	OH	OCH ₃	Oglc	H	H	OH
d	Oglc	OCH ₃	OH	H	H	OH
e	Orut	H	OH	H	H	OH
f	OCH ₃	H	OH	H	H	OH
g	OH	H	OH	H	H	OCH ₃
h	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H	OH
i	OCH ₃	H	Oglc	H	H	OH
j	OH	OH	OH	H	OH	OH
k	OH	OH	Oglc	H	OCH ₃	OH
l	OH	OH	Oglc	H	OH	OH



25



26



27

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Qureshi. N., Porter. J. W. (1981) In Biosynthesis of isoprenoid Compounds; Porter. J. W., Spurgeon. S. L. Eds ; Wiley : New York, Vol 1, pp 47-94
- [2] Cram,D. G. and Mahmoud,G. S; *Chimie organique*. (1968) 2^{ème} edition. Quatheir-villars. pp 918-930
- [3] Pegel KH, (1997) *South Africa Journal of Science*,;93 : 263-268.
- [4] Valdés, L. J.; A. (1994). *J. Psychoactive Drugs* 26 : 277-283
- [5] Von Holtz RL, Fink CS, Awad AB. (1998) *Nutr.Cancer*; 32:8-12.
- [6] Jones P.J, MacDougall DE, Ntanios F, Vanstone CA.(1997) *J Physiol Pharmacol*. 75,217-27.
- [7] Law M.R. (2000) *West J Med*; 173, 43-47.
- [8] Awad AB, Downie AC, Fink CS. (2000) *Int. J Mol. Med*; 5:541-5.
- [9] Awad AB, Chen YC, Fink CS, Hennessey T. (1996) *Anticancer Res.*;16:2797-804.
- [10] Awad AB, von Holtz RL, Cone JP, Fink CS, Chen YC. (1998) *Anticancer Res.*;18:471-3.
- [11] Gonzalez, A.G., Barrera, J.B., Garcia, T.Z. and Rosas, F.E. (1984): *Phytochemistry*, 23(9), 2071-2072.
- [12] Barrero, A.F., Sanchez, J.F., Rodriguez, I. and Soria Sanz, C. (1988) : *An. Quim.*, 84, C, 344-347.
- [13] Tesevic, V., Vajs, V., Todorovic, N., Dokovic, D., Marin, P. and Milosavljevic, S. (1998) , *J. Serb. Chem. Soc.*, 63 (2), 131-135.
- [14] Vajs, V., Todorovic, N., Ristic, M., Tesevic, V., Todorovic, B., Janackovic, P., Marin, P. and Milosavljevic, S. (1999): *Phytochemistry*, 52, 383-386.
- [15] Skaltsa, H., Lazari, D., Garcia, B. and Pedro, J.R. (2000): *Z. Naturforsch.*, 55c, 534-539.
- [16] Fortuna, A.M., de Riscalca, E.C., Catalan, C.A.N., Gedris, T.E. and Herz, W. (2001): *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 967-971.
- [17] Bruno, M., Maggio, A., Paternostro, M.P., Rosselli, S., Arnold, N.A. and Herz, W. (2001) *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 433-435.
- [18] Bentamene, A., Benayache S., Creche, J., Petit, G., Bermejo, B. J., Leon, F. and Benayache, F. (2005). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 1061-1065.
- [19] Benayache, F., Benayache, S., Medjroubi, K., Massiot, G., Aclinou, P., Drozd, B. and Nowak, G. (1992): *Phytochemistry*, 12, 4359.
- [20] Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Kaabeche, M., Tillequin, E. and Seguin, E. (1998): *Phytochemistry*, 49 (8), 2425.
- [21] Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Khalfallah, N. and Aclinou, P. (1997): *Phytochemistry*, 45, 1449.

- [22] Flamini, G., Bulleri, C. and Morelli, I. (2002):
Biochemical Systematics and Ecology **30**: 1051–1054
- [23] Flamini, G., Giuseppe Stoppelli, G., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Osman Tugay, O. and Demirelma, H. (2004) *Biochemical Systematics and Ecology*, **32** : 553–557
- [24] Flamini, G., Pardini, M. and Morelli, I. (2001): *Phytochemistry*, **58** : 1229–1233
- [25] Flamini, G., Antognoli, E. and Morelli, I. (2001): *Phytochemistry*, **57**: 559–564.
- [26] Picher, M. T., Seoane, E. and Tortajada, A. (1984) *Phytochemistry*, 23, 9: 1995-1998,
- [27] Ahmed, Z.F., Hammouda, F.M., Rizk, A.M. and Ismail, S.I.(1970) :
Planta Med., **18**: 227-231.
- [28] Oksuz, S., B. Halfon, and B. Terem, (1988). *Planta Med.*,**11**(2) : 66-71.
- [29] Ali, Y. E., Omar. A. A., Sarg.T.M, and Slatkin. D. J, (1987). *Planta Med.*, **53**(5) : 503- 504
- [30] Cardona, M. L., Fernandez, I. Jo& Pedro, R and Beatriz, P., (1991)
Phytochemistry, Vol. 30, No. 7: 2331-2333,
- [31] Ahmed, Z. F., Rimpler, H., Hamouda, F. M., Rizk, A. M, and Ismail, S. I, (1970).
Phytochemistry., **9**(7) : 1595-1601.
- [32] Pedja, J. k., Vele, T., Slobodan, M., Vlatka V. and Petar D. Marin (2004)
Biochemical Systematics and Ecology **32**: 355–357
- [33] Picher, M. T., Seon, E, and Tortadjada, A. (1984). *Phytochemistry.*, 23(9) :1995-1998.
- [34] Bandyukova, V. A., Khalmatov, Kh. Kh, and Alimov, Kh. I., (1969)
Khim. Prir. Soedin, **5**(4) : 324-325
- [35] Akkal, S., Benayache, F., Medjroubi, K., Tillequin, F. and Seguin, E. (2003).
Biochemical Systematics and Ecology **31** 641–643
- [36] Oksuz, S., Ayyilidiz, and Johansson, C, (1984). *J. Nat. Prod.*, **47**(5) : 902-903.
- [37] Oksuz, S., Putun,E, (1987). *Doga Kim.Ser.*,**11**(2) : 66-71.
- [38] Gousiadou, C. and Skaltsa, H. (2003) *Biochemical Systematics and Ecology* **31**: 389–396
- [39] Shoeb, M., Celik, S., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., M. MacManus, S. M., Nahar, L., Thoo-Lind, P. K. and Sarkere, S. D. (2005) *Tetrahedron* **61**: 9001–9006
- [40] Youssef and August W. Frahm (1995). *Planta Med.* 61, 570-573
- [41] Ferreres, F., and Tomas, F., (1980). *An Quim.,Ser. C*,**76**(1), 92-93.
- [42] Amer, M.M.A., Salama, O.M., Omar, A.A., (1984). *Acta Pharm. Jugosl.* 34, 257.
- [43] Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S and Jay, M. (1997).
Biochemical systematics and ecology, 361-362.
- [44] Mansour, R. M. A., Abdalla, M. F, and Salah, N. A. M, (1988). *Bull. Chem . Soc. Ethiop.*,
2(1) : 45-46.

- [45] Negrett, R. E., Lator. I., Backhouse. N., Pena. R., and Delporte. C, (1988). *Plant Med. Phytother.*, **22(1)** : 1-10.
- [46] Gonnet, J. F. (1989). These, Lyon I.
- [47] Ulubelen. A and Oksuz. S, (1982). *J. Nat. Prod.*, 45(3), 373.
- [48] Gonnet, J. F. (1996) *Biochemical Systematics and Ecology*. **24(5)**,: 447-460.
- [49] Asen. S., and Horowitz.R. M, (1974). *Phytochemistry.*, **13(7)**, 1219-1223.
- [50] Tamura. H., Kondo. T., Kato. Y and Goto. T, (1983). *Tetrahedron Lett.*, 24 (51),5749-5752.
- [51] Ferreres. F., and Tomas. F, (1980). *Bull. Liaison-Groupe polyphenol*, (9) :294-301.
- [52] Ferreres. F., and Tomas. F, (1980). *An Quim.,Ser. C*,**76(1)** : 92-93.
- [53] Takeda, K., Akiko Osakabe, A., Saito, S., Furuyama, D., Tomita, A., Kojima, Y., Yamadera, M. and Sakuta, M. (2005) *phytochemistry* **66** :1607–1613.
- [54] Ribeiro, N.L., Nahar, L., Kumarasamy, Y., Mir-Babayev, N. and Sarker, S.D. (2002) *Biochemical Systematics and Ecology* **30**: 1097–1100
- [55] Kamanzi, K.,Raymond, J.,and Voirin, B. (1983). *Plant Med et Phytother.*, **17(1)**, 47-51.
- [56] Athmani, G., Benayache , F., Benayache, S. and Dendougui, H., (1998). *Journal de la Societe Algerienne de Chimie*, **8(1)**: 29-36
- [57] Mishio, T., Honma, T. and Iwashina, T. (2006) *Biochemical Systematics and Ecology* **34**: 180-184.
- [58] Flaminia, G., Pardinia, M., Morellia, I. And Ertugrulb, K.(2002)*Phytochemistry* **61** 433–437
- [59] Aqil, M., Khan, I. Z. and Goni, A. D. (1998) *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **12(2)**: 177-180.
- [60] Bohlmann, F. and Zdero, C. (1967). *Tetrahedron Lett.*, (33), 3239-3242.
- [61] Roesler, H., Star, A E. and Mabry, T. J. (1971). *Phytochemistry.*, **10(2)**, 450-451.
- [62] Gonzales, A. G ., Bermejo, J., Breton, J. L., and Triana, J. (1971). *An Quim*, **67(8)**: 795- 799.
- [63] Farkas, L., Horhammer, L., Wagner, H., Roesler, H. and Grniak. R, (1964). *Magy Kem Folyoiat*, **70(7)** : 310-312
- [64] Wagner, H., Hoer, R. , Murkami, T. and Farkas, L. (1973). *Chem Ber.*, **106(1)** : 20-27.
- [65] Breton, G. l., Gonzales, A. G. and Rodriguez, .M. R. (1969). *An Quim.* **64(2)** : 297-301.
- [66] Negrett, R. E., Lator. I., Backhouse. N., Pena. R., and Delporte. C, (1988). *Plant Med. Phytother.*, **22(1)**: 1-10.
- [67] Negrett, R. E., Backhouse.N., Pravo.B., Erazo.S., Garcia.R and Avendano.S. (1987). *Plant Med. Phytother.*, **22(2)**, 168-172.
- [68] Ulubelen, A. and Oksuz, S and Mercilli .A. H. (1988). *Phytochemistry*, **27(12)**, 3964-3965.
- [69] Fathallah, H. M.,Kassem,F. F., El-Shaer, N. S. (1994).

Alexendria J. Pharm. Sci. **8(3)** : 219-222.

[70] Akkal, S., Benayache, F., Bentamene, A., Medjroubi, K., Seguin, E. and Tillequin, F. (2003)

Chem. Nat. Comp., **39**, No. 2, 219

[71] Kery. A., Tawaij, H. A. A and El-Khazraji, N. K. (1985). *Herba . Hung* , **24(23)** : 183-194.

[72] Tawaij, H. A. A., Kery. A and El-Khazraji, N. K.(1983).

J. Ethnopharmacol., 9(23): 299-314.

[73] Al-Easa, H. S. (1990). Phd. D. Thesis, University of Reading, Reading England

[74] Oksuz, S., Ulubelen, A., Aynechi, Y., and Wagner, H. (1982).

Phytochem.,**21(11)** : 2747-2749.

[75] Medjroubi, K.; Mezhoud, S.; Benayache F.; Seguin, E. and Tillequin, F. (2005)

Chemistry of natural compounds, **41(2)**: 226-227.

[76] Gousiadou, C. and Skaltsa, H., (2003) *Biochemical Systematics and Ecology* **31**: 389–396.

[77] Gadeschi, E., Jorge, Z. D., Massanet, G. M. and Lurs, F. R. (1989)

Phytochemistry. **28(8)**: 2204-2206.

[78] Bruno, M.,and Herz, W. (1988) .*Phytochemistry.*,**27(6)** :1873-1875.

[79] Oksuz, S., Halfon, B, and Terem, B. (1988). *Planta Med.*, **54(1)**: 89.

[80] Santos, M.B.P., Broti Balma, F., Grande, M.B. (1992).

Flavonoids from *Centaurea rothmalerana*, Groupe Polyphenol, : 153-156.

[81] Kupchan, S.M. et al. (1965). *J. Pharm. Sci.*, : 54,929

[82] Asen. S., and Horowitz.R. M, (1974). *Phytochemistry.*, **13(7)**, 1219-1223.

[83] Collado.I. G, Macias,F. A., Massanet,G .M., Lius,F. R, (1985) *J.Nat.Prod.*, **48(5)**: 819- 822.

[84] Collado, I. G, Macias, F. A., Massanet, G. M.,Lius, F. R. (1986).

Tetrahedron lett., **42(13)** : 3611-3622.

[85] Oksuz, S. and Ayyildiz, H. (1986) *Phytochemistry*. **25(2)**, : 535-537.

[86] Hieu-Hong Chou, Masood Parvez, M., Muhammad Shaiq Ali, M., Shakeel, A. and Waqar,

A.(2002) *Acta Crystallographica Section E* **58 (3)**,: 285–287

[87] XU Yan and Liang Jing-Yu (2005)

Journal of China Pharmaceutical University 36(5) 411-413

[88] Georgiadou, E., (1999). *Georg. M. Sc., Athens.*

[89] Gonnet, J. F. (1993) *Biochemical Systematics and Ecology*, **21(3)**: 389-396,

[90] Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S. Medroubi, K., Jay, M., Tillequin, F.,

Seguin, E. (1999). *Fitoterapia*, **70**, 368-370.

[91] Kamanzi, K.,Raymond, J.,and Voirin, B. (1982). *Pharmazie*, **38(7)**: 494-495.

- [92] Flamini, G., Bulleri, C., Morelli, I. and Manunta, A. (2000). *J. Nat. Prod.* 63, 662-663.
- [93] Christensen, L. P. and Lam, J.(1991). *Phytochemistry*, **30**, 2663.
- [94] Bohlmann, F., and Gupta, R. K. (1981) *Phytochemistry.*, **20(12)**, 2773-2775.
- [95] Ribeiro, N.L., Nahar, L., Kumarasamy, Y., Mir-Babayev, N. and Sarker, S.D., (2002). *Biochemical Systematics and Ecology* **30**: 1097–1100
- [96] Zapesochonaya, G.G., Evstratova, R.I., Muthan, M.N. (1977). *Khim Prir Soedin*, **5**,: 705-707.
- [97] Gavina, F., Delgado, J. Gonzalles, M.and Villar, E. (1974). *Quim.* 70(12) 1035-1036.
- [98] Bruno, M. and Herz, W. (1988). *Phytochemistry*, 27(6):1837-1875
- [99] Barrero, F. A., Sanchez, J.F. and Rodriguez, I. (1989). *Phytochemistry*, **28**, 1975.
- [100] Santos, M.B.P., Broti Balma, F., Grande, M.B. (1992).
Flavonoids from *Centaurea rothmalerana*, Groupe Polyphenol, : 153-156.
- [101] Kamanzi, K.,Raymond, J.,and Voirin,B. (1982). *Plante Med* **16(1)** : 30-33
- [102] Akkal, S. (2001): Thèse de doctorat d'état, Université de Constantine.
- [103] Kamanzi, K., Raymond, J. and Voirin, B. (1983). *Plant Med et Phytother.*, 17(1), 47-51.
- [104]. Ahmed, N., and Bibi, R. (1979). *Fitoterapia*,**50(5)** :199-200.
- [105] Ahmed, N., and Bibi, R. (1979). *Fitoterapia*, **52(4)** :187-188.
- [106] Gonzales,A. G., Arteaga,G. M. , and Breton,J. L (1973). *Phytochem.*,**12** :2997-2999.
- [107] Kery. A., Tawajj, H. A. A and El-Khazraji,.N. K. (1985). *Herba . Hung* , **24(23)**:183-194
- [108] Orallo, F., Lamella, M. and Carnica, M. (1988). *Planta Med.*
- [109] Kamanzi, K., Raynaud, J., Voirin, B., (1982b). *Pharmazie* **37**, 454
- [110] Kamanzi, K., Voirin, B. and Raynaud, J. (1983)
Plantas Med. Phytotherpia.XVII (1) :52-56.
- [111] Mahmoud, Z. F., Kasem, F. F. and Abdessalam, N. A. (1986).
Egypt. J. Pharm. Sci., **27(1-4)**, 283-289.
- [112] Bandyukova, V. A. (1967). *Khim. Prir. Soedin.*, **3(1)** : 58-59.
- [113] Plouvier, V. (1970). *C.R. Acad Sci., Ser.D.*, **270(22)** 2710-2713
- [114] Hala, S. Al-Easa, Alaa, K. and Rizk, A. M. (1992). *Fitoterapia*. **LXIII.5**.: 468.
- [115] Navarro, J. J, Caballero MC, Moran J. R, Medarde, M. Grande, M. and Anaya, J. (1990).
J. Nat. Prod. **53(3)**: 573-578.
- [116] Bandyukova, V. A., Oganesyanyan, T. E., Liseviteskaya, L. I., Sidel' Nikova, and Shinkarenko, A. L. (1966). Fenolnye Soedin . Ikh. Biol. Funkts., *Mater. Vses. Simp.*, 95-100.
- [117] Putun, E. and Cemil, A. (1989). *Doga Turk Kim* , **13(3)** , 293-298.

CHAPITRE II

LES FLAVONOÏDES

II.1. INTRODUCTION

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ce groupe comprend comme son nom l'indique des composés jaune mais aussi d'autres couleurs ou incolores. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les auronnes, les anthocyanes et les tanins. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}) et superoxydes ($O_2^{\bullet-}$).

Nous aborderons dans un premier lieu la biosynthèse des flavonoïdes, puis nous présenterons leur classification et leur distribution nutritionnelle. Ceci sera suivi, dans une deuxième partie, par une présentation de leurs activités biologiques.

Vers l'an 2000 plus de 6500 flavonoïdes ont été identifiés [1]. 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 C_6 (A et B), reliés par une chaîne en C_3 soit un système $C_6-C_3-C_6$ [2], comme le montre la Figure II.1 [3].

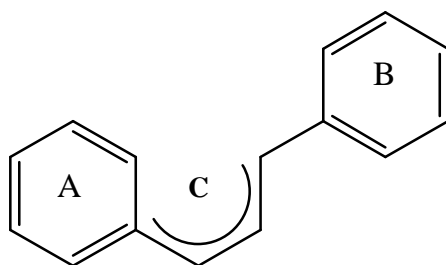


Figure II.1. Squelette de base des flavonoïdes

II.2. ORIGINE DES FLAVONOÏDES

11.2.1. Biosynthèse des flavonoïdes

Les composés de départ sont la **malonyl-CoA** et les **dérivés-CoA de l'acide cinnamique** (cinnamoyl-CoA) : ces derniers se forment avec l'intervention de cinnamoyl-CoA ligase. C'est l'acétyl-CoA carboxylase qui prépare le malonyl-CoA où trois molécules de cette dernière et la cinnamoyl-CoA produisent à l'aide de la **chalcone synthase**, **la structure de base en C-15** sous forme d'une chalcone soit la **4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone** [4]. Cette chalcone est **l'intermédiaire caractéristique** de la biosynthèse des divers **flavonoïdes**. Elle est en **équilibre** avec les flavanoïdes. Cet équilibre étant contrôlé par une enzyme la **chalcone isomérase**, cette dernière induit une fermeture stéréospécifique du cycle (addition syn. sur la double liaison) conduisant à la seule **(2S)-flavanone** [5].

- Les **aurones** dérivent directement des **chalcones**;
- L'oxydation des **flavanones** suivi de réarrangement, c'est-à-dire le déplacement d'un groupement aryle de C-2 à C-3 en présence d'enzyme **Isoflavone synthase** conduit à la formation d'**isoflavone** ; elle est considérée comme une réaction spécifique pour la biogenèse des **isoflavonoïdes** [6] où le composé 2-hydroxy isoflavone est considéré comme un intermédiaire [7];
- L'introduction d'une double liaison entre C-2 et C-3 dans les flavanones conduit à la formation des **flavones** cette réaction est catalysée par deux types d'enzymes différentes: **la flavone synthase I et la flavone synthase II (FNSI et FNSII)**;
- L'hydroxylation des flavanones en position 3 conduit aux **dihydroflavonols**, cette réaction est catalysée par l'enzyme **flavanone 3-hydroxylase**;
- Le dihydroflavonol est considéré comme un intermédiaire direct pour la synthèse des **flavonols** et des **flavan-3,4-diols**. Ce dernier est un intermédiaire biosynthétique dans la formation des **proanthocyanidines** des **anthocyanidines** et **catéchines (flavanols)**;
- Les **flavonols** sont formés par l'introduction d'une double liaison entre C-2 et C-3 dans les dihydroflavonols en présence d'enzyme **flavonol synthase**.

Toutes ces étapes sont reportées dans la figure **II.2**.

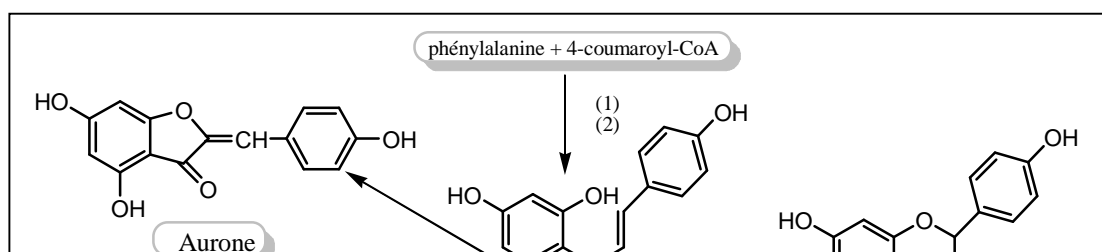


Figure II.2: schéma illustrant les différentes réactions enzymatiques conduisant aux principales familles des flavonoïdes

Le tableau (II.1) rassemble les différentes enzymes mises en jeu dans la biosynthèse reportée dans la figure II.2 [8, 9].

Tableau II.1 : Liste des enzymes (indiquées Figure II.2) conduisant aux différentes classes de flavonoïdes.

Numéro	Abreviations	L'enzyme
1	PAL	Phénylalanine ammonia-lyase
2	CHS	Chalcone synthase
3	CHI	Chalcone isomerase
4	FNSI	Flavone synthase I
5	FNSII	Flavone synthase II
6	DFR	Dihydroflavonol-4-reductase
7	IFS	Isoflavone synthase
8	FHT	Flavanone-3-hydroxylase
9	ANS	Anthocyanine synthase
10	FGT	Flavonoid-3-O-glucosyl-transferase
11	FLS	Flavonol synthase

II.2.2. Synthèse organique des flavonoïdes

Les voies synthétiques les plus utilisées pour former le squelette C₁₅ des flavonoïdes, commencent à partir d'unités simples, passant par l'intermédiaire chalcone et sont représentés dans la figure II.3.[10]

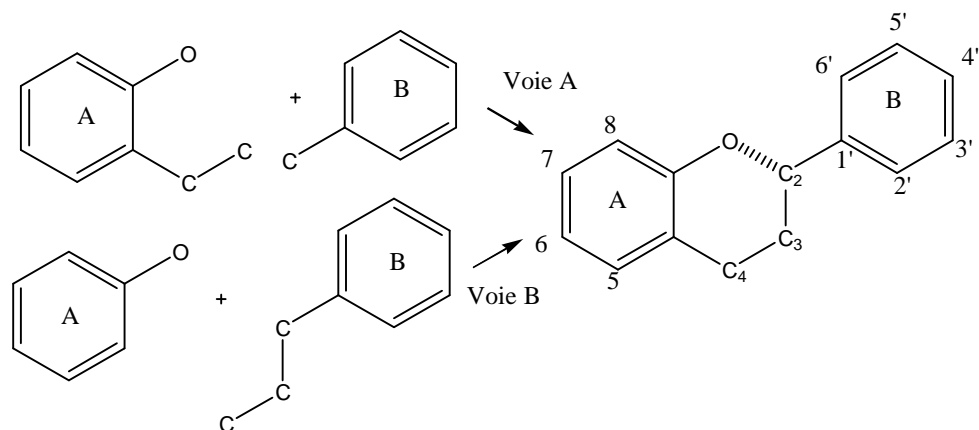


Figure II.3 : Voies rétrosynthétiques d'accès au squelette flavonoïde

- La voie A est la plus utilisée en synthèse organique, elle utilise une condensation d'un dérivé de l'acétophénone (unité C₆-C₂) avec un dérivé du benzaldéhyde (unité C₆-C₁).
- La voie B, qui correspond au chemin biosynthétique, consiste en l'acylation d'un phénol (unité C₆) par un dérivé d'acide cinnamique (unité C₆-C₃). Dans tous les cas les intermédiaires clés de synthèse racémique sont des chalcones et dihydrochalcones [Figure II.4 composés (1) et

(2)].

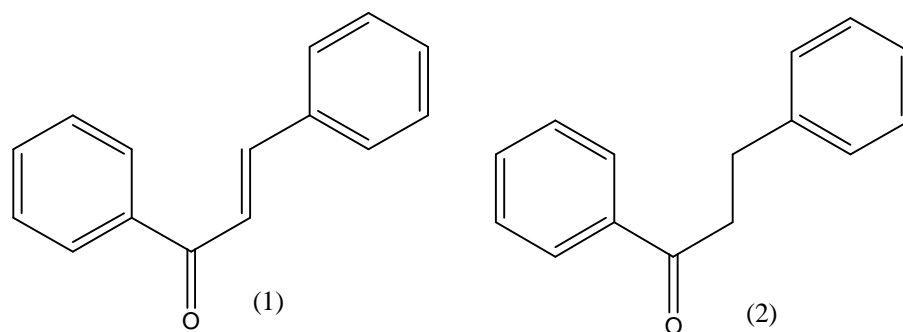


Figure II.4 : Squelette de chalcone (1), de dihydrochalcone (2)

Les chalcones intermédiaires clés dans la synthèse des flavonoïdes, peuvent être obtenues par condensation aldolique de dérivés de l'acétophénone et du benzaldéhyde substitués (catalyse acide ou basique).

L'une des condensations, qui a été très utilisée, s'effectue en catalyse basique (Figure II.5). Elle utilise de la potasse aqueuse ou de la soude maintenue entre 0° et 20°C durant une période de 15 à 72 heures. Les meilleurs rendements sont obtenus avec des substrats ayant des groupes hydroxyles méthylés ou benzylés. Notant que de bons rendements ont été obtenus avec des substrats non protégés, mais dans ce cas les temps de réaction peuvent être supérieurs à huit jours.

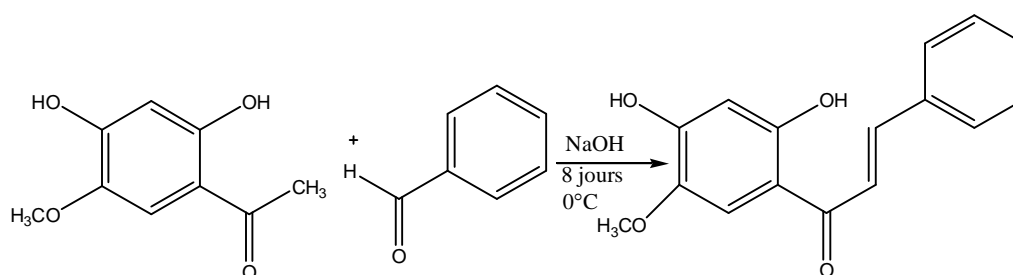


Figure II.5: Synthèse de la Flimichapparin [11]

II-3. STRUCTURE CHIMIQUE ET CLASSIFICATION

La variation du degré d'oxydation de la chaîne carbonée C 3 (formant, en général un hétérocycle C, par condensation avec un OH phénolique du noyau A) détermine les propriétés et la classification utile en sous-groupes ou famille dont les membres peuvent porter des substituants différents au niveau du noyau B [12].

Le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4 comme le montre la figure II.6.

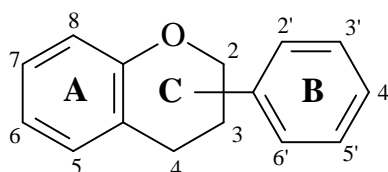


Figure (II.6)

La figure II.7 et le tableau II.2 montrent les différents sous-groupes dérivés des flavonoïdes

Tableau II.2 : Division des flavonoïdes

Flavones	Flavonols	Flavonone	Isoflavones	Chalcones	Aurones
Apigénine Lutéoline	Kaempférol quercétine	Eriodictyol	Génistéine	Butéine Phlorétine	Sulfurétine

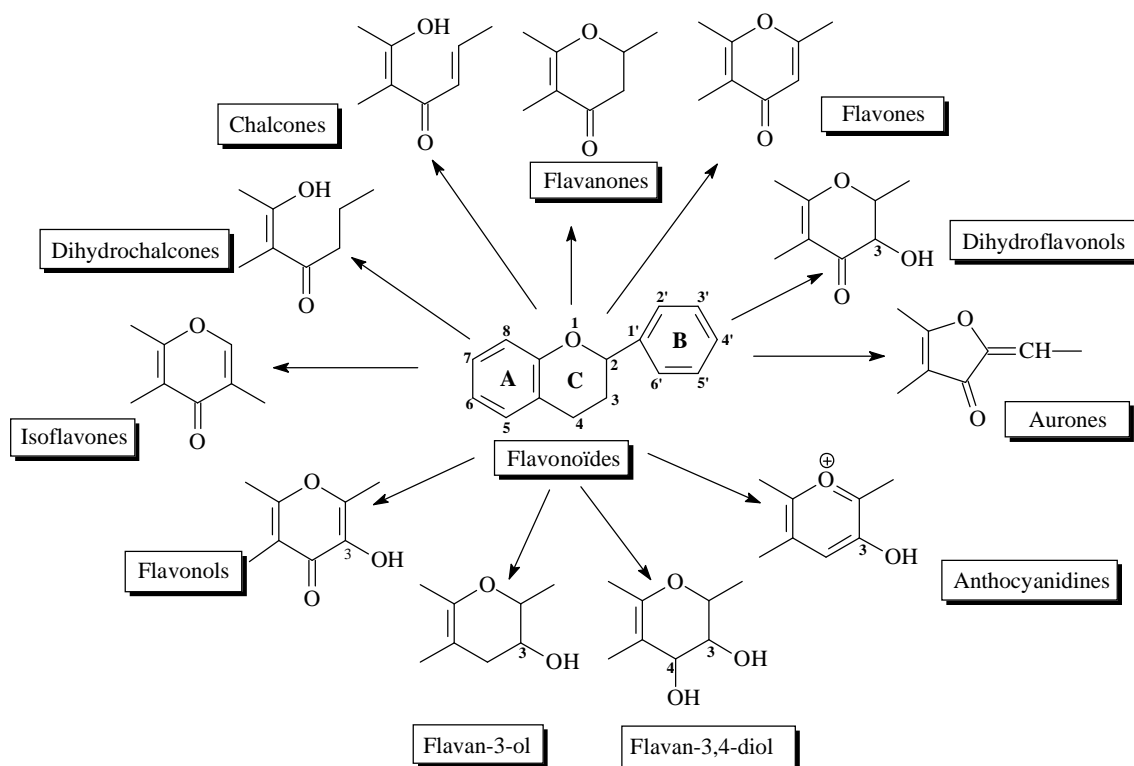


Figure II.7 : représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C.

II.3.1. FLAVONES ET FLAVONOLS

Comme nous avons mentionné ci-dessus, tous les types des flavonoïdes dérivent de la 4,2',4',6'-tétrahydrochalcone et par conséquent, possèdent tous au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' (**Figure II.2**), cela étant, l'un d'entre eux peut être absent.

Dans plus de 90% des cas, le cycle A des flavones et flavonols (**Figure II.2**) est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables: hydroxyles libres ou étherifiés en C-7 et/ou en C-8, méthylation en C-7 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre.

D'autre part, dans plus de 80% des cas, le cycle B est substitué en C-4' ou disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3',4',5'-trisubstitué; ces substituants peuvent être des groupes

hydroxyles (OH) comme peuvent être des méthoxyles (OCH₃). Les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées.

En plus, les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3 (**Figure II.2**).

II.3.2. FLAVANONES ET DIHYDROFLAVONOLS

Les flavanones et les dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison C₂-C₃ et par la présence de centres d'asymétrie (**Figure II.2**). Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Cette classe de flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé rassemblant les flavones et flavonols.

II.3.3. FLAVAN-3-OLS, FLAVAN-3,4-DIOLS ET ANTHOCYANIDOLS

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

Les anthocyanosides sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le pélargonidine-3-O-glucoside et le cyanidine-3-O-rutinoside ou kéraucyanine. Les plus fréquents sont le pélargonidine et la cyanidine.

II.3.4. CHALONES ET AURONES

Les chalcones sont différents des autres types de flavonoïdes cités au-dessus. D'une part l'ouverture du noyau pyranique central d'autre part elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique, α,β -insaturée (**Figure II.2**). Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes.

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone.

Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes décrits précédemment (**Figure II.8**).

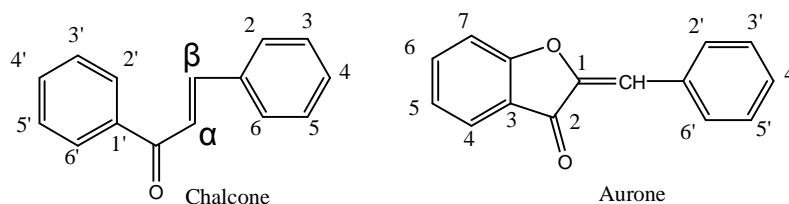


Figure II-8 : Structure des chalcone et Aurone

II.4. SUBSTITUTION DU SQUELETTE FLAVONIQUE

II.4.1. L'hydroxylation

D'une manière générale pour les flavones et les flavonols, et d'après les réactions de biogenèse (figure II.2), les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone [13].

L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la fermeture de l'hétérocycle C, c'est-à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3', 5') se fera par le biais des enzymes (hydroxylases) [14, 15].

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

II.4.2. La méthylation ou méthylation

La méthylation se fait uniquement en C-6 et ou C-8 par contre la fixation du groupement méthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (*O*-methyltransferase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la *S*-adenosyl-methionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone [16, 17].

Cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7, 8), noyau B (carbones 2', 3', 4', 5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones et flavonols [16].

11.4.3. La O-glycosylation

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

D'une manière générale, l'hydroxyle de la position 7 constitue le site préférentiel de la glycosylation dans le cas des flavones alors que dans le cas des flavonols c'est l'hydroxyle de la position 3 [18].

11.4.4. La C-glycosylation

Les flavonoïdes C-glycosylés ne sont pas rares, on y trouve plus de 350 hétérosides [19]. Dans ce type de composés, le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide [20].

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

II.5. DISTRIBUTION ET LOCALISATION

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, oranges, pamplemousses, et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, brocolis, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité dans nombreuses plantes médicinales.

Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones [21-23]. Le **tableau II.3** regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes [21-23].

Tableau II.3: Sources alimentaires des flavonoïdes

Flavonoïdes	Aliments
Flavanones	
Naringénine	fruits du genre <i>citrus</i>
Flavones	
chrysin	peau des fruits
apigénine	persil, thym, romarin, céleri
lutéoline	persil, céleri
Flavonols	

Les flavones apigénine et lutéoline sont très spécifiquement détectées dans les herbes aromatiques comme le persil, le thym, le romarin et le céleri. Pour ce dernier, les concentrations de ces deux flavones sont largement supérieures à celles présentes dans les tiges. Cependant, leurs analogues hydrogénés (flavanones), l'hésperétine et la naringénine sont exclusivement présents dans les agrumes [22]. Dans les tomates, il y a autant de naringénine que de quercétine. Cette dernière comme flavonol se retrouve de façon majoritaire dans la quasi-totalité des végétaux. Le kaempférol, autre flavonols, y est également largement détecté. Les isoflavones sont largement distribuées dans des légumes comme le soja, les haricots verts, les haricots noirs et les pois. En effet, cela est reporté dans le **tableau II.4** ou on a la répartition des 4-oxo flavonoïdes dans quelques fruits et légumes.

Tableau II.4 : Teneur en 4-oxo-flavonoïdes de quelques fruits et légumes [23]

Fruits et l'égumes	mg/kg poids	Aglycones
Persil	500	Apigénine
Ciboulette	110	Quercétine + Kaempférol
Chou frisé	150	Quercétine + Kaempférol
Chou fris���� (serré)	105	Quercétine + Kaempférol
Laitue	320	Quercétine
Oignon	300	Quercétine + Kaempférol
Endives	290	Kaempférol
Poireau	100	Quercétine + Kaempférol
C��leri	100	Apigénine + Luteoline
Haricots verts	70	Quercétine + Kaempférol
Choux de Bruxelles	65	Quercétine + Kaempférol
Brocolis	35	Quercétine + Kaempférol
Tomate	10	Quercétine + Kaempférol
Chou-fleur	3	Quercétine + Kaempférol
Pomme de terre	3	Quercétine + Kaempférol
Orange	1700/2800	Hesper��tine
Pamplemousse	2700/6000	Naringénine
Myrtilles cultivées	165	Quercétine
Cerises aigres	100	Quercétine + Kaempférol
Cerises douces	12	Quercétine + Kaempférol
Bois de ...	50/100	Quercétine + Myricétine

Les anthocyanes confèrent aux fruits et légumes leurs teintes rouges ou bleutées. Ils se trouvent surtout dans les myrtilles, cassis, airelles, groseilles, mais également, à un degré moindre, dans tous les autres fruits rouges comme les raisins, les fraises et les framboises. On peut aussi les trouver dans certains légumes comme le chou rouge et les radis.

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. Par exemple la chrysin, la quercétine, et la galangine se trouvent dans la propolis des abeilles. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions de bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, le sapin, et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires.

II.6. PROPRIETES DES FLAVONOÏDES

Une des propriétés majeures des flavonoïdes 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 flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes 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 de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

Par ailleurs, les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel, 1937) [24], chercheur de l'Université de Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou de jus de citron, riches en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité).

Malgré ces premiers résultats prometteurs, les recherches ne permettent pas ensuite d'attribuer un rôle essentiel aux divers polyphénols du monde végétal. A partir des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour ces molécules dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

II.6.1. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

L'oxygène est essentiel à la vie, mais en même temps représente une source d'agression constante pour les organismes vivants par les radicaux libres. Si la production de ces derniers n'est pas contrôlée d'une manière adéquate, ces formes réactives de l'oxygène causent des dommages oxydatifs aux macromolécules biologiques, modifiant leurs propriétés et par là, la structure et la fonction des cellules. Les radicaux libres participent à la pathogenèse d'un nombre croissant de maladies, dont le cancer et l'artériosclérose. Ils sont aussi impliqués dans l'asthme, l'inflammation, la neurodégénérescence, la maladie de Parkinson et le mongolisme. Les inhibiteurs de radicaux libres tel que les polyphénols constituent de ce fait une arme relativement efficace pour la prévention et le traitement de ces diverses affections. En effet au sein de l'organisme, les flavonoïdes protègent les acides gras insaturés, les protéines et le matériel génétique. Ils contribuent également à prévenir les cancers et les maladies cardio-vasculaires, à renforcer l'activité du système immunitaire, à faire face aux polluants exogènes de toutes origines et enfin à ralentir le processus de vieillissement [25].

Les résultats obtenus pour l'étude de l'activité antioxydante des flavonoïdes, ont montré que leur activité antioxydante est essentiellement liée à leur structure.

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

Une étude de l'activité antioxydante de trois flavonoïdes (figure II.9) hydroxyles aux mêmes positions [un flavonol (la quercétine) ; un flavan-3-ol (la catéchine) et un anthocyane (la cyanidine)] a montré que l'activité de la quercétine est deux fois plus élevée que celle de la catéchine. Ceci est dû au fait que la quercétine possède une double liaison C₂-C₃ et une fonction 4-oxo. La cyanidine avec une structure conjuguée, a approximativement la même activité antioxydante que celle de la quercétine [25].

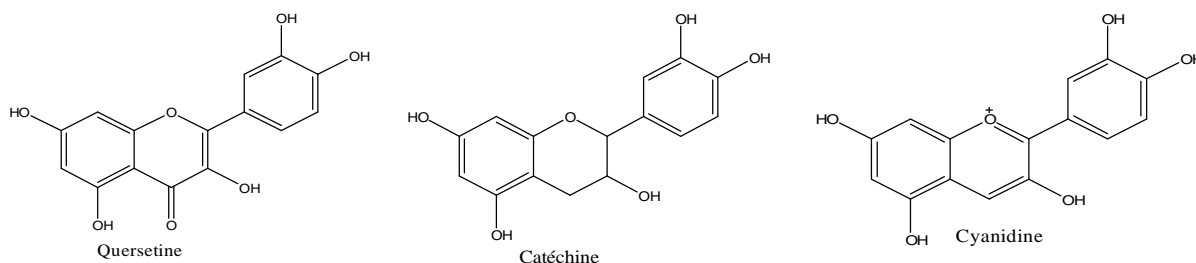


Figure II.9 : 3,5,7,3',4' –pentahydroxy flavonoïdes

b) Importance de l'ortho-dihydroxy du cycle B des flavonoïdes

La présence de deux groupements hydroxyles ortho sur le cycle B d'un flavonoïde (quercétine) lui donne une activité meilleure que celle où on a deux hydroxyles en position méta, ou un seul hydroxyle. Ce qui montre l'importance de la structure ortho-dihydroxy du cycle B [25].

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

La glycosylation du groupement 3-OH de la quercétine (cas de la rutine) ou sa suppression (cas de la lutéoline) diminue l'activité antioxydante. Ceci démontre l'importance du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C₂-C₃ adjacente à la fonction 4-oxo [24, 25].

d) L'effet de la glycosylation et la O-méthylation sur l'activité des flavones et flavanones

La comparaison de la naringénine avec le naringoside (**Figure II.10**) montre que la glycosylation du groupe 7-OH diminue largement l'activité antioxydante. Des effets similaires sont observés quand l'hespérétine est comparée avec son rutinoside (hespéridine), et la lutéoline avec son 3',7-diglucosides. La O-méthylation du groupe 7-OH a donnée des résultats semblables [25-26] et [28-29].

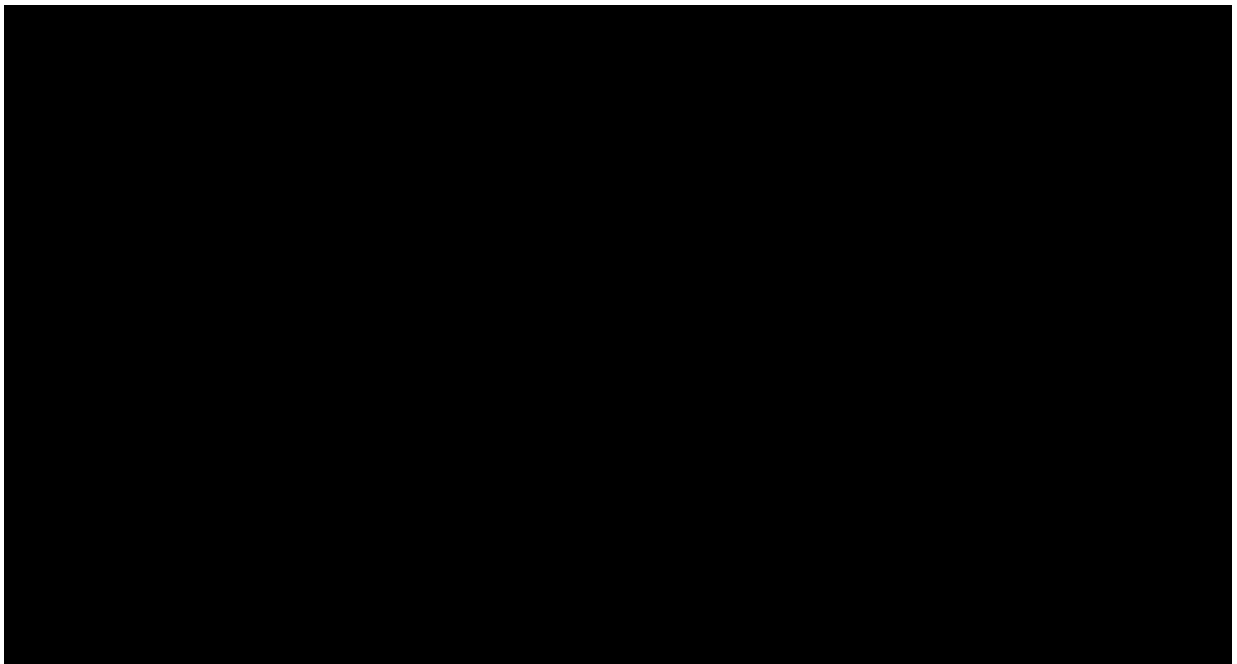


Figure II.10 : Influence de la glycosylation sur l'activité antioxydante des flavones et des flavanones (les valeurs sont exprimées en mM) [25].

En conclusion, on conclue que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- Ø La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- Ø La double liaison C₂-C₃ en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- Ø La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C₂-C₃.

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères, elle dérive du motif flavonol. Sa structure particulière lui confère les caractéristiques les plus souvent mises en avant dans l'activité d'un flavonoïde : le cycle catéchol et l'insaturation en position 2 conjuguée avec la fonction carbonyle en position 4. De plus elle possède les trois sites de complexation communément admis pour les flavonoïdes figure II.11. Elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes [25].

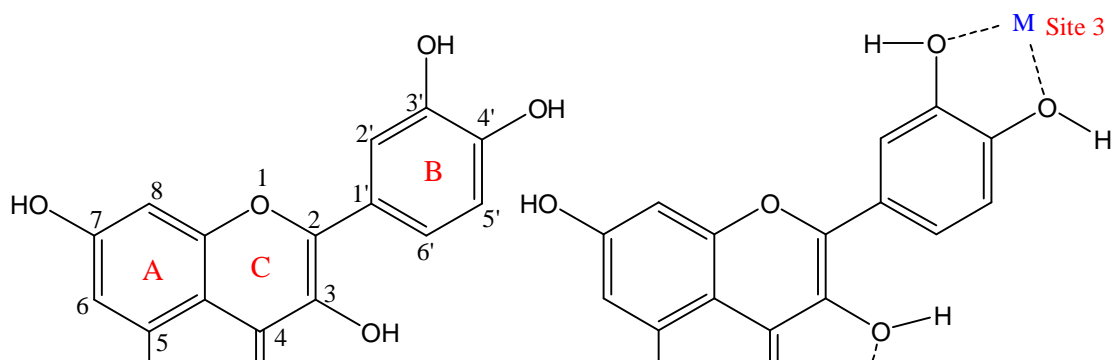


Figure II.11: structure de la quercétine, numérotation des positions et des cycles, et sites potentiels de chélation

II.6.2. AUTRES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités biologiques et pharmaceutiques.

Ils sont notamment : antiallergiques [29, 30], anti-inflammatoires [31, 32], antihypertenseurs [33], anti-influenzas [34], antifongiques [35], antivirales [36], antiulcéreux [29, 37], antiradicalaires [38, 39], et on leur reconnaît également une activité anti-malaria [40]. Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase [41]. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques [42, 43].

II.7. EXTRACTION, ISOLEMENT, PURIFICATION ET ANALYSES STRUCTURALES DES FLAVONOÏDES

Une étude phytochimique d'une plante passe impérativement par les étapes suivantes :

- Ø Récolte de la plante
- Ø Extraction
- Ø Séparation et purification
- Ø Identification structurale des produits isolés

II.7.1. Récolte des plantes

Les espèces sélectionnées sont collectées dans leur habitat naturel. La détermination botanique des espèces est réalisée par des taxonomistes.

II.7.2. Extraction des flavonoïdes

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes [19, 44]. L'une de ces méthodes est adoptée par notre laboratoire. Les étapes essentielles sont :

- ü La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante.
- ü Extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante. Les solvants les plus utilisés sont : le chloroforme qui permet l'extraction des aglycones méthoxylés et peu hydroxylés, l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés, et en dernier le *n*-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type C-glycosyle.
- ü Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec et pesés pour un éventuel traitement de séparation chromatographique.

II.7.3. Méthodes de séparation et de purification

La chromatographie est aujourd'hui, une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre la phase stationnaire et la phase mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide [47].

Il existe différentes sortes de chromatographies parmi lesquelles on peut citer :

- Ø La chromatographie de partage : C'est une chromatographie liquide-liquide. Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides.
- Ø La chromatographie d'exclusion : elle est encore appelée chromatographie d'exclusion-diffusion, tamisage moléculaire, gel filtration, perméation de gel. La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche les petites particules incluses diffusent plus lentement dans les pores du gel.
- Ø La chromatographie d'adsorption : c'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire.
- Ø La chromatographie d'adsorption en phase inverse: c'est une chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire.

11.7.3.1. La chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des différents métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption avec comme phase stationnaire une couche d'absorbant (gel de silice ou autre) étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimensions variables (généralement 20 x 20 cm, 10 x 10cm ou 5 x 10cm) avec une épaisseur comprise entre 0.5 et 2 mm et une phase mobile comme éluant. Elle est composée d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants qui migrent lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé [44].

Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée sous UV (longueurs d'ondes $\lambda = 254$ nm et 365 nm). Si nécessaire, les taches du chromatogramme sont révélées par pulvérisation de réactifs appropriés. On détermine alors, pour chaque constituant, le Rapport frontal (R_f).

La valeur du R_f est définie comme suit :

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit après élution}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant après élution}}$$

11.7.3.2. La chromatographie sur couche mince préparative

La CCM préparative est une technique chromatographique utilisée dans la séparation et l'isolement de divers métabolites présents dans un mélange peu ou pas complexe. Elle dérive de la chromatographie sur couche mince mais dans ce cas, les zones de silice correspondante aux taches sont récupérées de la plaque contrairement à la CCM analytique. En utilisant diverses phases stationnaires et les systèmes de solvants appropriés, on examine les bandes des constituants sous lumière UV ou on révèle une frange de la plaque par pulvérisation avec le réactif adéquat [45].

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

11.7.3.3. Chromatographie d'adsorption sur colonne

Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme gel de silice, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités importantes de mélanges complexes [44]. L'élution peut se faire sous forme isocratique ou sous forme d'un gradient. En principe, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la CCM analytique. Toutefois, l'élution peut-être accélérée grâce à l'addition progressive de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale.

II.7.4. LES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION STRUCTURALE DES FLAVONOIDES

L'identification des structures moléculaires organiques se fait généralement par l'utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques, telles que la résonance magnétique nucléaire (R.M.N) avec ses différentes techniques (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, etc.), la spectrométrie de masse (SM) avec différents types d'ionisation : impact électronique (IE), ionisation chimique (IC) et bombardement par des atomes accélérés (FAB) ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible qui

reste la méthode de choisie pour ce type de composés [45,46]. Elle donne des indications importantes sur la nature du flavonoïde et son mode de substitution. Toutefois, la fluorescence sous lumière UV et les valeurs de leur R_f dans différents systèmes de solvants donnent des informations utiles.

11.7.4.1. Effet du rapport frontal (R_f).

Le rapport frontal (R_f) est défini comme étant le rapport de la distance entre la tâche du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part. Il est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé (organique ou aqueux) sur un support «phase stationnaire» donné (gel de silice, polyamide, cellulose). Notant que la valeur du R_f varie avec le type de squelette flavonique (aglycone ou glycosyle) ainsi que la disposition de ses différents substituants [45, 46, 47].

Le **tableau II.5** montre l'effet de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du R_f .

Tableau II.5 : La relation entre le R_f et la structure flavonique.

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

11.7.4.2. La fluorescence sous lumière de Wood

La fluorescence sous lumière de Wood (la longueur d'onde de 365 nm) des flavonoïdes donne des renseignements très utiles sur leurs structures chimiques préliminaires.

Le **tableau II.6** montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [13, 44].

Tableau II.6. : 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 Flavonol avec 3-OR. Chalcones.
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleu-verte	Flavanone sans 5-OH

II.7.4.3. La spectrophotométrie UV-Visible

C'est une technique très importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle permet la localisation des hydroxyles libres et leur position sur le squelette flavonique, par la formation de complexes avec les différents réactifs, qui se traduit sur le spectre UV-Visible par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorptions par rapport au spectre de référence pris dans le méthanol. Ce dernier est caractérisé par deux bandes d'absorption principales : la bande I et la bande II (figure II.12) [48].

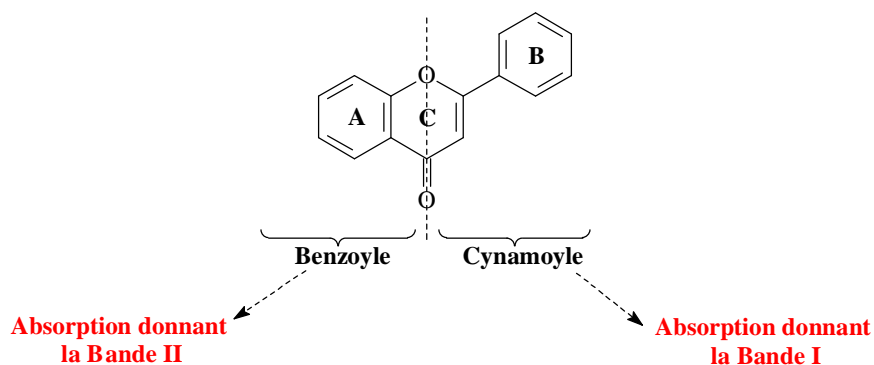


Figure II.12 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

La bande I : présentant un maximum d'absorption entre 300 et 385 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoylé qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C₂-C₃) et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.

La bande II : présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoylé qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A[45].

Le tableau **II-7** donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes.

Tableau II.7. : 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 Ep	245-275

Le maximum d'absorption d'une telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles, méthoxyles ou glycosylés sur le squelette flavonique. L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacer le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosylés fait déplacer ce maximum vers des longueurs d'onde plus faibles [49].

II.7.4.3.1. Addition de réactifs (série spectrale UV)

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que **NaOH**, **NaOAc**, **AlCl₃**, **H₃BO₃** et **HCl**. Ces derniers réagissent avec les groupements hydroxyles par formation de complexes qui se traduira sur le spectre UV par des

déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique.

a)- Spectre en présence de NaOH:

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

Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de l'intensité lumineuse de la bande I renseigne sur le nombre et la position des hydroxyles libres [44]. L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence d'un OH libre en 7. Cependant, l'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et / ou 4' et 7.

Dans le cas des isoflavones hydroxylées sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est ortho-dihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [46].

b)- Spectre en présence de NaOAc:

L'acétate de sodium, **NaOAc**, base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soit les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH.

Un faible déplacement bathochrome de la bande II des flavones, et des flavonols traduit la présence d'un hydroxyle libre en 7. Cet effet peut être perturbé par la présence d'autres substituants en 6 ou en 8 [46].

Dans le cas des isoflavones, le **NaOAc** ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7 [45], ceci se traduit par un déplacement bathochrome de la bande II (6-20 nm). Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné [46].

c)- Spectre en présence de NaOAc + H₃BO₃:

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (**H₃BO₃**) est additionné à l'échantillon en présence de **NaOAc**. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système ortho-dihydroxyle sur le

cycle B (3', 4') ou sur le cycle A (6, 7 ou 7, 8) suite à la formation des chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande I (figure II.13) [46].

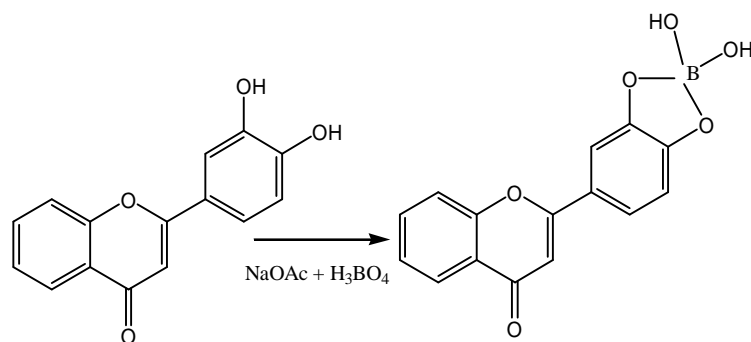


Figure II.13

d)- Spectre en présence de AlCl₃ et AlCl₃+HCl :

La présence du chlorure d'aluminium (AlCl₃) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le MeOH. Les complexes formés entre AlCl₃ et les groupes ortho-dihydroxyles des noyaux aromatiques A et B sont instables et se décomposent en présence de HCl [48], par contre, ceux formés entre AlCl₃ et les hydroxyles 5-OH ou 3-OH et la fonction carbonyle sont stables [50,51]. Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande I. par rapport au spectre après addition de AlCl₃ et un déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le MeOH (figure II.14).

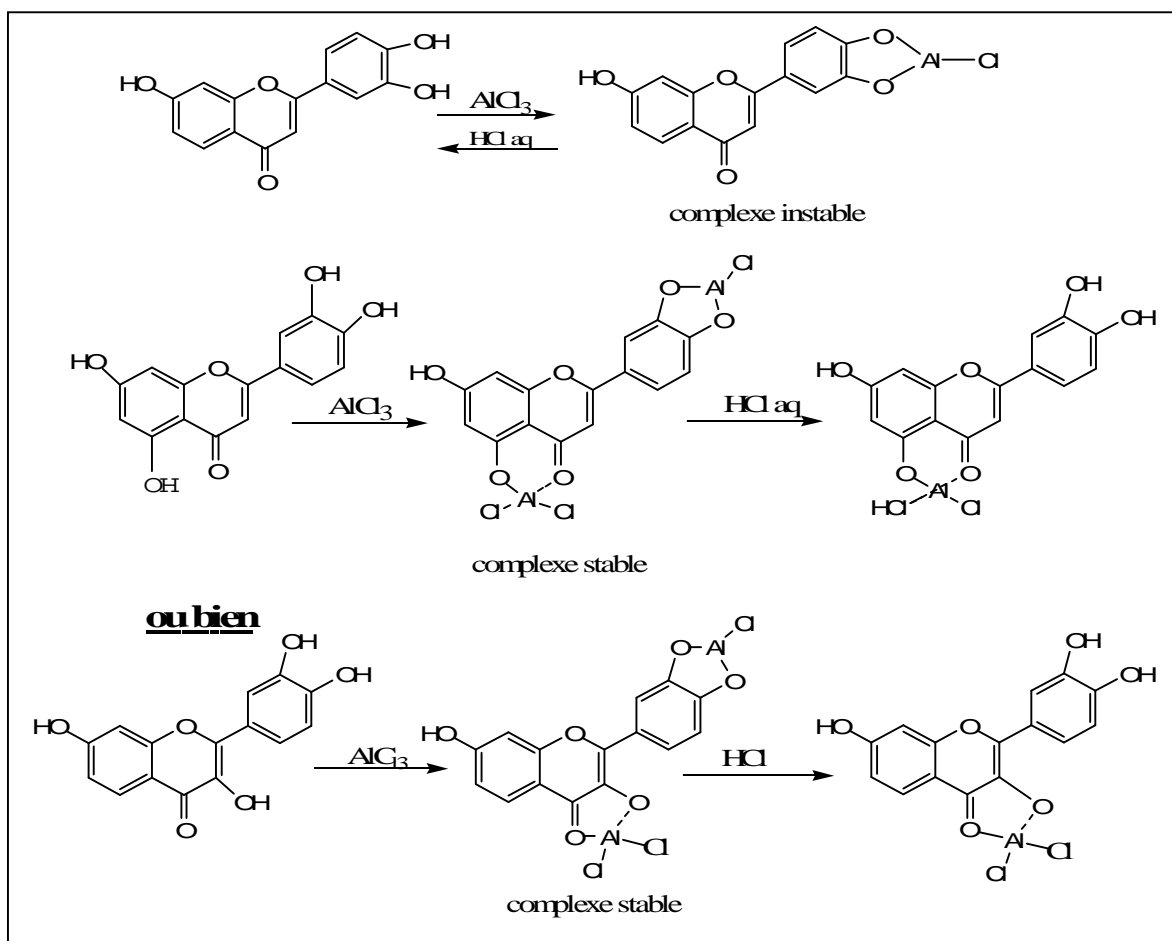


Figure II.14: Formation des différents types de complexes après addition de AlCl_3 et en présence de HCl

Le tableau II.8 récapitule les principaux déplacements des bandes I et II en présence des réactifs dans le cas des flavones et flavonols.

Tableau II.8 : Les principaux déplacements des bandes I et II

Les réactifs	Les déplacements (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
NaOMe (NaOH)	<p>- Stable +45 à +65 1- L'intensité ne diminue pas/ MeOH. 2- L'intensité diminue/ MeOH.</p> <p>- L'intensité diminue avec le temps, décomposition.</p>		<p>4'-OH 4'-OR ; 3-OH 3,4'-OH ; Ortho di-OH sur A (6,7) ou (7,8) ; Ortho di-OH sur B.</p>
	<p>Nouvelle bande par rapport au spectre MeOH entre [320-335]</p>		<p>7-OH</p>
NaOAc		<p>+5 à +20 déplacement diminue en présence d'un substituant en 6 ou 8.</p> <p>Pas de déplacement ou très faible.</p> <p>Spectre qui se décompose avec le temps.</p>	<p>7-OH 7-OR 5,6,7-tri-OH ou 5,7,8-tri-OH</p>
NaOAc+H ₃ BO ₃	<p>+12 à +36 +05 à +10</p>		<p>Ortho di-OH sur B Ortho di-OH sur A (6,7) ou (7,8).</p>
AlCl ₃	<p>Une seule bande entre 420-430. Une seule bande entre 440-460.</p>		<p>Ortho di-OH sur B avec 5-OH (flavone) Ortho di-OH sur B avec 5-OH (flavonol)</p>
MeOH /	<p>+17 à +20</p>		<p>5-OH avec une 6-OR</p>

II.7.4.4. L'hydrolyse acide des hétérosides :

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

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

II.7.4.5. La Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique qui permet la détermination du poids moléculaire des aglycones ainsi que le nombre et la nature des substituants hydroxyyles ou méthoxyyles [52,53]. Les ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, donnent des ions fragments caractéristiques, ces derniers fournissent des renseignements utiles, notamment sur la substitution des noyaux A et B [53].

Il existe plusieurs analyses en spectrométrie de masse. Celles utilisées au cours de notre étude sont énumérées ci-dessous :

- l'ionisation par impact électronique (IE)
- l'ionisation par impact électronique à haute résolution (IEHR)
- The Fast Atom Bombardment (FAB)

Dans cette dernière technique l'ion moléculaire n'est pas toujours observable. On observe généralement, l'ion correspondant au poids moléculaire plus un proton $[M+H]^+$. D'autres ions peuvent se former lorsqu'il existe des impuretés de sel ou par addition de chlorure de sodium NaCl (on obtient l'ion $[M+Na]^+$), ou de chlorure de potassium (on obtient l'ion $[M+K]^+$). Ces informations permettent de déduire le poids moléculaire du composé étudié.

Les différents mécanismes de fragmentation des flavones et des flavonols sont récapitulés dans les figures (II.15 et II.16). Pour le kaempférol [55] et la luteoline [56] pris comme exemples.

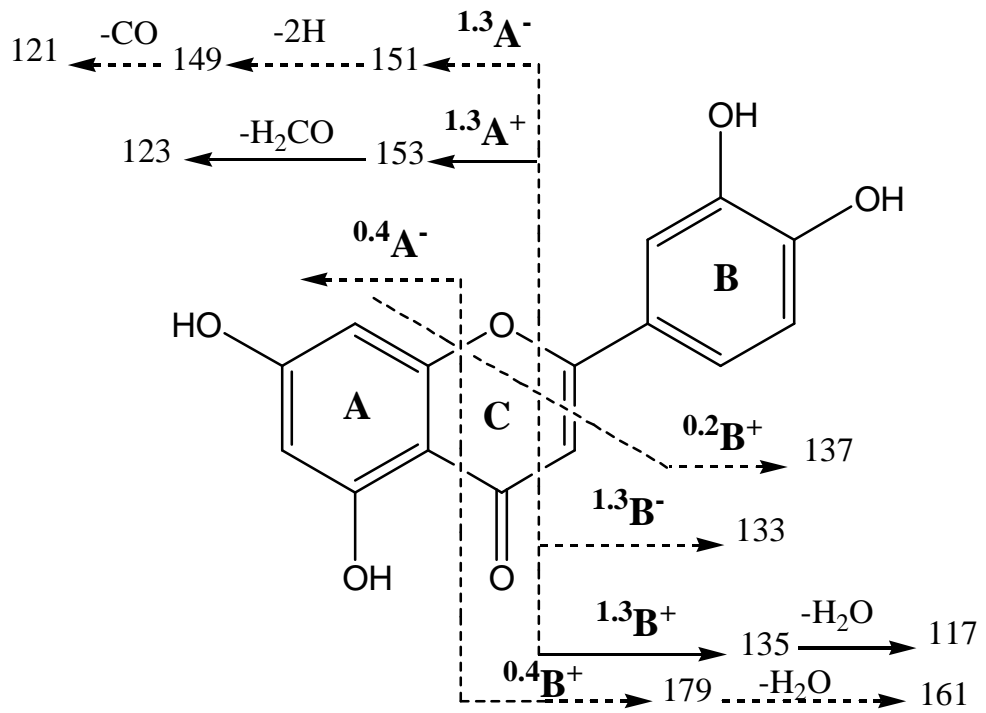


Figure II.15 : Les fragmentations principales des ions de la luteoline $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$

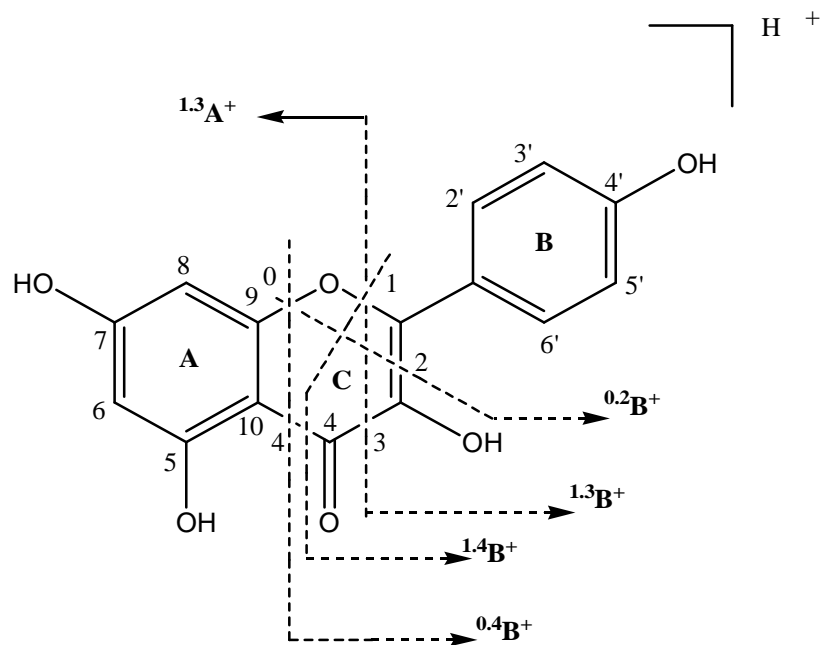


Figure II.16 : Les fragmentations principales de l'ion $[M+H]^+$ du kaempférol

Pour plus de détails sur Les fragmentations du kaempférol $[M+H]^+$. March et Miao [56] ont proposé une récapitulation sur les fragmentations primaires de ces composés (figure II.17)

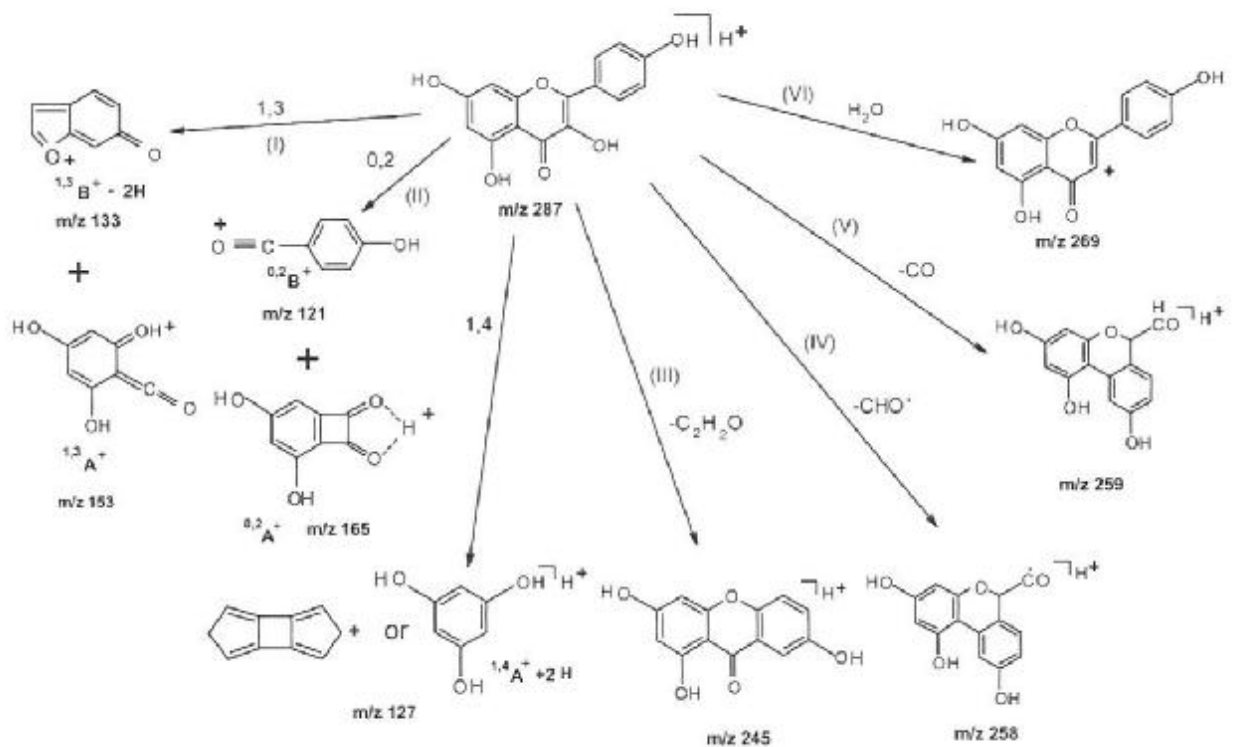


Figure II.17 : Les différents fragments primaires du spectre de masse du kaempférol $[M+H]^+$

Les ruptures utilisées dans l'identification des différents substituants des flavones et des flavonols sont celles donnant les fragments $^{1,3}A$, $^{1,3}B$ et $^{0,2}B$. Elles obéissent aux règles de Diels-Alder (figures II.18 et II.19).

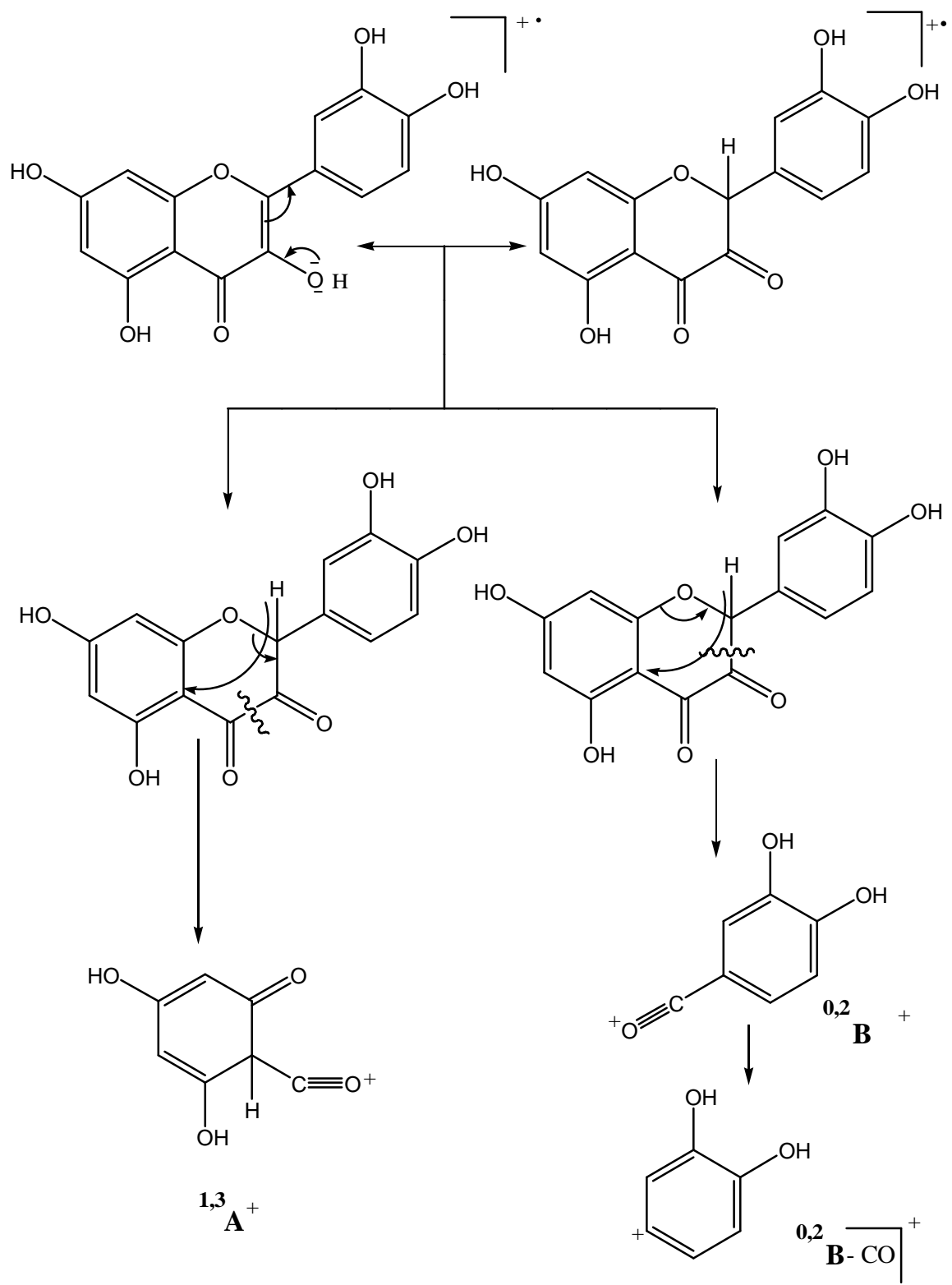


Figure II.18 : Les mécanismes classiques de fragmentation du quercétine

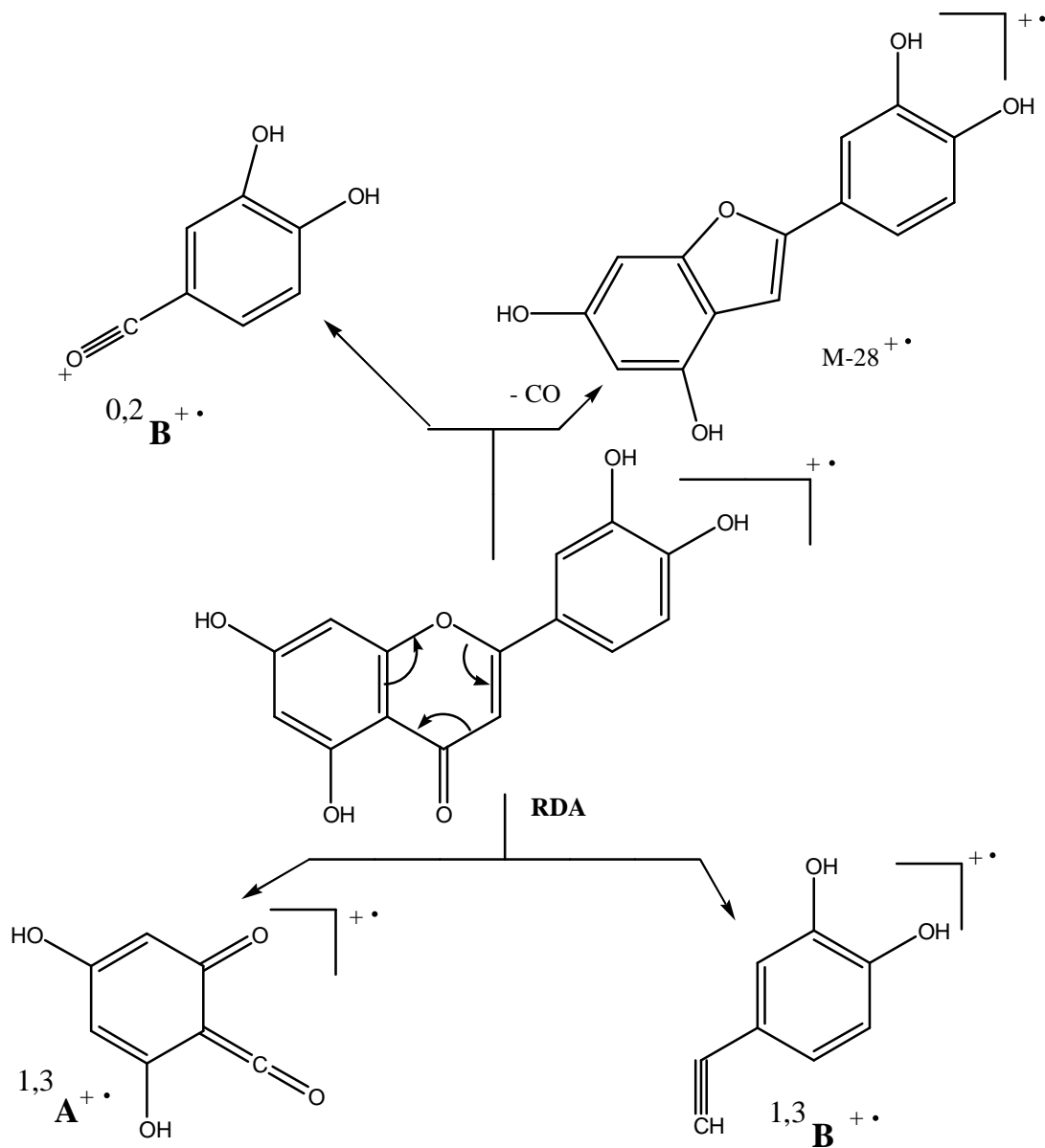


Figure II.19 : Les mécanismes classiques de fragmentation de la lutéoline

II.7.4.6. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination

structurale du squelette flavonoïque ainsi que les différents substituants [57]. Cette méthode renferme plusieurs techniques telles que :

a) RMN monodimensionnelle

- **RMN du proton (^1H):** Le spectre RMN du proton informe sur les différents types d'hydrogène présents dans la molécule analysée, ainsi que les différents types d'hydrogène présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.
- **RMN carbone (^{13}C): DEPT 135° et J mod:** Cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH_3), secondaires (CH_2), tertiaire (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires. La différence majeure entre le DEPT 135° et le J mod, réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le J mod alors qu'ils ne le sont pas avec le DEPT.

b) RMN bidimensionnelles

Les expériences de RMN bidimensionnelles reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage [58].

Corrélations homonucléaires

- **COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$):** cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires ^2J et ^3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.
- **NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$):** cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

Corrélations hétéronucléaires

ü **HSQC** ($^1J_{H-C}$) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

ü **HMBC** ($^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$) : cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance $^2J_{H-C}$ $^3J_{H-C}$, et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Harborne, J.B. et Williams, C.A. (2000).

Avances dans la recherche flavonoïde depuis 1992. *Phytochimie* 55(6):481-504.

[2] Paris, M. et Hurabielle, M. (1981).

Abrégé de matière médicale, *Pharmacognosie*, Tome 1, 82.

[3] Guignard, J. L., (1974).

Abrégé de biochimie à l'usage des étudiants en pharmacie, 165.

[4] Richter, G. (1933).

Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie, 333

[5] Bruneton, J. (1933).

Phytochimie et pharmacognosie des plantes médicinales, Techniques et Documentation Lavoisier.

[6] Kochs G. and Grisebach, H. (1986).

Eur. J. Biochem., 155, 311.

[7] Stotz, G., Spribille, R. and Forkmann, G.J. (1984).

Plant Physiol., 116, 173.

[8] Heller, W., Forkmann, G., British L. and Grisebach, H. (1985a).

Planta Med., 163-191.

[9] Forkmann, G., (1992).

Structure and Biogenesis of Flavonoids , 16^{ème} Assemblée degroupes polyphénols, Lisbon, 16, 19-27.

- [10] Scout G. H. and Scout V. F., (1961).
Tetrahedron **14**, 296-303. The Structure and Synthesis of Xanthomicrol.
- [11] Adityachaudhury N., Kitaniga C. L. and Mukherjee B., (1971).
The Structure and Synthesis of Flemichapparin Chalcones of Flemingia Chapper Ham.
Tetrahedron **27**, 2111-2117.
- [12] Korte, F., Barkemeyer, H. and Korte, I.(1959).
Pflanzliche Bitterstoffe. In: Fortschr.d. chemie Organ.Naturstoffe (Zechmeister, L, ed), Vol.,**17**,
p.124. wien : springer.
- [13] Harborne, J. B. (1975).
Flavonoids in phytochemistry, Vol. II, Edition Lawrence, P. L., Vol. II, Litton Educational
Publishing.
- [14] Iinuma, M. and Mizuno, M. (1989).
Phytochemistry, **28**, 681
- [15] Deluca, V. and Ibrahim R. K. (1985b)
Arch. Biochem. Biophysics, p. 606.
- [16] Heller, W. and Forkmann, G. (1988).
In the flavonoids advances in research since 1980. ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall,
London, 399-425.
- [17] Ebel, J. and Hahlbrock, K. (1982).
In the flavonoids advances in research eds J. B. Harborne and T. J. Mabry, Chapman and Hall,
London, 641-659.
- [18] Harbone, J.B. and Williams, C.A. (1988).
The flavonoids advances in research since 1986. ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall. Ltd. P.
303.
- [19] Bruneton, J., (1999).
Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3^{ème} édition. 3, lavoisier, Paris.
- [20] Chopin, J. (1966).
Actualité de phytochimie fondamentale, IIème série, édition Masson, Paris, p.119.
- [21] Bronner, W.E.; Beecher, G.R. (1995).
Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice
concentrates. *Journal of Chromatography A.*, **705**: 247-256.

- [22] Hollman, P.C.H.; Hertog, M.G.L.; Katan, M.B. (1996) Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem.*, **57**, 43-46.
- [23] Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O., Regeat F. (1996).
Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd. Nut.* **32** (1), 17-27.
- [24] Crozier, A.; Jensen, E.; Lean, M.E.J.; McDonald, M.S. (1997).
Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography
J.Chromatography A., **761**, 315-321.
- [25] Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1996).
Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933-956.
- [26] Hahida, F. and Wanasundara, P.K.J.P.D. (1992),
Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32** (1), pp. 67-103
- [27] Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.-I. and Nishioka, I. (1998). Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Biochem.Pharmacol.*, **56** (2), pp. 213-222.
- [28] Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L. (1997).
Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.*, **22** (5), pp. 749-760.
- [29] Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.A., Capasso, F., (1999).
Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Review. Life Sci.*, **65**: 337-53.
- [30] Matsuda, H., Yano, M., Kubo, M., Linuma, M., Oyama, M. and Mizuno, M. (1991).
Pharmacological Study on *Citrus* fruits unshiu Markovich (2) on Flavonoid
Components, *Yakugata Zasshi.*, **111**, 193-198.
- [31] Nakujima, T., Manishi, M.I., Yamamoto, K., Cyong, J.C. and Hirai, K. (2001).
Inhibitory effects of Baicalein, A Flavonoid in *Scutellaria* Root, On Eotaxin Production by human Dermal Fibroblasts, *Planta Med.*, **67**, pp. 132-135.
- [32] Emin, J.A., Oliveira, A.B. and Lapa, A.J. (1994).
Pharmacological Evaluation of the anti-Inflammatory activity of Citrus Bioflavonoids, Hesperidin, and the isoflavonoids, Durtin and Claussequinone in rats and mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, pp. 118-122.

- [33] Eibi, G., Wagner, H. (1991),
A new method for the in *Vivo* Screening of inhibitors of Angiotensin converting Enzyme (ACE),
Using the chromophore Labeled Substrate Dansyltriglycine, *Planta Medica*. **57**, pp. 137-141.
- [34] Kim, H.K., Jeon, W.K. and Ko, B.S. (2001).
Flavanone Gglycoside from *Citrus junos* and their Anti-influenza Virus Activity, *Planta Med.*,
67, 548-549.
- [35] Elsohly, H.N., Joshi, A.S., Nimrod, A.C., Walker, L.A. and Clark, A.M., (2001). Antifungal
Chalcones fom *Maclura tinctoria*, *Planta Med.*, **67**, 87-89.
- [36] Shahat, A.A., Cos, P., Bruyne, T.D., Apers, S., Hammouda, F.M., Ismail,
S.I., Azzam, S., Claeys, M., Goovaerts, E., Pieters, L., Berghe, D.V. and
Vlietinck, A.J. (2002).
Antiviral and Antioxidant activity of Flavonoids and Proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*,
Planta Med., **68**, 539-541.
- [37] Gordon, H.M. (1996).
Dietary Antioxydants in Disease Prevention. *Natural Product Reports*, pp. 265-273.
- [38] Gutteridge, J.M.L., and Halliwell, B. (1994).
Antioxidants in nutrition, Health and Disease. Oxford University Press. Oxford.
- [39] Colette, N., Bernier, J.L., Henichart, J.P.Catteau, J.P., Gaydou, E.M.Wallt, J.C. (1992).
Scavanger and antioxydant properties of ten synthetic Flavones. *Free Radical Biology and
Medecine*. **13**, pp. 211-219.
- [40] Murakami, N., Mostaqul, H.M., Tamura, S., Itagak, S. and Horii, T. (2001).
A New anti-malarial flavonol glycoside from *Hydrangeae dulcis Folium (Hydrangea
macrophylla)* *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2445-2447.
- [41] Chaudhry, P.S.; Cabrera, J.; Juliani, H.R.; Varma, S.D. (1983).
Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem
Pharmacol.*, **32**, 1995-1998
- [42] Ong, K.C.; Khoo, H.E. Biological Effects of Myricetin. *General Pharmacol.* (1997).
29, 121-126.
- [43] Ong, K.C.; Khoo, H.E. (2000).
Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci.*, **67**, 1695-
1705.

- [44] Ribereau-Gayou, J.B. (1968).
The phenolic compounds of vegetals, Edition Dunod, Paris.
- [45] Markham, K.R. (1982).
Technique of flavonoides identification, Academic press, London.
- [46] Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970).
The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.
- [47] Berthillier, A. (1972).
La chromatographie et ses applications», Dunod paris.
- [48] Jurd, L. and Horowitz, R. (1962).
Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.
- [49] Markham, K.R. and Mabry, T.J. (1968).
Phytochemistry., **7**, pp. 1197.
- [50] Horhammer, L. and Hänsel, R. (1952).
Arch. Pharm., **285**, 438.
- [51] Jurd, L. and Geissman, T.A. (1956).
J. Org. Chem., **21**, 1395.
- [52] Audier, H. (1966).
Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse.
- [53] Nielsen, J. G. and Moller J. (1970).
Acta Chem. Scand., **24**, 2665.
- [54] Combier, H. (1968).
Thèse de doctorat, université de Lyon.
- [55] Es-Safi, N. E., Kerhoas, L., Einhorn, J. and Ducrot, P. H. (2005).
International Journal of Mass Spectrometry **247**, 93–100
- [56] March, R. E., Miao, X. S. (2004)
International Journal of Mass Spectrometry **231** 157–167
- [57] WILSON, R.G., BOWIE, J.H. et WILLIAMS, D.H. (1986).
Tetrahedron, **24**, 1407.
- [58] Gunther, H. (1994).
La spectroscopie de RMN, Masson, Paris

CHAPITRE III

PARTIE EXPERIMENTALE

III.1. CRITERES DE CHOIX DES DEUX ESPECES

Les critères de choix de ces deux espèces, reposent essentiellement sur le fait que:

- Ø Ces espèces appartiennent au genre *Centaurea* de la famille des composées dont plusieurs activités biologiques ont été mises en évidence [2-8]: astringentes, dépuratives, antiseptiques, antipyrétiques, cytotoxiques, antibactérienne, antifongique, antirhumatismal, anti-inflammatoires, diurétique et fébrifuge. Citons comme exemple l'espèce *Centaurea cyanus* [9-11], utilisée comme plante médicinale, car elle est réputé pour son traitement des affections oculaires, on le dit par ailleurs qu'elle possède des propriétés légèrement antiseptique, calmantes, fortifiantes, antirhumatismal, diurétiques, astringentes, digestives et cholagogues ainsi la décoction de fleurs soigne la toux et les catarrhes, est utilisée en lavage, contre l'inflammation des yeux, des paupières, contre la conjonctivite. Aussi elle est réputée pour l'utilisation de l'extrait de ses fleurs (un colorant bleu) en peinture, imprimerie, cosmétique et en pharmacie.
- Ø Les espèces de ce genre étant réputées par l'accumulation des métabolites secondaires de type flavonoïde et lactones sesquiterpéniques.
- Ø Les résultats des investigations phytochimiques obtenus de ces types d'espèces dans notre laboratoire, depuis deux bonnes décennies, nous ont encouragés à entreprendre cette étude à la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives.

III.2. PLACE DANS LA SYSTEMATIQUE (botanique)

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure [1] synthétisée dans le tableau III.1.

Tableau III.1: classification botanique des espèces étudiées

Figure III.1 : Photo des feuilles et des fleurs de l'espèce *Centaurea africana*

Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Astérales
Famille	Compositae
Sous-famille	Tubiflores
Tribu	Cynarées
Genre	<i>Centaurea</i>
Espèces	<i>africana</i> Lamk, variété <i>africana</i> (Bonnet) M. <i>niagansis</i> sous espèce <i>williamsii</i>

III.3. DESCRIPTION DES ESPECES

Ø *Centaurea africana* Lamk, variété *africana* (Bonnet) M.

C'est une plante annuelle, vivace, ferme, dressée et puissante 60-150 cm, les feuilles grandes et vertes à fleurs jaune (figure III.1). Elle est endémique pour l'Algérie et la Tunisie. [1].



Figure III.1 : Photo des feuilles et des fleurs de l'espèce *Centaurea africana*

Ø *Centaurea nicaeensis* sous-espèce *williana*

C'est une plante annuelle, bractée à appendices dont l'épine médiane est très courte (3-4 mm) et de couleur noire, dressée (figure III.2) [1].



Figure III.2 : Photo de *Centaurea nicaeensis*

LE

Les deux espèces *Centaurea africana* et *Centaurea nicaeensis* ont été récoltées durant le mois de juin 1998. La première des montagnes de la région d'El-kala de Taref, la deuxième, des montagnes de Souk-Ahras.

La détermination botanique des deux espèces a été réalisée par le professeur Kaabache (Département des sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas, Setif).

Les plantes séchées pendant plusieurs jours à l'abri de la lumière directe du soleil, pesées et broyées grossièrement.

III.5. EXTRACTION DE *CENTAUREA AFRICANA*

La poudre du matériel végétal (feuilles et fleurs, 1,8 kg) est mise à macérer à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau ; 70/30 ; v/v).

Cette macération est répétée 4 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures. Après concentration à une température n'excédant pas 35 °C, l'extrait

éthanolique dilué avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière sèche, est additionné d'acétate de plomb $[(\text{CH}_3\text{COO})_4\text{Pb}]$ pour éliminer la chlorophylle par précipitation. Après filtration, la solution est devenue rouge-brune. Cette dernière a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. La figure III.3 résume les différentes étapes de l'extraction jusqu'à l'obtention des extraits bruts.

Les trois phases organique ainsi obtenus (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre, puis filtrées, concentrés à sec sous pression réduite, pesées et les rendements sont donnés dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Rendements des extraits

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement
1800g	Chloroforme	11	0,61%
	Acétate d'éthyle	18	1%
	<i>n</i> -butanol	100	5,6%

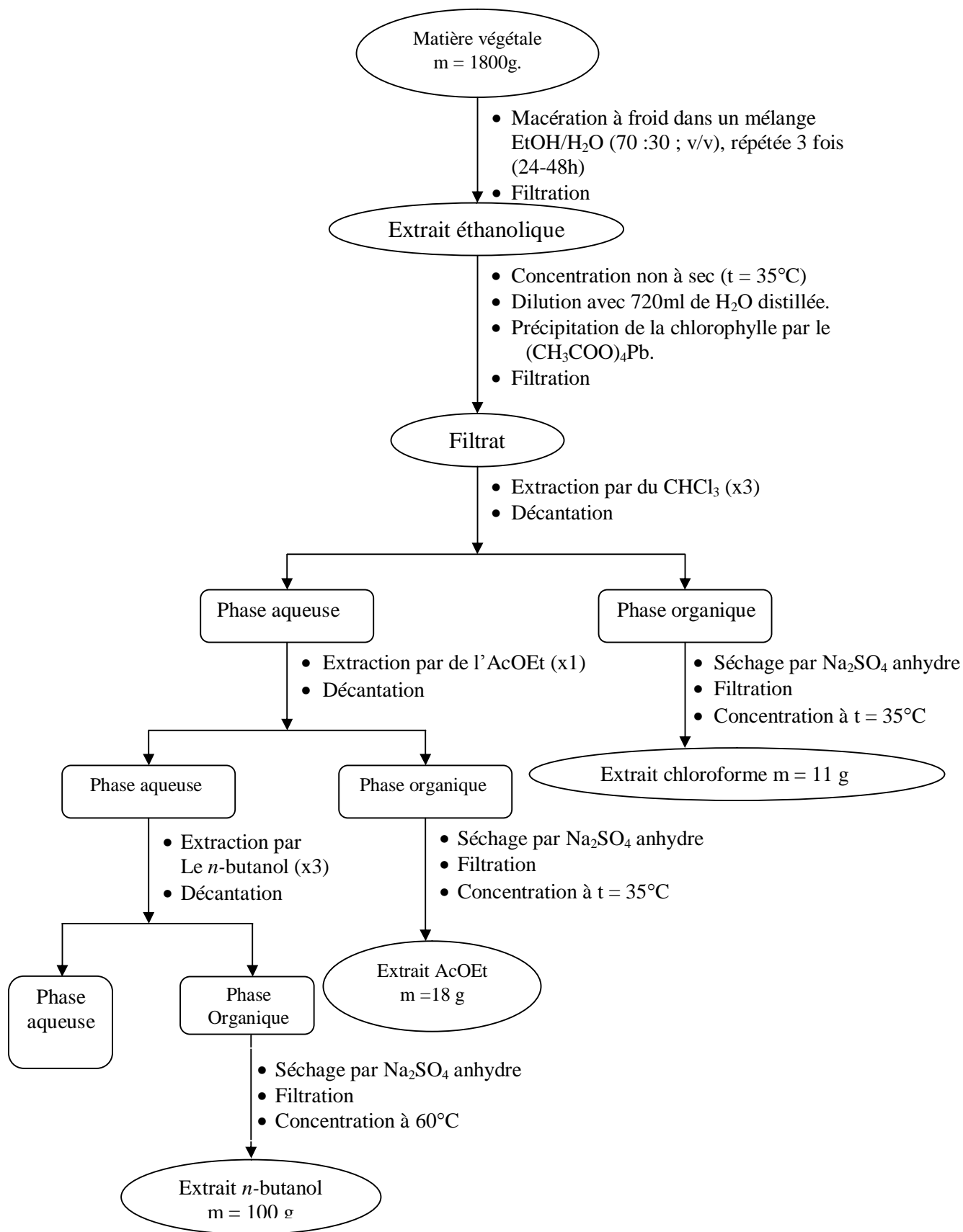


Figure III.3 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de *Centaurea africana*

III.5.1 : Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme *C. africana*

L'extrait chloroforme est soumis à des fractionnements successifs par différentes méthodes chromatographiques conduisant à l'isolement des molécules pures.

III.5.1.1 Fractionnement de l'extrait chloroforme

Un premier fractionnement de l'extrait chloroforme de *C. africana* (11 g) a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice de granulométrie moyenne : 40-63 µm (230-400 mesh), Merk H60, réf. 9385.

L'extrait chloroforme dissout dans de l'acétone est mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur une colonne de gel de silice, préparée dans le dichlorométhane. La masse de silice utilisée correspond approximativement à 30 fois le poids de l'extrait à séparer (330 g). L'élution a été réalisée par du dichlorométhane enrichi progressivement en acétone, puis introduction du méthanol. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couches minces de gel de silice déposées sur feuilles d'aluminium (Merck) qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes adéquats, ont été visualisées à la lumière du jour et sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec l'anysaldéhyde et chauffées pendant 3 mn à 100°C. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.3.

Tableau III.3: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroforme de *Centaurea africana*

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'éluion			
		% CH ₂ Cl ₂	% CH ₃ COCH ₃	% MeOH	Poids de la fraction (mg)
1-6	F1	100	0	0	10,5
7-11	F2	100	0	0	9,7
12-18	F3	100	0	0	13,6
19-25	F4	100	0	0	12,8
26-39	F5	100	0	0	15,2
40-80	F6	100	0	0	72,5
81-92	F7	100	0	0	148,2
93-118	F8	99	1	0	105,6
119-134	F9	99	1	0	85,0
135-139	F10	99	1	0	55,0
140-155	F11	99	1	0	88,2
156-164	F12	99	1	0	97,5
165-195	F13	98	2	0	167,0
196-241	F14	96	4	0	234,6
242-253	F15	95	5	0	76,5
254-272	F16	90	10	0	98,7
273-321	F17	90	10	0	90,5
322-353	F18	80	20	0	340,0
354-375	F19	80	20	0	200,0
376-397	F20	80	20	0	305,2
398-409	F21	50	50	0	215,3
410-425	F22	50	50	0	161,4
426-445	F23	50	50	0	145,5
446-449	F24	50	50	0	575,6
450-457	F25	50	50	0	425,3
458-467	F26	50	50	0	548,6
468-471	F27	0	50	50	1457,4
472-500	F28	0	0	100	1800,0

III.5.1.2. Etude des fractions F9, F17 et F24

La recristallisation est une méthode de purification utilisée dans la plupart des cas pour les composés pouvant se présenter sous forme de cristaux. Elle est utilisée même pour des petites quantités mais n'est pas utilisable avec les huiles et d'autres composés liquides. Le principe de cette technique est basé sur la solubilité des mélanges à séparer. En effet, lorsque l'on veut isoler ou purifier un composé présent dans un mélange par cette technique, la première étape consiste à

trouver le meilleur solvant de recristallisation. On appelle meilleur solvant de recristallisation, le solvant dans lequel le produit à cristalliser est peu soluble à froid et très soluble à chaud alors que les impuretés sont solubles à chaud et à froid. Par chauffage suivi immédiatement de filtration, on élimine une partie des impuretés insolubles à chaud. Le refroidissement permet ensuite au produit de cristalliser. La filtration suivante permet d'éliminer le solvant et la partie des impuretés solubles à froid.

- La fraction F9 a été recristallisée dans le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (avec un peu de chloroforme), après chauffage, filtration, séchage lent (à l'aire libre), des cristaux sous forme d'aiguilles blanches sont formés. Ces derniers insolubles dans le méthanol, sont purifiés par lavages successifs à l'aide de ce solvant et pesés (30 mg). Le R_f de ce composé (F9) est de 0,45 dans le système dichlorométhane/méthanol (99/1). Ce produit incolore sur plaque CCM, il donne une coloration violette après révélation à base d'acide sulfurique.
- La fraction F17 a subi une recristallisation dans un mélange Hexane/acétone, menant à la formation de cristaux jaunes qui après plusieurs lavages successifs à l'hexane, ont donné un produit pur F17 de masse 60 mg.
- La fraction F24, insoluble dans le méthanol, a subi une recristallisation dans un mélange dichlorométhane et un peu de méthanol. Les cristaux blancs obtenus sont lavés plusieurs fois avec du méthanol, pour donner un produit pur (F24) de masse 120mg. La coloration de ce produit sur plaque CCM après révélation à l'acide sulfurique est violette avec son R_f est de 0,32 dans le système dichlorométhane/méthanol (90:10).

III.5.1.3. Etude des fractions F7 et F8

D'après les résultats des tests analytiques sur plaque CCM de gel de silice avec comme système d'éluion Hexane/Acétate d'éthyle (4/1), les fractions F7 et F8 sont presque identiques.

Le mélange des deux fractions (253,8 mg) est déposé sur une colonne 65 g de gel de silice 200-400 mesh, Merck, élué par le système n-Hexane / acétate d'éthyle avec des polarités croissantes. Les résultats de cette colonne sont récapitulés dans le tableau III.4.

Tableau III.4: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne du mélange F7 et F8

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'élution		
		% Hexane	% AcOEt	Poids de la fraction (mg)
1-11	A1	100	0	5,7
12-13	A2	80	20	6,0
14	A3	80	20	3,2
15-16	A4	80	20	8,7
17-20	A5	80	20	45,7
21-25	A6	70	30	21,8
26-60	A7	70	30	45,5
61-72	A8	50	50	18,6
73-94	A9	30	70	20,0
95-105	A10	0	100	38,7

L'étude de la fraction A5 sur plaques préparatives de gel de silice éluées par le système *n*-hexane/acétate d'éthyle, a permis d'isoler trois produits purs A51, A52 et A53 de masse 2,5 ; 5 et 4 mg respectivement.

Les autres fractions peu abondantes sont assez complexes, renferment le composé F9 comme produit majoritaire.

III.5.2. : Séparation et purification des composés de l'extrait acétate d'éthyle

L'extrait acétate d'éthyle a été testé avec plusieurs systèmes de solvant avec des polarités différentes. L'éluant utilisé est composé de trois solvants le *n*-Hexane/AcOEt/Méthanol.

L'extrait acétate d'éthyle, dissout dans le méthanol, est mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur une colonne de gel de silice, préparée dans le système *n*-Hexane/AcOEt (9/1) sur une colonne de 450 g de gel de silice (200-400 mesh, merck),

avec comme système d'élution *n*-Hexane/ACOEt/Méthanol avec des polarités croissantes. Notons que Le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions, ont été effectués sur la base d'analyses par CCM analytique, cela a permis de réunir 27 fractions. Les conditions opératoires sont présentées dans le tableau III.5.

Tableau III.5 : Résultat de fractionnement sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *Centaurea africana*

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'élution			Masse de la fraction (mg)
		% n-Hexane	% Acétate d'éthyle	% Méthanol	
1-3	AC1	90	10	0	20,7
4-7	AC2	90	10	0	19,5
8-10	AC3	80	20	0	20,0
11-16	AC4	80	20	0	34,1
17-33	AC5	70	30	0	80,0
34-39	AC6	60	40	0	60,0
40-51	AC7	50	50	0	44,5
52-56	AC8	30	70	0	60,4
57-66	AC9	30	70	0	250,8
67-69	AC10	30	70	0	98,5
70-76	AC11	0	100	0	1000,0
77-87	AC12	0	100	0	200,5
88-91	AC13	0	100	0	120,3
92-97	AC14	0	95	5	80,8
98-101	AC15	0	95	5	78 ,4
102-104	AC16	0	90	10	55,4
105-111	AC17	0	90	10	95,7
112-118	AC18	0	90	10	140,6
119-126	AC19	0	90	10	2004,6
127-129	AC20	0	90	10	145,6
130-154	AC21	0	80	20	480,6
155-162	AC22	0	60	40	254,3
163-168	AC23	0	60	40	365,8
169-176	AC24	0	60	40	525,4
177-190	AC25	0	50	50	587,8
191-205	AC26	0	50	50	472,6
206-215	AC27	0	0	100	1450,3

III.5.2.1 Etude de la fraction AC4

La fraction AC4 de masse 34,1 mg a subi une séparation sur plaques de gel de silice, éluées trois fois par le système : **dichlorométhane/*n*-hexane** (2/1), menant au composé AC41 (5 mg) qui apparaît sous forme d'un spot unique sur plaque analytique de gel de silice.

III.5.2.2 Etude de la fraction AC6

La chromatographie de cette fraction sur plaques préparatives de gel de silice éluées par le système dichlorométhane/acétone (98/2), a permis d'isolé un produit pur (AC62), les autres produits issus de cette séparation, sont sous forme de mélange en très faible quantité.

III.5.2.3 Etude de la fraction AC8

La fraction AC8 (60,4 mg), après une séparation sur plaques préparatives éluées par le système dichlorométhane / acétone (9/1), a permis l'isolement des produits suivants :

- ∅ AC82, un produit pur de couleur jaune (7mg), testé par l'ammoniac, il donne une coloration caractéristique d'un flavonoïde.
- ∅ AC833, un produit pur (5mg).
- ∅ AC81, AC85, AC87 avec des masses 1,7 ; 1,2 et 2,5 mg respectivement.
- ∅ AC86, un produit pur sous forme d'aiguilles jaune (10 mg), testé par l'ammoniac, il donne une coloration caractéristique d'un flavonoïde.
- ∅ AC84 (20 mg) comportant quatre produits, rechromathographié sur plaques préparatives de gel de silice, éluées par le système dichlorométhane / méthanol (99/1), a permis d'isoler quatre produits :
 - AC841 un flavonoïde pur (3,5 mg) de couleur jaune.
 - AC842 un produit pur (1,6 mg) dont la structure n'est pas encore déterminée.
 - AC843 un flavonoïde pur (2,8 mg) de couleur jaune.
 - AC844 un flavonoïde pur (3,2 mg) de couleur jaune.

III.5.2.4 Etude de la fraction AC9

La fraction AC9, testé sur plaque CCM, renferme deux produits majoritaires. La recristallisation d'une partie de AC9 dans un mélange de solvant chloroforme et un peu d'acétone, a donné des cristaux sous forme d'aiguilles jaunes, après plusieurs lavages avec du chloroforme, la masse du produit pur (AC91) obtenu est de 25 mg. La coloration de ce produit sur plaque CCM exposé à des vapeurs d'ammoniac est jaune, indiquant la présence d'un flavonoïde. L'autre partie a subi une recristallisation dans un mélange *n*-hexane /acétate d'éthyle, a donné des cristaux jaunes, après plusieurs lavage avec le *n*-hexane la masse du produit pur (AC92) obtenu est de 18 mg, testé par les vapeurs d'ammoniac sur plaque CCM indiquant que c'est un flavonoïde.

III.5.2.5 Etude de la fraction AC11

La recristallisation de 60 mg de la fraction AC11 dans un mélange de solvant *n*-hexane et un peu d'acétone, a donné un produit pur (20 mg) sous forme de cristaux jaune, testé par l'ammoniac, il donne une coloration caractéristique d'un flavonoïde.

Une autre quantité (50 mg) de la même fraction (AC11) a été chromatographié sur plaques préparatives, éluées par le système dichlorométhane / acétone (4/1), a permis d'isoler AC11, séparé précédemment par recristallisation et un autre produit AC116 (14 mg) pur.

III.5.2.6 Etude de la fraction AC20

Une quantité (70 mg) de cette fraction, après séparation sur plaques préparatives de gel de silice, éluées par le système d'éluion dichlorométhane / méthanol (6/1), a donné trois produits purs.

- Ø AC201 (5 mg).
- Ø AC202, (11mg), testé par l'ammoniac, il donne une coloration jaune caractéristique d'un flavonoïde.
- Ø AC203, (18 mg), testé par l'ammoniac, il donne une coloration jaune, caractéristique d'un flavonoïde.

III.5.2.7 Etude de la fraction AC19

La fraction AC19 (2g) dissoute dans du méthanol, est mélangée à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur une colonne de gel de silice, préparée dans le dichlorométhane, éluée par le système dichlorométhane / méthanol (9/1) en mode isocratique, avec augmentation du pourcentage de méthanol à la fin de l'opération. Le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions, ont été effectués sur la base d'analyses par CCM analytique. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau **III.6**.

Tableau III.6: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne du mélange AC19

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'éluion		
		% CH ₂ Cl ₂	% MeOH	Poids de la fraction (mg)
1	L1	90	10	6,0
2	L2	90	10	12,1
3-4	L3	90	10	8,6
5	L4	90	10	10,5
6-8	L5	90	10	12,5
9-11	L6	90	10	11,8
12-13	L7	90	10	15,0
14-15	L8	90	10	18,7
16-21	L9	90	10	25,7
22-24	L10	90	10	68,9
25-33	L11	90	10	78,2
34-37	L12	90	10	56,4
38-39	L13	90	10	49,2
40-50	L14	90	10	245,3
51-55	L15	50	50	185,5
56-61	L16	10	100	232,8

Ø Etude de la sous fraction L10

La sous fraction L10, chromatographié sur des plaques préparative de gel de silice, éluées deux fois par le système, dichlorométhane / méthanol (9,5/0,5), a mené à l'isolemant des produits purs L10-1(6,7 mg), L10-2 (8,5 mg), L10-3 (3 mg), L10-4 (15 mg), L10-5 (8 mg).

Ø Etude de la fraction L12

La fraction L12, insoluble dans l'acétate d'éthyle, a subi une recristallisation dans un mélange acétate d'éthyle avec un peu de méthanol, a donné des cristaux jaunes (15 mg), après plusieurs lavages à l'acétate d'éthyle.

Conclusion

L'étude par chromatographie liquide des phases chloroforme et acétate d'éthyle de l'extrait hydroéthanolique des feuilles et des fleurs de *Centaurea africana* (Bonnet) M. a mené à l'isolement et à la purification de produit à l'état natif, ces produits sont :

Ø Pour la phase chloroforme : **F9** (30 mg), **F17** (60 mg), **F24** (120 mg), **A51** (2,5mg), **A52** (5 mg) et **A53** (4mg).

Ø Pour la phase acétate d'éthyle : **AC41** (5 mg), **AC62** (6 mg), **AC81** (1,7 mg), **AC82** (7 mg), **AC833** (5 mg), **AC85** (1,2 mg), **AC86** (10 mg), **AC87** (2,5 mg), **AC841** (3,5 mg), **AC842** (1,2 mg), **AC843** (2,8 mg), **AC844** (3,2 mg), **AC91** (25 mg), **AC92** (18 mg), **AC11** (20 mg), **AC116** (14 mg), **AC201** (5mg), **AC202** (11 mg), **AC203** (18 mg), **L10-1** (6,7 mg), **L10-2** (8,5 mg), **L10-3** (3 mg), **L10-4** (15 mg), **L10-5** (8 mg) et **L12** (15 mg).

Avant de soumettre nos échantillons à l'analyse structurale par les différentes techniques spectroscopique, nous avons procédé à des co-chromatographies dans divers systèmes et enregistré des spectres de RMN-¹H de l'ensemble des produits isolés.

Ces opérations ont montré que : AC203 ≡ L10-1 ≡ L12.

Ainsi le nombre de produits est réduit à **6** de la phase chloroforme et **23** pour la phase acétate d'éthyle.

Tenant compte du poids des produits isolés et de l'allure de leur spectre RMN-¹H, seuls les échantillons : F9, F17, F24, A52, AC41, AC62, AC82, AC833, AC86, AC841, AC843 AC844, AC91, AC92, AC11, AC116, AC202, L10-4 et L12, ont été soumis à l'analyse structurale complète.

III.6. EXTRACTION DE *CENTAUREA NICEANSIS*

La poudre du matériel végétal (feuilles et fleurs) (1,95 kg) est mise à macérer à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau ; 70/30 ; v/v). Le même protocole que précédemment a été suivi. Les extraits obtenus sont concentrés à sec sous pression réduite, les poids et les rendements sont reportés dans le tableau : III.7.

La méthode d'extraction est récapitulée dans la figure III.4.

Tableau III.7 : Rendements des extraits

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement
1950g	Chloroformique	35	1,80 %
	Acétate d'éthyle	23	1,18 %
	butanolique	68	3,49 %

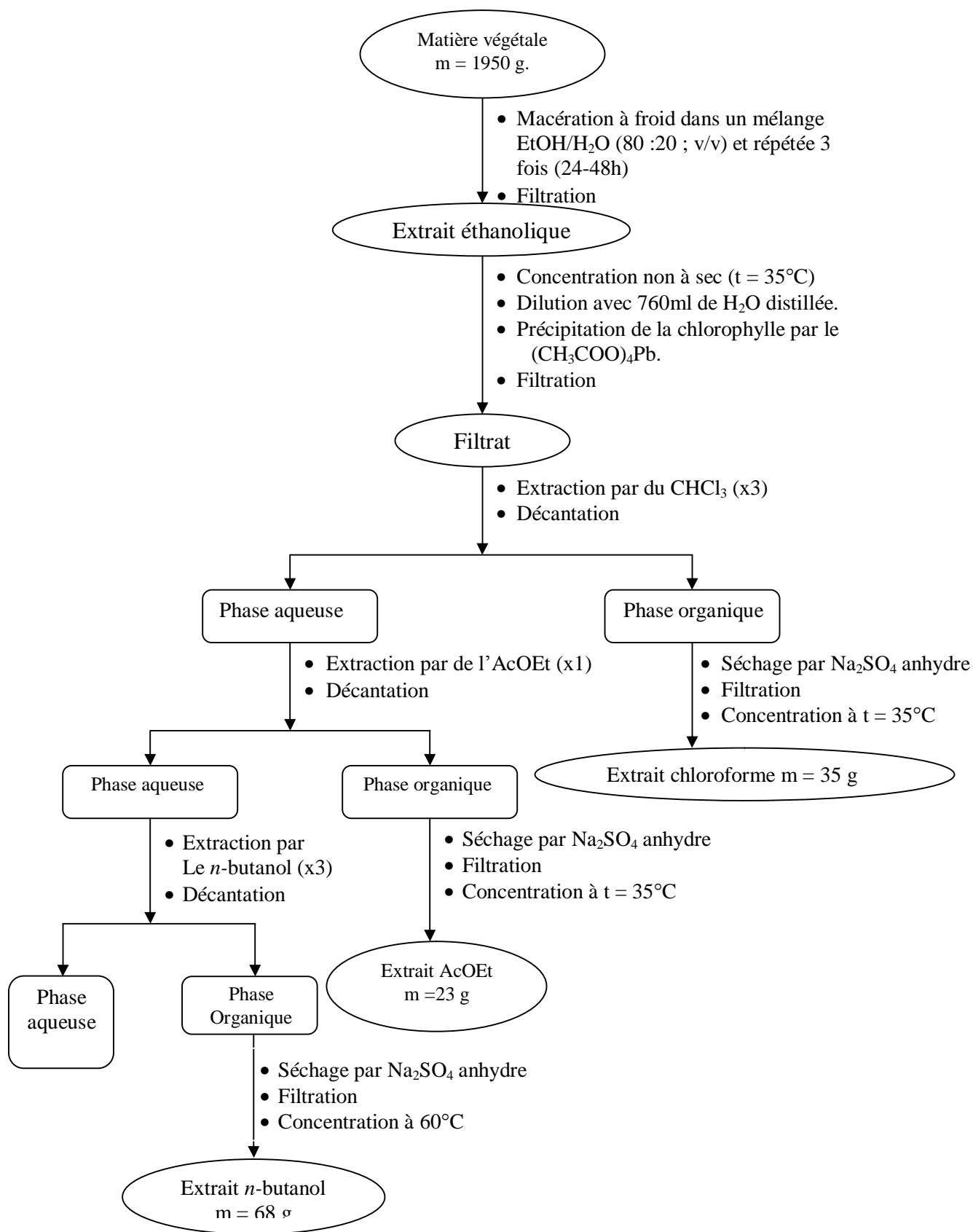


Figure III.4 : Protocole d'extraction de *Centaurea nicaensis*

III.6.1. : Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme

Dans ce travail, nous reportons uniquement les résultats de l'étude de l'extrait chloroforme de cette espèce.

III.6.1.1. Fractionnement de l'extrait chloroformique

L'extrait chloroforme de *Centaurea nicaensis* (20 g) a été chromatographié sur une colonne de gel de silice de granulométrie moyenne : 40-63 μm , 230-400 mesh (Merk H60, réf. 9385).

L'extrait chloroforme dissout dans de l'acétone, est mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur une colonne de gel de silice, préparée dans le chloroforme. La masse de gel de silice utilisée est de 400 g, éluée par le système chloroforme/acétate d'éthyle et terminée par du méthanol pur. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique en couche mince sur des plaques de gel de silice (60 F₂₅₄ sur feuilles d'aluminium). Les plaques ont été visualisées à la lumière du jour et sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec l'acide sulfurique et chauffées pendant 3 mn à 100°C. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.8.

**Tableau III.8 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne
de l'extrait chloroforme (20 g) de *Centaurea nicaensis***

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'élution			Poids de la fraction (mg)
		% Chloroforme	% Acétate d'éthyle	% Méthanol	
1-18	F1	100	0	0	15,5
19-28	F2	100	0	0	8,7
29-39	F3	100	0	0	12,2
40-56	F4	100	0	0	25,6
57-62	F5	100	0	0	15,2
63-65	F6	100	0	0	72,5
66-73	F7	100	0	0	170,0
74-89	F8	100	0	0	79,6
90-99	F9	100	0	0	75,0
100-115	F10	95	5	0	120,0
116-126	F11	95	5	0	270,2
127-131	F12	95	5	0	375,8
132-163	F13	95	5	0	96,0
164-189	F14	90	10	0	145,8
190-203	F15	90	10	0	62,5
204-251	F16	80	20	0	166,7
252-270	F17	80	20	0	238,8
271-317	F18	80	20	0	389,5
318-323	F19	70	30	0	246,0
324-355	F20	70	30	0	688,5
356-413	F21	50	50	0	715,3
414-451	F22	50	50	0	578,6
452-535	F23	30	70	0	850,5
536-560	F24	0	100	0	1480,6
561-580	F25	0	0	100	1576,8
581-620	F26	0	0	100	2050,6

III.6.1.2. Etude de la fraction F7

La fraction F7, après recristallisation dans un mélange n-hexane et un peu d'acétate d'éthyle, a donné des cristaux sous forme d'aiguilles jaunes après plusieurs lavages à l'hexane, la masse de ce produit pur (F7) obtenu est de 54 mg, sa coloration sur plaque CCM sous des vapeurs d'ammoniac est jaune, orientant vers un flavonoïde.

III.4.1.3. Etude de la fraction F11

La recristallisation de la fraction F11 dans un mélange dichlorométhane / acétone, a permis d'isoler un produit sous forme de cristaux (aiguilles jaunes). Après plusieurs lavages avec le dichlorométhane, la masse du produit pur (F11) obtenu est de 78,5 mg, sa coloration sur plaque CCM sous des vapeurs d'ammoniac est jaune, indiquant que c'est un flavonoïde.

Conclusion

Cette étude a mené à l'isolement à l'état pur et natif de deux composés de type flavonoïdes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Quezel, P. and Santa, S. (1963), Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1 C.N.R.S. Paris.
- [2] Arif, R., Küpeli, E., Ergun, F. (2004) Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, **17**: 149.
- [3] Baytop, T., (1999) Therapy with medicinal plants in Turkey past and present, 2nd ed. Istanbul: Tip Basimevi.
- [4] Buruk, K., Sokmen, A., Aydin, F. and Murat Erturk, M. (2006), *Fitoterapia*, **77**: 388–391.
- [5] Skliar, M. I., Toribio, M.S. and Oriani, D.S. (2005), *Fitoterapia*, **76**: 737– 739
- [6] Font Quer, P. (1995), Plantas Medicinales. El Dioscorides Renovado. Editorial Labor SA; 851.
- [7] Yayli, N., Ahmet Yas, A., Canan Gulec, C., Usta, A., Kolaylı, S., Cos_kunc, E. K.and S_Engui, (2005), *Phytochemistry*, **66**: 1741–1745.
- [8] Kumarasamy, Y, Middleton, M., Reid, R. G., Nahar, L. and Sarker, S.D. (2003), *Fitoterapia* **74**: 609–612.
- [9] R. Kulikowski, R. R. and Mascarenhas, J. P. (1978). *Plant Physiol.* **61**, 575-580
- [10] Pallet, K., Cole, J., Oberwalder, C. and Prch, J. (2007) *Pest Manag Sci.* 63(2):134-40.
- [11] Garbacki, N., Gloaquen, .V., Bodart, P., Tits, M. and Angenot, L. (1999). *J Ethnopharmacol.* **15;68(1-3):235-41.**

CHAPITRE IV

RESULTATS ET DISCUSSIONS

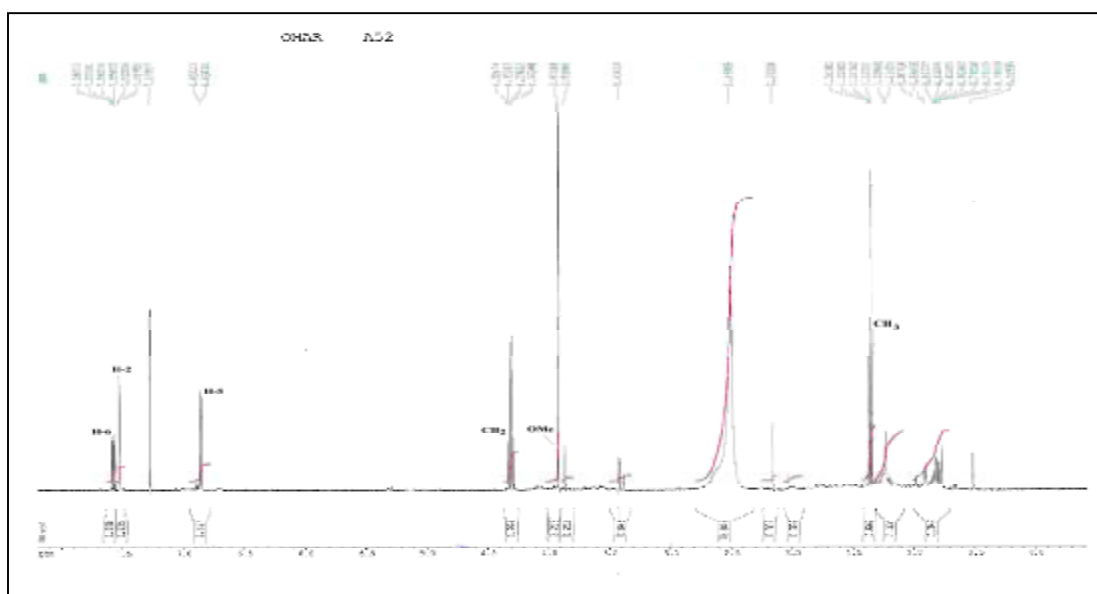
IV.1 : Identification des produits isolés de *C. africana*

IV.1.A : Identification des produits isolés de la phase chloroformique de *C. africana*

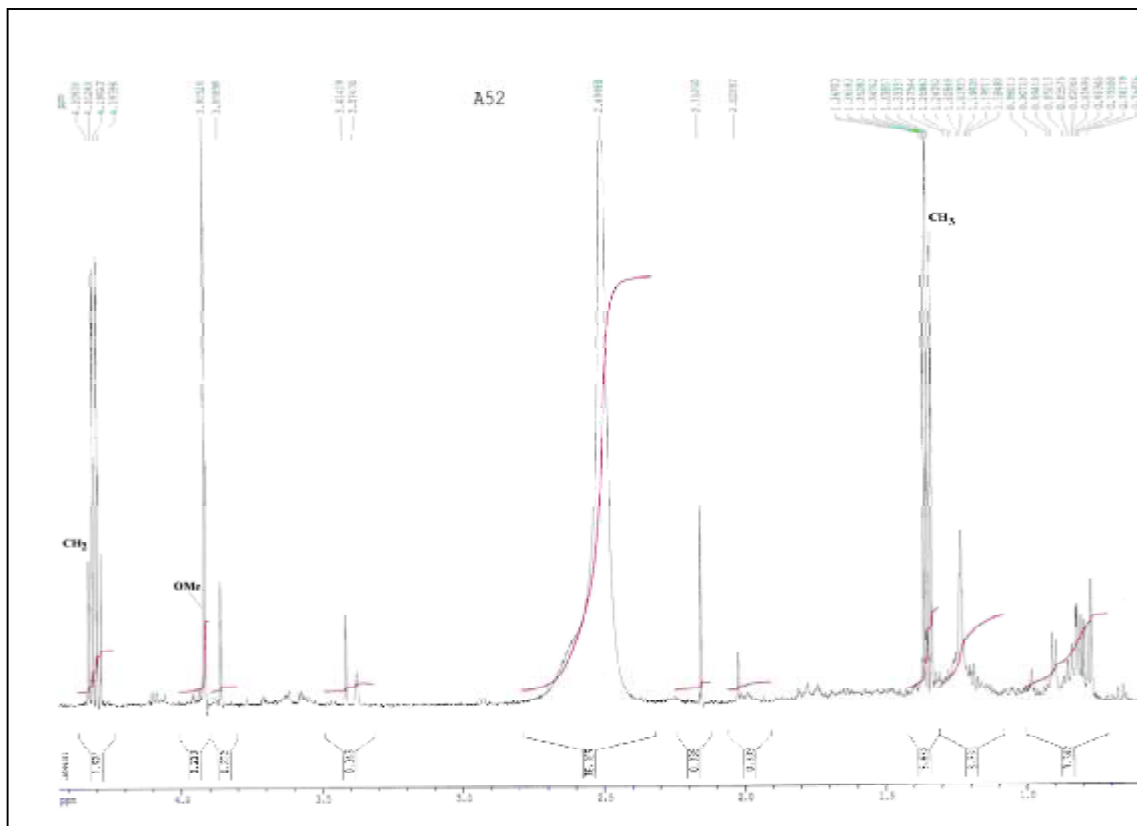
IV.1.A1: Elucidation structurale du composé A 52

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV.1.A1.1) ainsi que ces spectres étalés (n° IV.1.A1.2 et IV.1.A1.3), montre qu'il s'agit d'un composé aromatique substitué en position 1, 3 et 4, caractérisé par les signaux:

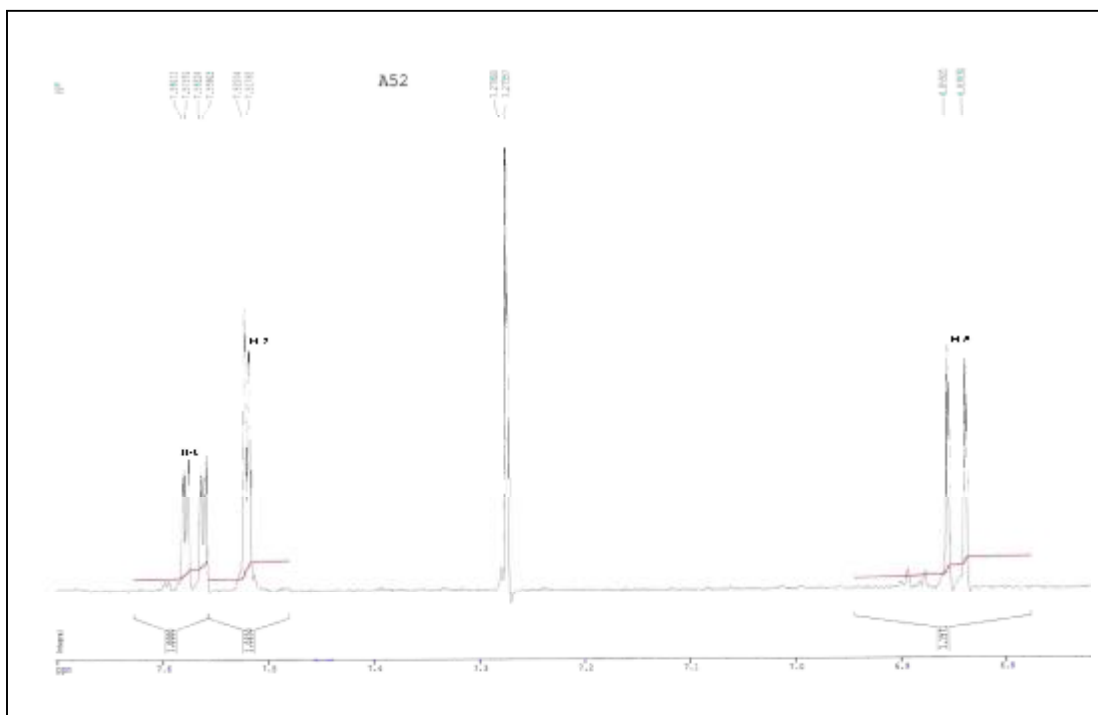
- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à $\delta = 7,57$ ppm ($J = 8,4$ Hz ; 2,1 Hz) attribuable à H-6,
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,52$ ($J = 2,1$ Hz) attribuables à H-2,
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,87$ ppm ($J = 8,4$ Hz) attribuable à H-5,
- Un quadruplet d'intégration 2H à $\delta = 4,31$ ppm ($J = 7,1$ Hz) attribuable à CH_2 voisin d'un atome d'oxygène et d'un CH_3 .
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,91$ ppm, indiquant la présence d'un groupement méthoxyle (OCH_3).
- Un triplet d'intégration 3H à $\delta = 1,35$ ppm ($J = 7,1$ Hz) attribuable à CH_3 voisin d'un CH_2 ,



Spectre n° IV.1.A1.1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, Acetone- d_6 , δ ppm) du composé A52



Spectre n° IV.1.A1.2 : Spectre RMN ^1H étalé de 1 à 4,5 ppm du composé A52



Spectre n° IV.1.A1.3 : Spectre RMN ^1H étalé entre 6,5 et 8,0 ppm du composé A52

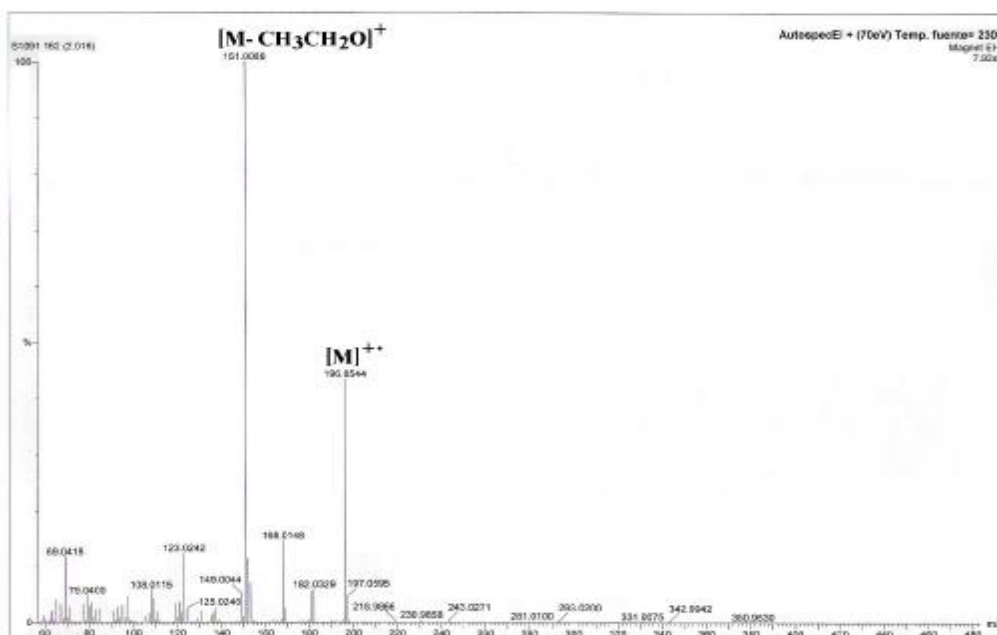
Le tableau n° IV.1.A1.a rassemble les résultats de la RMN ^1H .

Tableau n° IV.1.A1.a : Données de la spectroscopie RMN ^1H (500 MHz ; acetone- d_6) du composé A52

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7,57	1H	<i>dd</i> (8,4 ; 2,1)	H-6
7,52	1H	<i>d</i> (2,1)	H-2
6,85	1H	<i>d</i> (8,4)	H-5
4,31	2H	<i>q</i> (7,1)	OCH ₂
3,91	3H	<i>s</i>	OCH ₃
1,35	3H	<i>t</i> (7,1)	CH ₃

Les données relatives à l'étude du spectre RMN- ^1H , montrent un noyau aromatique trisubstitué. Un substituant comporte le groupement OCH₂CH₃, le 2^{ème} comporte un groupement OCH₃, le troisième ne donnant pas de signal pourrait être un hydroxyle.

L'examen du spectre SMIE (spectre n° IV.1.A1.4) et tableau n° IV.1.A1.b, montre un pic moléculaire à $m/z = 196$ Da correspondant à une formule brute de C₁₀H₁₂O₄ soit une molécule à 5 insaturations.



Spectre n° IV.1.A1.4 : Spectre SMIE du composé A52

Tableau n° IV.1.A1.b: Les fragments du spectre de masse EI du composé A52

M^{+}	$[M-CH_3]^+$	$[M-CH_2CH_2]^+$	$[M-OCH_2CH_3]^+$	$[M-OCOCH_2CH_3]^+$
196	181	168	151	123

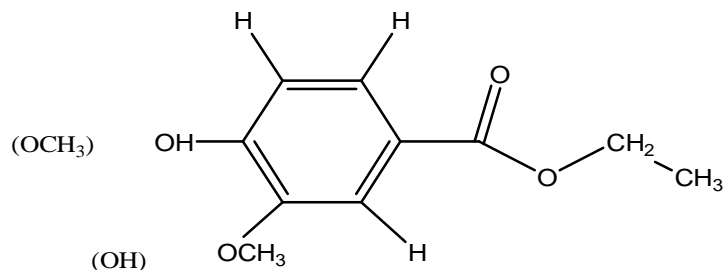
Ce résultat suppose en plus des trois substituants cités, la présence d'un groupement C=O dans cette molécule.

Par ailleurs ce spectre admet comme pic de base le signal à $m/z = 151$ Da, correspondant à $M^{+}-45$ soit $M^{+}-OCH_2CH_3$. Le fait que ce signal soit le pic de base, signifie que cette rupture est privilégiée dans cette molécule. Comme il s'agit d'un composé aromatique, cette rupture doit être une rupture benzylique, autrement dit, entre le groupement OCH_2CH_3 et le noyau aromatique il doit y avoir un atome de carbone, lequel ne peut être que celui du groupement carbonyle. Ainsi le composé A52 renferme un noyau aromatique, trisubstitué par un hydroxyle, un méthoxyle et un carbethoxy.

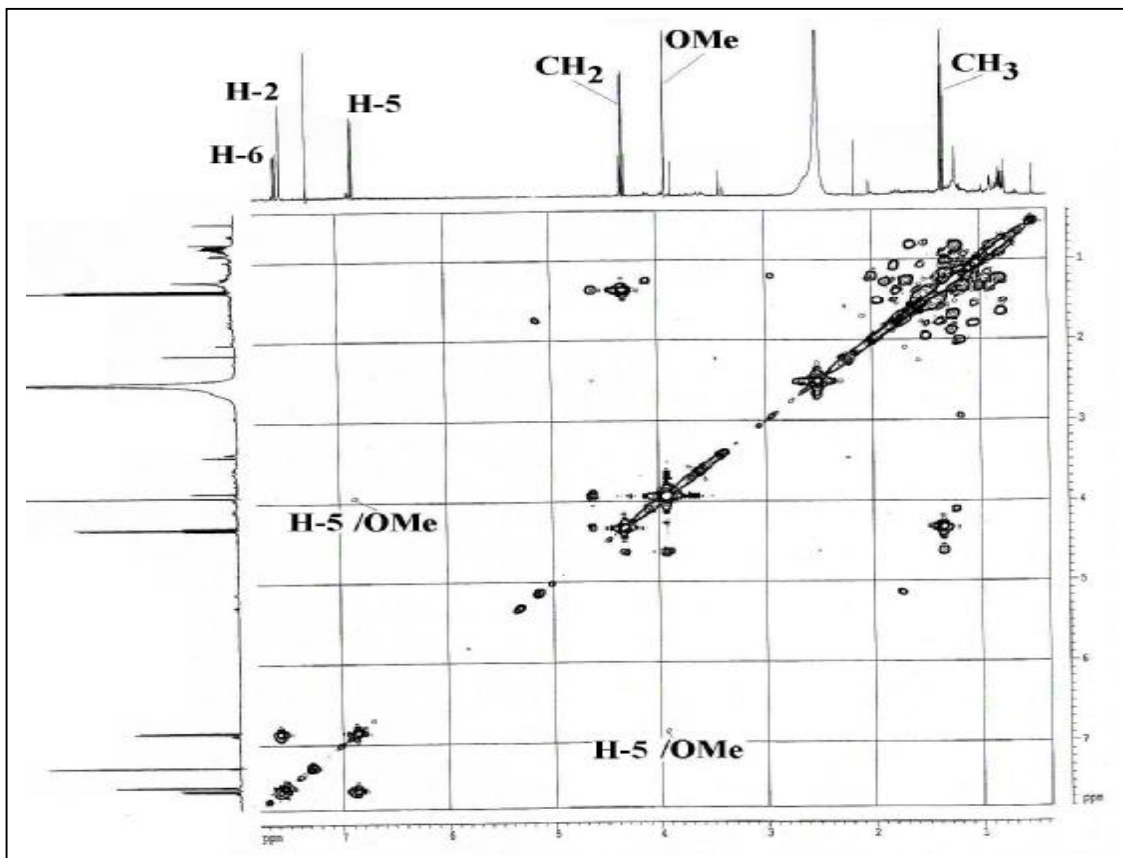
La multiplicité des signaux des protons aromatiques montre qu'il s'agit d'une substitution 1, 3, 4. En effet le doublet à $\delta = 7,57$ ppm oriente vers deux hypothèses.

- La première concerne les interactions de couplage du noyau relatif à ce signal qui sont de type ortho et méta, déduites des valeurs 8,4 et 2,1 Hz des constantes de couplage.
- La seconde hypothèse porte sur la valeur du déplacement chimique relatif à ce noyau le plus élevé des trois, ce qui le place en ortho du groupement attracteur par effet mésomère et par conséquent en ortho par rapport au groupement carbonyle. Toujours par rapport aux valeurs des déplacement chimiques, le doublet à $\delta = 7,52$ ppm ($J = 2,1$) ne peut être attribué qu'à un proton en position ortho par rapport au carbonyle et en position méta par rapport au proton précédent, vu la multiplicité du signal de ces deux noyaux et après attribution de la position 1 au carbone du noyau aromatique portant le groupement carbethoxy, le troisième proton aromatique occupe la position 5.

Ces données mènent à la structure partielle :

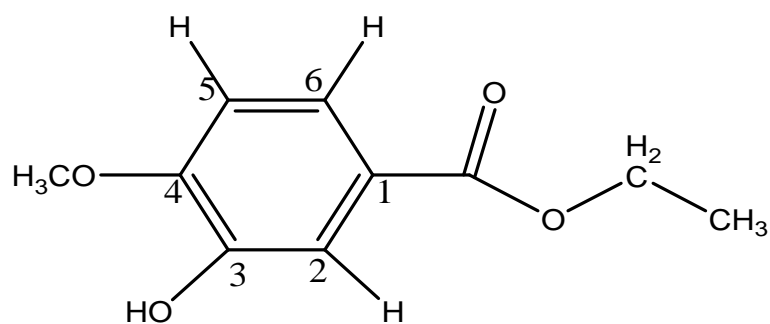


L'examen du spectre COSY (^1H - ^1H) (spectre n° IV.1.A1.5) de ce composé, confirme toutes ces hypothèses et montrent une corrélation lointaine entre le proton H-5 et les protons du groupement méthoxyle, ce qui place ce dernier en position 4 du noyau aromatique.



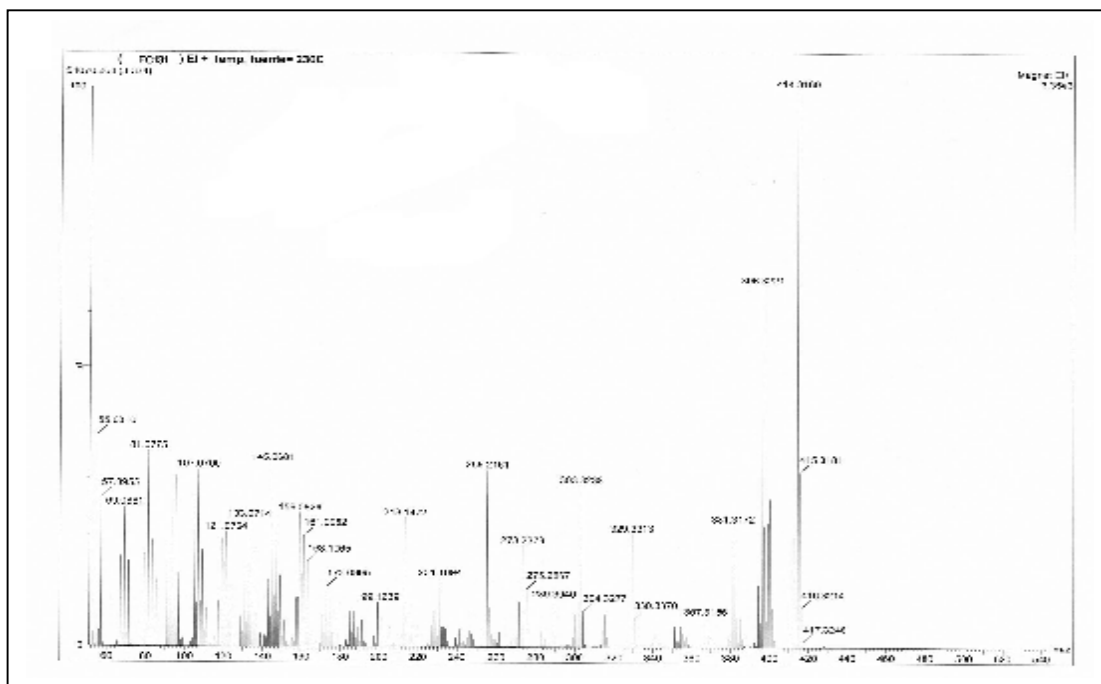
Spectre n° IV.1.A1.5 : Spectre COSY (^1H - ^1H) (500 MHz, Acetone- d_6 , δ ppm) du composé A52

Ainsi la structure du composé A52 est : **3-hydroxy-4-méthoxybenzoate d'éthyle**



IV.1.A2: Elucidation structurale du composé F9

Le spectre de masse à haute résolution (SMHR) (spectre n°IV.1.A2.1) du composé F9 donne une masse exacte du pic moléculaire à $m/z = 414,3160$ (100 %) correspondant à la formule brute $C_{29}H_{50}O$, soit un composé à cinq insaturations. Ces données nous ont incité à réaliser le test de LIEBERMANN & BURCHARD relatif à la mise en évidence des stérols et des triterpènes. En effet, après addition de $CHCl_3$ et d'une même quantité d'anhydride acétique à quelques milligrammes de ce produit, une bonne agitation et addition de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, le mélange au début incolore a viré brutalement au vert attestant la présence d'un stérol.



est suivie par la perte d'une molécule d'eau, confirmant la présence de la fonction alcool sur la partie polycyclique.

Les valeurs des ions caractéristiques des fragmentations de ce stérol sont résumées dans le tableau n° IV.1.A2.a:

Tableau IV.1.A2.a: Données du SMHR

Fragment	[M] ⁺	[M-15] ⁺	[M-18] ⁺	[M-18-15] ⁺	[M-C ₁₀ H ₂₁] ⁺
m/z	414	399	396	381	273,21
Int. Rel. (%)	100	26,99	63,89	21,22	17,96

L'examen du spectre RMN ¹H de ce produit (spectre n° IV.1.A2.2) et son étalement (spectre n° IV.1.A2.2') enregistré dans CDCl₃ montre :

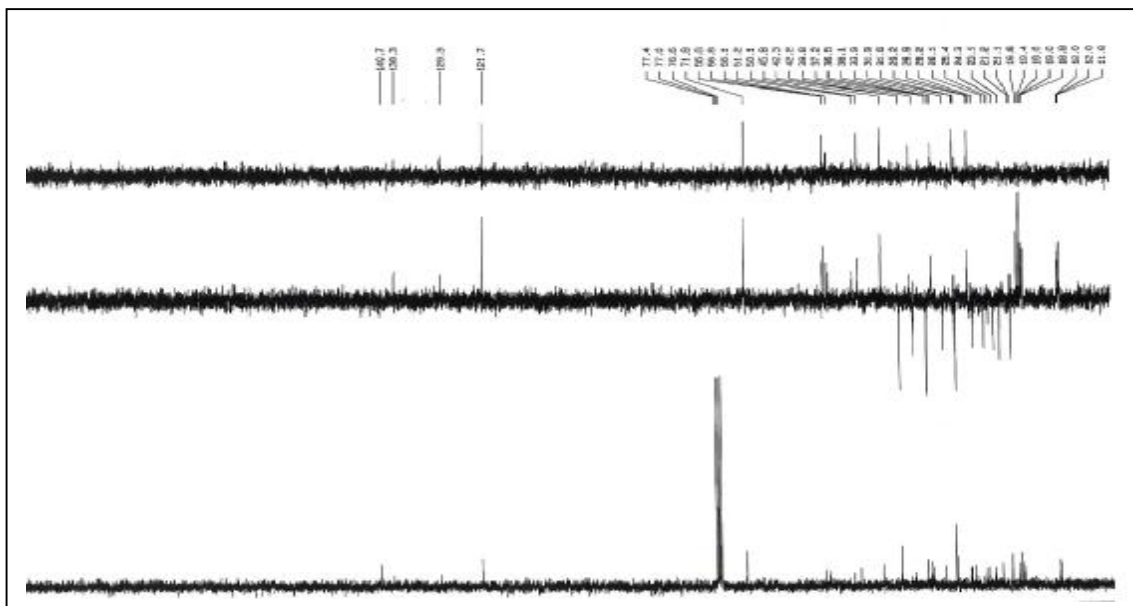
- un doublet large à $\delta = 5,35$ ppm d'intégration 1H correspondant au proton éthylénique connu avec la numérotation H-6.
- un multiplet d'intégration 1H à $\delta = 3,53$ ppm correspondant à un proton sur un carbone oxygéné, notamment le H-3 d'un stérol.
- Un singulet à $\delta = 0,68$ ppm d'intégration 3H attribuable au méthyle 18.
- Deux doublets et un triplet superposés d'intégration 9H centrés à $\delta = 0,86$ ppm correspondant aux deux méthyles isopropyliques qui sont diastérotopiques et par conséquent magnétiquement non équivalents et au méthyle du groupement éthyle respectivement.

Le tableau n°IV.1.A2.b rassemble les données de la RMN ¹H du composé F9.

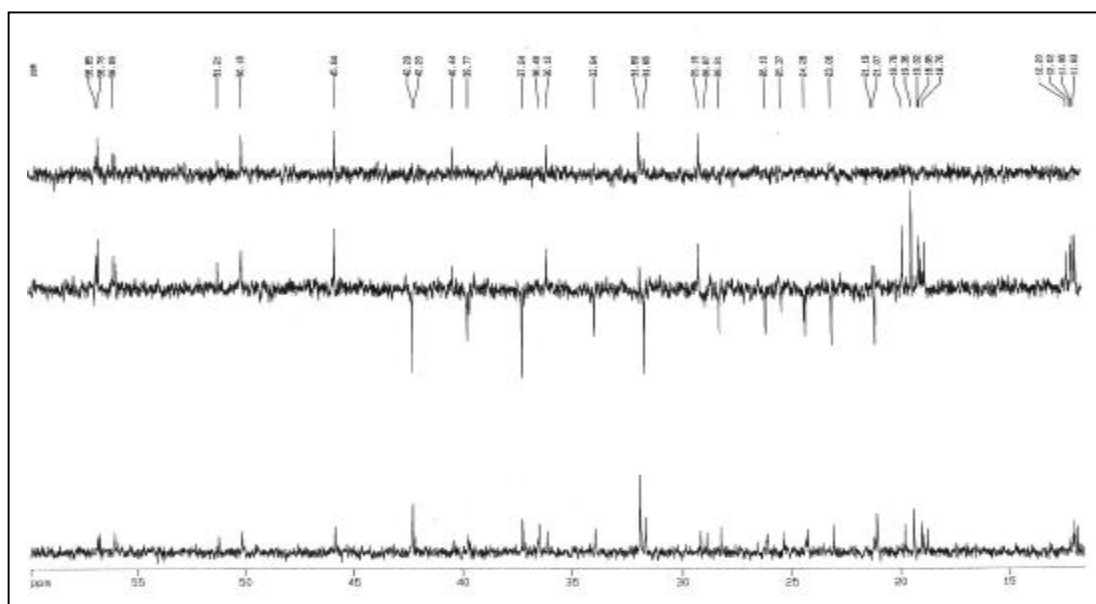
Tableau n°IV.1.A2.b: Données de la RMN ¹H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
5,35	1H	<i>s large</i>	H-6
3,53	1H	<i>multiplet</i>	H-3
2,25	2H	<i>d (6,5) large</i>	H-4
0,68	3H	<i>s</i>	CH ₃ -18
0,82	3H	<i>d (6,8)</i>	CH ₃ -27
0,85	3H	<i>d (7,0)</i>	CH ₃ -26
0,86	3H	<i>t (7,0)</i>	CH ₃ -29
0,94	3H	<i>d (6,5)</i>	CH ₃ -21
1,01	3H	<i>s</i>	CH ₃ -19

ppm relatif au carbone portant la fonction alcool (C-3). Les valeurs des déplacements chimiques sont caractéristiques des positions attribuées.

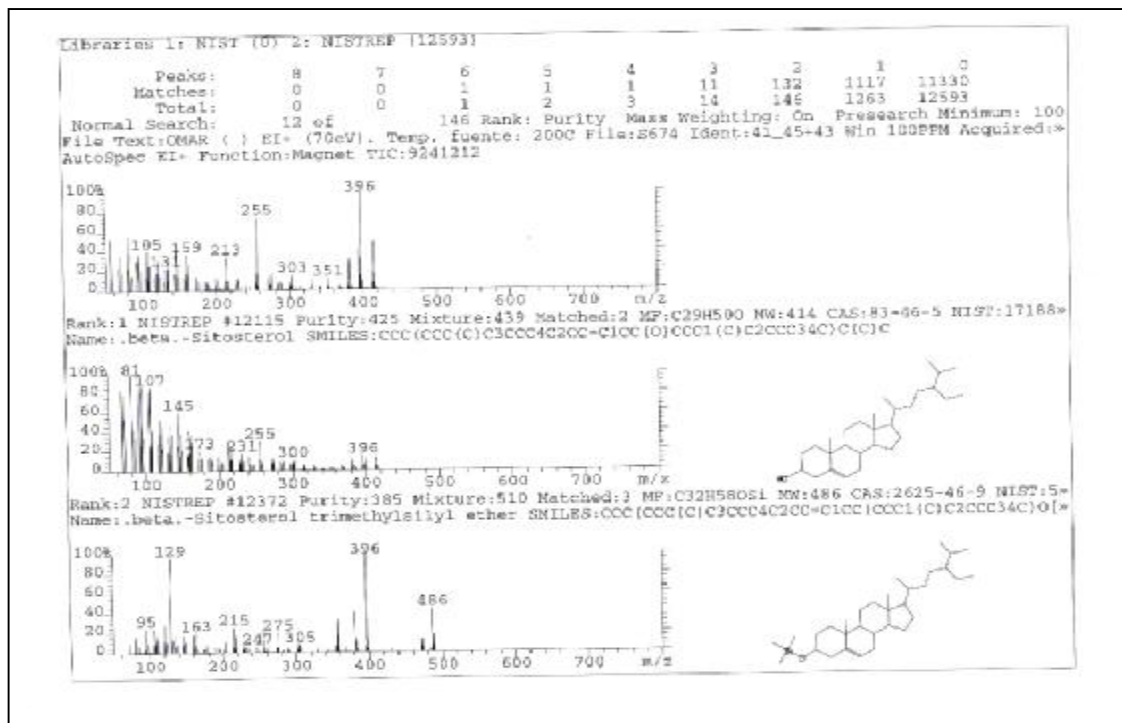


Spectre n° IV.1.A2.3 : Spectre RMN ^{13}C et DEPT (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé F9



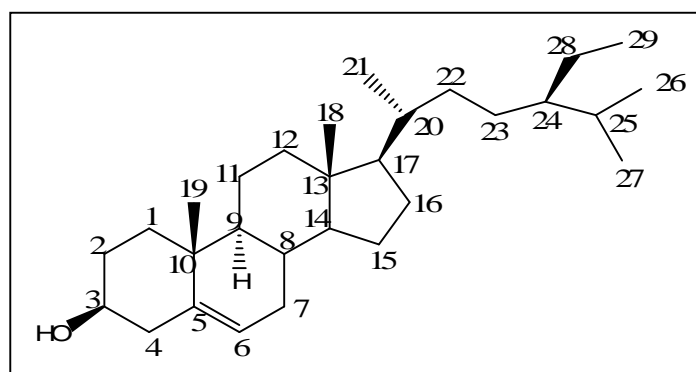
Spectre n° IV.1.A2.3' : Spectre RMN ^{13}C étalé (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé F9

La recherche et la comparaison avec les spectres des banques de données de NIST et WILEY, confirment bien notre analyse, en affichant un spectre très similaire à celui de notre molécule et la même structure (spectre n° IV.1.A2.4).



Spectre n° IV.1.A2.4 : Spectre SMIE donné par la littérature (NIST et WILEY)

L'ensemble de ces données comparées aux résultats de la littérature [1-3] ainsi que la co-chromatographie avec un échantillon authentique mène au β -sitostérol et permet d'écarter son épimère le γ -sitostérol.

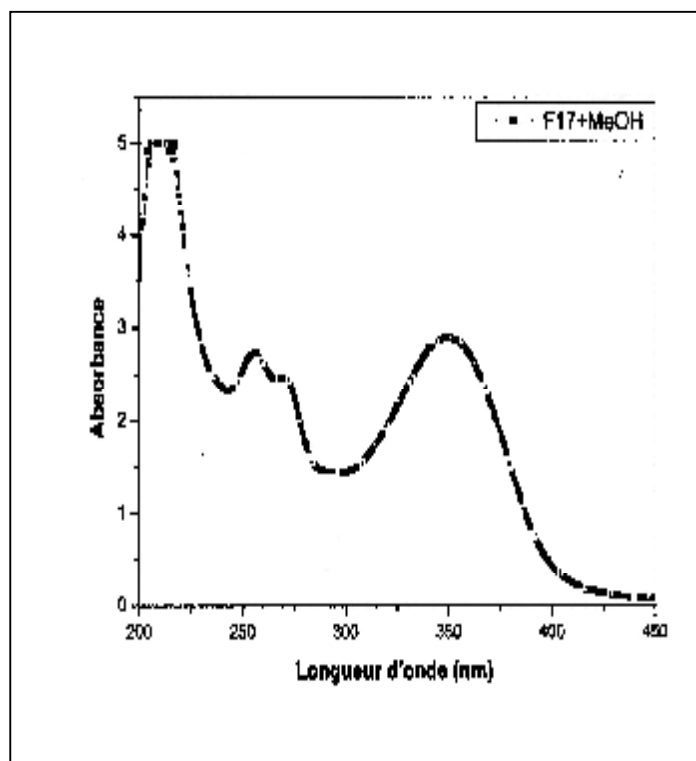


β -sitostérol

IV.1.A3: Elucidation structurale du composé F17

La fluorescence noire-violette de ce composé sous lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

Le spectre d'absorption ultraviolette enregistré dans le méthanol donnant la valeur de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I à 352 nm, oriente vers la structure d'un flavonol substitué en 3 (3-OR) (spectre n° IV.1.A3.1).



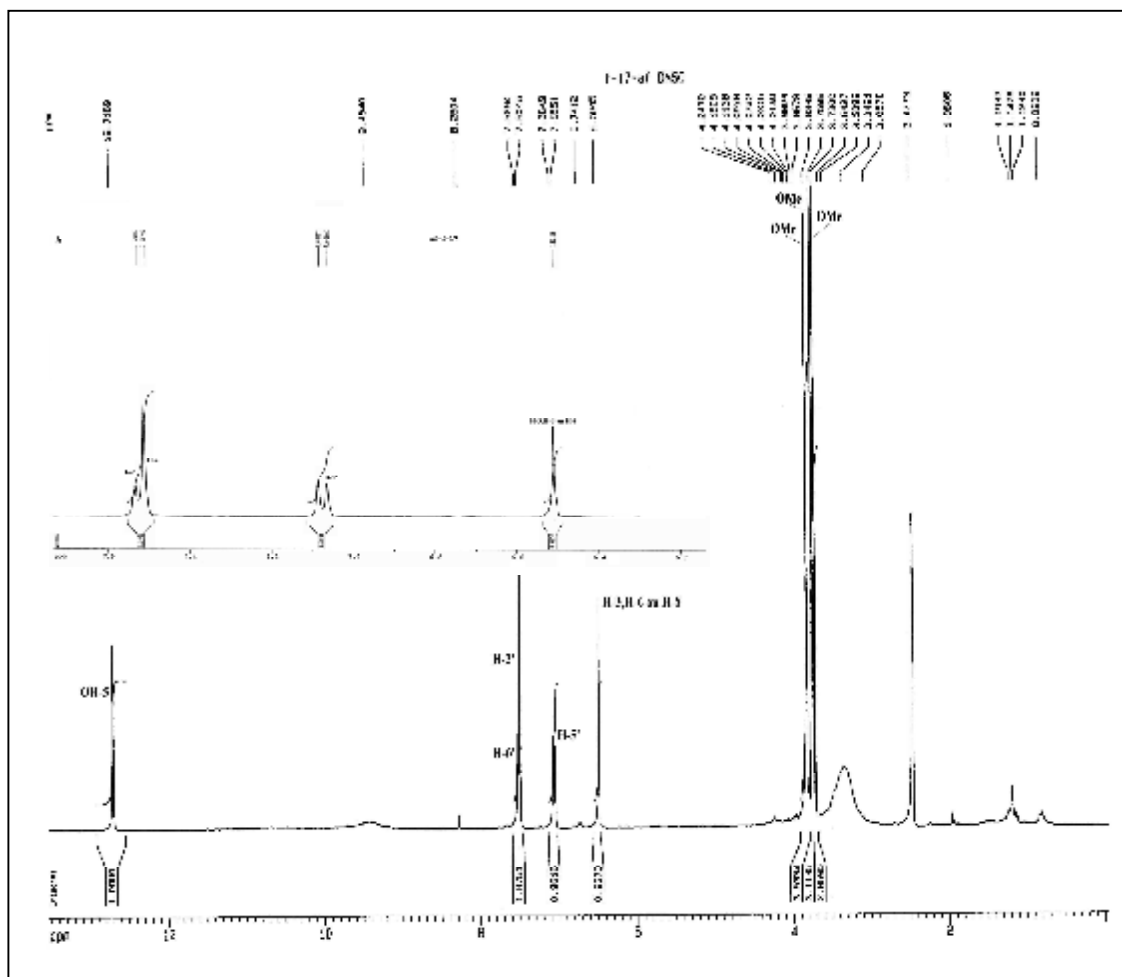
Spectre n° IV.1.A3.1: Spectre UV du composé F17.

L'examen du spectre RMN ^1H enregistré dans CDCl_3 + une goutte de CD_3OD (spectre n° IV.1.A3.2) montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde que l'on peut identifier par :

- Un signal sous forme d'un doublet large d'intégration 1H à $\delta = 7,52$ ppm ($J = 8,2$ Hz) attribuable à H-6'.
- Un signal sous forme d'un singulet large d'intégration 1H à $\delta = 7,51$ ppm attribuable à H-2'.
- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,07$ ppm ($J = 8,2$ Hz) attribuable à H-5'.

Ces trois signaux montre une disubstitution du noyau B.

- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 12,72$ ppm, attribuable à OH-5.
- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,51$ ppm qui peut être attribuer soit à H-6, soit à H-8, vu les résultats du spectre d'absorption ultraviolette.
- Trois signaux sous forme d'un singulet d'intégration 3H chacun à $\delta = 3,84$ ppm, $\delta = 3,76$ ppm et $\delta = 3,73$ ppm révélant la présence de trois groupements méthoxyles dans la molécule.



Spectre n° IV.1.A3.2 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé F17

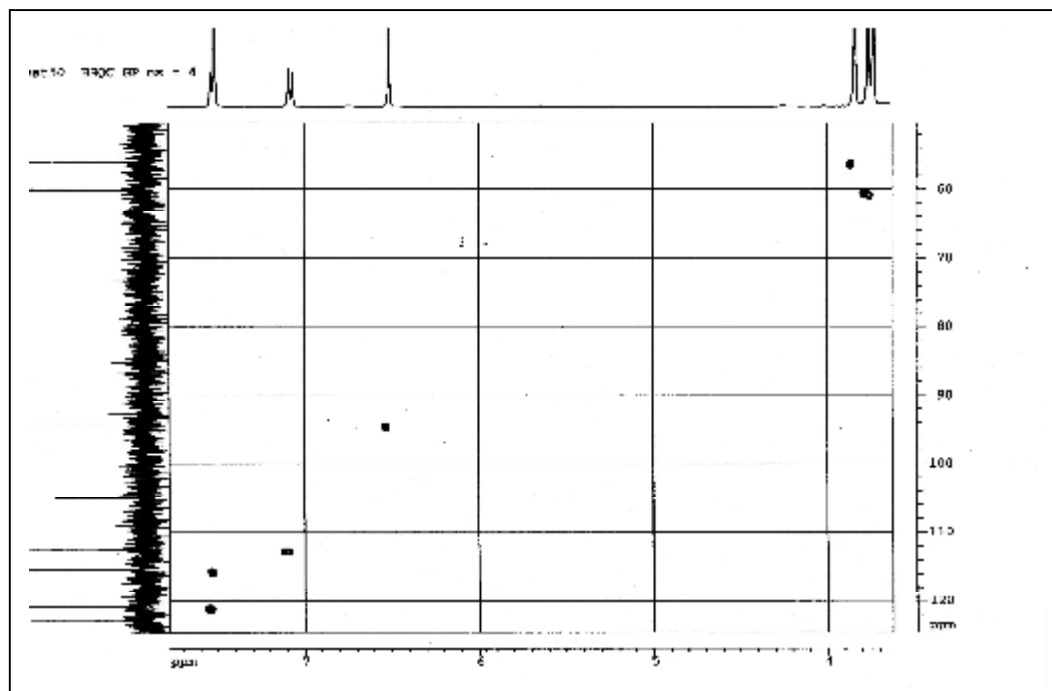
Le tableau IV.1.A3.a rassemble les données de RMN ^1H .

Tableau n° IV.1.A3.a : Données de la spectroscopie RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz).

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
12,72	1H	<i>s</i>	OH-5
7,53	1H	<i>d</i> (8,2) <i>large</i>	H-6'
7,51	1H	<i>s large</i>	H-2'
7,07	1H	<i>d</i> (8,2)	H-5'
6,51	1H	<i>s</i>	H-3, H-6, H-8
3,84	3H	<i>s</i>	OCH_3
3,76	3H	<i>s</i>	OCH_3
3,73	3H	<i>s</i>	OCH_3

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (spectre n° IV.1.A3.3) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants ainsi :

- Le H-6' permet l'attribution du signal à $\delta = 120,8$ ppm à l'atome de carbone C-6'.
- Le H-2' permet l'attribution du signal à $\delta = 115,4$ ppm à l'atome de carbone C-2'.
- Le H-5' permet l'attribution du signal à $\delta = 112,4$ ppm à l'atome de carbone C-5'.
- Les trois groupements méthoxyles à $\delta = 3,84$; 3,76 et 3,73 ppm permettent l'attribution des atomes de carbones respectifs à $\delta = 56,1$; 60,2 et $\delta = 60,4$ ppm.



Spectre n° IV.1.A3.3: Spectre HSQC (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé F17

L'étude du spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre n° IV.1.A3.4) et ses étalements (spectre n° IV.1.A3.4' et spectre n° IV.1.A3.4'') mettent en évidence les corrélations proton-carbone à longue distance, permettant de tirer les indications suivantes :

Ü Le proton du groupement hydroxyle en C-5 donne trois taches de corrélation :

- La première avec l'atome de carbone à $\delta = 105,1$ ppm attribuable à C-10.
- La deuxième avec l'atome de carbone à $\delta = 131,6$ ppm qui ne peut être que le C-6, Ce même atome de carbone montre une tache de corrélation avec les protons du groupement méthoxyle à $\delta_H = 3,73$ ppm ($\delta_C = 60,4$ ppm), ceci mène à localiser ce groupement sur le carbone C-6 et permet en même temps d'éliminer la probabilité d'existence de H-6, donc le singulet à $\delta_H = 6,51$ ppm ne peut être que H-8. Cette attribution est appuyée par la tache de corrélation observée sur ce spectre entre C-6 et ce proton (H-8).
- La troisième avec l'atome de carbone à $\delta = 152,8$ ppm qui ne peut être attribuer qu'à C-5.

Sur le même spectre, d'autres informations peuvent être tirées comme suit :

Ü Les protons H-2' et H-6' montrent:

- Deux taches de corrélation avec le même atome de carbone à $\delta = 150,7$ ppm qui ne peut être attribuer qu'au carbone C-4'. Ce même atome de carbone montre une tache de corrélation avec le méthoxyle à $\delta_H = 3,84$ ppm ($\delta_C = 56,1$ ppm), cela suppose que ce groupement méthoxyle est porté par le carbone C-4'.
- Deux taches de corrélation avec un atome de carbone à $\delta = 155,7$ ppm attribuable à C-2.

Ü Le proton H-5' montre deux taches de corrélation :

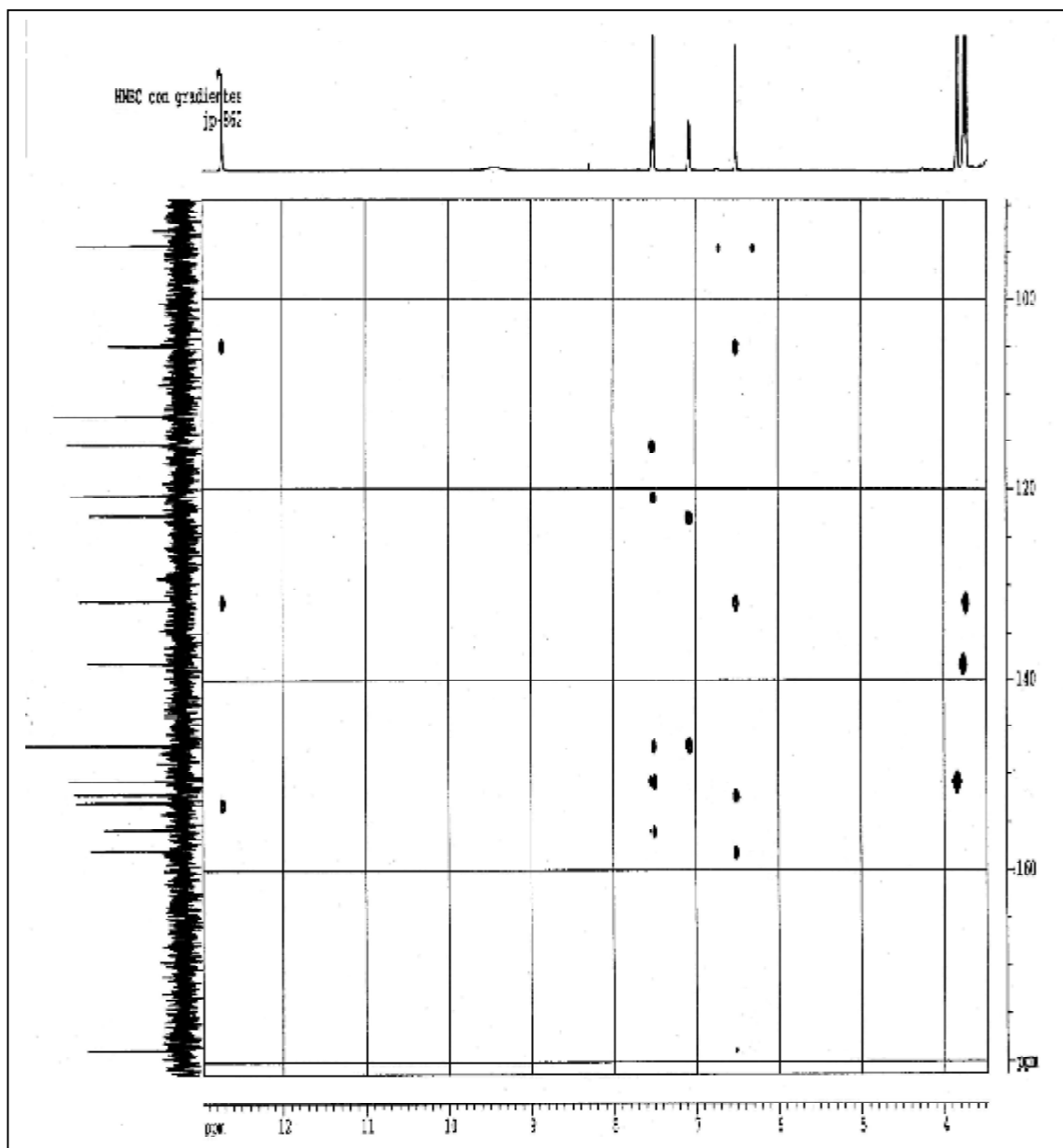
- La première avec l'atome de carbone à $\delta = 122,8$ ppm attribuable à C-1'.
- La deuxième avec l'atome de carbone à $\delta = 146,8$ ppm attribuable à C-3'. Cette attribution est confirmée par la tache de corrélation de ce noyau (C-3') et H-2'.

Ü Le proton attribué à H-8 montre trois autres taches de corrélation :

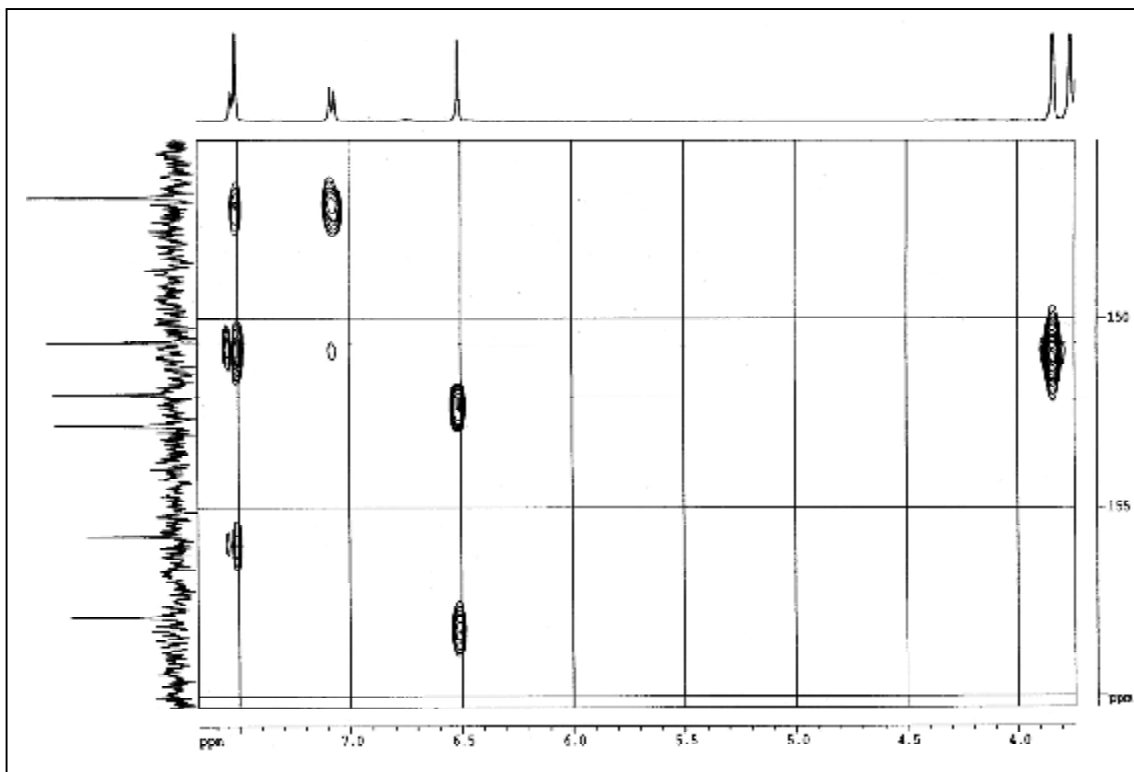
- La première confirme le C-10 à $\delta = 105,1$ ppm.

- La deuxième avec un atome de carbone oxygéné à $\delta = 152,0$ ppm qui ne peut être attribué qu'au C-9.
- La troisième avec un autre atome de carbone oxygéné représenté par le signal à $\delta = 157,9$ ppm qui ne peut que le C-7.

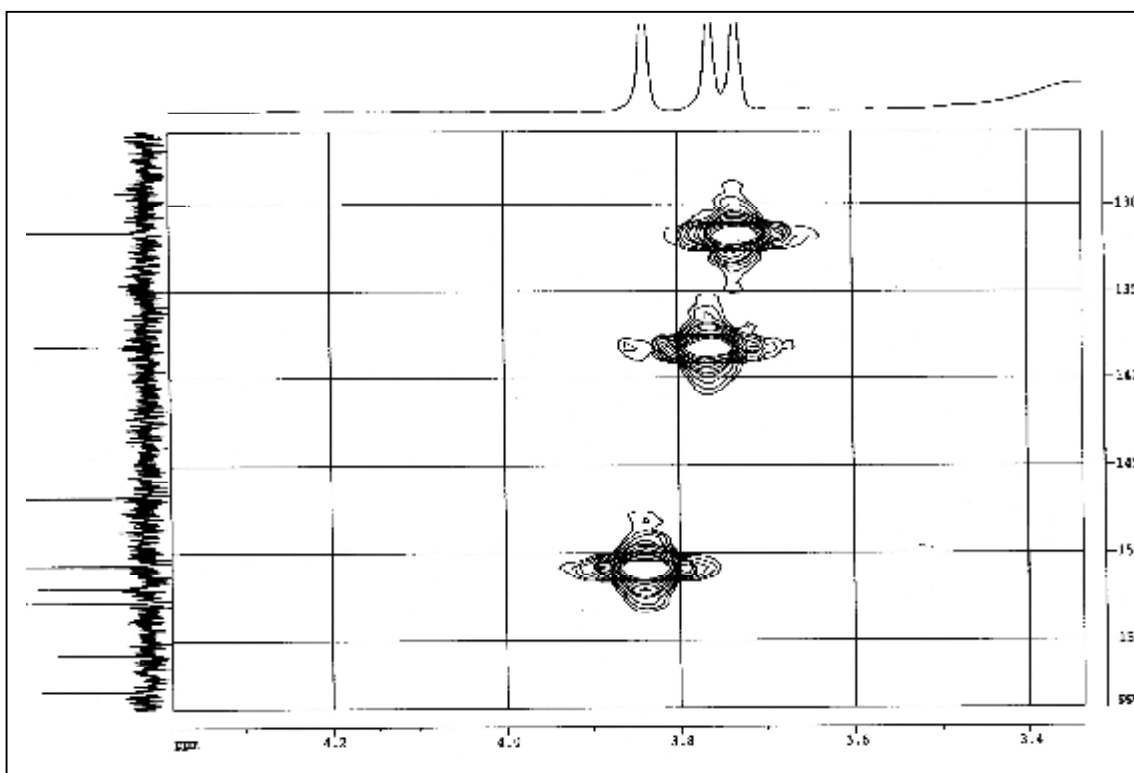
Enfin le carbone à $\delta_C = 138,1$ ppm, corrélant avec les proton du méthoxyle à $\delta_H = 3,76$ ppm ($\delta_C = 60,2$ ppm) et par conséquent substitué par ce méthoxyle, ne peut être attribué qu'au carbone C-3.



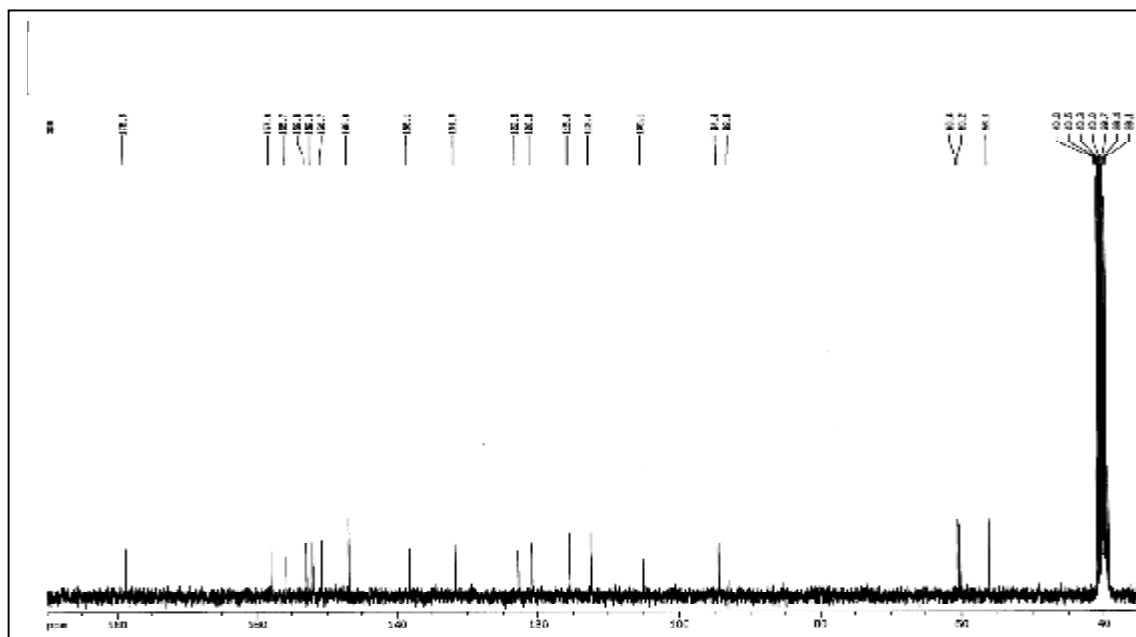
Spectre n° IV.1.A3.4.1: Spectre HMBC (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé F17



Spectre n° IV.1.A3.4.2: Spectre HMBC (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé F17



Spectre n° IV.1.A3.4.3: Spectre HMBC (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé F17

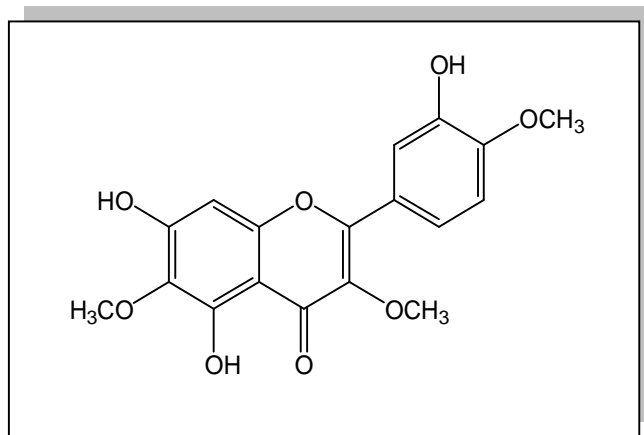


Spectre n° IV.1.A3.5: Spectre ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé F17

Le tableau n° IV.1.A3.b rassemble les données des différentes expériences de la RMN (HSQC, HMBC, RMN ^{13}C) dont la combinaison avec celles obtenue par spectrophotométrie ultraviolette mène à la structure de la Centaureidine. Ces résultats sont en concordance avec ceux de la littérature [4-7].

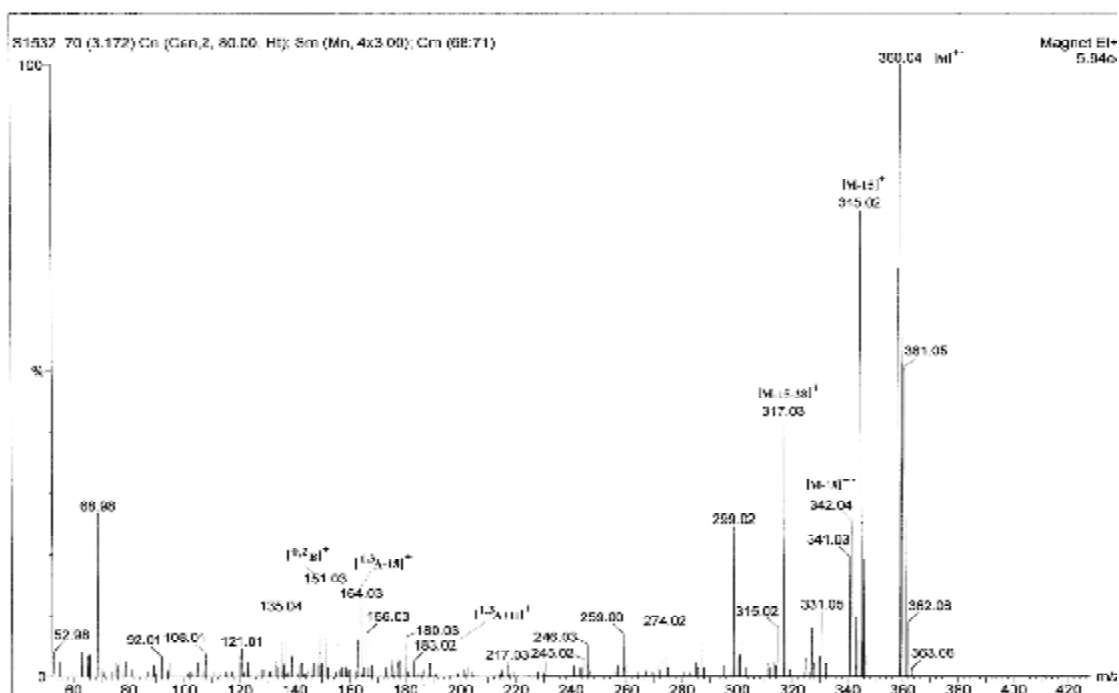
Tableau n° IV.1.A3.b: Données RMN ^{13}C

Déplacement chimique (ppm)	Carbone
178,6	C-4
157,9	C-7
155,7	C-2
152,8	C-5
152,0	C-9
150,7	C-4'
146,8	C-3'
138,1	C-3
131,6	C-6
122,8	C-1'
120,8	C-6'
115,4	C-2'
112,4	C-5'
105,1	C-10
84,4	C-8
60,4	O-CH ₃ - 6
60,2	O-CH ₃ -3
56,1	O-CH ₃ - 4'



5,7,3'-trihydroxy 6,3,4'-trimethoxyflavone (Centaureidine)

L'examen du spectre de masse (spectre n° IV.1.A3.6) en mode impact électronique confirme les substitutions des cycle A et B du squelette flavonique grâce aux signaux :



Spectre n° IV.1.A3.6: Spectre SMIEHR du composé F17

- Ø $m/z = 360$ correspondant à $[M]^+$ d'une génine correspondant à la formule brute $C_{18}H_{16}O_8$ soit un flavonoïde comportant trois méthoxyles et trois hydroxyles.
- Ø $m/z = 345$ correspondant au fragment $[M-15]^+$ indiquant la présence d'un méthoxyle,
- Ø $m/z = 317$ correspondant au fragment $[M-15-28]^+$ caractéristique des flavonoïdes,

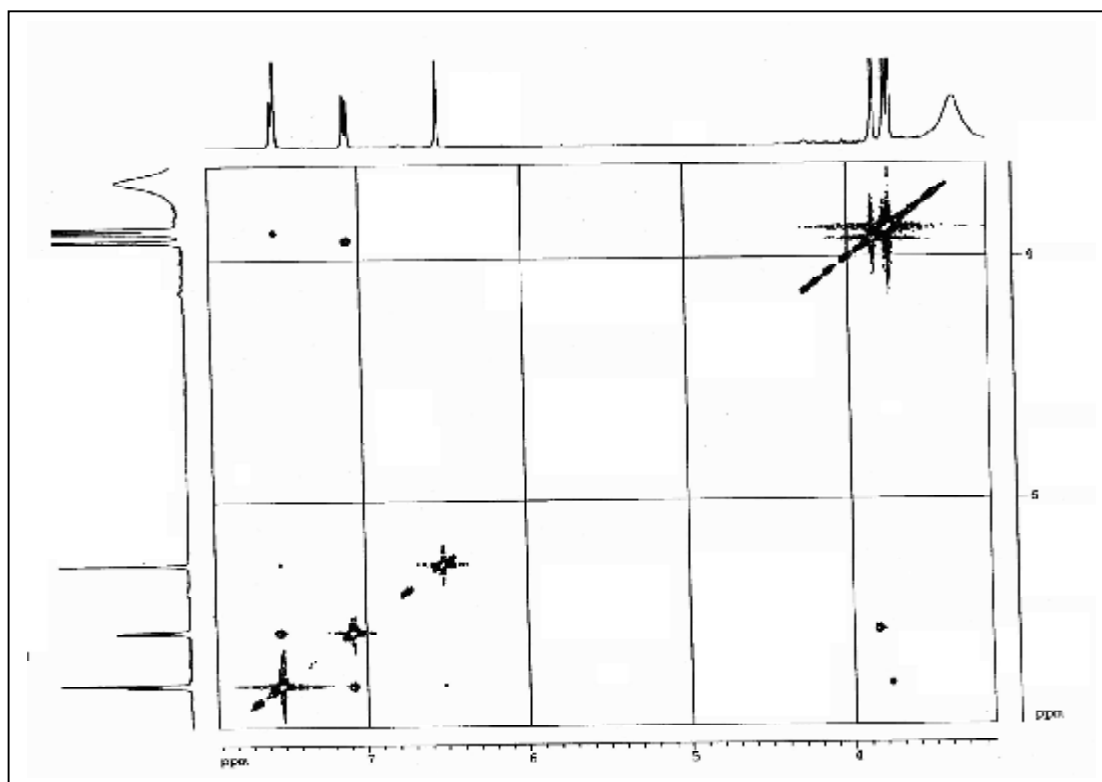
Ø $m/z = 183$ correspondant au fragment $[^{1,3}\text{A+H}]^+$ indiquant un squelette flavonique dont le cycle A comporte deux hydroxyles et un méthoxyle,

Ø $m/z = 151$ correspondant au fragment $[^{0,2}\text{B}]^+$, indiquant la présence d'un hydroxyle et un méthoxyle sur le cycle B,

Ø L'ensemble de ces données permet de placer le troisième méthoxyle en position 3.

L'examen du spectre ROESY (spectre n° IV.1.A3.7, 300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) montre une corrélation de type NOE de H-5' avec le méthoxyle à $\delta = 3,84$ ppm confirmant ainsi la position de ce dernier en C-4'. De même H-2' et H-6' montrent une corrélation de type NOE avec le méthoxyle à $\delta = 3,76$ ppm confirmant la position de ce dernier en C-3.

A noté aussi la corrélation de type NOE de H-2' et H-6' avec le H-8 confirmant ainsi son attribution.

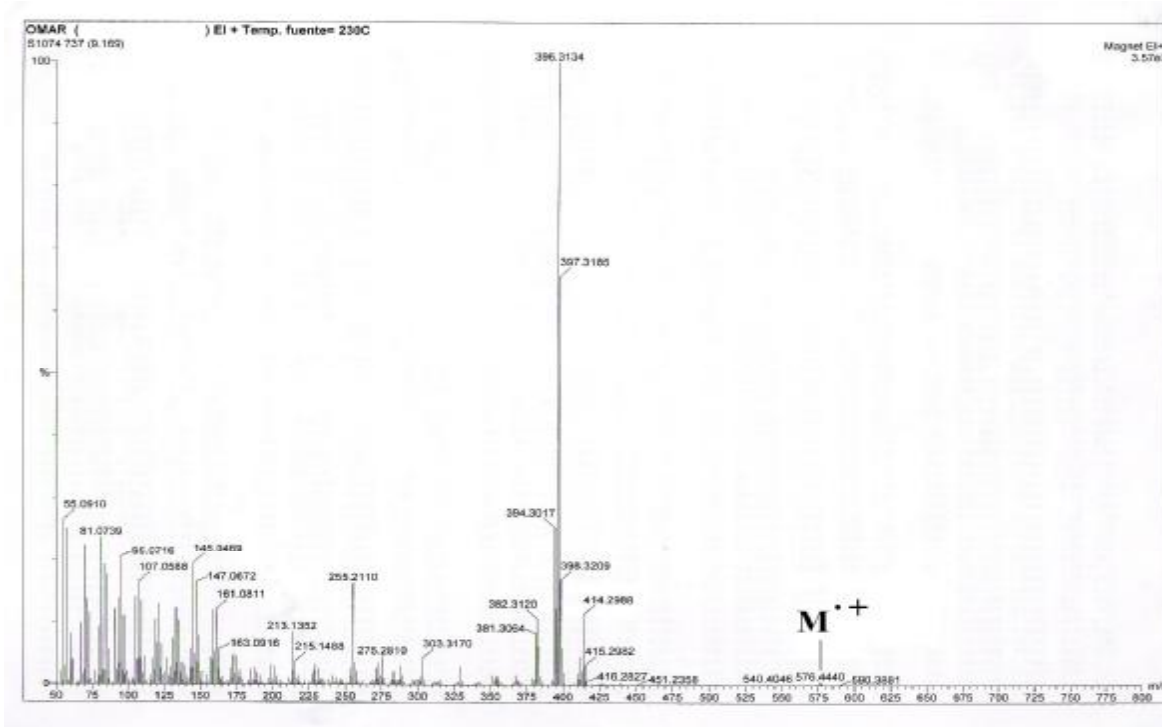


Spectre IV.1.A3.7: Spectre ROESY du composé F17

IV.1.A4: Elucidation structurale du composé F24

Le spectre de masse à haute résolution sous impact électronique (spectre n° IV.1.A4.1) du produit F24 présente un pic moléculaire à $m/z = 576,4440$ correspondant à la formule brute $C_{35}H_{60}O_6$ pour laquelle la masse calculée est $m/z = 576,4390$.

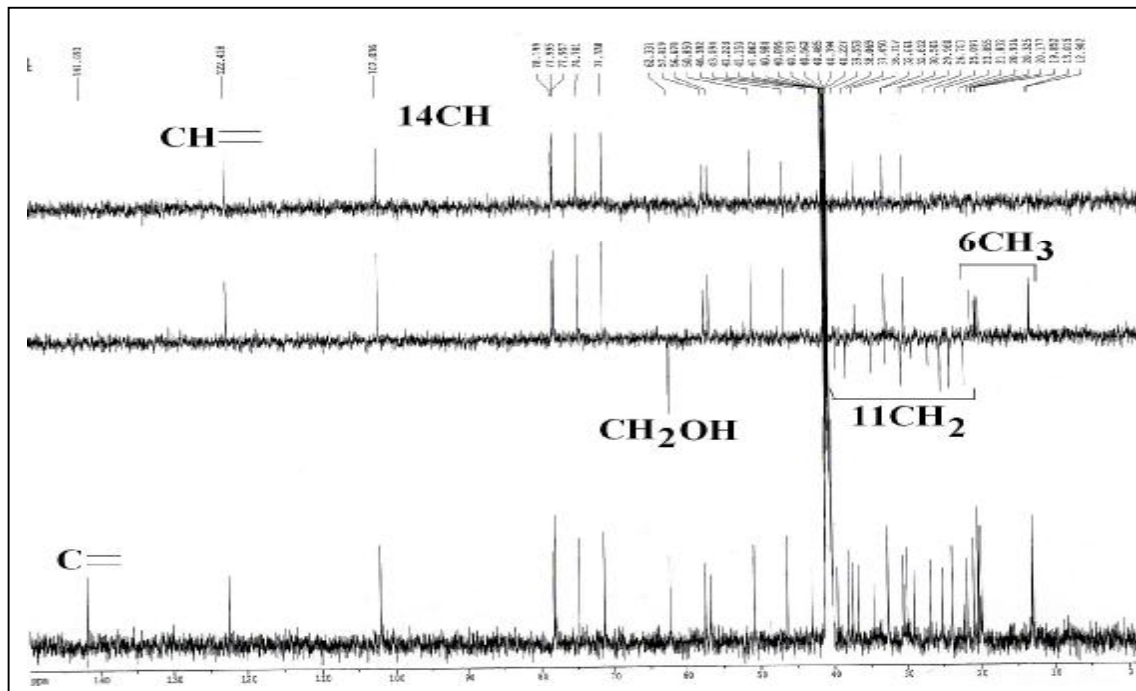
Ce spectre montre également un pic à $m/z = 414,2988$ d'abondance relative 11,38 % correspondant à une formule brute $C_{29}H_{50}O$ relatif à un réarrangement avec perte d'une entité [sucre à six atome de carbone - H_2O] [$M-C_6H_{10}O_5$]⁺. La présence du sucre en C_6 est confirmée par la présence des pics $m/z = 163, 73$ et 57 . Par ailleurs, ce spectre montre un pic de base à $m/z = 396$ (100 %) correspondant à l'ion [$M-C_6H_{10}O_5-H_2O$]⁺ et un pic $m/z = 255$ [$M-C_6H_{10}O_5-H_2O-C_{10}H_{21}$ (chaîne latérale)]⁺. Ce qui suppose que la génine comporte une fonction hydroxyle. La formule brute ($C_{29}H_{50}O$) additionnée de la fonction alcool, d'un nombre d'insaturations 5 et une chaîne latérale $C_{10}H_{21}$ oriente vers une génine de type sitostérol.



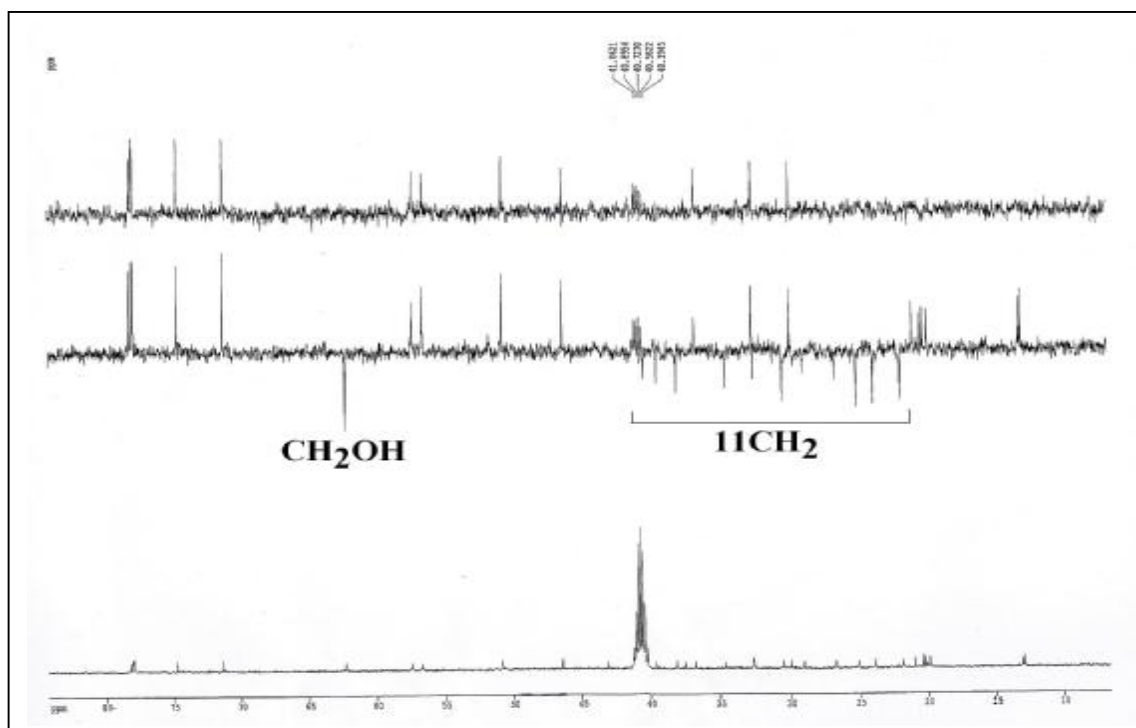
Spectre n° IV.1.A4.1: Spectre SMHR du composé F24

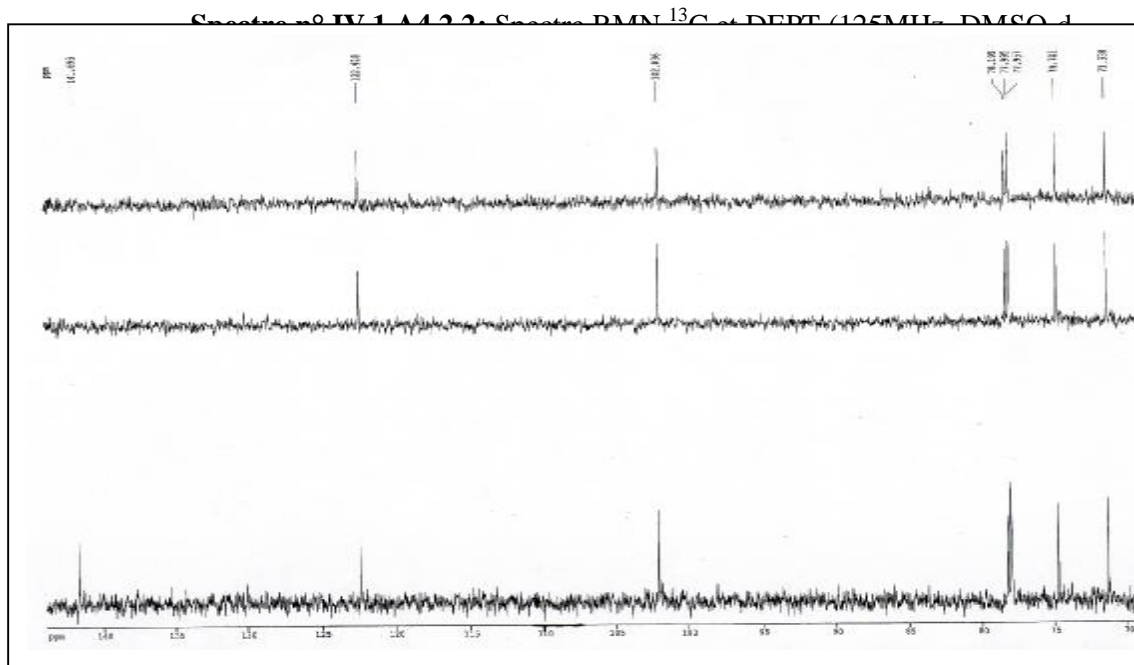
L'étude des spectres RMN ^{13}C et les séquences DEPT 90 et 135 (spectre n° IV.1.A4.2.1) et ses étalement (spectres n° IV.1.A4.2.2 et n° IV.1.A4.2.3) de ce composé montrent la présence de deux atomes de carbones éthylénique. Le premier correspondant à un CH à $\delta = 122,4$ ppm et le second à un atome de carbone quaternaire à $\delta = 141,7$ ppm. Comme ces spectres ne

montrent la présence d'aucun autre atome de carbone éthylénique, cela suppose que ces deux atomes de carbone délimitent la même double liaison. Les valeurs de leur déplacement chimique sont caractéristiques des positions C-5 et C-6 d'un stérol. Par ailleurs ces spectres montrent la présence de six groupements de méthyles.



Spectre n° IV.1.A4.2.1: Spectre RMN ^{13}C et DEPT (125 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé F24





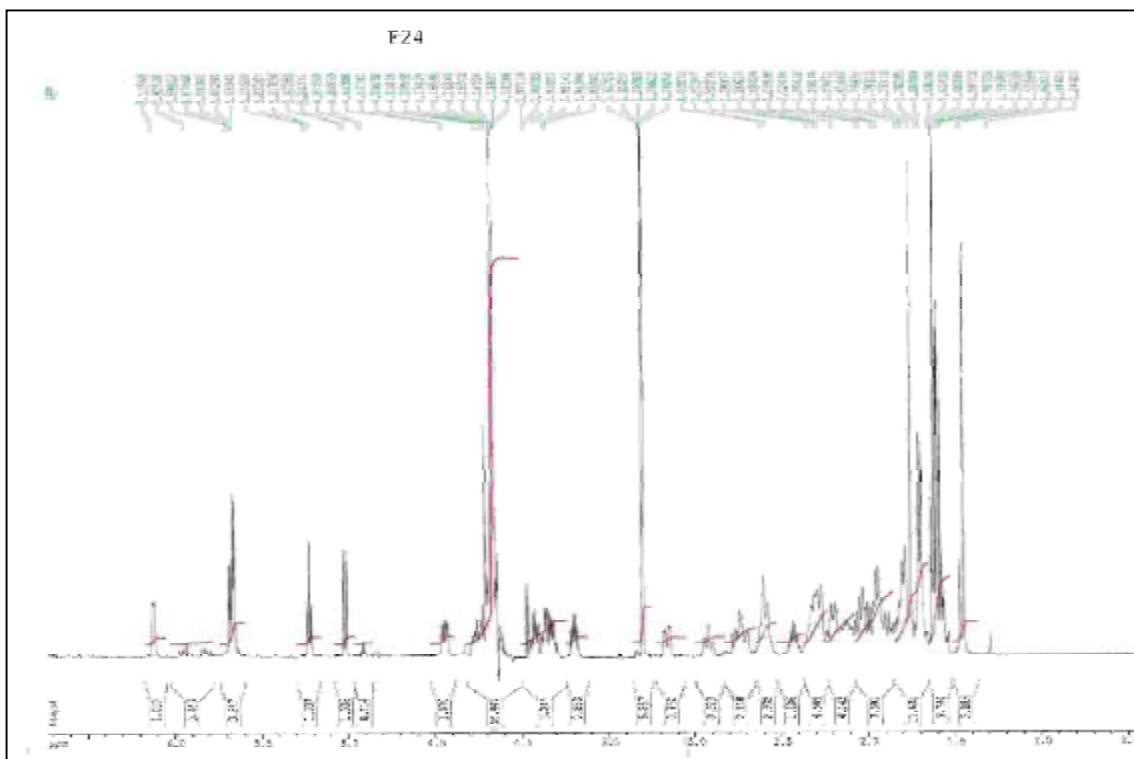
Spectre n° IV.1.A4.2.3: Spectre RMN ¹³C (125MHz, DMSO-d₆, δ ppm)
du composé F24

L'examen du spectre RMN ¹H (spectre n° IV.1.A4.3.2) et notamment la zone des méthyles indique la présence de:

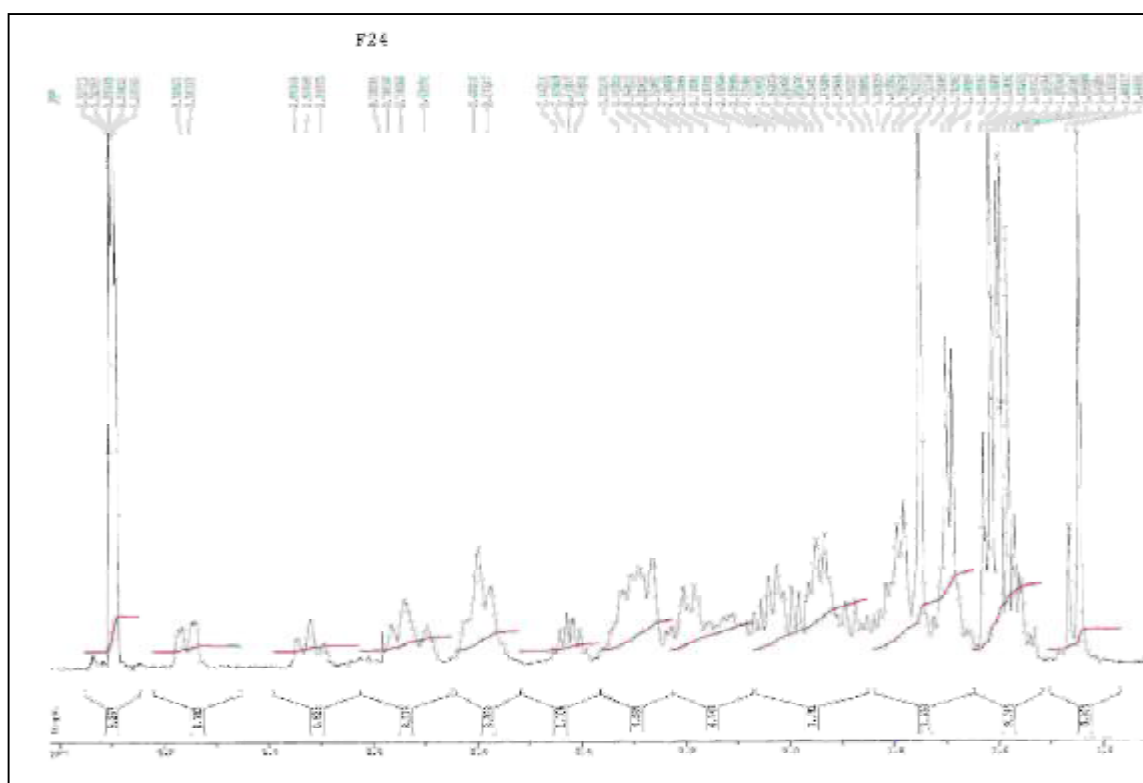
- Un méthyle tertiaire sous forme d'un singulet à δ = 1,75 ppm caractéristique du méthyle 19.
- Un méthyle secondaire sous forme d'un doublet ($J = 6,5$ Hz) à δ = 1,70 ppm caractéristique du méthyle 21.
- Un méthyle sous forme d'un triplet ($J = 7,0$ Hz) à δ = 1,62 ppm,
- Un méthyle sous forme d'un doublet ($J = 7,0$ Hz) à δ = 1,61 ppm et un méthyle sous forme d'un doublet ($J = 7,0$ Hz) à δ = 1,59 ppm, corrélant avec le même proton sur le spectre COSY (¹H-¹H) (spectre n° IV.1.A4.5.1)

La présence de ces deux derniers méthyles suppose la présence d'un groupement isopropyle relié à un centre asymétrique faisant de ces deux méthyles deux groupements diastériotopiques et par conséquent magnétiquement non équivalents, ils sont caractéristiques des méthyles 26 et 27.

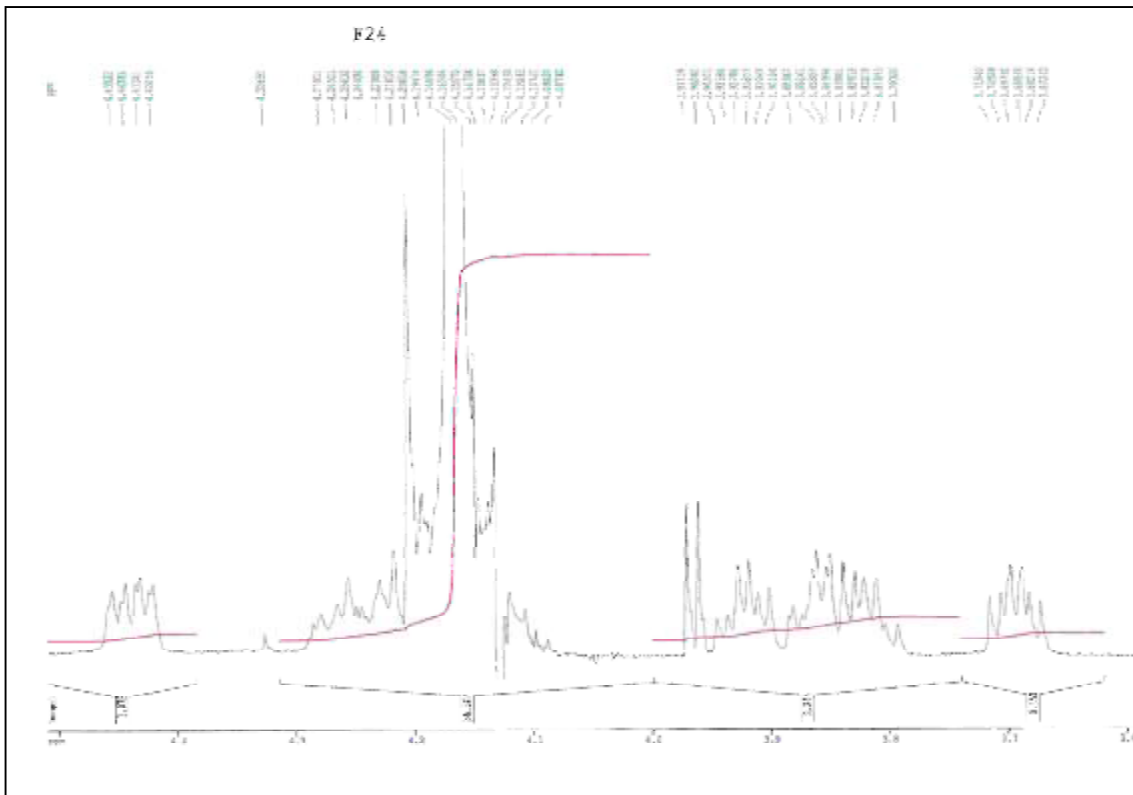
- Un méthyle tertiaire sous forme d'un singulet à δ = 1,45 ppm caractéristique du méthyle 18.



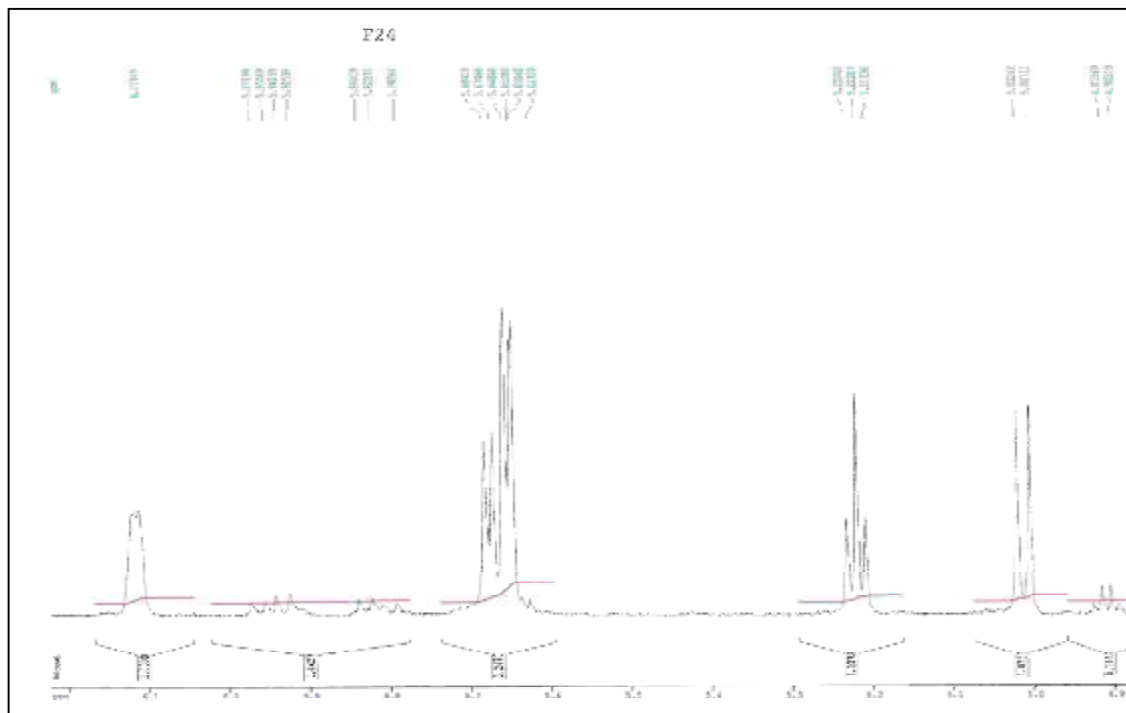
Spectre n° IV.1.A4.3.1: Spectre RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé F24



Spectre n° IV.1.A4.3.2: Spectre RMN ^1H étalé de 1,4 à 3,4 ppm du composé F24



Spectre n° IV.1.A4.3.3: Spectre RMN ^1H étalé de 3,6 à 4,5 ppm
du composé F24



Spectre n° IV.1.A4.3.4: Spectre RMN ^1H étalé de 4,9 à 6,2 ppm
du composé F24

D'après ces données :

- ü la présence du groupement isopropyle
- ü la présence du méthyle sous forme de triplet supposant le voisinage d'un CH₂ soit la présence d'un groupement éthyle
- ü la présence d'un méthyle sous forme d'un doublet

Sont caractéristiques d'une chaîne latérale d'un sitostérol. Ceci mène à la structure de la génine reporté sur le schéma n°IV.1.A4.1.

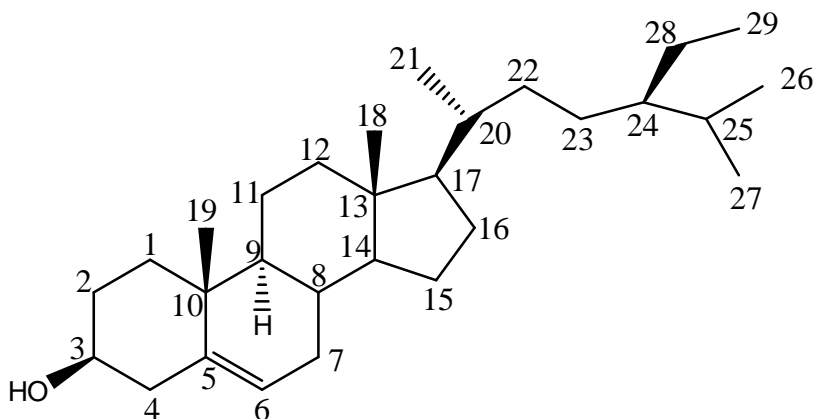
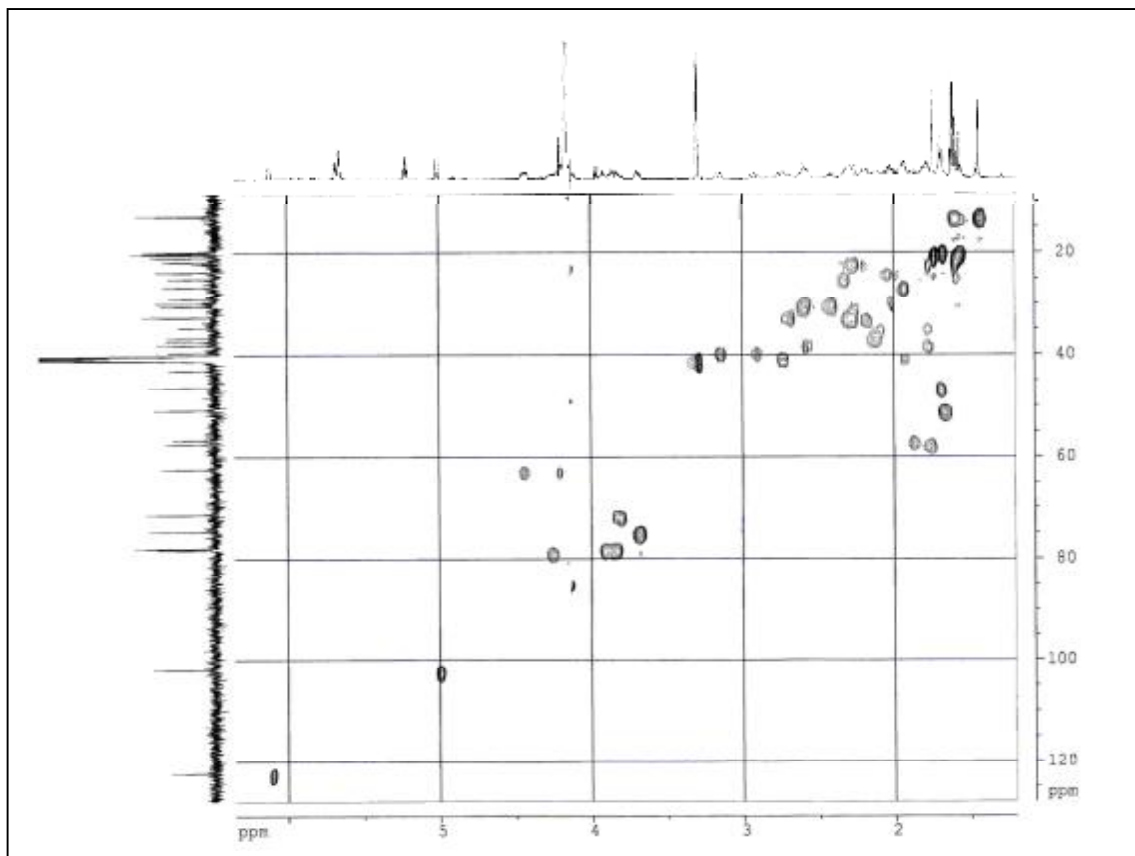


Schéma n°IV.1.A4.1 : génine du composé F24

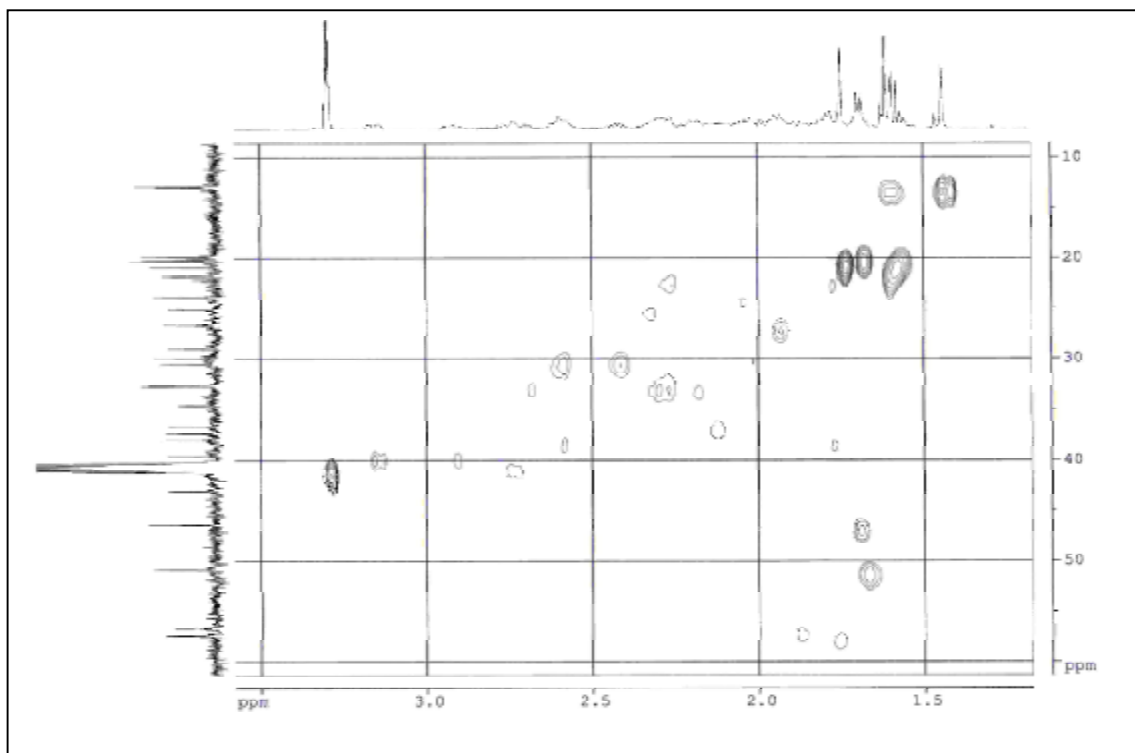
La localisation de H-3 est réalisée grâce à l'étude du spectre HSQC et son spectre étalé (spectres n° IV.1.A4.4.1 et n° IV.1.A4.4.2) montrent une corrélation entre le carbone oxygéné à $\delta = 78,2$ ppm attribuable à C-3 et le proton sous forme d'un multiplet partiellement recouvert par le signal de l'eau de contamination du DMSO-d₆ à $\delta = 4,26$ ppm (H-3).

La stéréochimie des centres asymétriques est basée sur les données de la littérature. Par contre la stéréochimie du carbone C-3 est déduite de la valeur des constantes de couplage des protons H-4 et H-4'. En effet sur le spectre COSY et sur son étalement (spectres n° : IV.1.A4.5.1 et IV.1.A4.5.2) le H-3 à $\delta = 4,26$ ppm corrèle avec les deux protons à $\delta = 3,16$ ppm et $\delta = 2,92$ ppm. Ces deux noyaux corrélient sur le spectre HMBC (spectre n° IV.1.A4.6.1 et n° IV.1.A4.6.2) avec l'atome de carbone éthylénique C-5 à noter également une corrélation du premier proton avec le C-6. Ces corrélations ajoutées à celle du spectre COSY permettent ainsi l'attribution de ces deux protons à H-4 et H-4' respectivement.

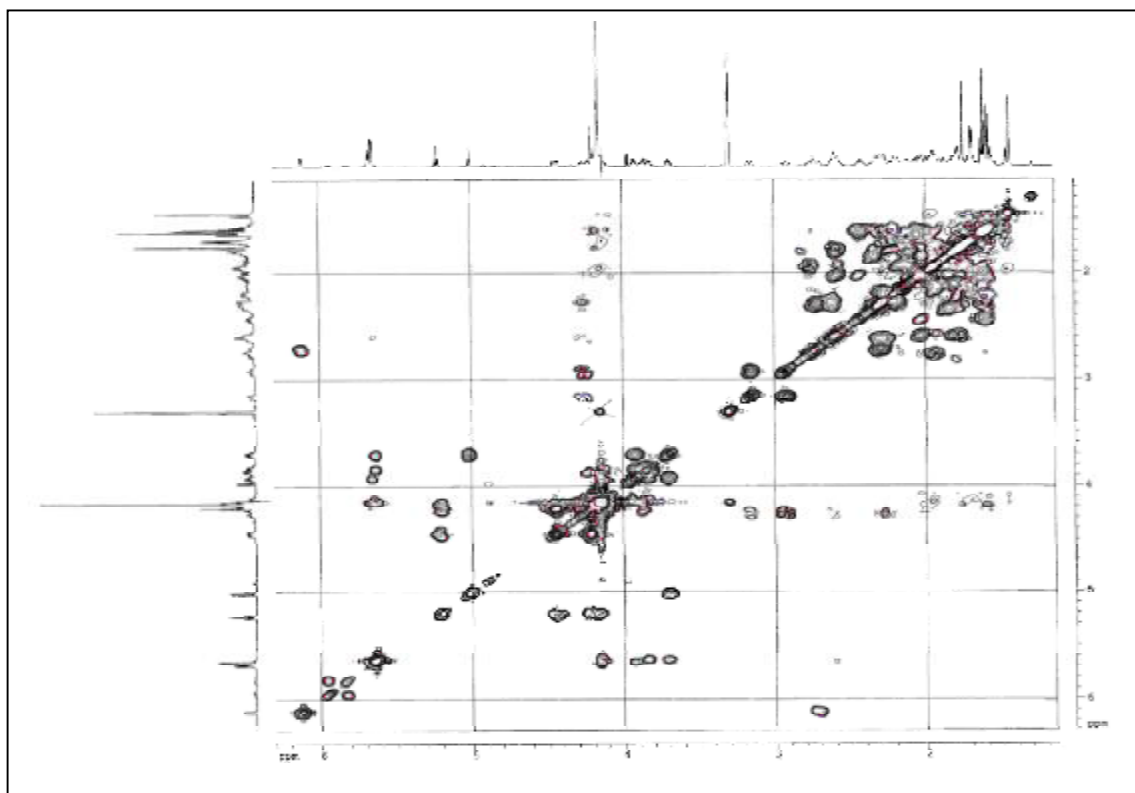
D'après la valeur des déplacements chimiques, H-4' a une orientation axiale soit β , son signal apparaît sous forme d'un doublet dédoublé $J = 12,0$ Hz signifiant une interaction géminale (2J H-4 et H-4') et une interaction vicinale (3J H-3 et H-4'). Ce qui place H-3 en position axiale ou α et par conséquent le substituant en position équatoriale β .



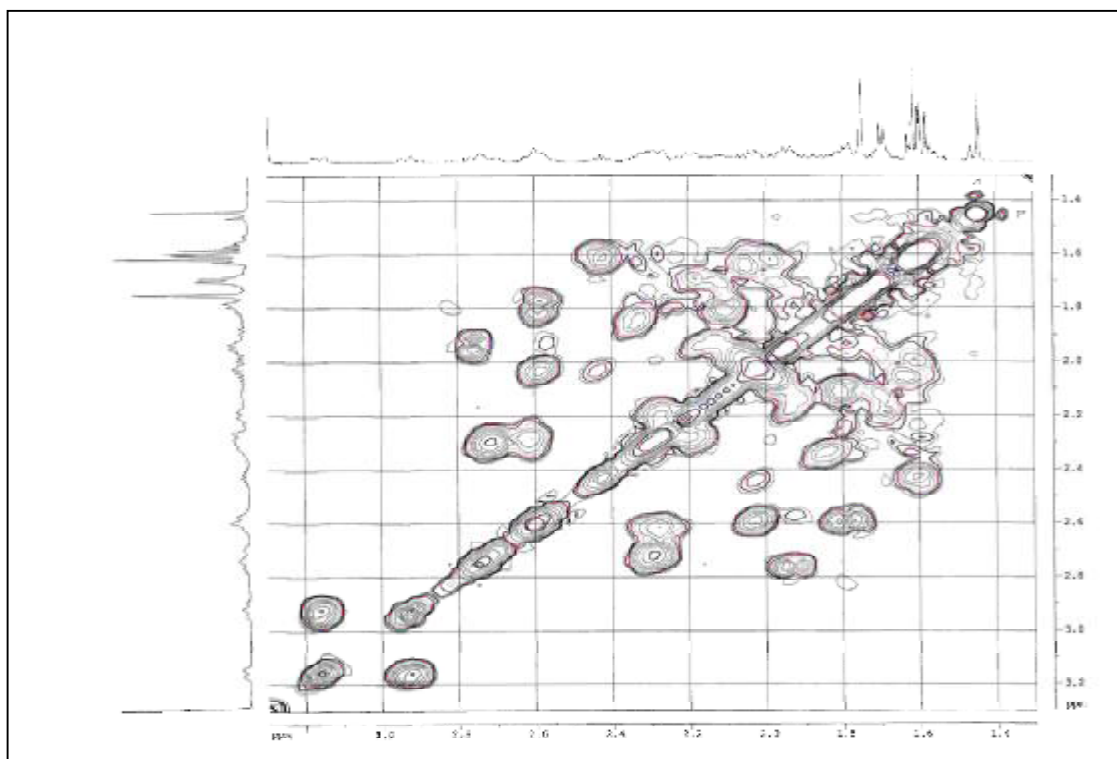
Spctre n° IV.1.A4.4.1 : Spctre HSQC (500 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé F24



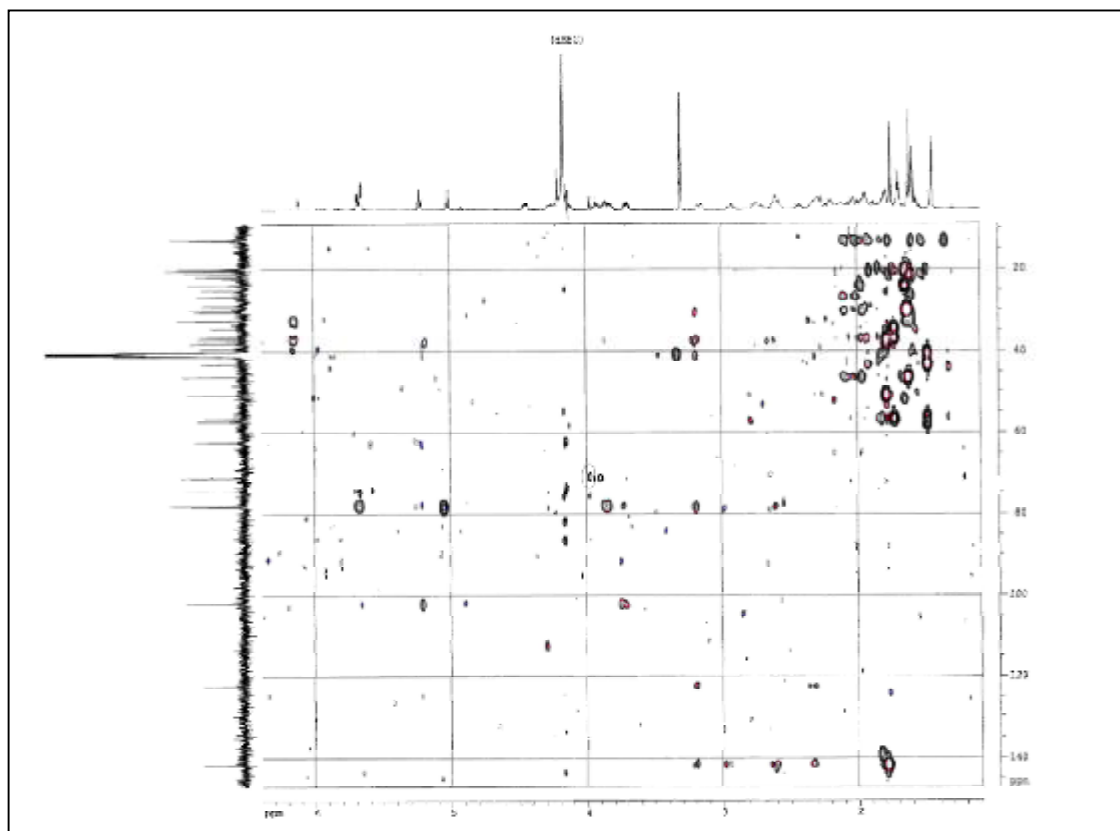
Spctre n° IV.1.A4.4.2 : Spctre HSQC (500 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé F24



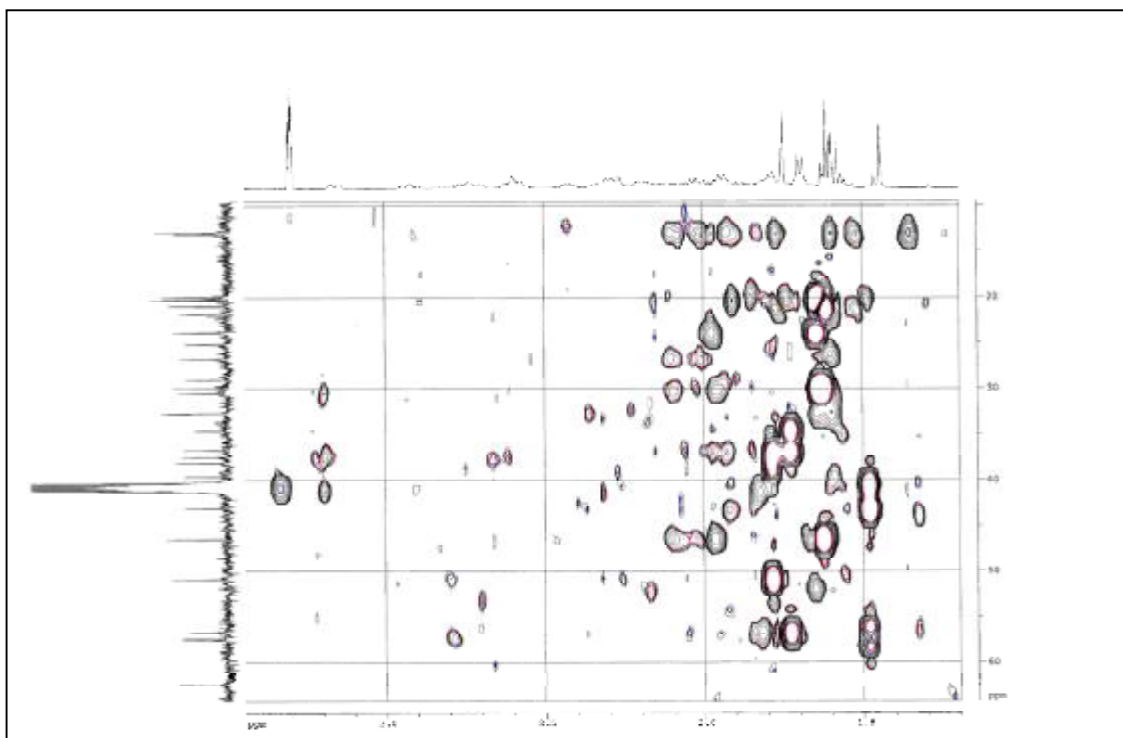
Spectre n° IV.1.A4.5.1 : Spectre COSY (^1H - ^1H) (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé F24



Spectre n° IV.1.A4.5.2 : Spectre COSY (^1H - ^1H) (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé F24



Spectre n° IV.1.A4.6.1 : Spectre HMBC (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé F24

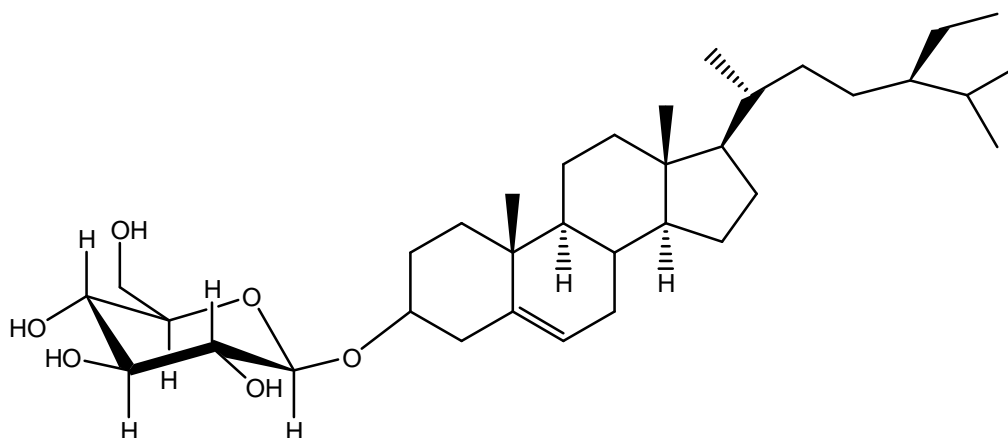


Spectre n° IV.1.A4.6.2 : Spectre HMBC étalé du composé F24

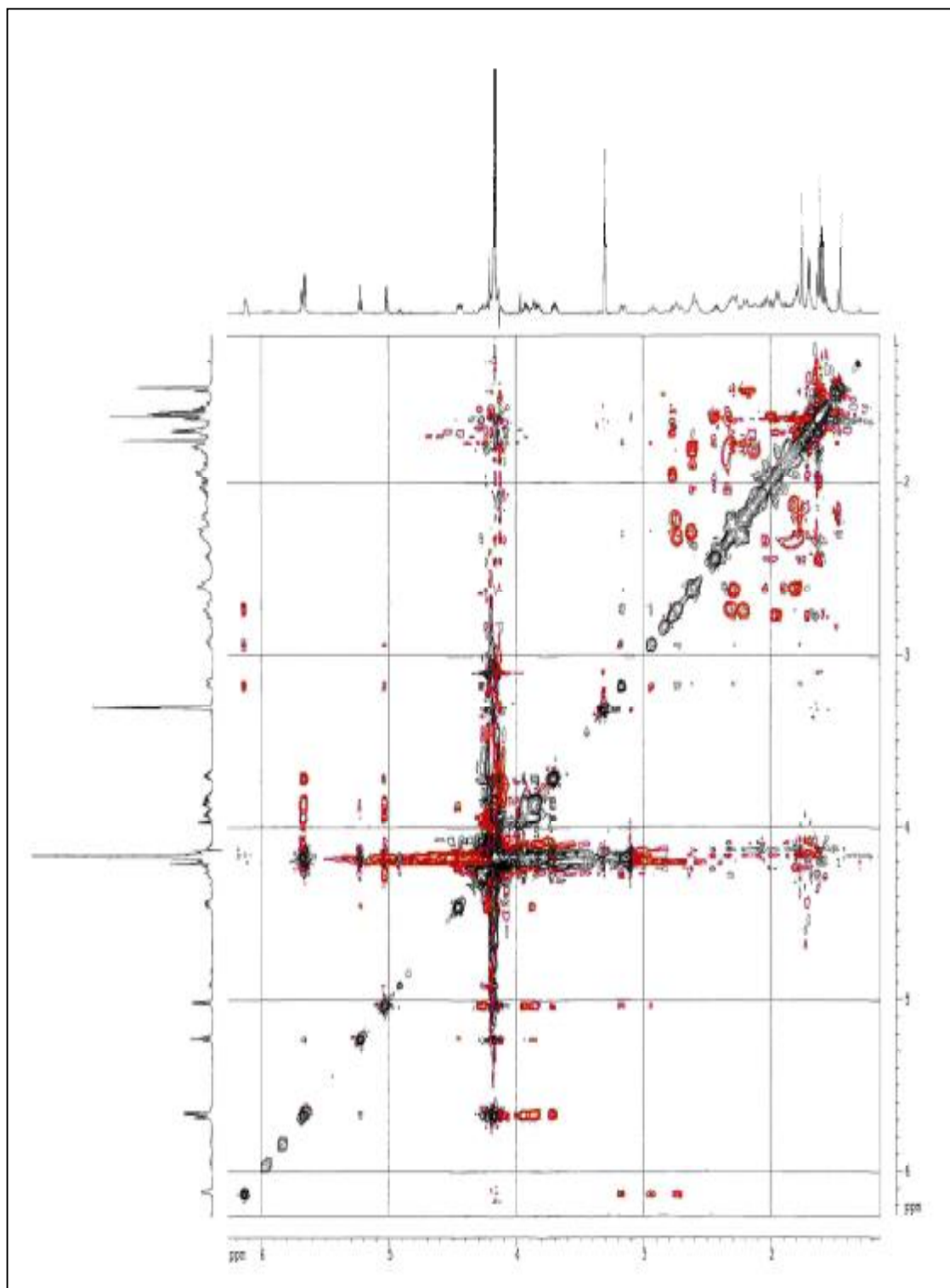
Ces données mènent au sitostérol glycosylé en position 3. Le pont oxygéné entre la génine et le sucre est confirmé par le signal à $\delta = 102,0$ ppm sur le spectre ^{13}C (spectre n° IV.1.A4.2.3) attribuable au Carbone anomérique du sucre.

Le proton anomérique du glycosyle apparaît à $\delta = 5,01$ ppm sous la forme d'un doublet $J = 8,0$ Hz. Cette valeur oriente vers une jonction de type β du glycosyle et une orientation axiale de H-2'' du sucre ce qui exclut le mannose comme substituant, le rhamnose n'étant pas mis en cause car ce sucre admet le C-6'' sous forme de CH_2OH à $\delta = 62,3$ ppm. Par ailleurs, un réexamen des spectres COSY (^1H - ^1H) permet la localisation de H-2' sous forme d'un triplet dédoublé ($J = 8,0 ; 4,9$ Hz) grâce à sa corrélation avec le proton anomérique. La multiplicité de H-2'' confirme sa position axiale ainsi que celle de H-3'', à noter que la petite constante de couplage $J = 4,9$ Hz résulte du couplage vicinal entre ce noyau et le proton du groupement hydroxyle dont le signal apparaît sous forme d'un doublet ($J = 4,9$ Hz) à $\delta = 5,66$ ppm. L'attribution de H-2'' mène à celle de H-3'' grâce à leur corrélation dans le même spectre COSY. En effet H-3'' apparaît sous forme d'un triplet dédoublé ($J = 8,0 ; 4,6$ Hz) à $\delta = 3,92$ ppm. La valeur $J = 8,0$ Hz de la constante de couplage entre H-2'' et H-3'' ; H-3'' et H-4'' indique des interactions de type axiale-axiale entre ces trois noyaux, on en déduit par conséquent que le groupement hydroxyle en position C-4' est équatoriale ce qui est en faveur d'un groupement β -D-glucosyle comme substituant. Cela est confirmé par le spectre ROESY (spectre n° IV.1.A4.7), qui montre des taches de corrélation de type NOE entre H-1'', H-3'' et H-5'' caractéristiques d'un β glucopyranosyle.

L'ensemble de ces données mène à la structure :



3- β -D (+) glucopyranosyl β -sitostérol



Spectre n° IV.1.A4.7 : spectre ROESY du composé F24

Une analyse complète des spectres RMN mono et bidimensionnelle a permis de compléter les attributions des carbones restant de cette molécule (tableau : n° IV.1.B13.a). En effet, ces résultats sont en accord avec la littérature [8-10].

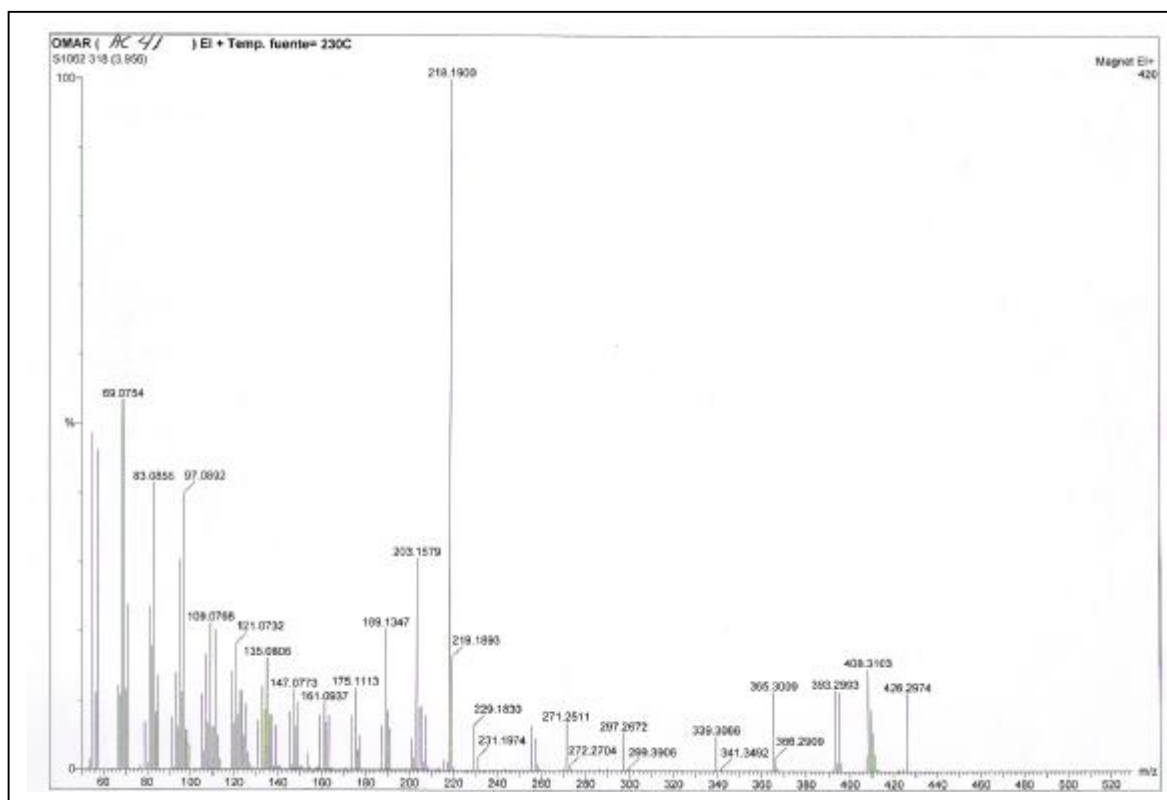
Tableau n° IV.1.A3.b: Données RMN ¹³C

Déplacement chimique (ppm)	Carbone
140,6	C-5
122,6	C-6
102,5	C-1''
78,2	C-3
78,0	C-3''
77,9	C-5''
74,7	C-2''
71,3	C-4''
62,3	C-6''
56,8	C-14
56,2	C-17
50,3	C-9
46,0	C-24
42,4	C-13
40,2	C-4
39,9	C-12
37,5	C-1
36,9	C-10
36,4	C-20
34,2	C-22
32,2	C-8
32,0	C-7
30,0	C-2
29,4	C-25
28,5	C-16
26,3	C-23
24,5	C-15
23,4	C-28
21,3	C-11
20,9	C-27
20,3	C-19
20,1	C-26
20,3	C-21
12,9	C-18
12,2	C-29

IV.1.B : Identification des produits isolés de la phase acétate d'éthyle de *C. africana*

IV.1.B1: Elucidation structurale du composé AC 41

Le spectre SMIEHR (spectre n° IV.1.B1.1) montre un pic moléculaire de masse exacte 426,2974 Da correspondant à la formule brute $C_{30}H_{50}O$. Ce résultat nous a incité à réaliser le test de LIEBERMANN & BURCHARD relatif à la mise en évidence des stérols et des triterpènes. En effet, après addition de $CHCl_3$ et d'une même quantité d'anhydride acétique à quelques milligrammes de ce produit, une bonne agitation et addition de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, le mélange au début incolore puis cette coloration a viré brutalement vers le rouge orientant vers un triterpène de type oléanane ou ursane. Ce qui suppose que AC41 est soit un triterpène de type oléanane ou de type ursane, ceci est confirmé sur ce même spectre par le signal $m/z = 218$ relatif au rétro Diels-Alder (RDA) relatif au cyclohexène du noyau triterpénique. Ce schéma de fragmentation est reporté dans la figure V.1.B1.1, la nature de ce signal est appuyé par le signal $m/z = 203$ correspondant à la perte d'un radical CH_3 de la part de cet ion.

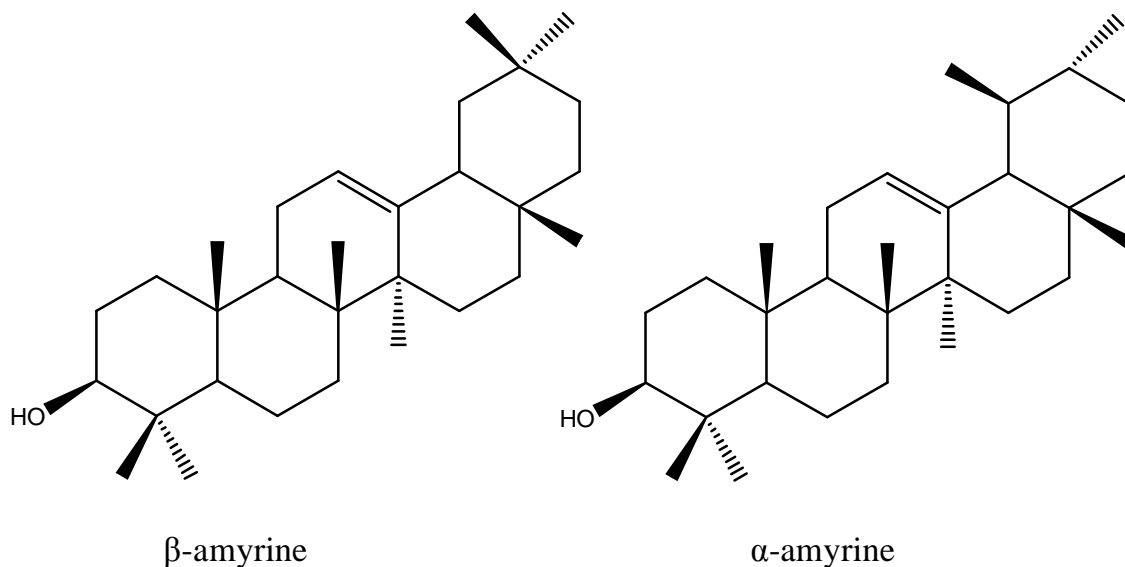


Spectre n° V.1.B1.1: Spectre SMIEHR du composé AC41

L'examen du spectre RMN-¹H montre (spectre n° V.1.B1.2, 400 MHz, C₆D₆, δ ppm) une zone de méthyle assez complexe notamment l'apparition d'un nombre de méthyles au delà de ceux attendus pour l'oléanane et ceux attendu pour l'ursane. On remarque en effet, le dédoublement de l'ensemble de ces signaux. Par ailleurs ce spectre montre la présence de deux signaux sous forme de triplet à δ = 5,18 ppm et δ = 5,12 ppm d'intégration différentes dont la somme des intégrales équivaut à celle du multiplet à δ = 3,23 ppm. Ce dernier signal ne peut être attribué qu'au H-3 de l'ursane ou de l'oléanane dont les déplacements chimiques sont connus très proche dans la littérature [11,12]. On relève également dans la littérature que les déplacements des protons oléfiniques en C-12 de ces deux molécules sont assez proches. Notant cependant un léger blindage de celui de l'α-amyrine dû à la proximité à travers l'espace du méthyle 29 par rapport à celui de la β-amyrine. Ceci se traduit par un léger déplacement vers les champs fort du H-12 de l'α-amyrine.

L'ensemble de ces données et la reconsidération du spectre proton de ce composé orientent vers un mélange α-amyrine et β-amyrine.

La comparaison des intégrales des deux protons oléfiniques permet de déduire la proportion : 36 % α-amyrine et 64 % β-amyrine.



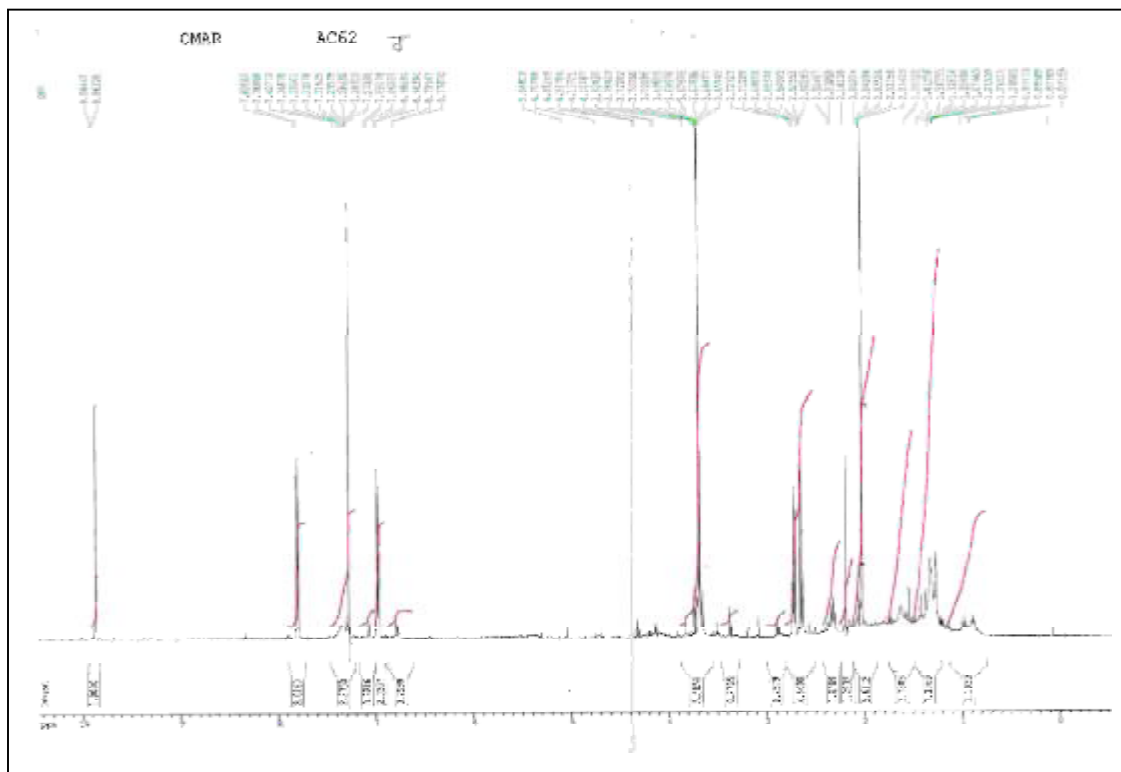
IV.1.B2: Elucidation structurale du composé AC 62

L'examen du spectre RMN ^1H (Acetone- d_6 , 500 MHz) (spectre n° IV.1.B2.1), montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique parasubstitué est caractérisé par :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 9,86$ ppm attribuable à un OH phénolique
- Un doublet d'intégration 2H à $\delta = 7,80$ ppm ($J = 8,5$ Hz) attribuable à H-3 et H-5'
- Un doublet d'intégration 2H à $\delta = 6,97$ ppm ($J = 8,5$ Hz) attribuable à H-2 et H-6'
- Un triplet d'intégration 2H à $\delta = 2,71$ ppm ($J = 7,0$ Hz) attribuable à un CH_2
- Un triplet d'intégration 2H à $\delta = 2,64$ ppm ($J = 7,0$ Hz) attribuable à un CH_2

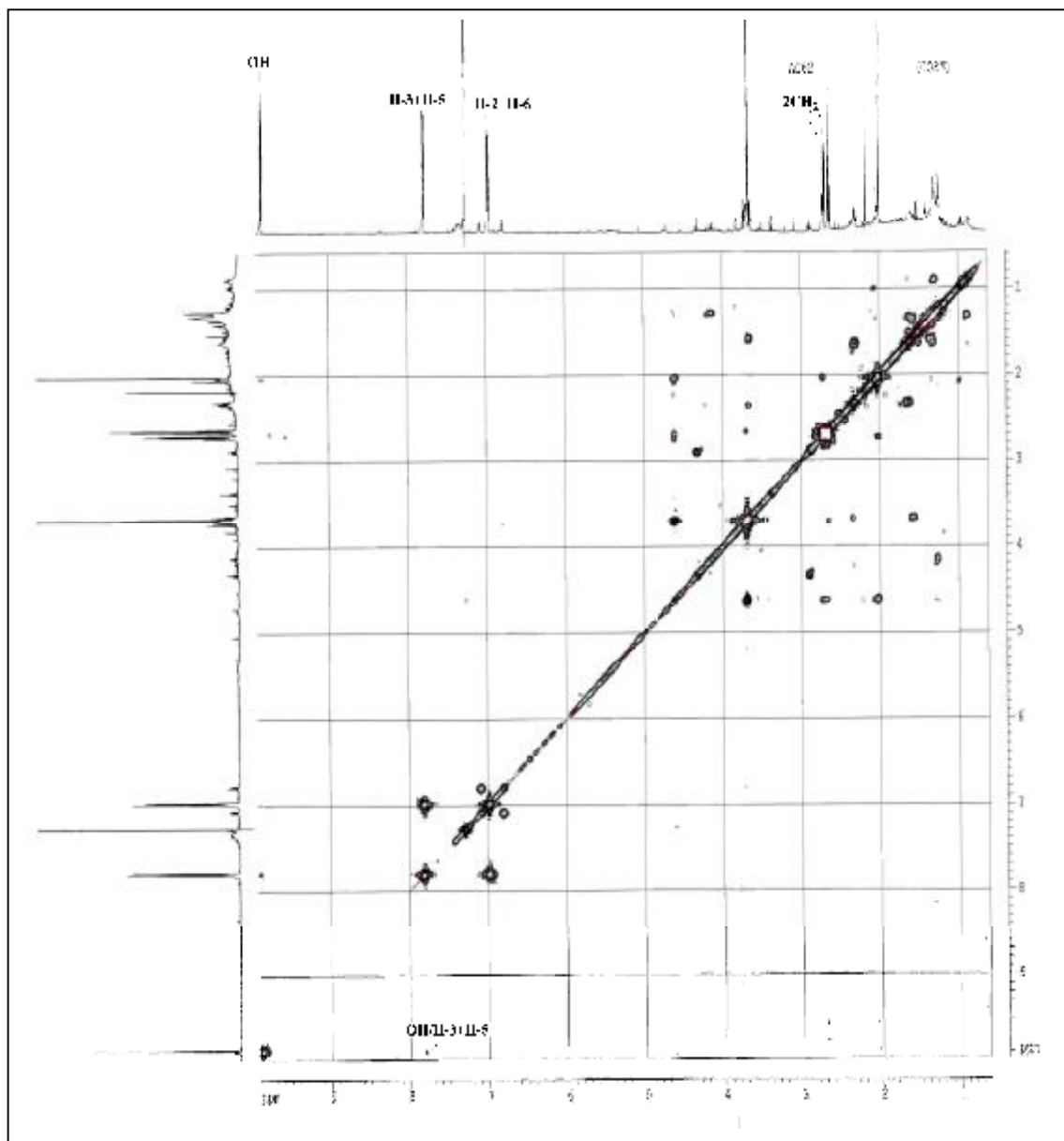
La multiplicité des deux derniers signaux oriente vers la présence d'un enchaînement $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ avec absence de noyaux couplant sur les atomes voisin. Les valeurs des déplacements chimiques des protons de ces deux groupements excluent leur oxygénation.

Par ailleurs, ce spectre montre la présence d'un signal d'intégration 3H à $\delta = 3,68$ ppm attribuable à un groupement méthoxyle.



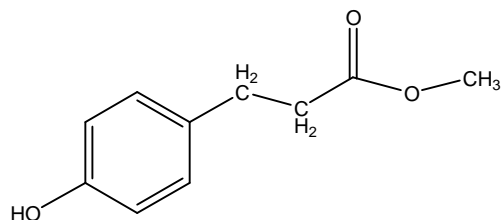
Spectre n° IV.1.B1.1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, Acetone- d_6 , δ ppm) du composé AC 62

L'examen du spectre COSY (^1H - ^1H) (spectre n° IV.1.B1.1) montre une tache de corrélation entre H-3 et H-5 du noyau aromatique et le proton de l'hydroxyle, ce qui permet de placer ce groupement en C-4. Par conséquent l'enchaînement CH_2CH_2 est en C-1. La présence d'un groupement méthoxyle et la valeur des déplacements chimiques des protons des deux groupements CH_2 , imposent la présence d'un carbonyle entre le méthoxyle et le groupement méthylène terminal.



Spectre n° IV.1.B1.2 : Spectre COSY (^1H - ^1H) (500 MHz, Acetone- d_6 , δ ppm) du composé AC 62

Ces données mène à la structure du : 3-(4-hydroxyphenyl)propanoate de methyle.



L'ensemble des données de RMN-¹H est reporté dans le tableau IV.1.B1.1.

Tableau IV.1.B1.1 : Données de la spectroscopie RMN ¹H (Acetone-d₆, 500MHz)

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
9,86	1H	<i>s</i>	OH
7,80	2H	<i>d</i> (8,5)	H-3' et H-5'
6,97	2H	<i>d</i> (8,5)	H-2' et H-6'
3,68	3H	<i>s</i>	OCH ₃
2,71	2H	<i>t</i> (7,0)	CH ₂ -3
1,34	2H	<i>t</i> (7,0)	CH ₂ -2

IV.1.B3: Elucidation structurale du composé AC 82

La fluorescence noire violette de ce composé sous lumière de Wood laisse supposer la structure d'une flavone ou un flavonol substitué en C-3.

L'examen de la série spectrale UV (spectre n° IV.1.B3.1) montre :

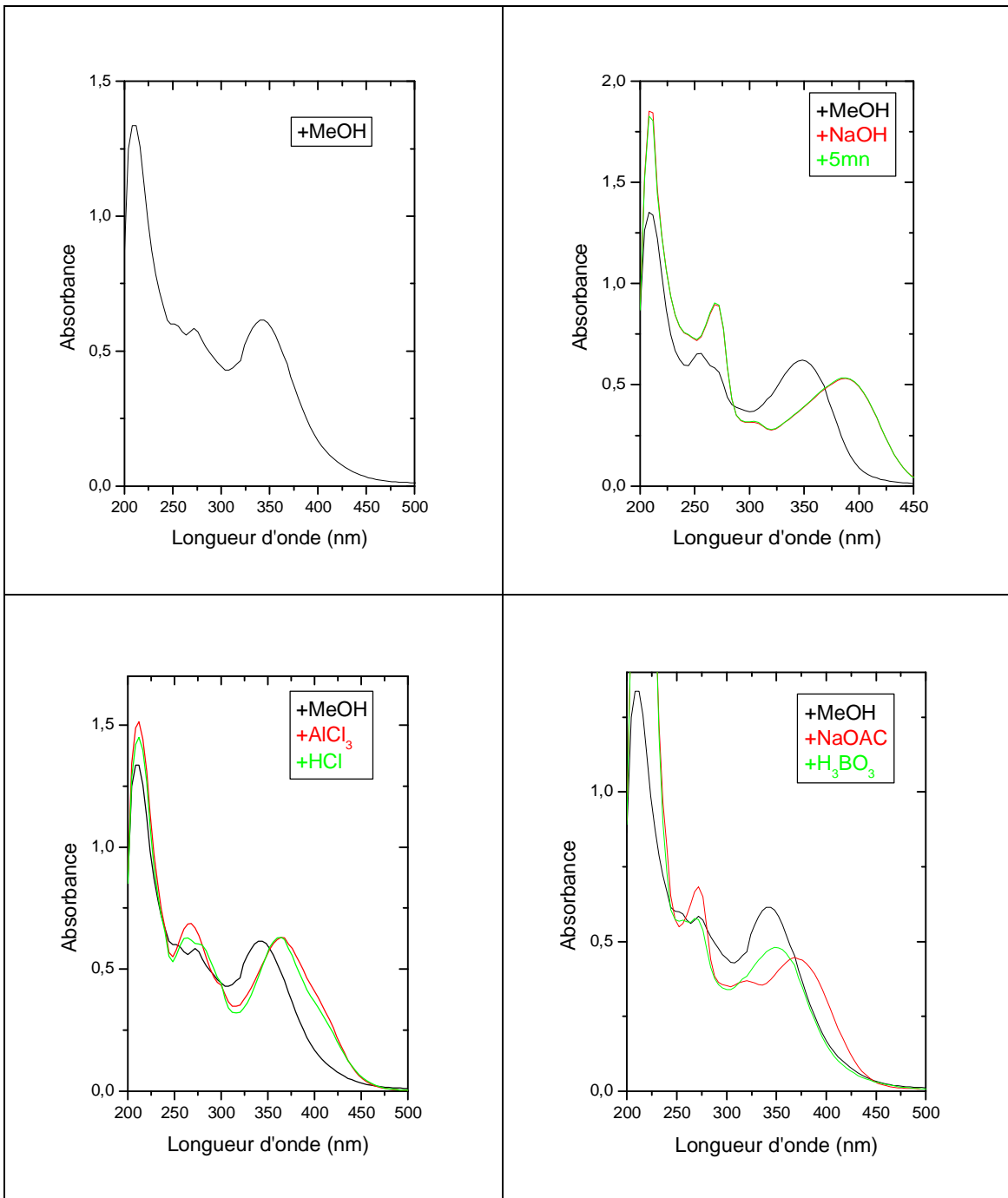
- La longueur d'onde d'absorption maximale dans le méthanol de la bande I à 344 nm laisse supposer la structure de type flavone ou flavonol substitué en C-3.
- Un effet bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le milieu (AlCl₃+HCl) ($\Delta\lambda = + 20$ nm) comparativement au spectre enregistré dans le MeOH indiquant la présence d'un OH libre en C-5 et une oxygénation en C-6.

La comparaison de la bande I après ajout de HCl et celle en présence de AlCl₃ ne montre aucun effet hypsochrome indiquant l'inexistence de système ortho di OH sur le cycle A (pas de orth di-OH en 6,7 ou 7,8).

- L'ajout de NaOAc, ne provoque aucun déplacement de la bande II révélant la présence d'un OR sur C-7.
- L'ajout de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = + 44$ nm) avec diminution de l'intensité révèle la présence d'un OR en position C-4'.

L'étude du spectre RMN ¹H donne les indications suivantes (spectre n° IV.1.B3.2)

- Un doublet large d'intégration 1H à $\delta = 7,62$ ppm ($J = 7,8$ Hz) partiellement recouvert par un singulet large d'intégration 1H à $\delta = 7,60$ ppm, attribuables à H-6' et H-2' respectivement.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,08$ ppm ($J = 7,8$ Hz) attribuable à H-5'.
- Trois singulets d'intégration 3H chacun à $\delta = 3,95$, 3,80 et 3,72 ppm attribuables à trois groupements méthoxyles.



Spectre n° IV.1.B3.1 : Série spectrale UV du composé AC 82.

Les données de la spectroscopie RMN ^1H complétées par celle de la spectrométrie ultraviolette sont reportées dans les tableaux n° **IV.1.B3.b** et **IV.1.B3.a**

Tableau IV.1.B3.b : Données de la spectroscopie RMN ^1H .

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7,62	1H	<i>d</i> (7,8) <i>large</i>	H-6'
7,60	1H	<i>s large</i>	H-2'
7,08	1H	<i>d</i> (7,8)	H-5'
3,95	3H	<i>s</i>	OCH ₃
3,80	3H	<i>s</i>	OCH ₃
3,72	3H	<i>s</i>	OCH ₃

Tableau IV.1.B3.a : Données de la série spectrale UV (λ_{max} , nm)

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	344		272	Flavone ou flavonol (3-OCH ₃)
+ NaOH	388	304	268	OCH ₃ en C-4'
+AlCl ₃	364		268	OH en C-5 OH en C-6
+AlCl ₃ /HCl	364		268	
+NaOAc	372		272	OCH ₃ en C-7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	348		272	
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

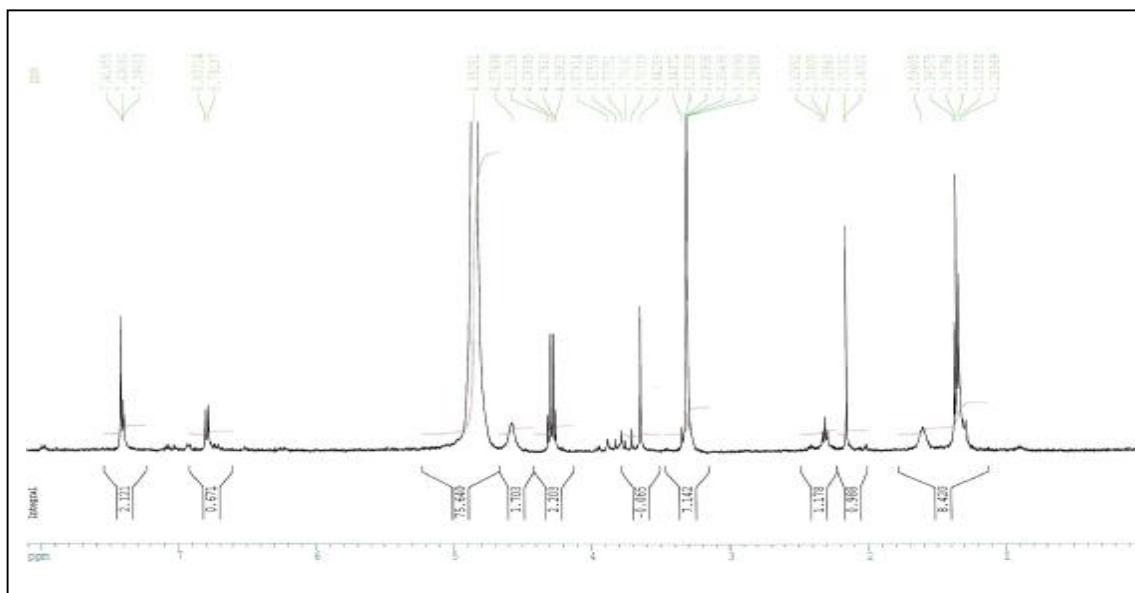
IV.1.B4 : Elucidation structurale du composé AC833

L'examen du spectre RMN-¹H (spectre n°IV.1.B4.1), montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle aromatique est substitué en position 1, 3 et 4, les signaux des noyaux relatifs à ce cycle apparaissent sous forme de :

- Un singlet large à $\delta = 7,42$ ppm d'intégration 1H recouvrant partiellement un doublet large d'intégration 1H centré à $\delta = 7,41$ ppm ($J = 8,5$ Hz).
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,79$ ppm ($J = 8,5$ Hz).

La multiplicité de ces signaux et la valeur des constantes de couplage orientent vers un noyau aromatique trisubstitué dans les positions 1, 3 et 4.

Ce spectre montre également la présence d'un quadruplet d'intégration 2H à $\delta = 4,28$ ppm ($J = 7,1$ Hz) caractéristique d'un groupement CH₂ oxygéné voisin d'un groupement CH₃, le quel apparaît sous forme d'un triplet à $\delta = 1,34$ ppm ($J = 7,1$ Hz).

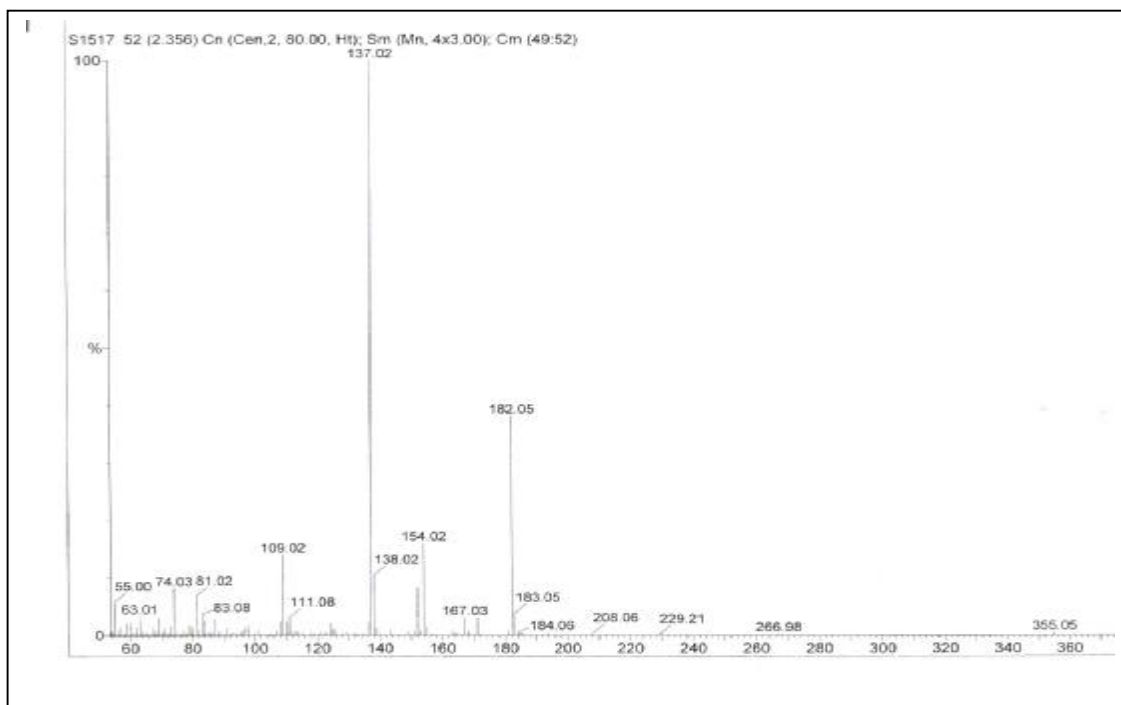


Spectre n° IV.1.B4.1 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé AC833.

Le spectre SMIE (spectre n° IV.1.B4.2) montre une masse exacte pour le pic moléculaire à $m/z = 182.05$ correspondant à la formule brute C₉H₁₀O₄. Ce spectre montre également un signal à $m/z = 154$ indiquant un réarrangement avec perte d'une molécule d'éthylène (CH₂CH₂) qui ne peut provenir que du groupement OCH₂CH₃. Orientant ainsi vers un réarrangement de Mac lafferty mettant en œuvre une fonction ester. Ceci est confirmé par le signal à $m/z = 137$ correspondant à la perte du radical [•]OCH₂CH₃. Ainsi un des substituants du cycle aromatique est sous forme -COOCH₂CH₃. Cette hypothèse est appuyée par le

signal à $m/z = 109$, résultant d'une rupture inductive en α de CO, avec perte du radical $\cdot\text{OCOCH}_2\text{CH}_3$. La valeur 109 Da de cet ion suppose la présence de deux hydroxyles sur le noyau aromatique.

La disposition de ces trois substituants sur le noyau aromatique peut être effectuée sur la base de valeurs des déplacements chimiques des protons de ce noyau. En effet les signaux à $\delta = 7,42$ ppm et $\delta = 7,41$ ppm ne peuvent être attribués qu'aux protons voisins du carbonyle. Vu, leur multiplicité, et en attribuant la position 1 au carbone qui porte le carbonyle, ils sont attribuables aux protons H-2 et H-6 respectivement.



Spectre n° IV.1.B4.2: Spectre SMIE du composé AC833.

L'ensemble de ces données résumé dans les tableaux n° IV.1.B4.a et n° IV.1.B4.b mène à la structure du : **3,4-dihydroxybenzoate d'éthyle**

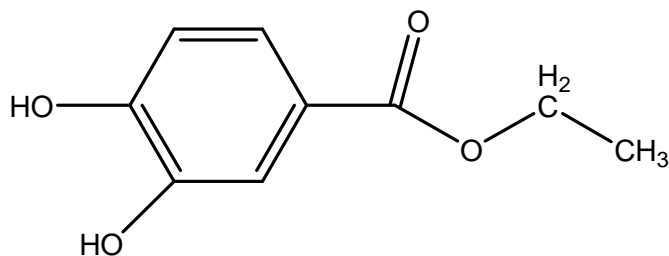


Tableau IV.1.B4.a: Données de la spectroscopie RMN ^1H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7,42	1H	<i>s large</i>	H-2
7,41	1H	<i>d (8,5)</i>	H-6
6,79	1H	<i>d(8,5)</i>	H-5
4,28	2H	<i>d (7,1)</i>	OCH ₂
3,97	3H	<i>d (7,1)</i>	CH ₃

Tableau IV.1.B4.b: Les fragments du spectre de masse IE du composé AC833.

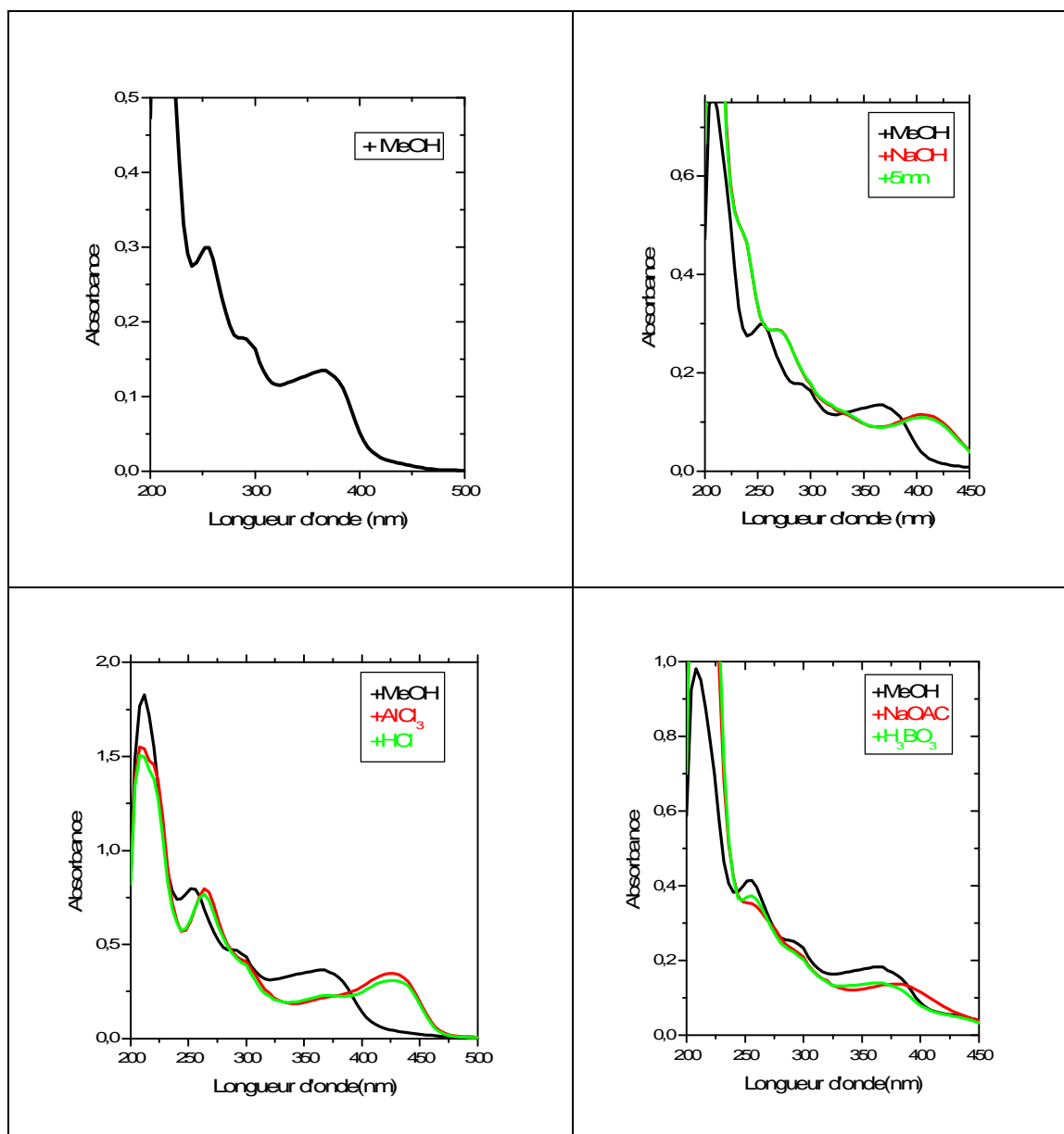
M ⁺	[M- CH ₃] ⁺	[[M- CH ₂ CH ₂] ⁺	[M- OCH ₂ CH ₃] ⁺	[M- OCOCH ₂ CH ₃] ⁺
182	167	154	137	109

IV.1.B5 : Elucidation structurale du composé AC 841

La fluorescence noire-violette de ce composé sous lumière de Wood laisse supposer la structure d'une flavone ou un flavonol substitué en C-3 (3-OR).

L'examen de la série spectrale UV (spectre n° IV.1.B5.1) montre :

- La longueur d'onde d'absorption maximale dans le méthanol de la bande I est à 364 nm ($\lambda_I = 364$ nm), indiquant un flavonol substitué en C-3.

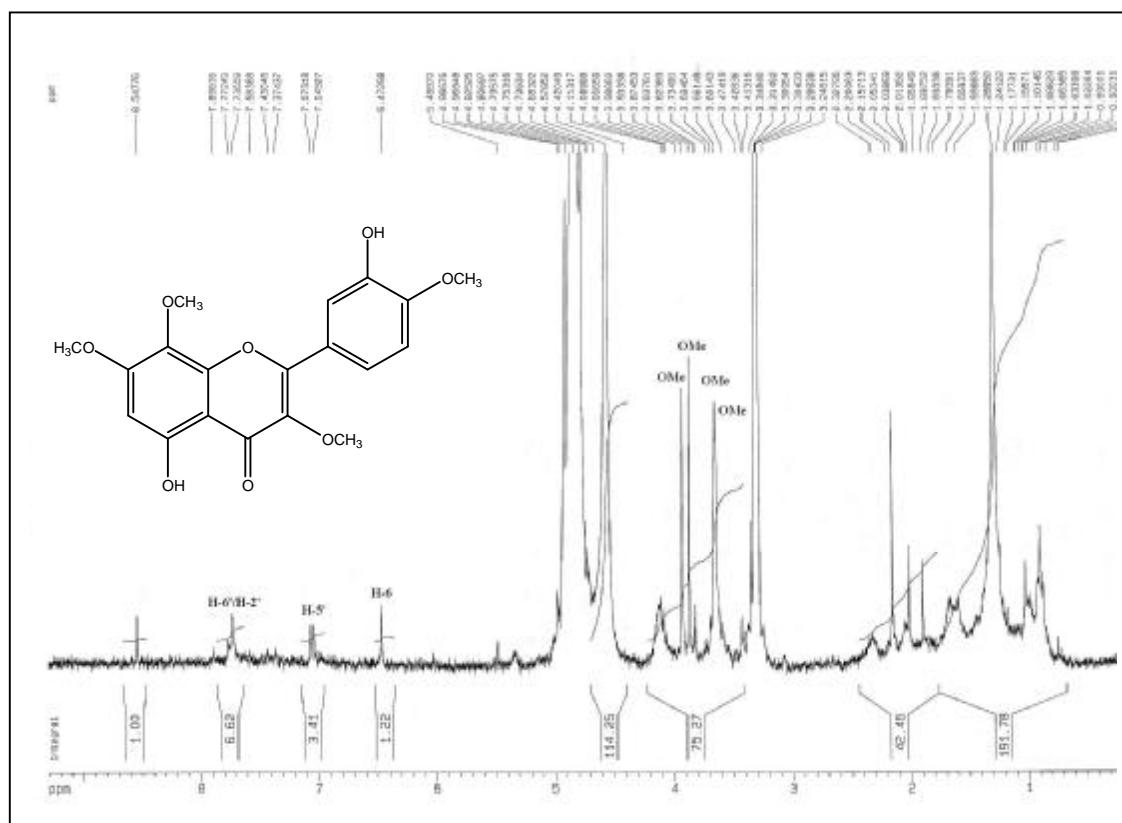


Spectre n° IV.1.B5.1: Série spectrale UV du composé AC 841.

- Un effet bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le milieu (AlCl₃ + HCl) ($\Delta\lambda_I = + 60$ nm) comparativement à celui enregistré dans le MeOH indique la présence d'un OH libre en C-5 et pas d'oxygénation en C-6.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda=+40$ nm) avec diminution de l'intensité révèle la présence d'un OR sur C-4'.
- Pas de déplacement de la bande II après addition de NaOAc ($\Delta\lambda_{II} = 0$ nm) comparativement au spectre pris dans le MeOH indiquant un OR sur C-7.

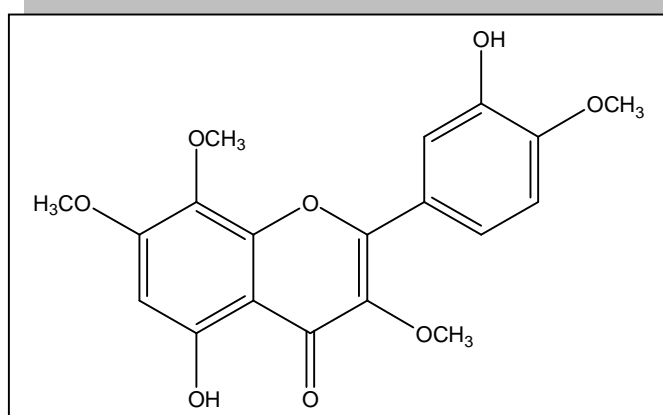
L'étude du spectre RMN-¹H donne les indications suivantes (spectre n IV.1.B5.2) :

- Un doublet large d'intégration 1H à $\delta = 7,75$ ppm ($J = 8,4$ Hz) partiellement recouvert par un singlet large d'intégration 1H à $\delta = 7,74$ ppm attribuables à H-6' et H-2' respectivement.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,05$ ppm ($J = 8,4$ Hz) attribuable à H-5',
- Un singlet large d'intégration 1H à $\delta = 6,47$ ppm attribuable à H-6,
- Trois singlets d'intégration 3H, 3H et 6H à $\delta = 3,93$, $\delta = 3,87$ et $\delta = 3,66$ ppm respectivement, attribuables à quatre groupements méthoxyles.



Spectre n° IV.1.B5.2: Spectre RMN ¹H (300 MHz, MeOH-d₆, δ ppm) du composé AC841.

L'ensemble des données relatives à la spectrophotométrie ultraviolette (tableau IV.1.B5.a) et de la spectroscopie de (tableau IV.1.B5.b) mène à la structure :



**5,3'-dihydroxy-3,7,8,4'-tetraméthoxyflavone ou 3'-hydroxyflindulatine
ou 3,7,8,4'-tetraméthyl gossypétine**

Tableau IV.1.B5.a : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	364		256	Flavonol (3-OCH ₃)
+ NaOH	404	292	268	OCH ₃ en C-4'
+AlCl ₃	424	300	264	OH libre en C-5 Pas de OR en C-6
+AlCl ₃ /HCl	424	300	264	
+NaOAc	376		256	OCH ₃ en C-7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	364		256	
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

Tableau IV.1.B5.b : Données de la série spectrale UV (λ_{max} , nm)

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7,75	1H	<i>d</i> (8,4) <i>large</i>	H-6'
7,74	1H	<i>s large</i>	H-2'
7,05	1H	<i>d</i> (8,4)	H-5'
6,47	1H	<i>s</i>	H-6
3,93	3H	<i>s</i>	OCH ₃
3,87	3H	<i>s</i>	OCH ₃
3,66	6H	<i>s large</i>	2OCH ₃

IV.1.B6 : Elucidation structurale du composé AC 843

La fluorescence noire-violette de ce composé sous lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

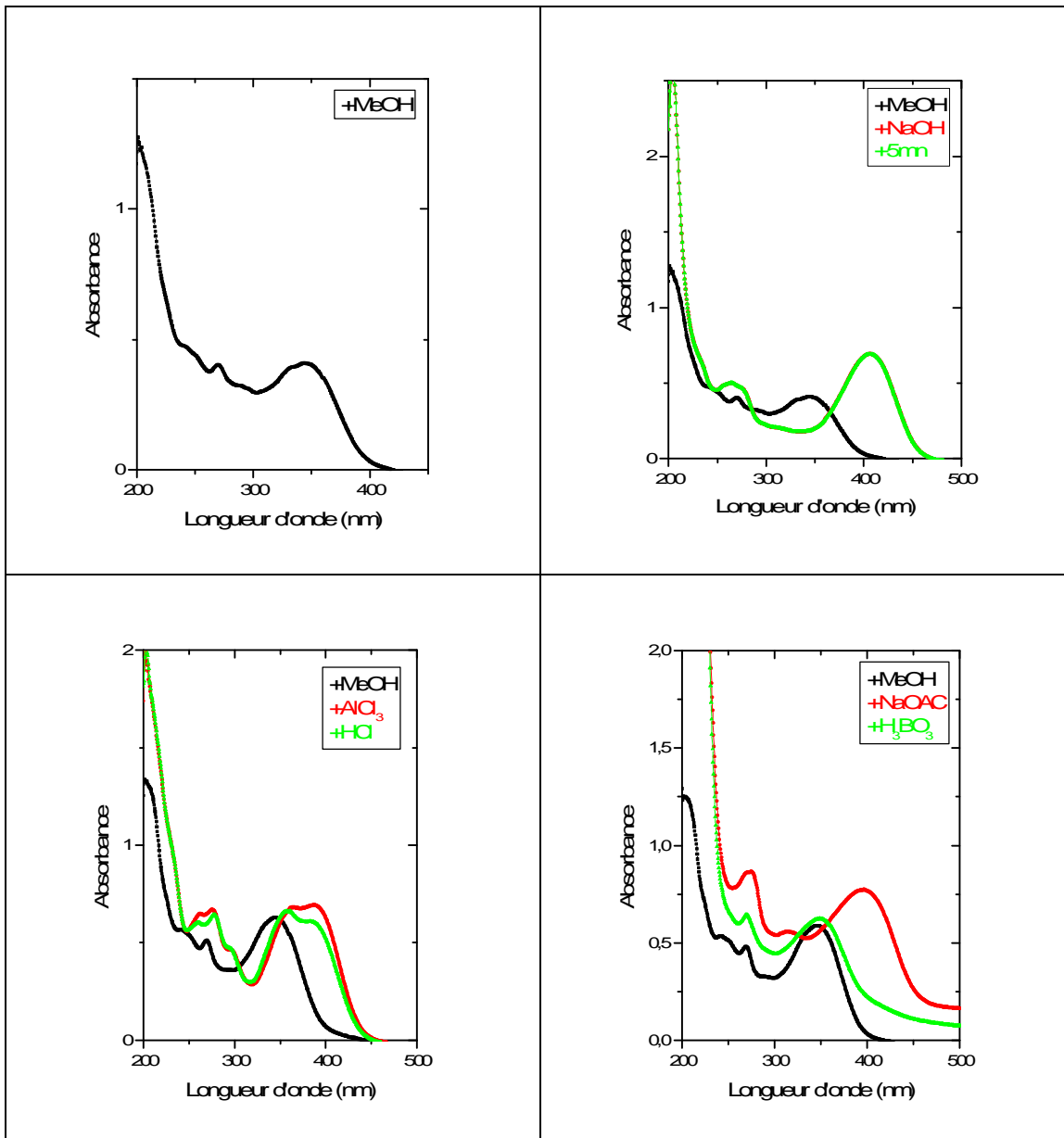
Les données de la série spectrale UV (tableau n° IV.1.B6.a, spectre n° IV.1.B6.1) donnent les indications suivantes :

- La valeur de la longueur d'onde de la bande I en présence du méthanol à 344 nm, oriente vers la structure d'une flavone.
- L'addition du réactif NaOH, conduit à un déplacement bathochrome de +63 nm de la bande I, avec une augmentation de l'intensité, ce qui prouve l'existence d'un OH libre en position 4'.
- Le spectre enregistré en présence de NaOAc, montre un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda_{II} = + 3$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, orientant vers la présence d'un OH libre en C-7.
- L'addition du réactif (AlCl₃+HCl), conduit à un déplacement bathochrome de +39 nm de la bande I, par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, ce qui indique l'existence d'un OH libre en position 5.
-

Les résultats de la série spectrale UV du composé **AC843** sont rassemblés dans le tableau.

Tableau n° IV.1.B6-a: Données de la série spectrale UV (λ_{max} , nm)

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	344	270	289Ep. 333	Flavone ou flavonol (3-OR)
NaOH	407	265 270	312	4'-OH et 7-OH
NaOH+5mn	407	265 270	312	Spectre stable
AlCl ₃	387	260 276	294 366	/
AlCl ₃ +HCl	383	260 277	296 358	5-OH
NaOAc	397	273	315	7-OH
NaOAc+H ₃ BO ₃	349	269	/	/



Spectre n° **IV.1.B6.1** : Série spectrale UV du composé AC 843

L'examen du spectre RMN ¹H enregistré dans CD₃OD (spectre n° **IV.1.B6.2**) montre :

- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à $\delta = 7,50$ ppm ($J = 8,5 ; 1,9$ Hz) partiellement recouvert par un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,47$ ppm ($J = 1,9$ Hz) attribuables à H-6' et H-2' respectivement.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,91$ ppm ($J = 8,5$ Hz) attribuable à H-5'.

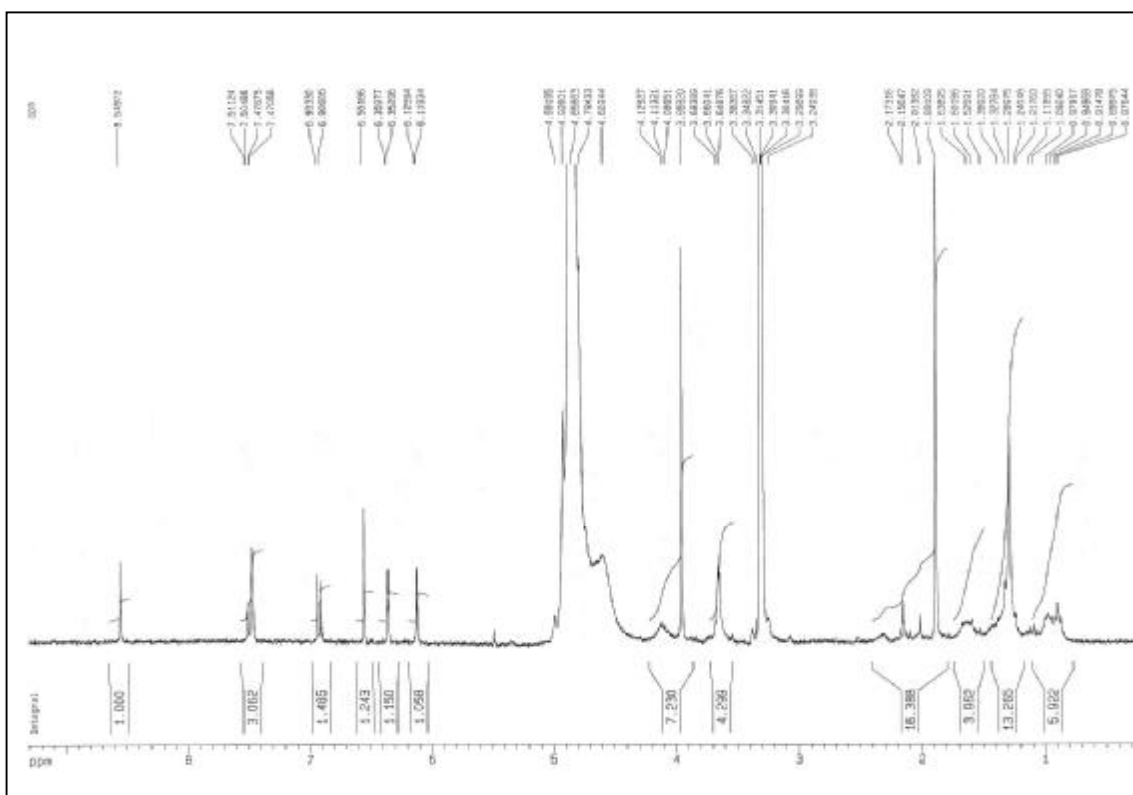
Ces trois signaux indiquent une disubstitution du noyau B.

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,55$ ppm attribuable à H-3.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,35$ ppm ($J = 2$ Hz) et le second à $\delta = 6,12$ ppm ($J = 2$ Hz) attribuables à H-8 et H-6 respectivement indiquant une disubstitution du cycle A dans les positions 5 et 7.
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,96$ ppm révélant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

Le tableau **IV.1.B6.b** rassemble les résultats de la RMN ^1H .

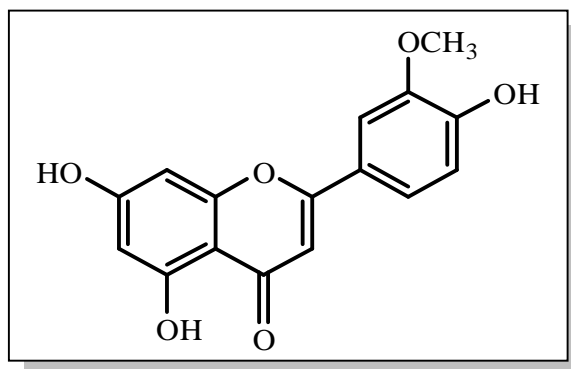
Tableau n° IV.1.B6.b : Données de la spectroscopie RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz).

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
7,83	1H	$d(1,9)$	H-2'
7,47	1H	$dd(1,9 ; 8,5)$	H-6'
6,91	1H	$d(8,5)$	H-5'
6,55	1H	s	H-3
6,35	1H	$d(2)$	H-8
6,12	1H	$d(2)$	H-6
3,96	3H	s	OCH_3



Spectre n° IV.1.B6.2 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé AC 843

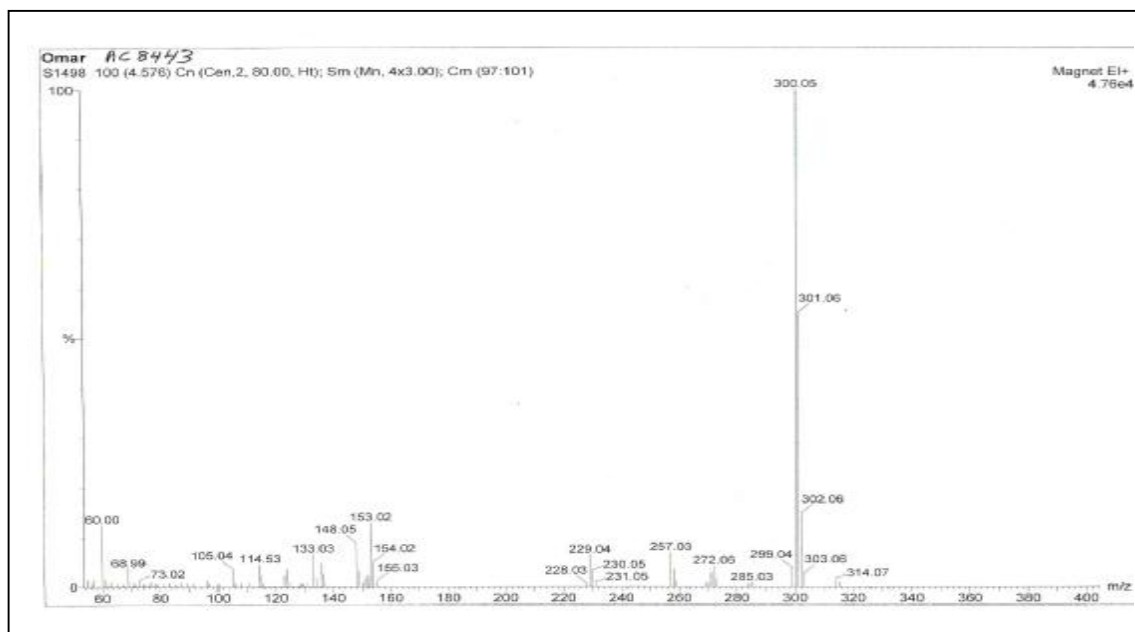
Toutes ces données sont en accord avec ceux de la littérature [31-14] et mènent à la structure du composé **chrysoeriol**.



5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavone (CHRYSOERIOL).

Cette structure est confirmée par l'étude de son spectre de masse en mode d'ionisation impact électronique (spectre n° IV.1.B6.3) qui montre un pic moléculaire à $m/z = 300$ $[M]^{+}$ confirmant le squelette d'un flavonoïde de type aglycone de formule brute $C_{16}H_{12}O_6$.

Ce spectre montre également un signal à $m/z = 272$ correspondant au réarrangement caractéristique des flavonoïdes, soit la perte d'un CO $[M-28]^{+}$, un signal à $m/z = 257$ correspondant à $[M-28-15]^{+}$ connu pour ce type de composé, un signal à $m/z = 153$ correspondant au fragment $[^{1,3}A+H]^{+}$ confirmant bien un cycle A dihydroxylé. Ainsi qu'un signal à $m/z = 148$ correspondant au fragment $^{1,3}B^{+}$ indiquant une hydroxylation et une méthylation du cycle B de cette flavone.



Spectre n° IV.1.B6.3 : Spectre SMIE du composé AC 843

IV.1.B7 : Elucidation structurale du composé AC 844

La fluorescence noire-violette de ce composé sous lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol substitué en C-3 (3-OR).

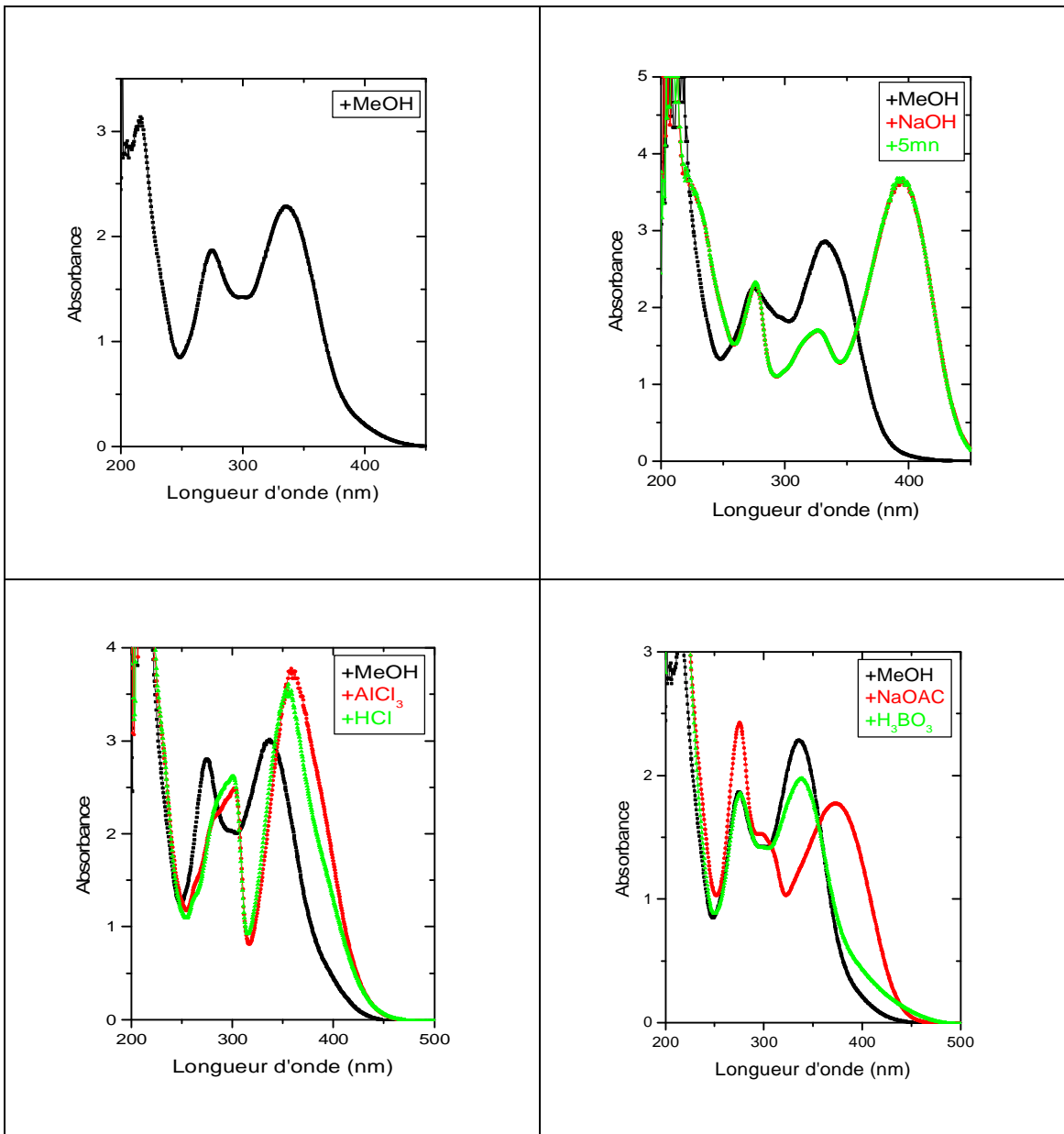
Les données de la série spectrale UV (tableau n° IV.1.B7.a, spectre n° IV.1.B7.1) donnent les indications suivantes :

- La valeur de la longueur d'onde de la bande I en présence du méthanol à 332 nm, oriente vers la structure d'une flavone.
- L'addition du réactif NaOH, conduit à un déplacement bathochrome +63 nm de la bande I, avec une augmentation de l'intensité, ce qui prouve l'existence d'un OH libre en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 327 nm prouve l'existence d'un OH libre en position 7, ceci est confirmé par le spectre enregistré en présence de NaOAc, où la bande II subit un déplacement bathochrome de + 21 nm par rapport au spectre enregistré dans le MeOH.
- L'addition du réactif (AlCl₃+HCl), conduit à un déplacement bathochrome de +24 nm de la bande I, par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, ce qui prouve l'existence d'un OH libre en position 5 avec une oxygénation en position C-6.

Les résultats de la série spectrale UV du composé **AC844** sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

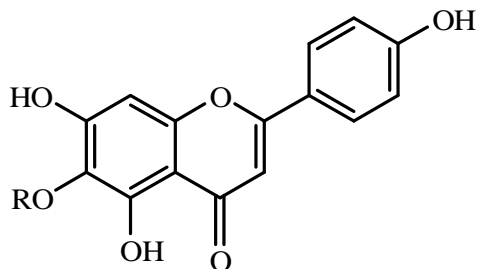
Tableau IV.1.B7.a : Données de la série spectrale UV (λ_{max} , nm)

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	332	276	/	Flavone
NaOH	395	277	327	4'-OH et 7-OH
NaOH+5mn	395	327	277	Spectre stable
AlCl ₃	359	304	280	/
AlCl ₃ +HCl	356	300	/	5-OH + OR en C-6
NaOAc	373	297	276	7-OH
NaOAc+H ₃ BO ₃	339	275	/	/



Spectre n° IV.1.B7.1: Série spectrale UV du composé AC 844

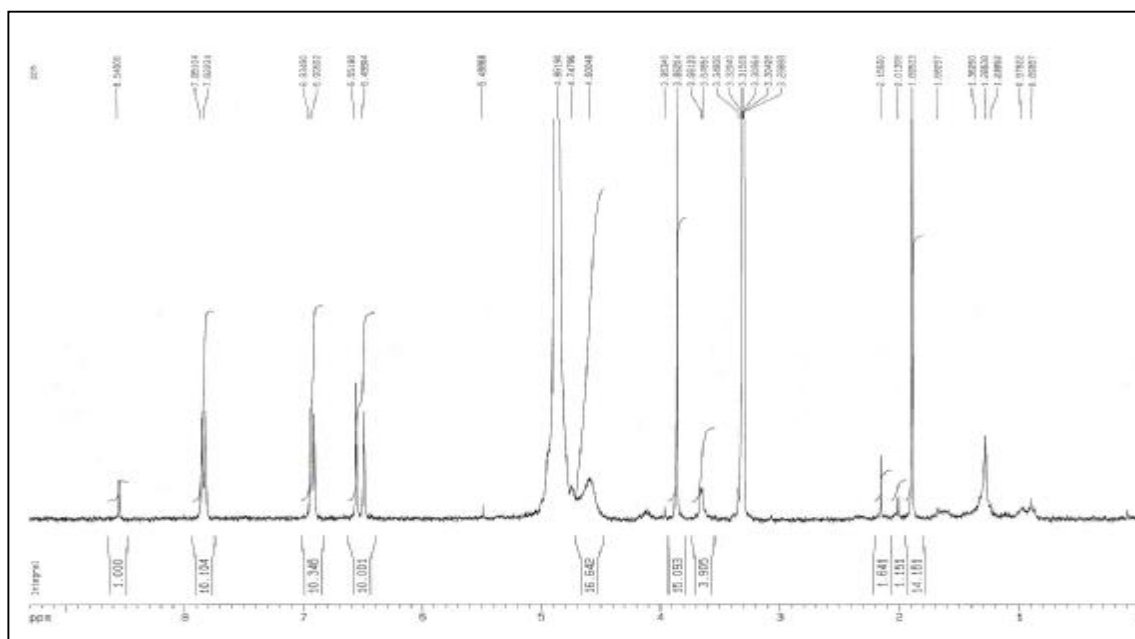
Ces données mènent à la structure partielle suivante :



avec : R différent de H

L'examen du spectre RMN ¹H enregistré dans CD₃OD (spectre n° IV.1.B7.2) montre :

- Deux doublets d'intégration 2H chacun, le premier à $\delta = 7,83$ ppm, le second à $\delta = 6,92$ ppm avec une constante de couplage $J = 8,6$ Hz attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement, confirmant ainsi la substitution para du noyau B.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,55$ ppm attribuable à H-8.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,49$ ppm attribuable à H-3.
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,86$ ppm révélant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.



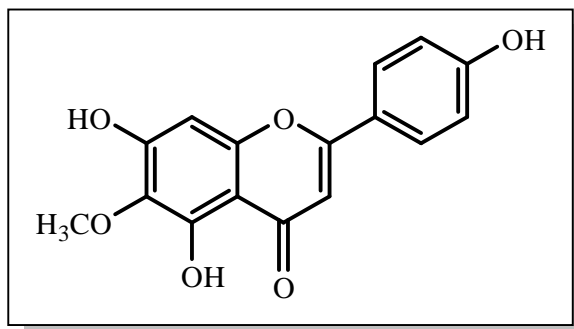
Spectre n° IV.1.B7.2: Spectre RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé AC 844

Le tableau IV.1.B7-b rassemble ces résultats.

Tableau n° IV.1.B7.b: Données de la spectroscopie RMN ^1H (CD_3OD , 300 MHz).

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
7,83	2H	$d(8,6)$	H-2' ; H-6'
6,92	2H	$d(8,6)$	H-3' ; H-5'
6,55	1H	s	H-8 ou H-3
6,49	1H	s	H-3 ou H-8
3,86	3H	s	OCH_3

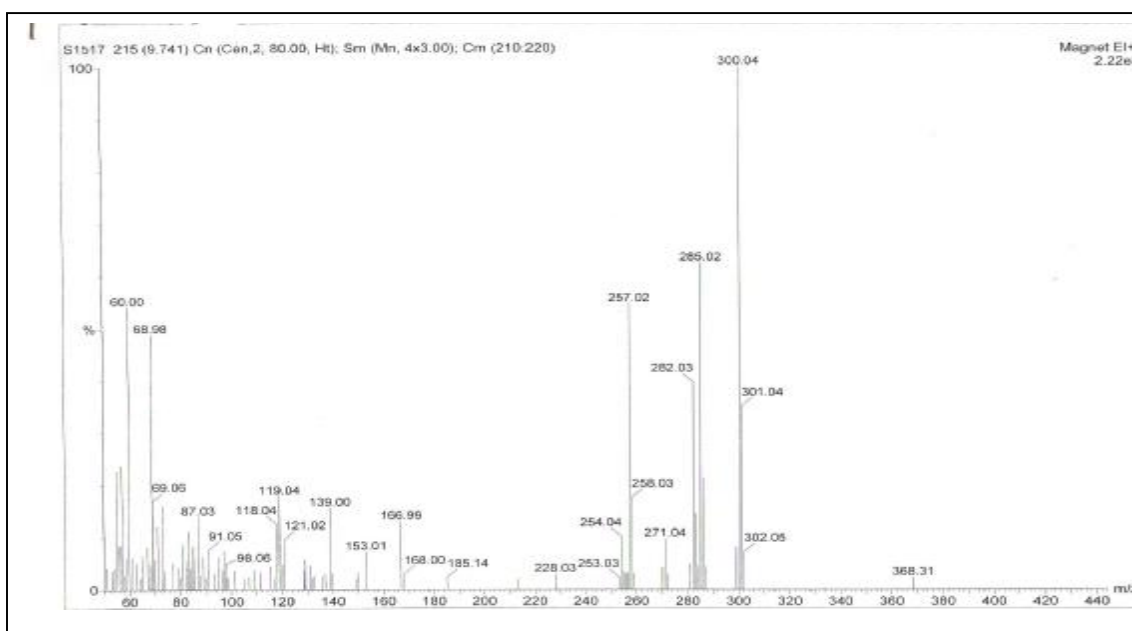
De toutes ces données sont en accord avec ceux de la littérature [15-17] on en déduit la structure du composé :



5,7,4'-dihydroxy-6-methoxyflavone (Hispiduline)

La structure proposée est confirmée par son spectre de masse en mode d'ionisation impact électronique (spectre n° IV.1.B7.3) qui montre un pic moléculaire à $m/z = 300$ $[M]^+$ Confirmant le squelette d'un flavonoïde de type aglycone de formule brute $C_{16}H_{12}O_6$.

Ce spectre montre également un signal à $m/z = 272$ correspondant au réarrangement caractéristique des flavonoïdes, soit la perte d'un CO $[M-28]^+$, un signal à $m/z = 257$ correspondant à $[M-28-15]^+$ onnu pour ce type de composé et un signal à $m/z = 167$ correspondant au fragment $[^{1,3}A-15]^+$ confirmant bien un cycle A comportant deux hydroxyles et un méthoxyle. Par ailleurs les fragments $m/z = 121$ et 118 correspondant au fragments $^{0,2}B^+$ et $^{1,3}B^{+}$ confirment une seule hydroxylation du cycle B.



Spectre n° IV.1.B7.3: Spectre SMIE du composé AC 844

IV.1.B8 : Elucidation structurale du composé AC 86

La fluorescence noire-violette de ce composé sous lumière de Wood laisse envisager la structure d'une flavone ou un flavonol substitué 3-OR.

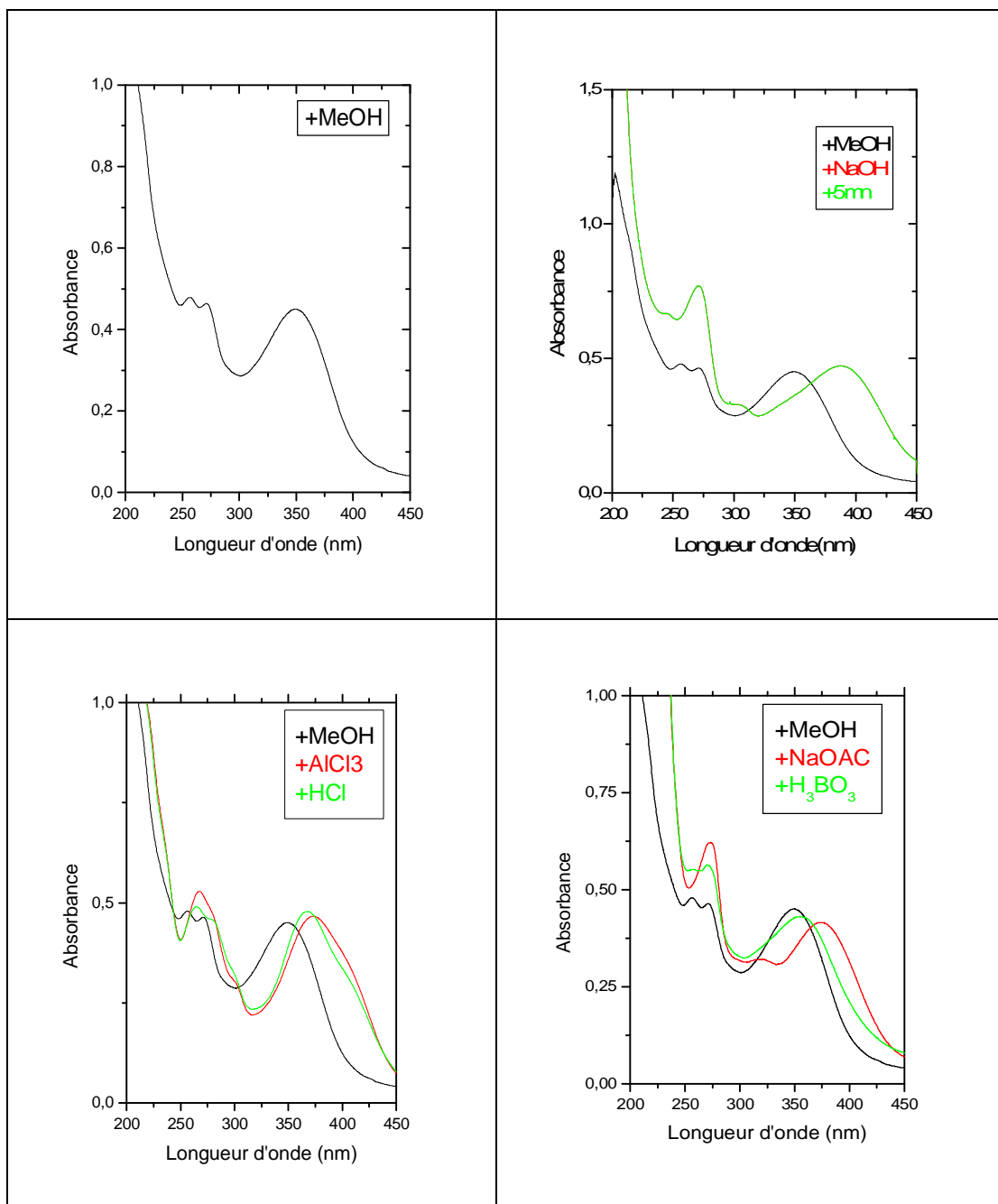
L'examen de la série spectrale UV (spectre n° IV.1.B8.1) montre :

- La longueur d'onde d'absorption maximale dans le méthanol de la bande I à 350 nm, est en faveur d'une structure de type flavonol substitué en C-3 (flavonol 3-OR).
- Un effet bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le milieu (AlCl₃ + HCl) comparativement à celui enregistré dans le MeOH ($\Delta\lambda = + 16$ nm) indique la présence d'un OH libre en C-5 et une oxygénation en C-6.
- L'ajout de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I comparativement à celui enregistré dans le MeOH ($\Delta\lambda = + 37$ nm) avec une augmentation de l'intensité, révèle la présence d'un OH libre sur C-4'.

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau IV.1.B8-a

Tableau IV.1.B7-a : Données de la série spectrale UV (λ_{max} , nm)

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	350	255	272	Flavonol 3-OR
+ NaOH	387	244, 304	268	OH en C-4' OH en C-7
+AlCl ₃	372	300	268	OH en C-5
+AlCl ₃ /HCl	366	281	268	OR en C-6
+NaOAc	373	320	272	OH en C-7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	356	256	272	
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				



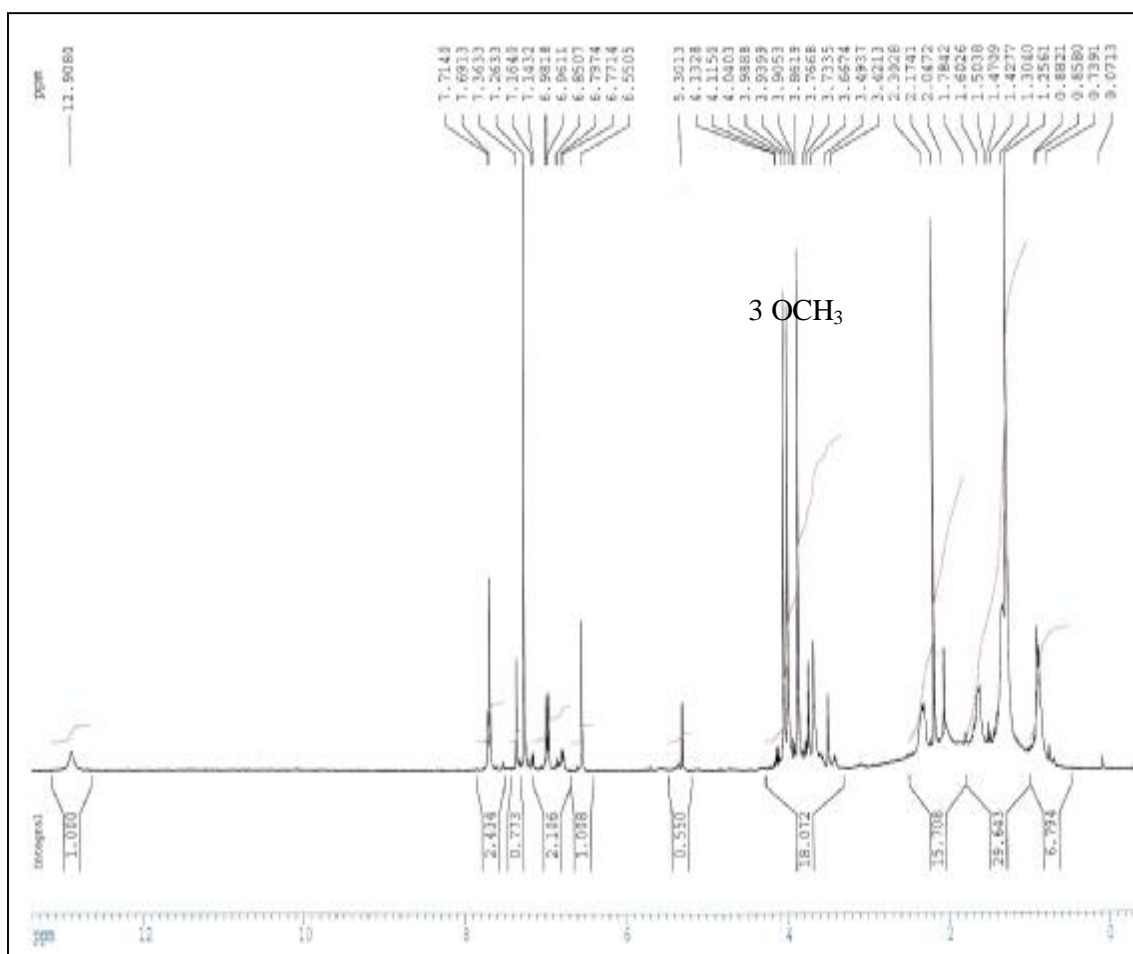
Spectre n° IV.1.B8.1: Série spectrale UV du composé AC 86.

L'étude du spectre RMN ^1H donne les indications suivantes (spectre n° IV.1.B8.2) :

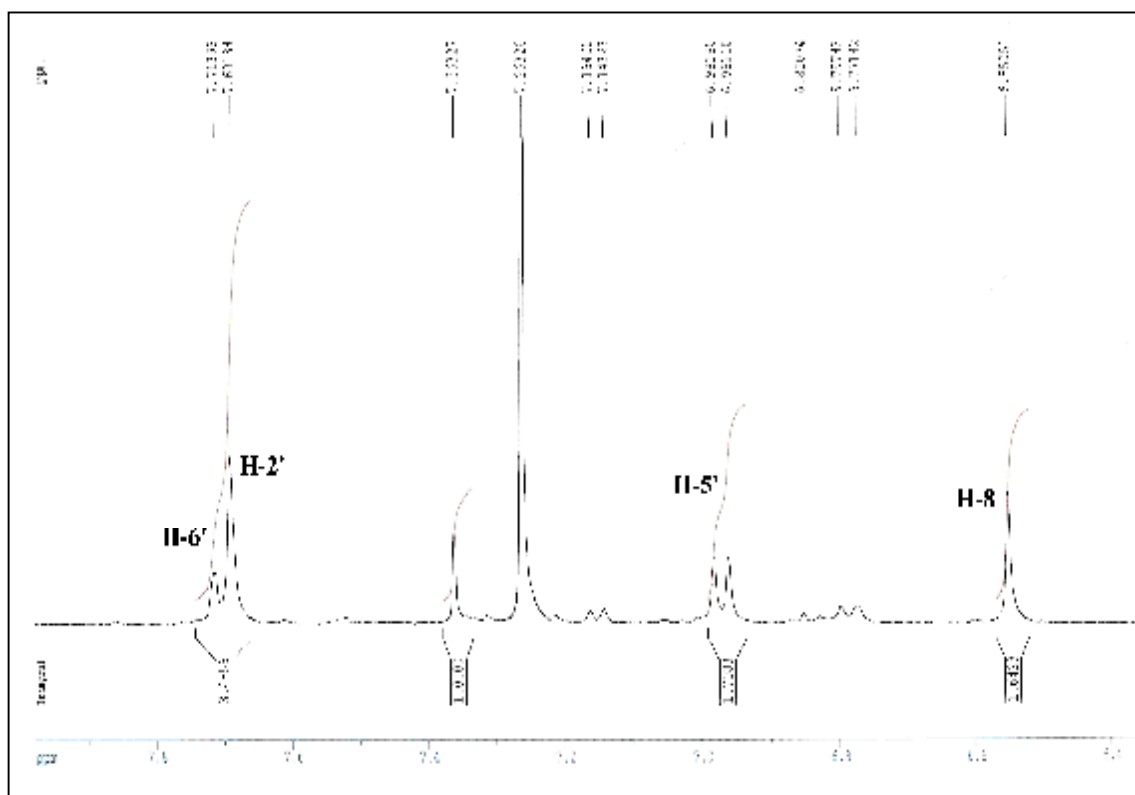
- Un signal sous forme d'un massif d'intégration 1H à $\delta = 12,91$ ppm confirme la présence d'un OH libre en position 5 du cycle A.
- Un doublet large à $\delta = 7,70$ ppm ($J = 8,0$ Hz) partiellement recouvert par un singlet large à $\delta = 7,69$ ppm d'intégration 2H, ces signaux sont attribuables à H-6' et H-2' respectivement.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,97$ ppm ($J = 8,0$ Hz) attribuable à H-5'.

Ces signaux indiquent qu'il s'agit d'une disubstitution du noyau B.

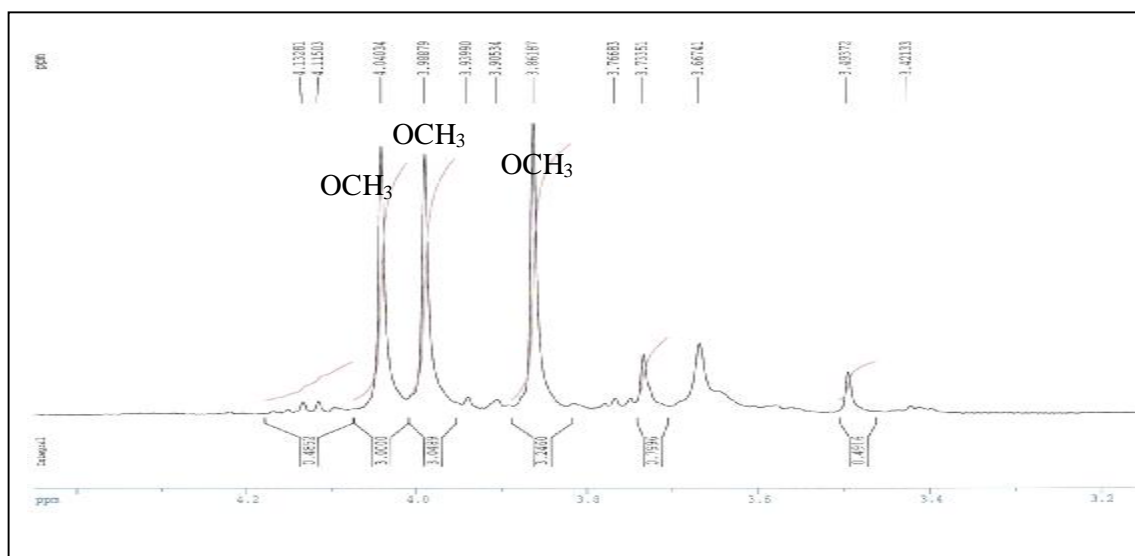
- Un singlet d'intégration 1H à $\delta = 6,55$ ppm attribuable à H-8.
- Trois singlets d'intégration 3H chacun à $\delta = 4,04$, $\delta = 3,99$ et $\delta = 3,86$ ppm attribuables à trois groupements méthoxyles.



Spectre n° IV.1.B8.2: Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé AC86.



Spectre n° IV.1.B8.3: Spectre RMN ^1H étalé de 6,4 à 7,8 ppm du composé AC86.



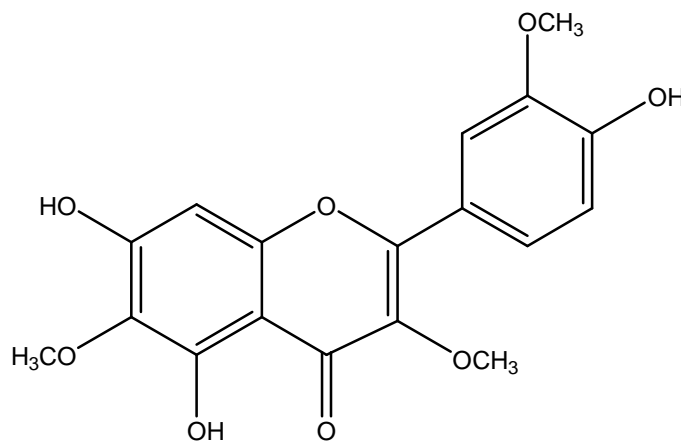
Spectre n° IV.1.B8.4: Spectre RMN ^1H étalé de 3,2 à 4,2 ppm du composé AC86.

Le tableau IV.1.B8.b Rassemble les résultats de la RMN ^1H .

Tableau IV.1.B8.b : Données de la spectroscopie RMN ^1H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
12,91	1H	<i>s</i>	OH en C-5
7,70	1H	<i>d (8,0) large</i>	H-6'
7,69	1H	<i>s large</i>	H-2'
6,97	1H	<i>d (8,0)</i>	H-5'
6,55	3H	<i>s</i>	H-8
4,04	3H	<i>s</i>	OCH ₃
3,99	3H	<i>s</i>	OCH ₃
3,86		<i>s</i>	OCH ₃

L'ensemble des données (UV et RMN ^1H) sont en accord avec ceux de la littérature [18-20] mènent à la structure : **Jaceidine**.



5,7,4'-trihydroxy-3,6,3'-trimethoxyflavone (Jaceidine)

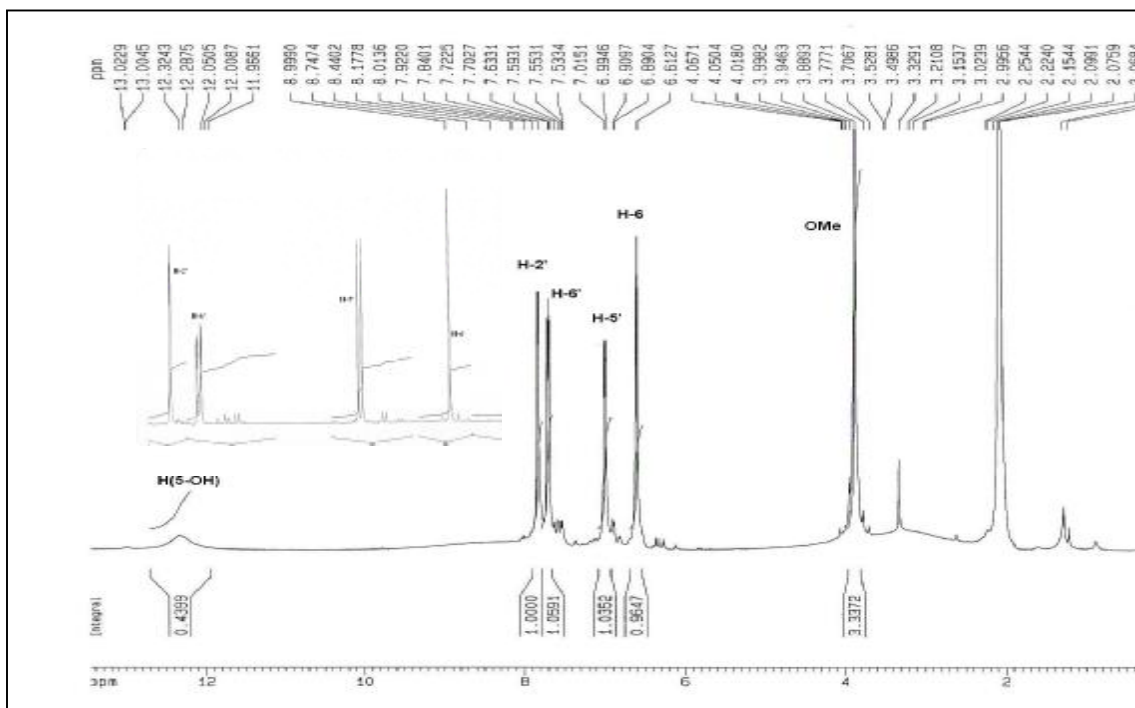
IV.1.B9: Elucidation structurale du composé AC 91

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV.1.B9.1) de ce composé, montre qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol caractérisé par :

- Un signal sous forme d'un massif d'intégration 1H à $\delta = 12,30$ ppm attribuable à un OH en position 5
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,82$ ppm ($J = 2,1$ Hz) (couplage méta) attribuable à H-2'.
- Un doublet dédoublé d'intégration 1H, à $\delta = 7,69$ ppm ($J = 8,5$ Hz ; 2.1 Hz) (couplage ortho et méta) attribuable à H-6'.
- Un signal sous forme d'un doublet à $\delta = 6,98$ ppm avec $J = 8,5$ Hz (couplage ortho) d'intégration 1H attribuable à H-5'.

Ces trois signaux orientent vers une disubstitution du noyau B.

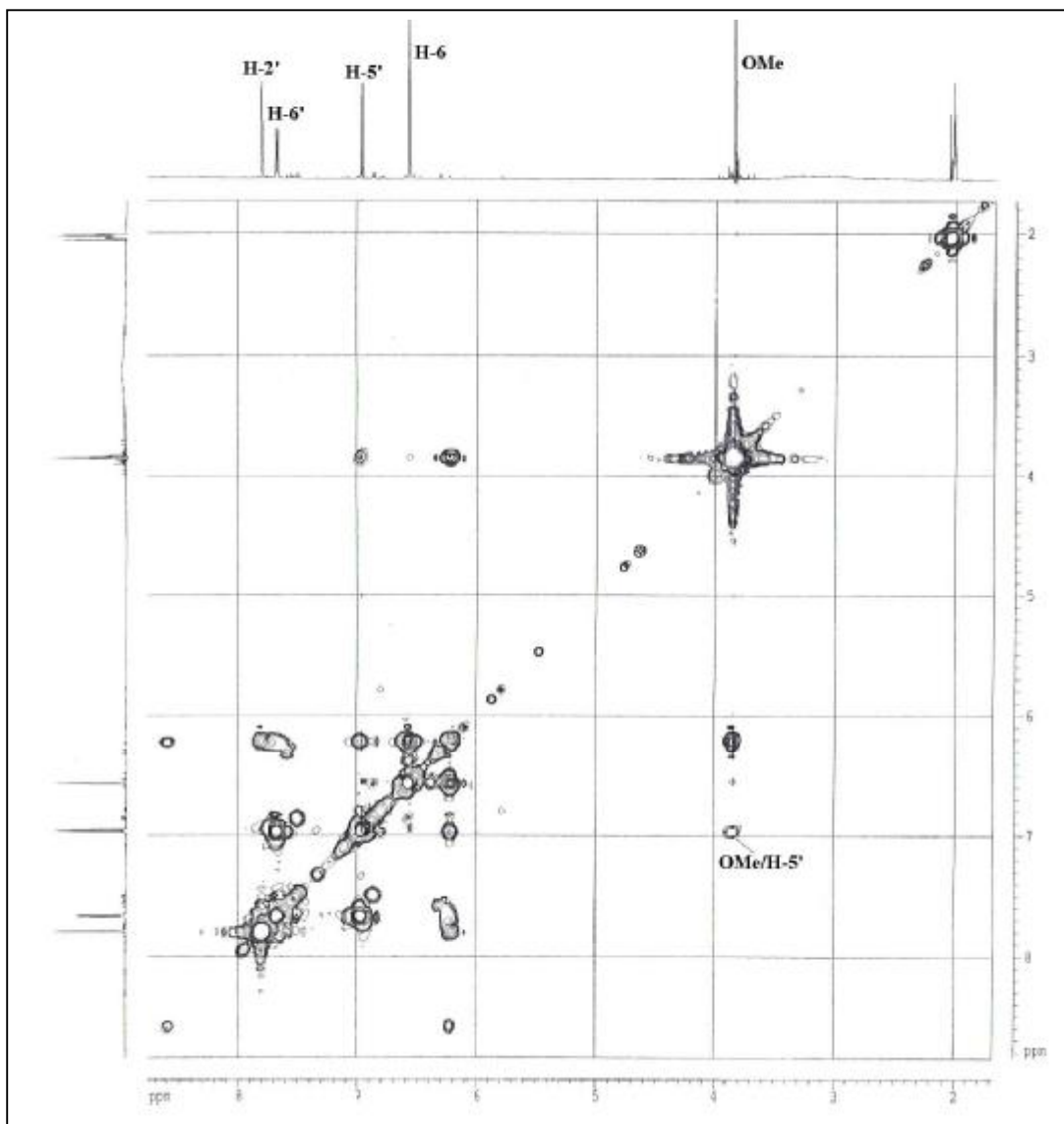
- Un singulet d'intégration 1H à 6,59 ppm attribuable à H-3 ou H-6 ou H-8
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,88$ ppm caractéristique d'un groupement méthoxyle.



Spectre n° IV.1.B9.1: Spectre RMN ^1H (500 MHz, acetone- d_6 , δ ppm) du composé AC91.

L'examen du spectre RMN 2D, COSY (spectre n° IV.1.B9.2) montre :

- Une tache de corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 7,82$ ppm et $\delta = 7,69$ ppm confirmant le couplage méta et aussi les attributions de H-2', H-6'.
- Une tache de corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 7,69$ ppm et $\delta = 6,98$ ppm confirmant le couplage ortho et aussi l'attribution de H-5' et H-6' donc une substitution du noyau B en 3' et 4'.
- Une autre tache de corrélation entre le H-5' et les protons du groupement méthoxyle relative à un couplage lointain. Cela impose que le groupement méthoxyle se trouve sur un carbone voisin de C-5', donc le groupement méthoxyle est porté par le C-4' du noyau B.



Spectre n°IV.1.B9.2: Spectre COSY (^1H - ^1H) (500 MHz, acetone- d_6) du composé AC 9-1.

Les données de la série spectrale UV (tableau n° IV.1.B9.b, spectre n° IV.1.B9.3) montrent :

- Le maximum d'absorption de la bande I est à environ 372 nm ainsi que la fluorescence jaune sous lumière de Wood oriente vers un squelette de type flavonol (OH libre en C-3).
- L'addition de NaOAc donne un déplacement bathochrome de la bande II comparativement à celui enregistré dans le MeOH ($\Delta\lambda_{II} = + 10$ nm) indiquant la présence d'un OH libre en C-7. L'ajout de H_3BO_3 donne un effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I$ [(NaOAc + H_3BO_3) / MeOH] = + 7 nm) indiquant la présence d'un ortho di- OH sur le noyaux A (6,7 ou 7,8).
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = + 47$ nm) comparativement à celui enregistré dans le MeOH avec diminution de l'intensité, confirme la position du groupement méthoxyle en C-4'. L'enregistrement du spectre après 5 minutes montre une décomposition de la bande I avec le temps ce qui laisse supposer la présence d'un Tri OH libre sur le noyau A (5, 6 et 7 ou 5, 7 et 8).
- Un effet bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le milieu $AlCl_3 + HCl$ ($\Delta\lambda_I = + 59$ nm) comparativement à celui enregistré dans le MeOH confirme le squelette d'un flavonol (OH libre en C-3) avec un OH libre en C-5 et pas d'oxygénation en C-6.

Ces données orientent vers un noyau A trihydroxylés en C-5, C-7 et C-8 permettent d'attribuer le proton à $\delta = 6,59$ ppm à H-6.

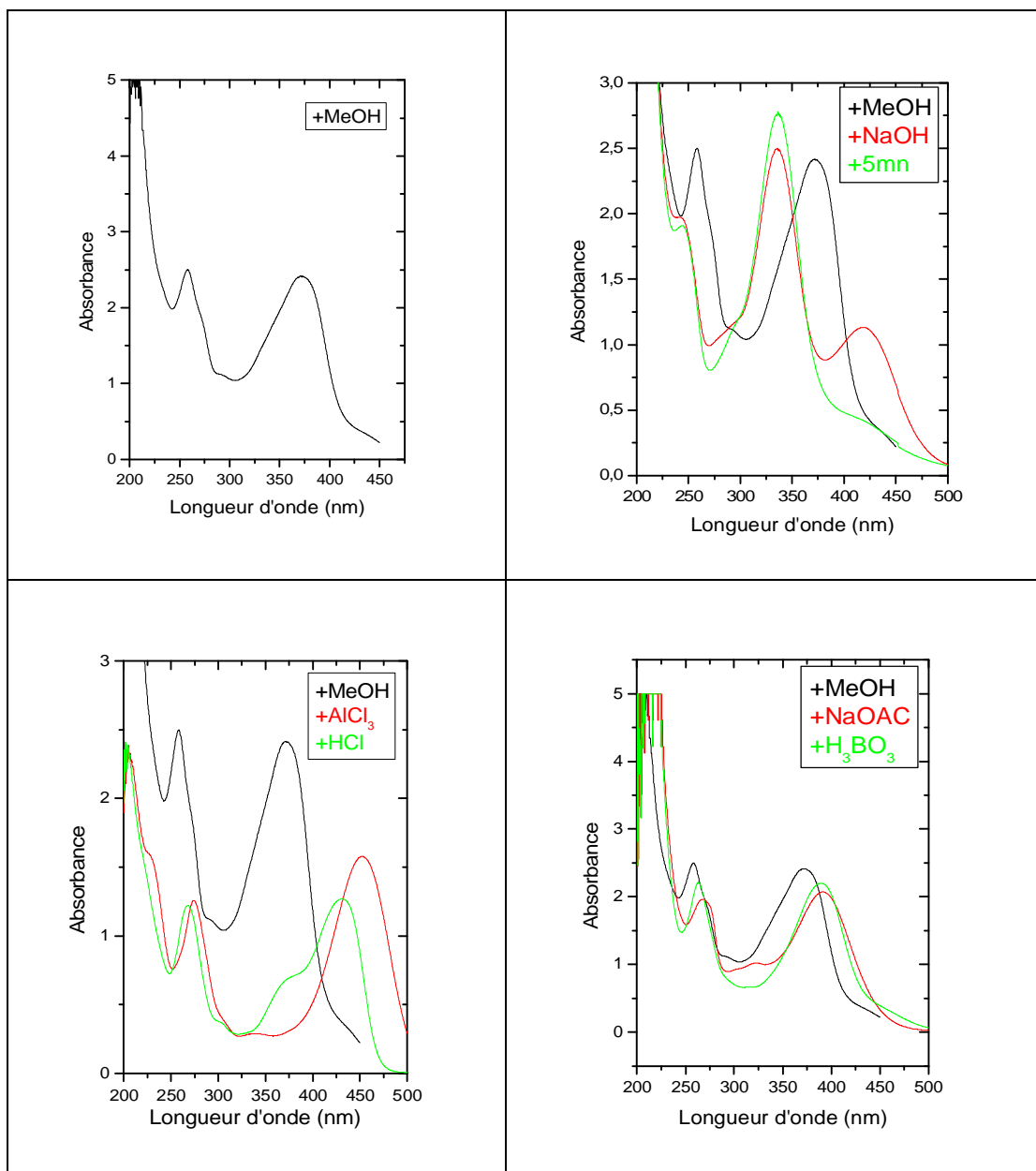
Les données de la spectroscopie RMN complétées par celle de la spectrométrie ultraviolette sont reportées dans les tableaux n° IV.1.B9.a et n° IV.1.B9.b.

Tableau n° IV.1.B9.a: Données de la RMN 1H (500 MHz, acetone-d6, δ ppm)

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution	Couplage avec 1H
7,82	1H	<i>d</i> (2,1)	H-2'	6'
7,69	1H	<i>dd</i> (8,5 ; 2,1)	H-6'	5' et 2'
6,98	1H	<i>d</i> (8,5)	H-5'	6' et O-CH ₃
6,59	1H	<i>s</i>	H-6	/
3,88	3H	<i>s</i>	O-CH ₃	5'

Tableau n° IV.1.B8.b : Données de la série spectrale UV (λ_{max} , nm).

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	372	257	437ep	Flavonol
+ NaOH	419	250	335	Diminution de l'intensité OH-7
+ NaOH + 5 mn	426	335	/	Décomposition Tri OH sur A
+AlCl ₃	452	273	/	/
+AlCl ₃ /HCl	431	268	305	OH libre en 5 et 3 Pas d'oxygénation en C-6
+NaOAc	393.	267	/	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	389	264	/	Ortho di OH sur A

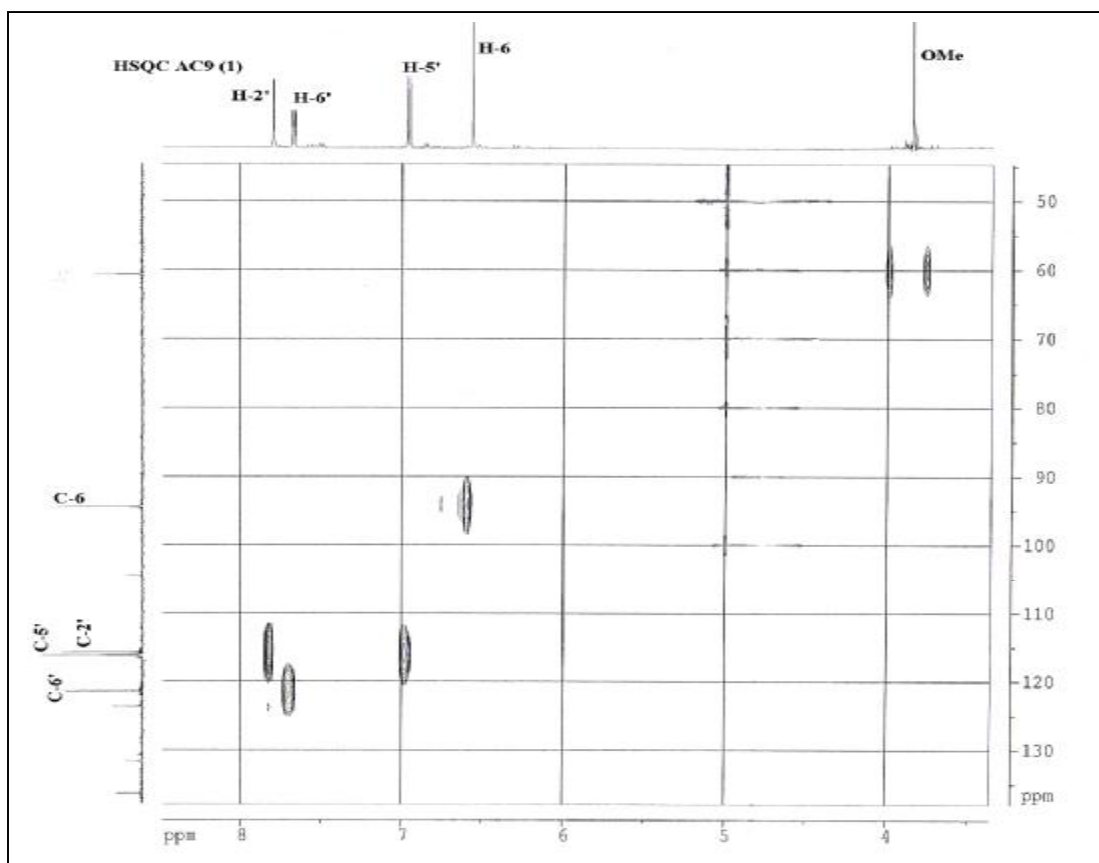


Spectre n° IV.1.B9.3: Série spectrale UV du composé AC91

L'examen des spectres HSQC (spectre n° IV.1.B8.4) permet l'attribution des carbones qui portent des protons:

- Une tache de corrélation entre H-2' et un atome de carbone à $\delta = 115,7$ ppm attribuable à C-2'.
- Une tache de corrélation entre H-6' et un atome de carbone à $\delta = 121,4$ ppm attribuable à C-6'.

- Une tache de corrélation entre H-5' et un atome de carbone à $\delta = 116,1$ ppm qui est le C-5'.
- Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à $\delta = 94,5$ ppm qui est le C-6.
- Une tache de corrélation entre les protons du méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 60,6$ ppm qui ne peut être que le carbone du méthoxyle.

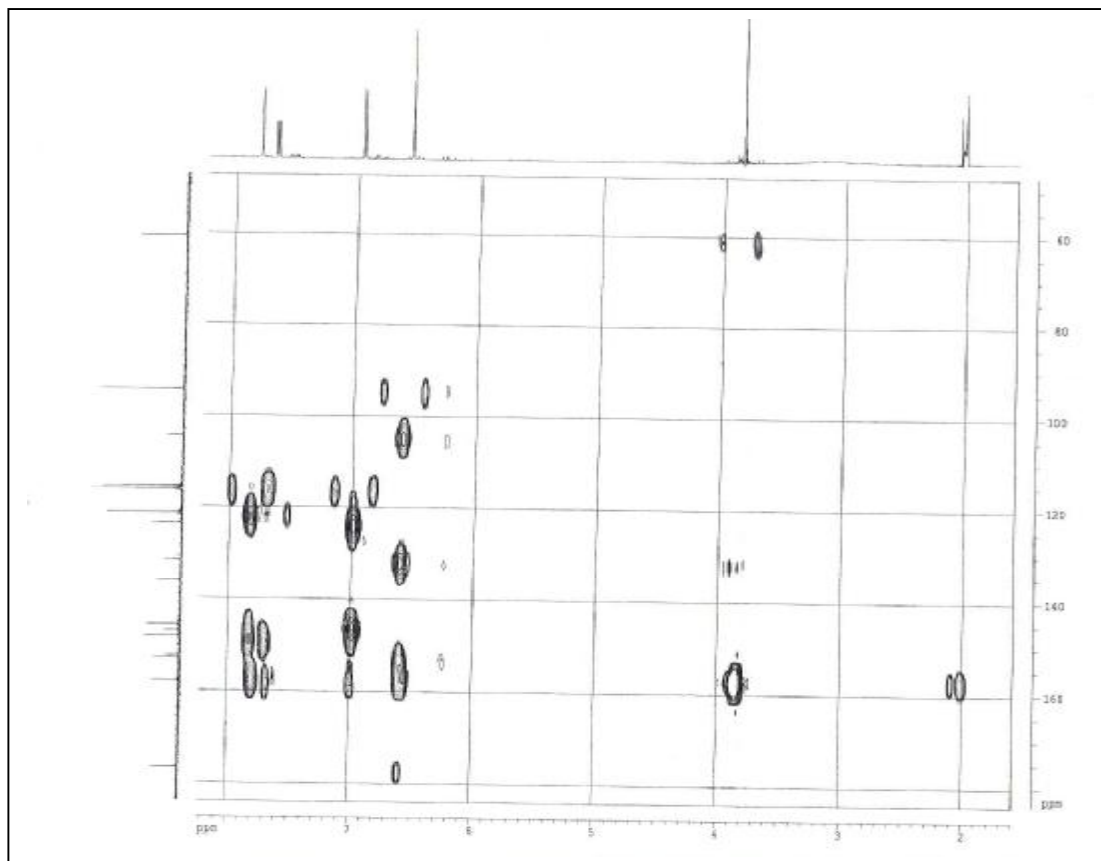


Spectre n° IV.1.B9.4: Spectre HSQC (500 MHz, acetone-d₆) du composé AC 91

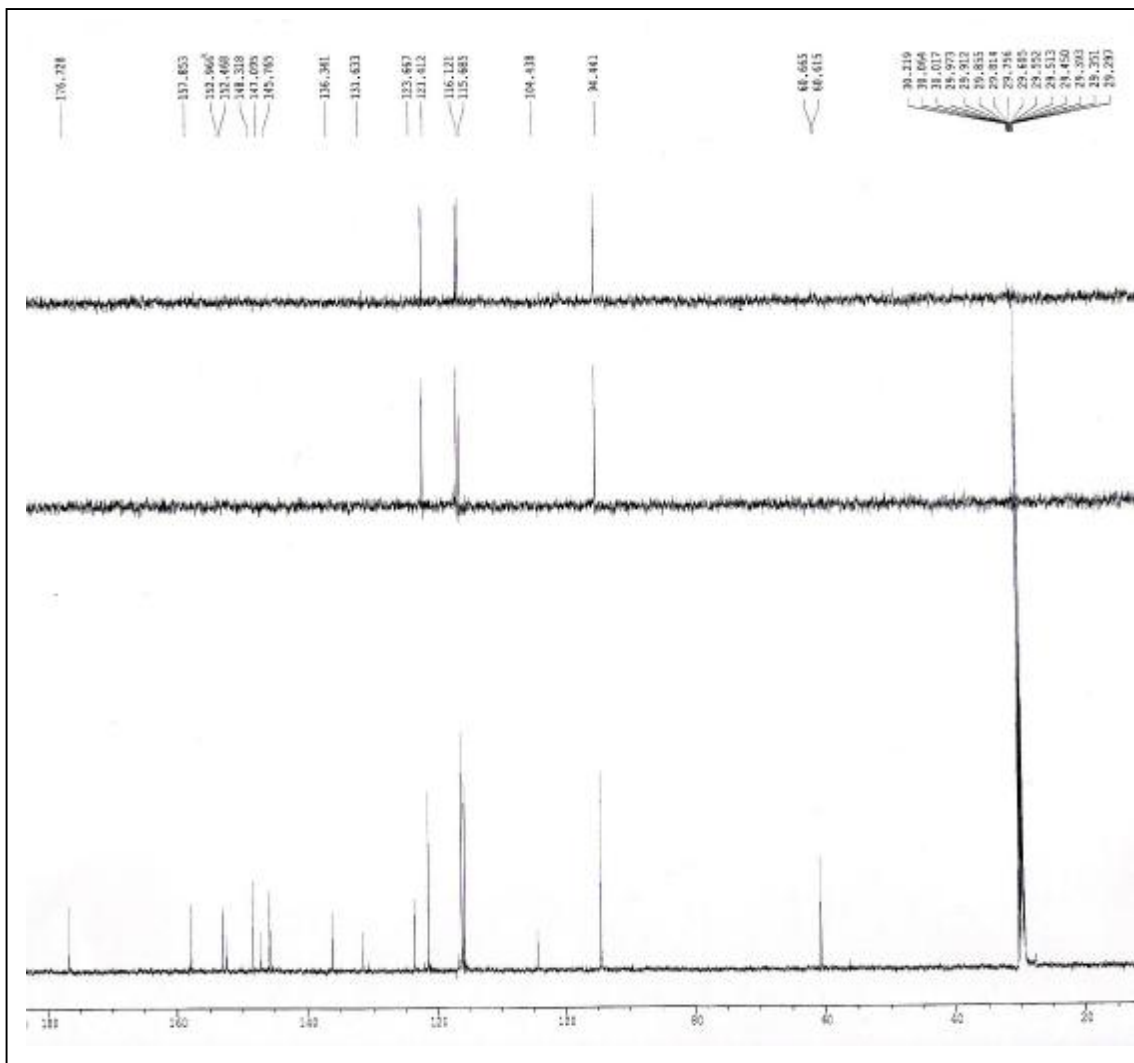
Les attributions des carbones restants ont été complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC enregistrés dans l'acétone d₆ (spectre n° IV.1.B9.5) ainsi que le spectre carbone 13 (spectre n° IV.1.B9.6) qui sont :

- trois taches de corrélation entre le H-2', H-5' et le H-6' et un atome de carbone à $\delta = 157,9$ ppm, Ce même atome de carbone corrèle avec les protons du méthoxyle à $\delta_H = 3,88$ ppm ($\delta_C = 60,6$ ce qui impose la substitution de cet atome de carbone par ce groupement méthoxyle donc c'est le C-4'.

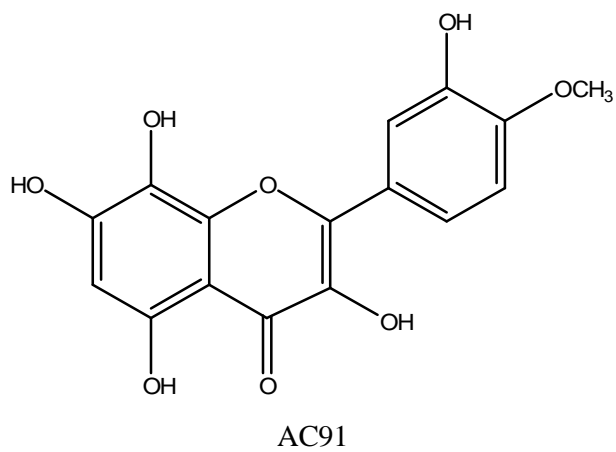
- une tache de corrélation entre le H-2' et un atome de carbone à $\delta = 123,7$ ppm qui ne peut être que le C-1'.
- Deux taches de corrélation entre le H-2' et le H-6' et un atome de carbone oxygéné à $\delta = 148,3$ ppm qui est attribuable à C-2.
- Une tache de corrélation entre H-5' et un atome de carbone à $\delta = 147,1$ ppm qui ne peut être que le C-3'.
- Quatre taches de corrélation entre le H-6 et quatre atomes de carbone, le premier à un déplacement chimique relativement faible $\delta = 104,4$ ppm attribuable à C-10 ; le deuxième à $\delta = 131,6$ ppm qui est le C-8, le troisième et le quatrième sont oxygénés et ont des déplacements chimiques plus élevés $\delta = 152,5$ ppm et $\delta = 153,0$ ppm et sont donc attribuables à C-7 et C-5 respectivement.
- Une tache de corrélation entre le H-6 et le carbone du carbonyle à $\delta = 176,7$ ppm (C-4).
- Les atomes de carbone restants à $\delta = 136,3$ ppm et $\delta = 145,8$ ppm sont attribuables à C-3 et C-9 respectivement.



Spectre n° IV.1.B9.5: Spectre HMBC du composé AC 91



Spectre n° IV.1.B9.6: Spectre RMN ^{13}C et DEPT (125 MHz, acetone- d_6 , δ ppm) du composé AC91.



L'ensemble des spectres menant à la structure de la **4'-methyl gossypetine**. Ainsi toutes les données sont rassemblées dans le tableau n° IV.1.B9.c.

Tableau n° IV.1.B9.c : Données de la RMN ^{13}C :

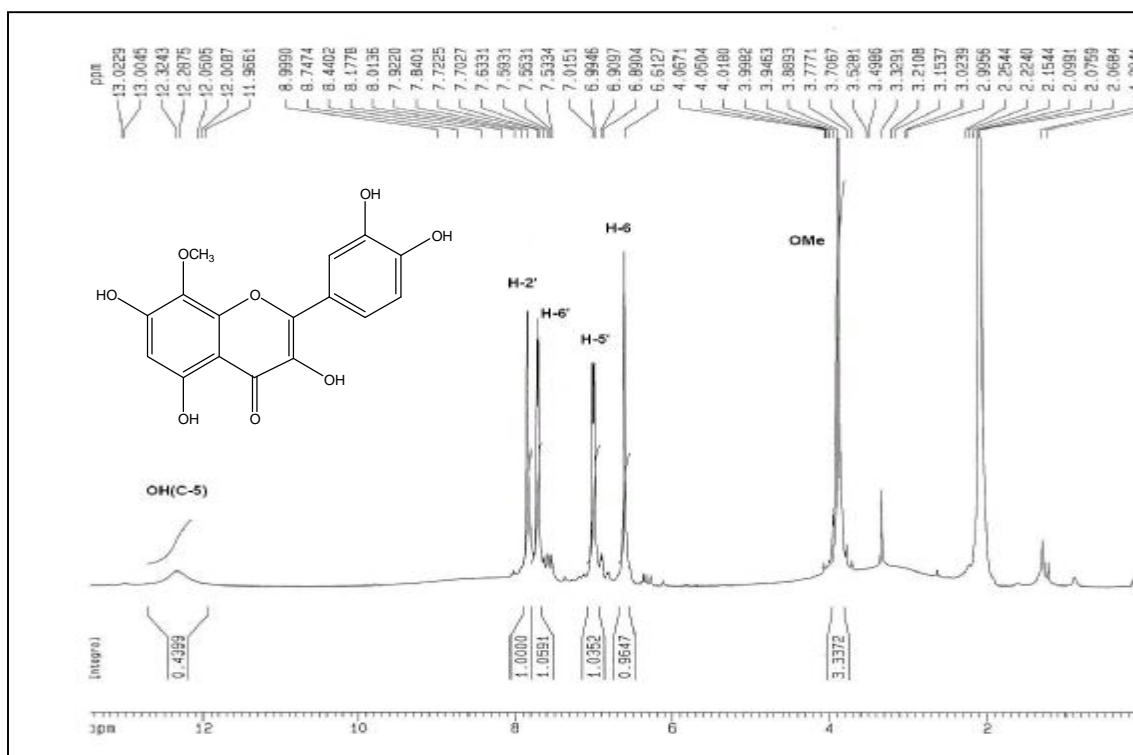
Déplacement chimique δ (ppm)	Attribution	HMBC (H – C)
148,3	C-2	H-2', H-6'
136,3	C-3	/
176,7	C-4	H-6
153,0	C-5	H-6
94,4	C-6	/
152,5	C-7	H-6
131,6	C-8	H-6
145,8	C-9	/
104,4	C-10	H-6
123,7	C-1'	H-5'
115,7	C-2'	H-6'
147,1	C-3'	H-5'
157,9	C-4'	H-2', H-5', H-6', OCH ₃
116,1	C-5'	H-2', H-6'
121,4	C-6'	H-5'
60,6	OCH ₃	/

Cette molécule est nouvelle en tant que substance naturelle, seule une synthèse organique réalisée la signale [21]. Sans toute fois rapporté de données spectroscopiques.

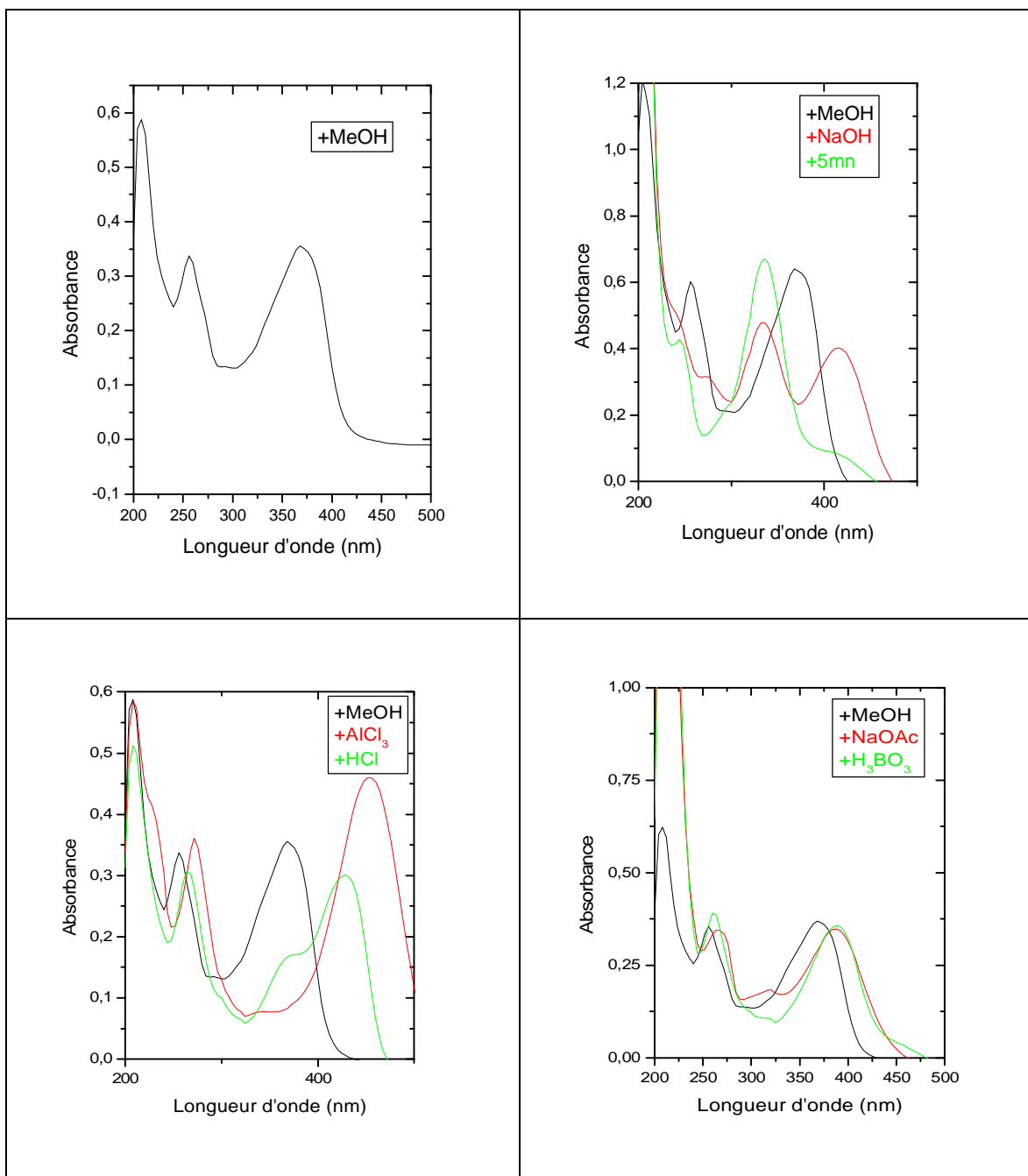
IV.1.B10 Elucidation structurale du composé AC 92

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV.1.B10.1) de ce composé montre qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol caractérisé par :

- Un signal sous forme d'un massif d'intégration 1H à $\delta = 12,30$ ppm caractéristique d'un OH en position 5.
- Un singulet large d'intégration 1H à $\delta = 7,82$ ppm attribuable à H-2'.
- Un doublet large d'intégration 1H, à $\delta = 7,70$ ppm ($J = 8,4$ Hz) (couplage ortho) attribuables à H-6'.
- Un signal sous forme d'un doublet à $\delta = 6,99$ ppm avec $J = 8,4$ Hz (couplage ortho) d'intégration 1H attribuable à H-5'.
- Un singulet d'intégration 1H à 6,60 ppm attribuable à H-3 ou H-6 ou H-8
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,87$ ppm caractéristique d'un groupement méthoxyle.



Spectre n° IV.1.B10.1 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, Acetone- d_6 , δ ppm) du composé AC92



Spectre n° IV.1.B10.2 : Série spectrale UV du composé AC 92

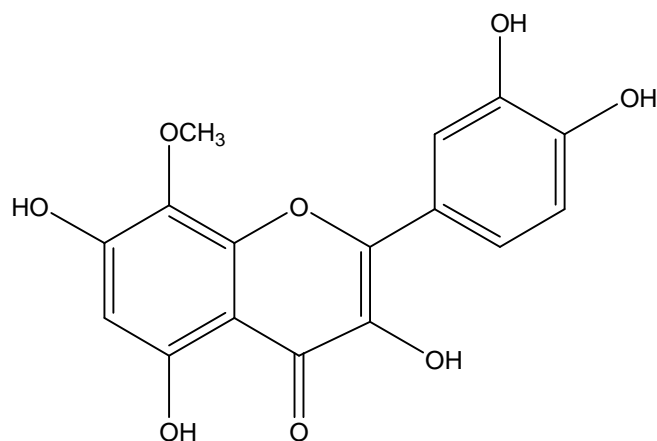
Les données de la série spectrale UV (tableau IV.1.B10.b, spectre n° IV.1.B10.2) montrent :

- Le maximum d'absorption de la bande I est à environ 368 nm et celui de la bande II est à 256 nm ainsi que la fluorescence jaune sous lumière de Wood orientent vers un squelette de type flavonol (OH libre en C-3).

- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = + 48$ nm) suivi de la décomposition du spectre avec le temps oriente vers la présence d'un OH libre en C-4' ou la présence d'un OH libre en C-3.
- L'addition de NaOAc donne un déplacement bathochrome de la bande II comparativement à celui enregistré dans le MeOH ($\Delta\lambda_{II} = + 8$ nm) indiquant la présence d'un OH libre en C-7. L'ajout de H₃BO₃ dans cet échantillon donne un effet bathochrome de la bande I comparativement au spectre enregistré dans le MeOH $\Delta\lambda_I [(NaOAc + H_3BO_3)/MeOH] = + 20$ nm indiquant la présence d'un ortho di OH sur le noyau B.
- Un effet bathochrome de la bande I du spectre enregistré dans le milieu AlCl₃ + HCl ($\Delta\lambda_I = + 59$ nm) comparativement à celui enregistré dans le MeOH confirme le squelette d'un flavonol (OH libre en C-3) et indique la présence d'un OH libre en C-5 et pas d'oxygénation en C-6 (H en position C-6). Ce spectre montre également un effet hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = + 24$ nm) par rapport au spectre enregistré après addition de AlCl₃, confirmant la présence du système ortho dihydroxyle sur le cycle B.

La combinaison des données de la RMN-¹H et de l'absorption ultraviolette mène au fait que cette molécule est un flavonol, tetrahydroxylé en C-5, C-7, C-3' et C-4' portant un groupement méthoxyle qui ne peut être qu'en C-8, vue que cette molécule n'est pas oxygéné en C-6.

Ces données reportées dans les tableaux **IV.1.B10.a** et **IV.1.B10.b.** sont en accord avec ceux de la littérature [22-23] et mènent à la structure :



8-méthylgossypétine ou corniculatusine

Tableau IV.1.B10.a: Données de la RMN ^1H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7,82	1H	<i>s</i>	H-2'
7,70	1H	<i>d</i> (8,4)	H-6'
6,99	1H	<i>d</i> (8,4)	H-5'
6,60	1H	<i>s</i>	H-6
3,87	3H	<i>s</i>	O-CH ₃

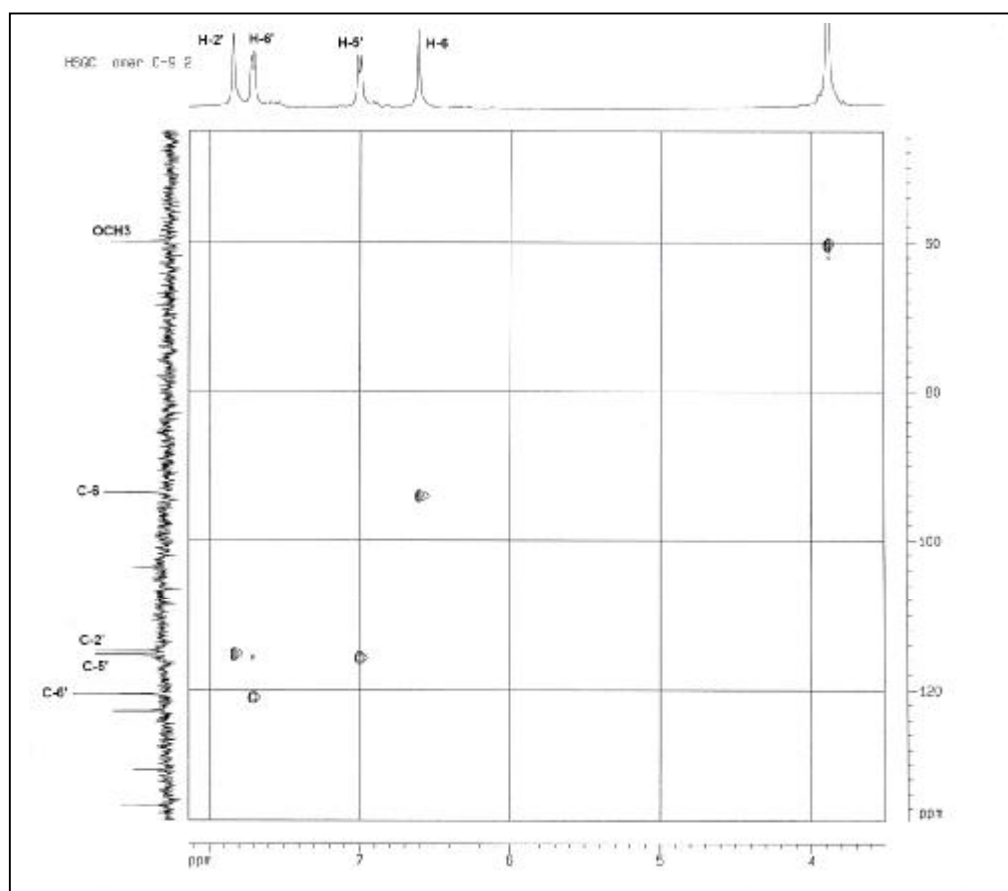
Tableau IV.1.B10.b : Données de la série spectrale UV (λ_{max} , nm).

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
+MeOH	368	257		Flavonol
+ NaOH	416	276	335	Diminution continue de l'intensité OH-7
+ NaOH + 5 mn		336	/	Décomposition (3-OH ; 4'-OH)
+AlCl ₃	452	272	/	/
+AlCl ₃ /HCl	428	264	372	OH libre en C-5 et C-3 Pas d'oxygénation en C-6 ; ortho-di-OH B
+NaOAc	388.	264	320	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	388	260	320	Ortho di OH en B

L'examen du spectre HSQC (400MHz ; Acetone-d₆) (spectre n° IV.1.B10.3) permet l'attribution des carbones qui portent des protons:

- Une tache de corrélation entre le H-2' et un atome de carbone à $\delta = 114,8$ ppm attribuable à C-2'.
- Une tache de corrélation entre le H-5' et un atome de carbone à $\delta = 115,3$ ppm attribuable à C-5'.

- Une tache de corrélation entre H-6' et un atome de carbone à $\delta = 120,6$ ppm attribuable à C-6'.
- Une tache de corrélation entre le H-6 et un atome de carbone à $\delta = 93,6$ ppm attribuable à C-6.
- Une tache de corrélation entre les protons du groupement méthoxyle et un atome de carbone à $\delta = 59,8$ ppm qui ne peut être que le carbone du méthoxyle.

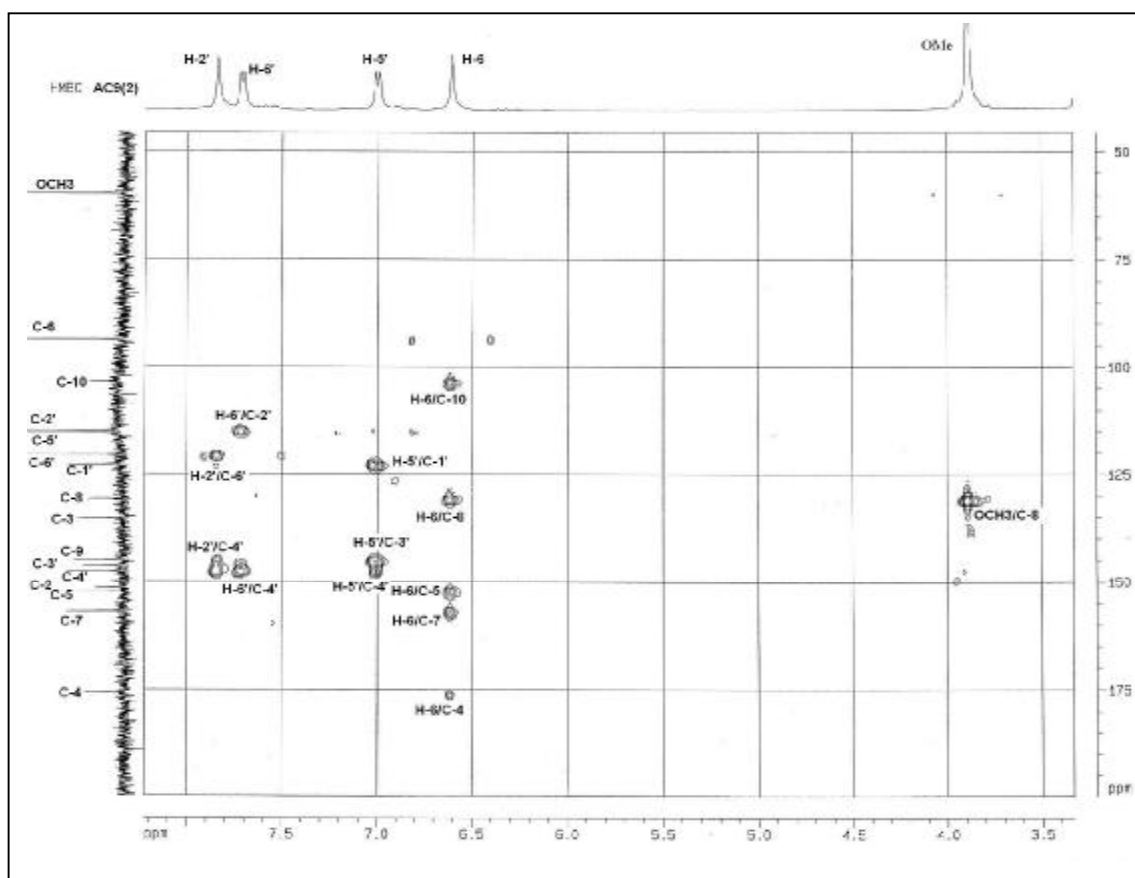


Spectre n° IV.1.B10.3 : Spectre HSQC (400 MHz, Acetone-d₆, δ ppm) du composé AC92

Les attributions des autres atomes de carbone ont été complétées par l'étude des spectres de corrélation hétéronucléaire à longue distance (HMBC) (spectre n° IV.1.B10.4) et le spectre carbone 13 (spectre n° IV.1.B9.5) qui montrent :

- Trois taches de corrélation entre H-2', H-5' et H-6' et un atome de carbone résonant à $\delta = 147,5$ ppm attribuable à C-4'.
- Une tache de corrélation entre H-5' et un atome de carbone résonant à $\delta = 146,2$ ppm qui ne peut être que le C-3'.

- Deux taches de corrélation entre H-2' et H-5' et un atome de carbone résonant à $\delta = 122,8$ ppm attribuable à C-1'.
- Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone résonant à $\delta = 103,6$ ppm qui ne peut être que le C-10.
- Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone à $\delta = 175,9$ ppm attribuable à C-4.
- Une tache de corrélation entre H-6 et un atome de carbone résonant à $\delta = 130,8$ ppm attribuable à C-8, ce même atome de carbone présente une tache de corrélation avec les protons du méthoxyle confirmant ainsi sa méthylation.
- Deux taches de corrélation entre H-6 et deux atomes de carbone à $\delta = 152,2$ et $157,0$ ppm qui ne peuvent être attribués qu'aux C-5 et C-7 respectivement.
- Trois atomes de carbone à $\delta = 135,5$, $144,9$ et $151,6$ ppm attribuables à C-3, C-9 et C-2 respectivement.

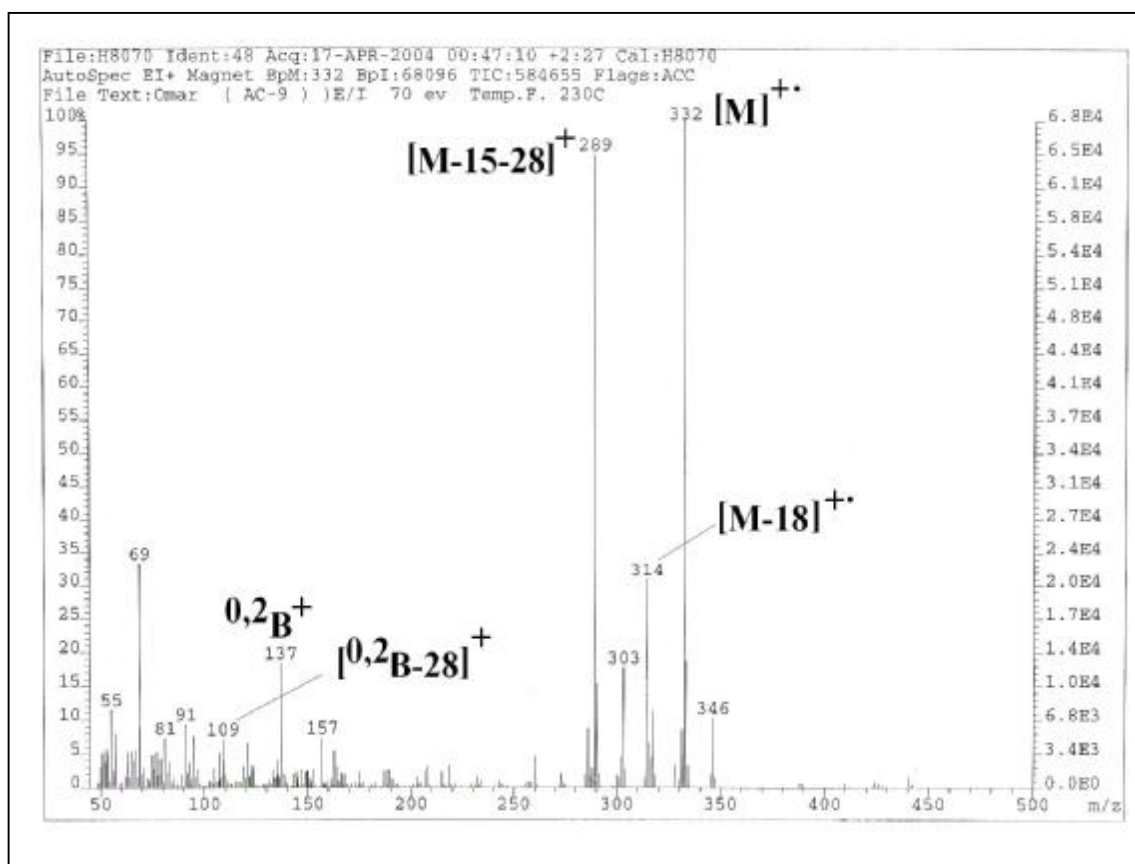


Spectre n° IV.1.B10.4 : Spectre HMBC (400 MHz, Acetone-d₆, δ ppm) du composé AC92

L'examen du spectre de masse en mode d'ionisation impact électronique (spectre n° IV.1.B10.5) montre un pic moléculaire à $m/z = 332$ $[M]^+$ Confirmant le squelette d'un flavonoïde de type aglycone de formule brute $C_{16}H_{12}O_8$.

Ce spectre montre également les signaux présentés :

- Ø $m/z = 317$ correspondant à M-15 indiquant la présence d'un méthoxyle,
- Ø $m/z = 314$ correspondant au fragment $[M-18]^+$
- Ø $m/z = 289$ correspondant au fragment $[M-15-28]^+$ caractéristique d'un flavonoïde méthoxylé.
- Ø $m/z = 137$ correspondant au fragment $^{0,2}B^+$, confirmant la présence de deux hydroxyles sur le cycle B.



Spectre n° IV.1.B10.5 : Spectre SMIE du composé AC 92

IV.1.B11: Elucidation structurale du composé AC 11

La fluorescence noire violette de ce composé sous lumière de Wood laisse envisager la structure d'une flavone ou un flavonol substitué en C-3 (3-OR).

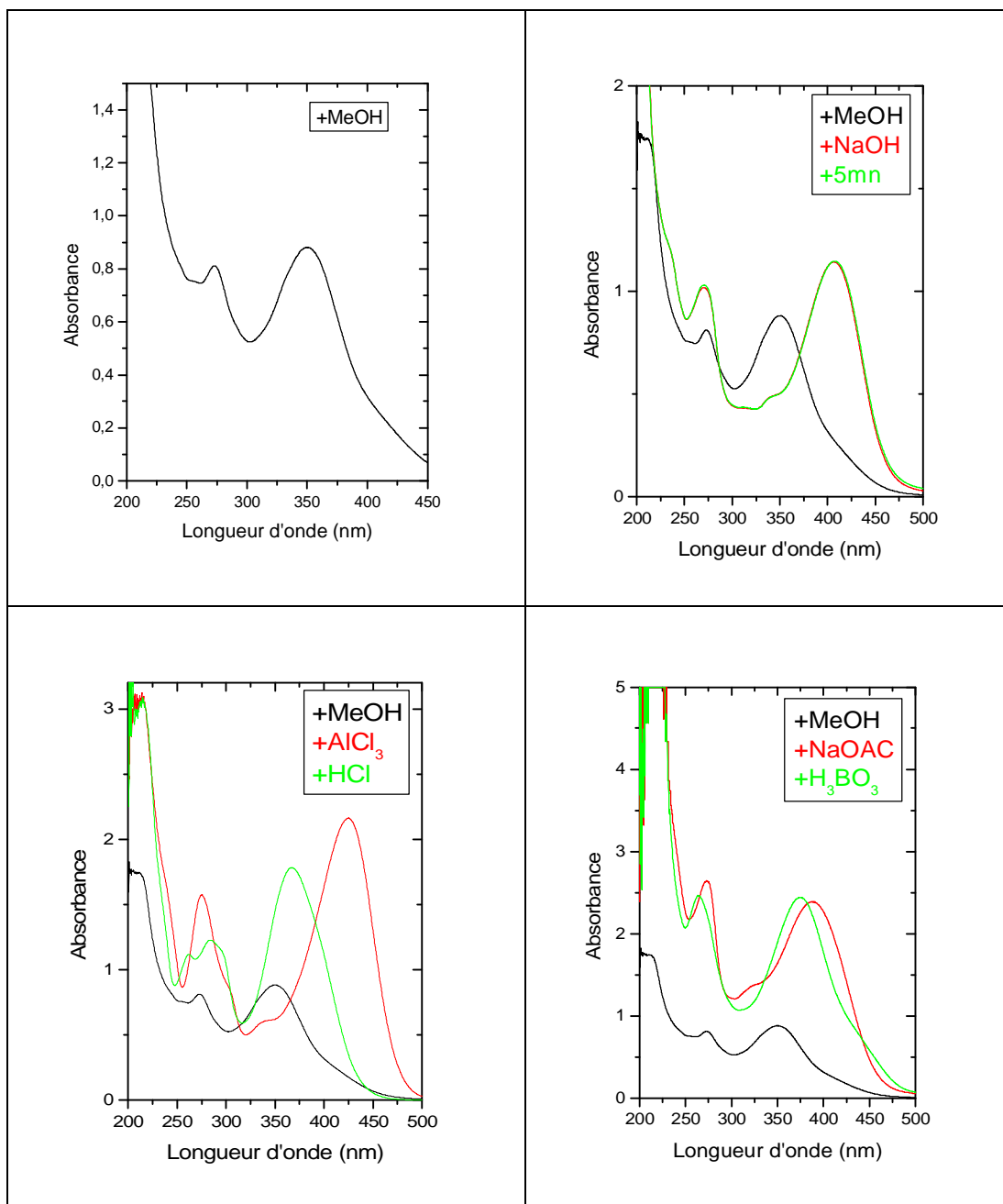
L'examen de la série spectrale UV (spectre n° IV.1.B11.1) montre :

- Un effet bathochrome de la bande I du spectre enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) ($\Delta\lambda_I = +17 \text{ nm}$) comparativement à celui enregistré dans le MeOH indique un OH libre en 5 et une oxygénation du carbone C-6 (6-OR) du noyau A.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +55 \text{ nm}$) avec augmentation de l'intensité révèle la présence d'un OH libre sur C-4'. L'apparition d'une nouvelle bande ce spectre à $\lambda = 341 \text{ nm}$ indique un OH libre en C-7. Ceci est confirmé par un déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc comparativement au spectre pris dans le MeOH ($\Delta\lambda_{II} = 3 \text{ nm}$), cette valeur relativement faible est due à l'oxygénation du noyau A en C-5, C-6, et C-7.
- Un déplacement bathochrome de la bande I après addition de NaOAc + H_3BO_3 comparativement à celui enregistré dans le MeOH ($\Delta\lambda_I = +23 \text{ nm}$) indiquant la présence d'un système ortho di OH sur le noyau B. Cette hypothèse est confirmée par l'effet hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = -57 \text{ nm}$) du spectre enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans AlCl_3 .

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau n° IV.1.B11.a.

Tableau n° IV.1.B11.a : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	351		270	Flavone ou flavonol 3-OR
+ NaOH	406	341	270	OH libre en C-4' OH libre en C-7
+ AlCl_3	425	304, 340	275	OH libre en C-5 OR en C-6
+ AlCl_3/HCl	368	338	284	
+NaOAc	387	324	273	OH libre en C-7
+NaOAc/ H_3BO_3	374		265	Ortho di OH sur B
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

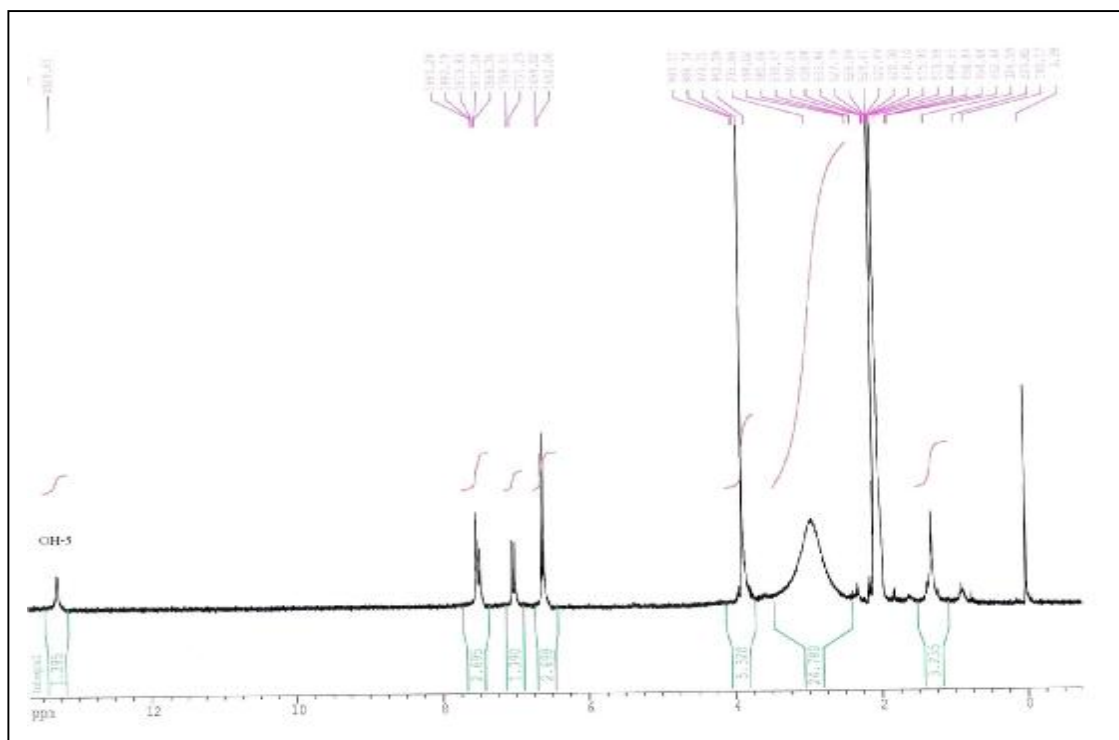


Spectre n° IV.1.B11.1: Série spectrale UV du composé AC11

L'étude du spectre RMN ¹H donne les indications suivantes (spectre n° IV.1.B11.2) :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 13,28$ ppm confirmant la présence d'un OH libre en position C-5 du noyau A.
- Un doublet d'intégration de 1H à $\delta = 7,53$ ($J = 2,2$ Hz) attribuables à H-2'.
- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à $\delta = 7,49$ ppm ($J = 8,4 ; 2,2$ Hz) attribuable à H-6'.

- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,02$ ppm ($J = 8,4$ Hz) attribuable à H-5'.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,63$ ppm attribuable à H-8 ou H-3.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,61$ ppm attribuable à H-3 ou H-8
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,89$ ppm, attribuable à un groupement méthoxyle.



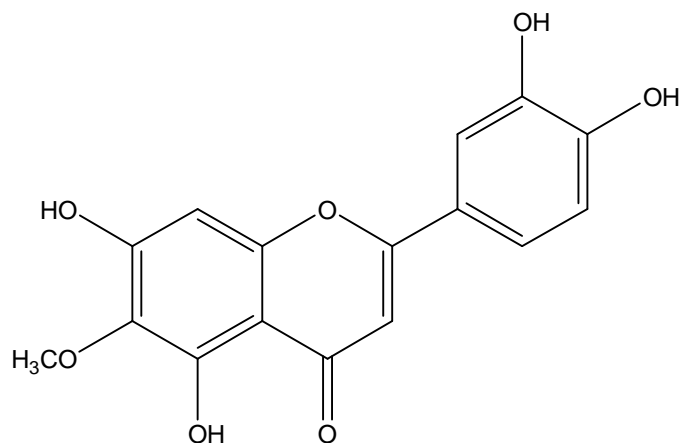
Spectre n° IV.1.B11.2: Spectre RMN ^1H (250 MHz, Acetone- d_6 , δ ppm) du composé AC11

Le tableau n° IV.1.B11.b rassemble les résultats de la RMN ^1H .

Tableau n° IV.1.B11.b : Données de la spectroscopie RMN ^1H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
13,28	1H	<i>s</i>	OH en C-5
7,53	1H	<i>d(2,2)</i>	H-2'
7,49	1H	<i>dd(8,3 ; 2,2)</i>	H-6'
7,02	1H	<i>d(8,3)</i>	H-5'
6,63	1H	<i>s</i>	H-8 ou H-3
6,61	1H	<i>s</i>	H-3 ou H-8
3,89	3H	<i>s</i>	OCH_3

Les données de la spectroscopie RMN-¹H complétées par celle de la spectrométrie ultraviolette sont en accord avec la littérature [24-25] et mènent à la structure suivante:

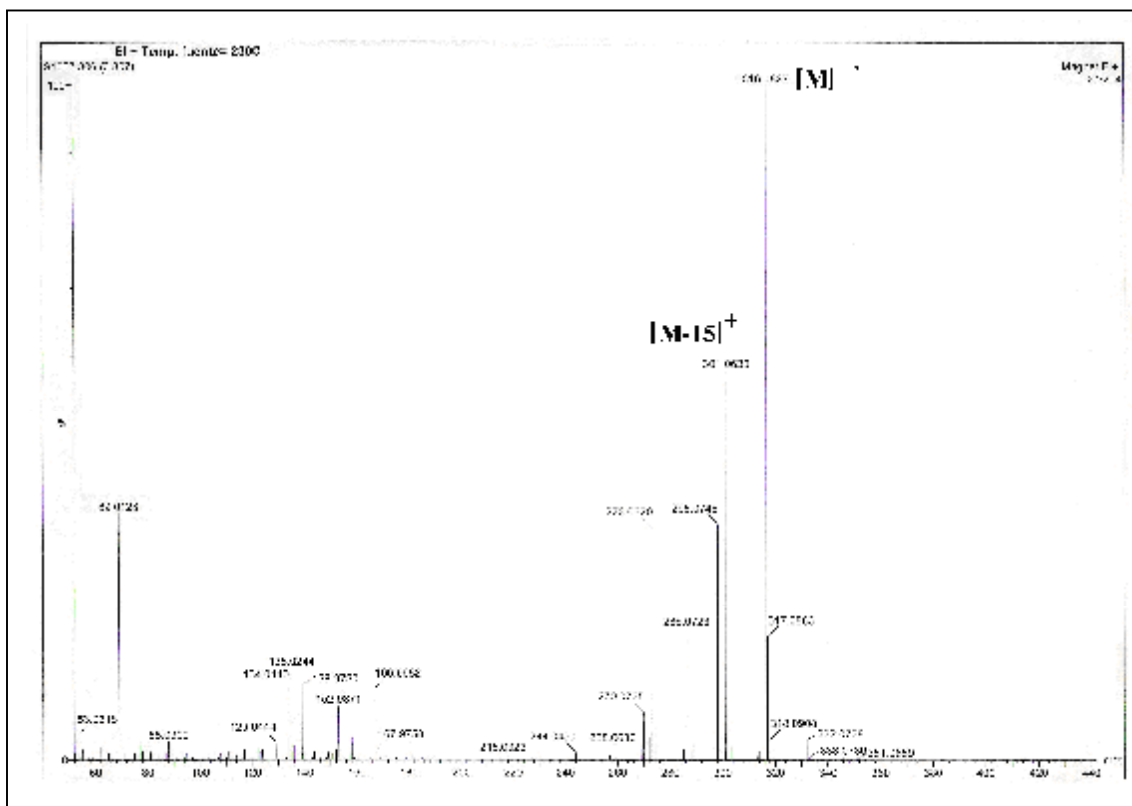


3',4',5,7-tetrahydroxy-6-methoxyflavone (népétine)

L'examen du spectre de masse en mode d'ionisation impact électronique (spectre n° **IV.1.B11.3**) montre un pic moléculaire à $m/z = 316$ $[M]^{+}$ Confirmant le squelette d'un flavonoïde de type aglycone de formule brute $C_{16}H_{12}O_7$.

Ce spectre montre également les signaux :

- Ø $m/z = 301$ correspondant à M-15 indiquant la présence d'un méthoxyle,
- Ø $m/z = 298$ correspondant au fragment $[M-18]^{+}$
- Ø $m/z = 273$ correspondant au fragment $[M-28-15]^{+}$ caractéristique d'un flavonoïde,
- Ø $m/z = 270$ correspondant au fragment $[M-18-28]^{+}$,
- Ø $m/z = 167$ correspondant au fragment $[^{1,3}A-15]^{+}$, le cycle A comporte deux hydroxyles et un méthoxyle,
- Ø $m/z = 139$ correspondant au fragment $[^{1,3}A-28-15]^{+}$ donc le cycle A comporte un méthoxyle,
- Ø $m/z = 137$ correspondant au fragment $^{0,2}B^{+}$, indiquant la présence de deux hydroxyles sur le cycle B.
- Ø $m/z = 134$ correspondant au fragment $^{1,3}B^{+}$ confirmant la présence de deux hydroxyles sur le cycle B d'une flavone.



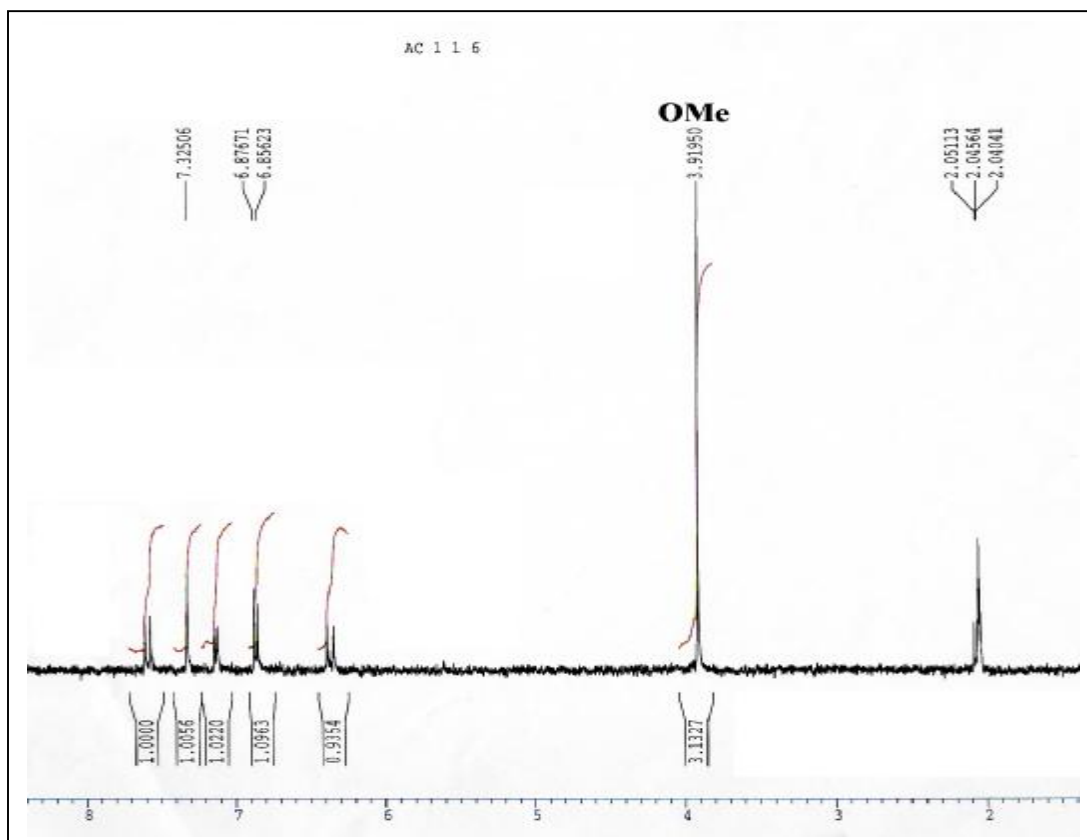
IV.1.B12: Elucidation structurale du composé AC 11.6

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV.1.B12.1) et son étalement (spectre n° IV.1.B12.2), montrent qu'il s'agit d'un composé phénolique de type $\text{C}_6\text{-C}_3$ caractérisé par :

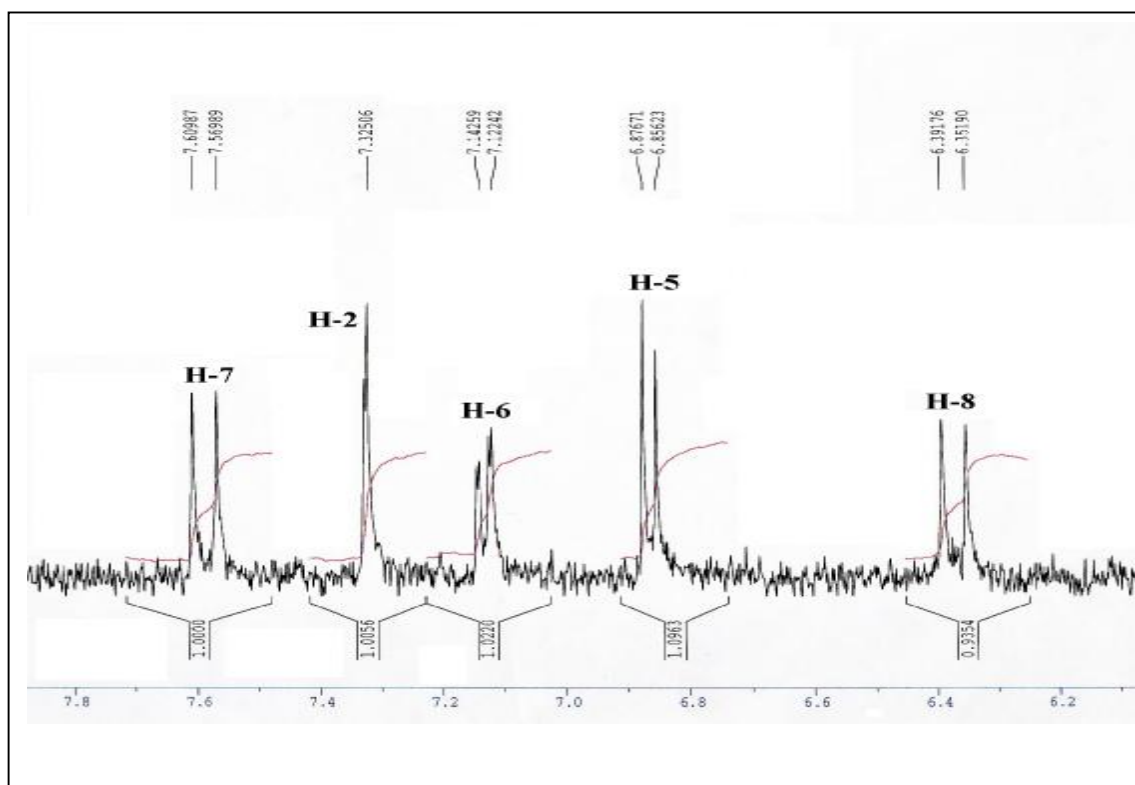
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,59$ ppm ($J = 16,0$ Hz) attribuables à un CH éthylénique voisin d'un autre CH éthylénique en position trans dont le signal apparaît sous forme d'un doublet à $\delta = 6,37$ ppm ($J = 16,0$ Hz).
- Trois signaux caractéristiques d'un noyau aromatique trisubstitué en position 1, 3 et 4. Parmi les trois substituants, un méthoxyle dont le signal apparaît à $\delta = 3,92$ ppm.

Les signaux relatifs aux protons du cycle aromatique apparaissent comme suit :

- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,33$ ppm ($J = 2,4$ Hz) attribuables à H-2.
- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à $\delta = 7,13$ ppm ($J = 8,1 ; 2,4$ Hz) attribuable à H-6
- Un doublets d'intégration 1H à $\delta = 6,87$ ppm ($J = 8,1$ Hz) attribuable à H-5.



Spectre n°IV.1.B12.1: Spectre RMN ^1H (400 MHz, Acetone- d_6 , δ ppm) du composé AC 11.6.



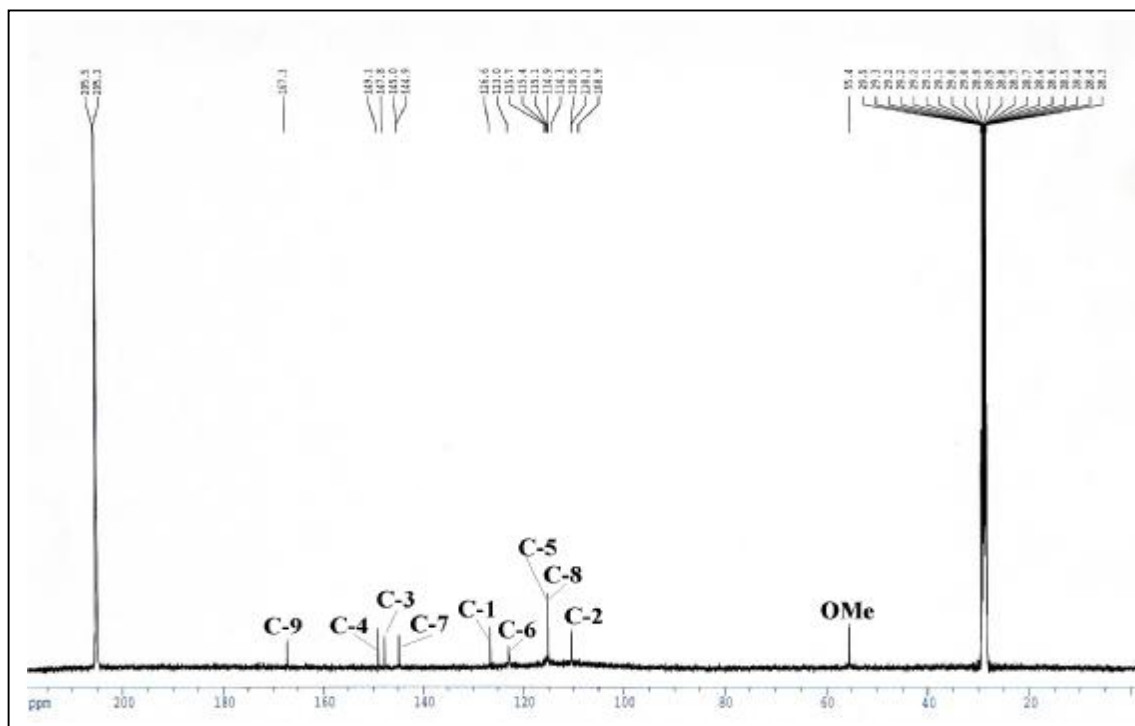
Spectre n°IV.1.B11.2 : Spectre RMN ^1H étalé entre 6,2 et 7,8 ppm
(400 MHz, Acetone-d₆, δ ppm) du composé AC 11.6

L'examen du spectre de carbone 13 (spectre n°IV.1.B12.3), montre que ce composé comporte 10 atome de carbone dont un C=O à $\delta = 167,3$ ppm orientant vers une fonction acide conjuguée, deux atomes de carbone éthylénique à $\delta = 115,1$ ppm et $\delta = 144,9$ ppm, confirmant ainsi la présence des deux groupements CH observés en RMN- ^1H .

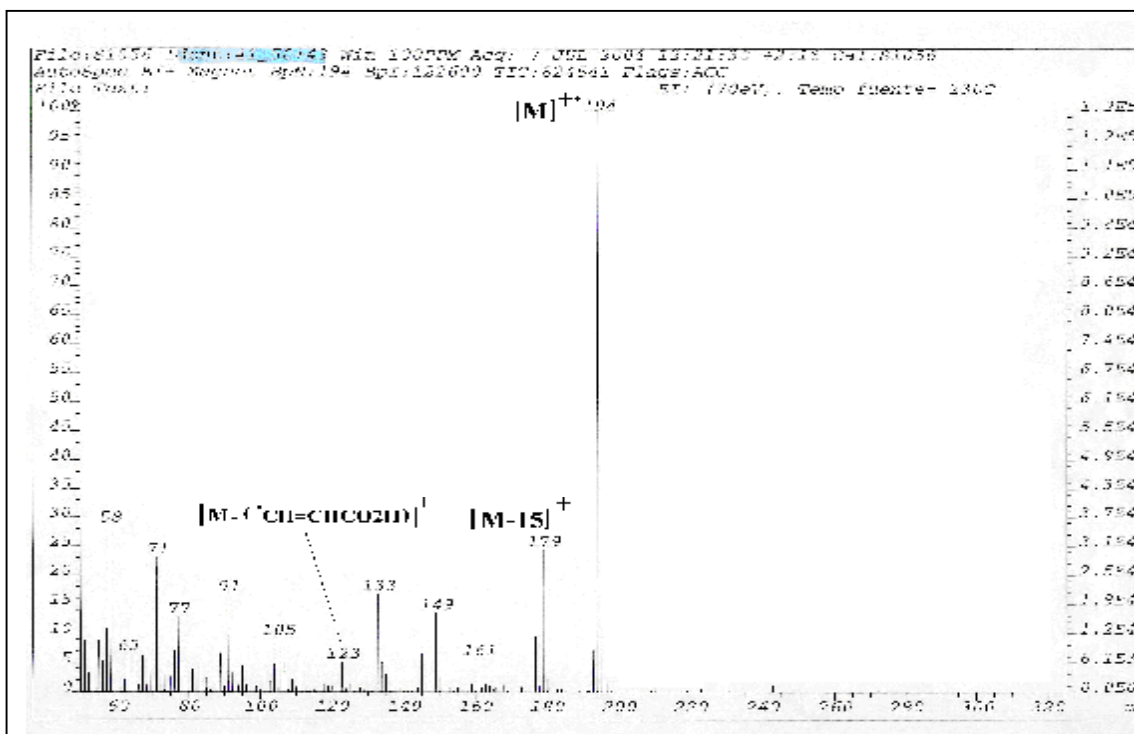
Ce même spectre montre la présence de deux atomes de carbone aromatiques oxygénés à $\delta = 147,8$ ppm et $\delta = 149,1$ ppm attribuables au carbones C-3 du cycle aromatique portant le groupement méthoxyle et au carbone C-4 de ce même cycle aromatique qui ne peut être substitué que par un groupement hydroxyle respectivement. Ainsi le groupement acide ne peut être lié qu'à l'enchaînement CH=CH.

Cette hypothèse est confirmée par l'étude du spectre de masse (spectre n° IV.1.B12.4) qui montre en particulier la perte du radical ($\cdot\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{H}$) $m/z = 123$ Da et la formation de l'ion à $m/z = 71$ Da.

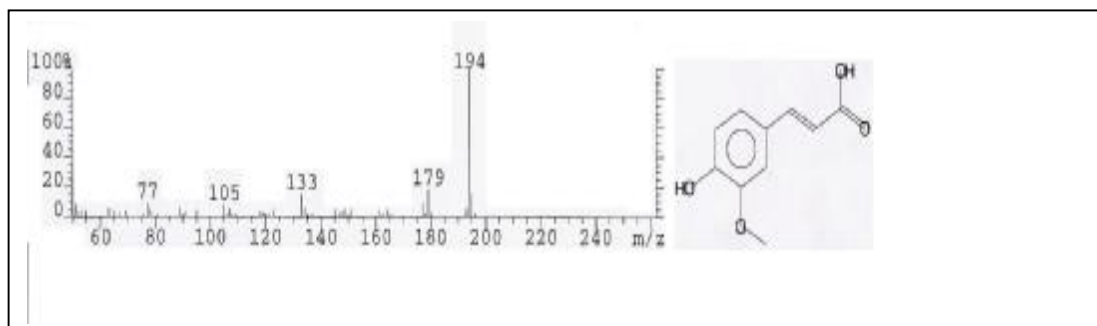
La recherche et la comparaison avec les spectres des banques de données de NIST et WILEY, confirment bien notre analyse, en affichant un spectre très similaire à celui de notre molécule et la même structure (spectre n° IV.1.B12.5).



Spectre n° IV.1.B12.3: Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, Acetone- d_6 , δ ppm) du composé AC 11.6



Spectre n IV.1.B12.4: Spectre SMIE du composé AC 11.6



Spectre n IV.1.B11.5: Spectre SMIE avec structure de la littérature (NIST et WILEY) du composé AC 11.6

L'ensemble des données de RMN-¹H, RMN-¹³C et SMIE en accord avec celles de la littérature [33-35] sont reporté dans les tableaux : n° IV.1.B12.a , n° IV.1.B11.b et n° IV.1.B12.c

Tableau n° IV.1.B11.a : Données de la spectroscopie RMN ¹H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7,59	1H	d(16)	H-7
7,33	1H	d	H-2
7,13	1H	dd (8,1)	H-6
6,87	1H	d(8,1)	H-5
6,37	1H	d(16)	H-8
3,92	3H	s	OCH ₃

Tableau n° IV.1.B12.b : Données de la RMN ¹³C :

δ (ppm)	55,4	110,4	115,1	122,9	126,6	144,9	147,8	149,1	167,3
C	OCH ₃	C-2	C-5/C-8	C-6	C-1	C-7	C-3	C-4	C-9

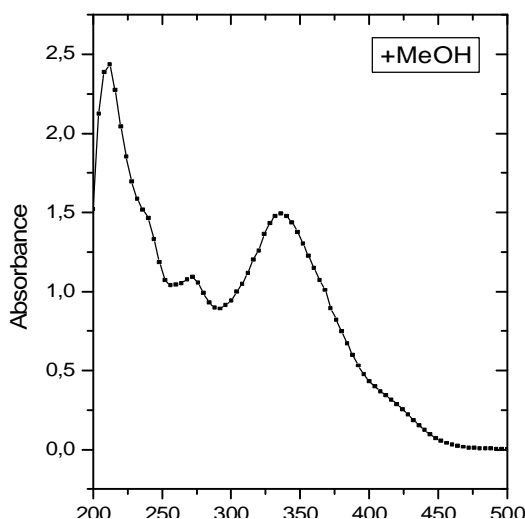
Tableau n° IV.1.B11.c : Les fragments du spectre de masse EI

M ⁺⁺	[M-15] ⁺	[M-15-18] ⁺	[M-45] ⁺	[M-71] ⁺	[M-123] ⁺	[M-71-18] ⁺
194	179	161	149	123	71	105

IV.1.B13: Elucidation structurale du composé L10-4

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

Le spectre d'absorption ultraviolette enregistré dans le méthanol (spectre n° IV.1.B13.1) montre deux bandes caractéristiques d'un flavonoïde, la bande I à $\lambda_{\max} = 350$ nm, est en faveur d'un flavonol substitué en position 3.

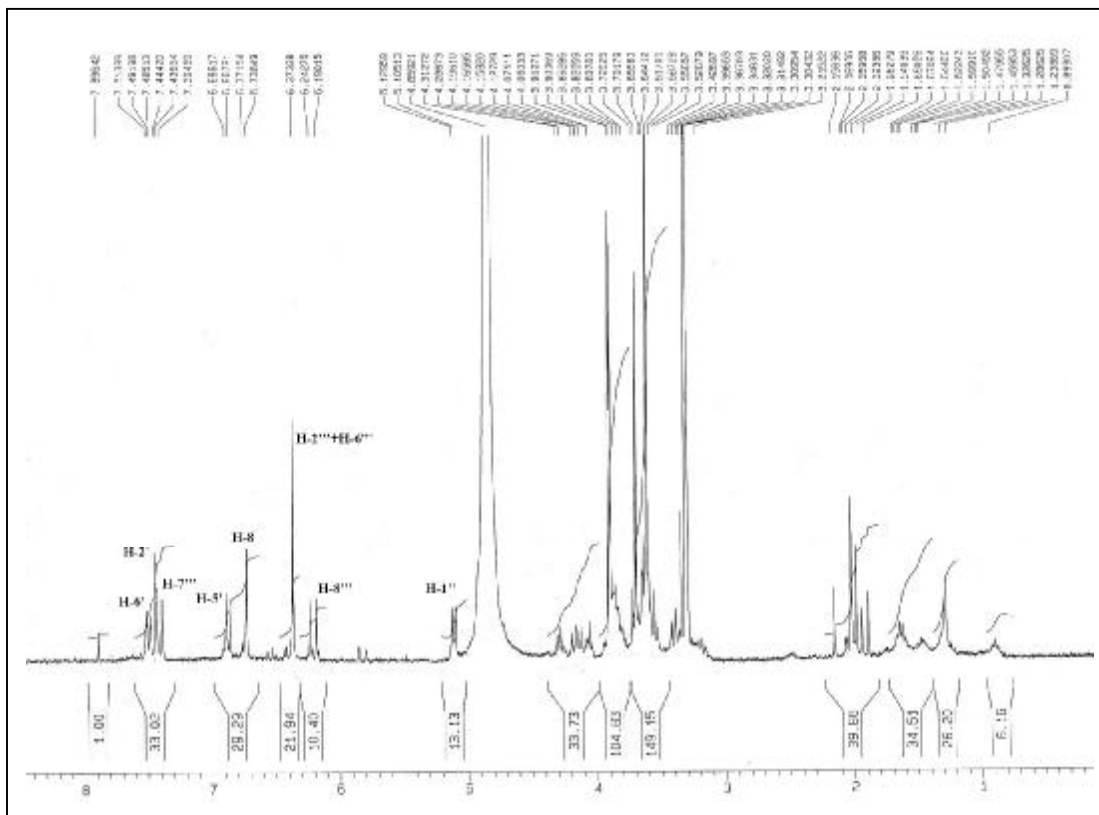


Spectre n° IV.1.B13.1: spectre UV du composé L10-4 dans le méthanol

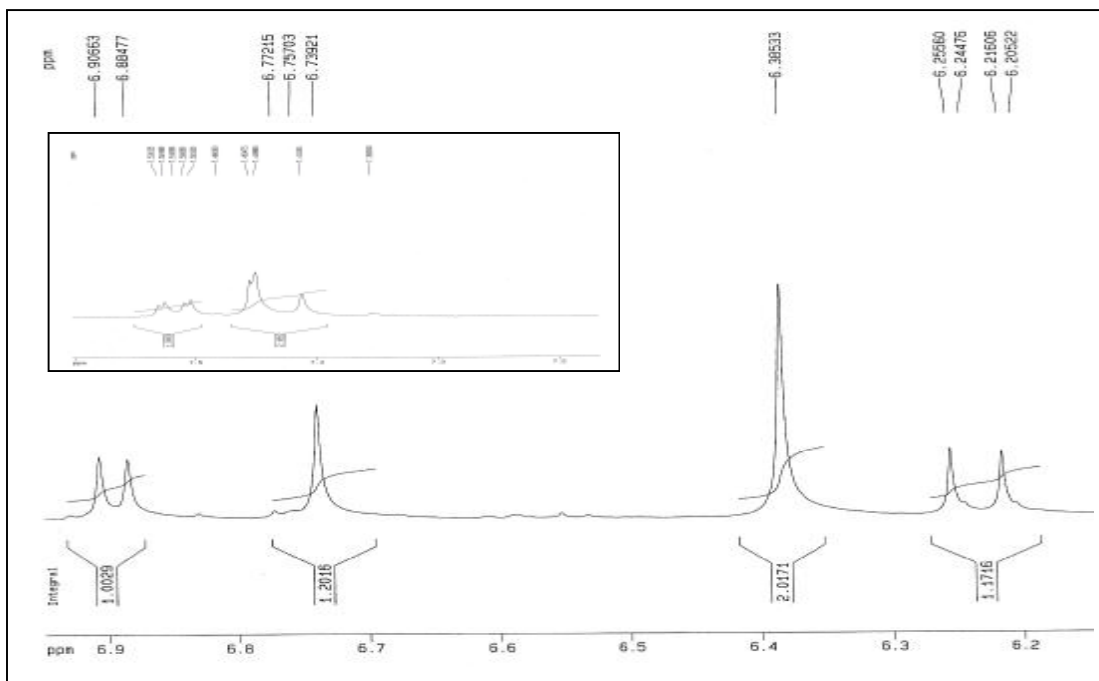
Le spectre RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) (spectre n°IV.1.B13.2) et son étalement (spectre n°IV.1.B12.2') donnent les indications suivantes

- Un signal sous forme d'un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta = 7,52$ ppm ($J = 8,7 ; 2,2$ Hz) attribuable à H-6'.
- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,45$ ppm ($J = 2,2$ Hz) attribuable à H-2'.
- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,90$ ppm ($J = 8,7$ Hz) attribuable à H-5'.
- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,74$ ppm attribuable soit à H-6 ou à H-8 selon la substitution du cycle A.

Ces signaux confirment une disubstitution du noyau B en 3' et 4' et une autre substitution du noyau A soit en 6 ou en 8.



Spectre n° IV.1.B13.2 : Spectre RMN ^1H (400 MHz ; CD_3OD ; δ ppm) du composé L10-4



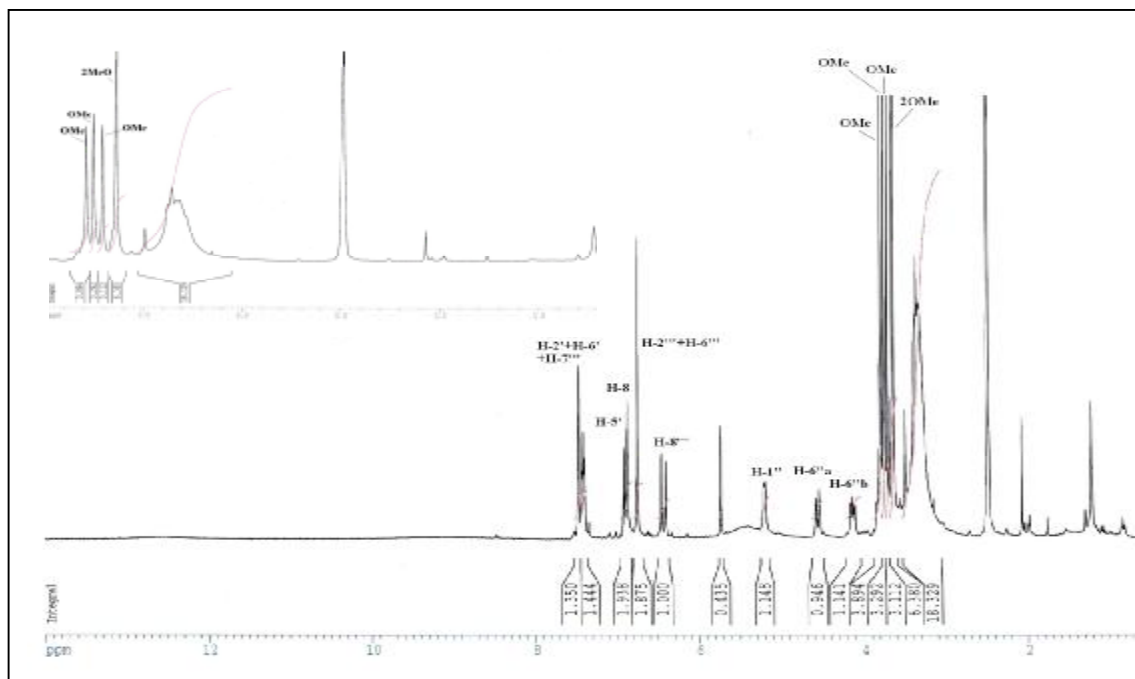
Spectre n° IV.1.B13.2' : Spectre RMN ^1H étalé (400 MHz ; CD_3OD ; δ ppm) du composé L10-4

Ce même spectre montre également, toujours dans la zone aromatique, la présence de:

- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 2H à $\delta = 6,38$ ppm.
- Deux signaux sous forme d'un système AB à $\delta = 7,42$ ppm et $\delta = 6,24$ ppm ($J = 15,6$ Hz) attribuable à un groupement CH=CH de configuration trans.

Par ailleurs on note sur le même spectre la présence entre autre de quatre signaux. Réenregistré dans le DMSO-d₆ (spectre n° IV.1.B12.3) ces quatre signaux apparaissent clairement sous forme de:

- Trois singulets d'intégration 3H chacun à $\delta = 3,93$, $\delta = 3,91$ et $\delta = 3,71$ ppm montrant ainsi la présence de trois méthoxyles magnétiquement non équivalents.
- Un singulet d'intégration 6H à $\delta = 3,64$ ppm indiquant la présence de deux méthoxyles magnétiquement équivalents.

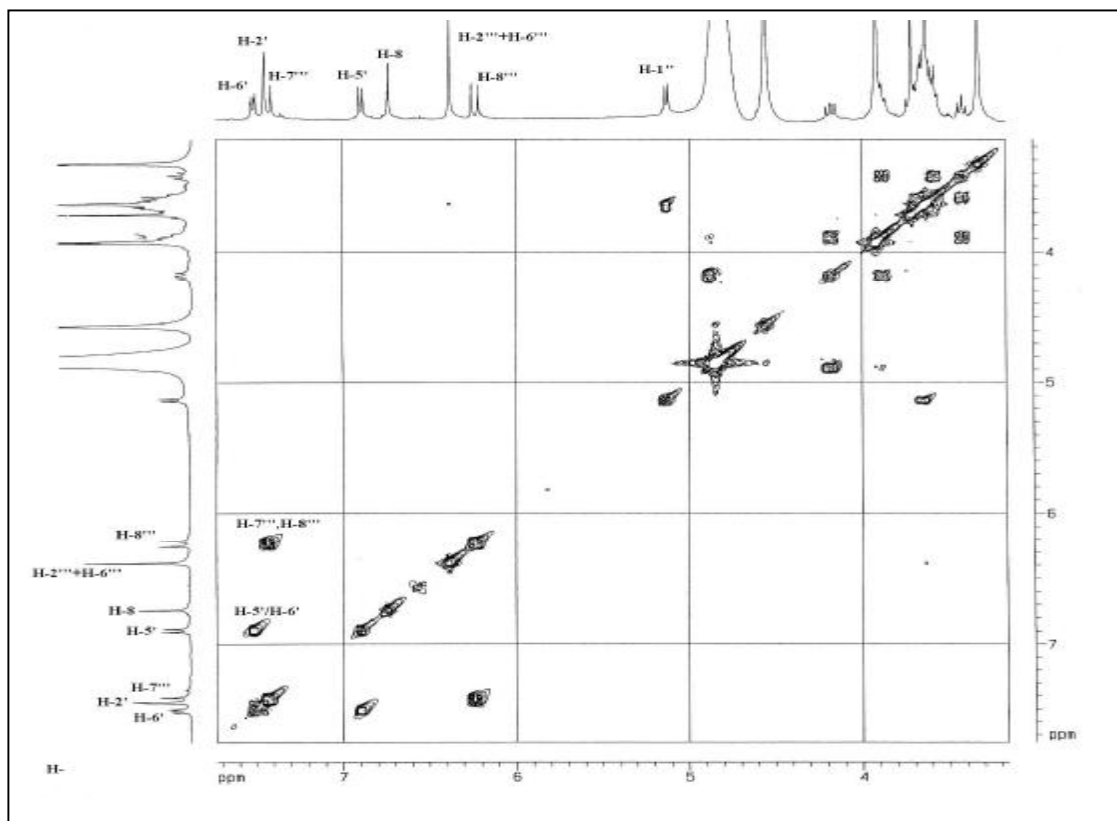


Spectre n° IV.1.B13.3: Spectre RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm) du composé L10-4

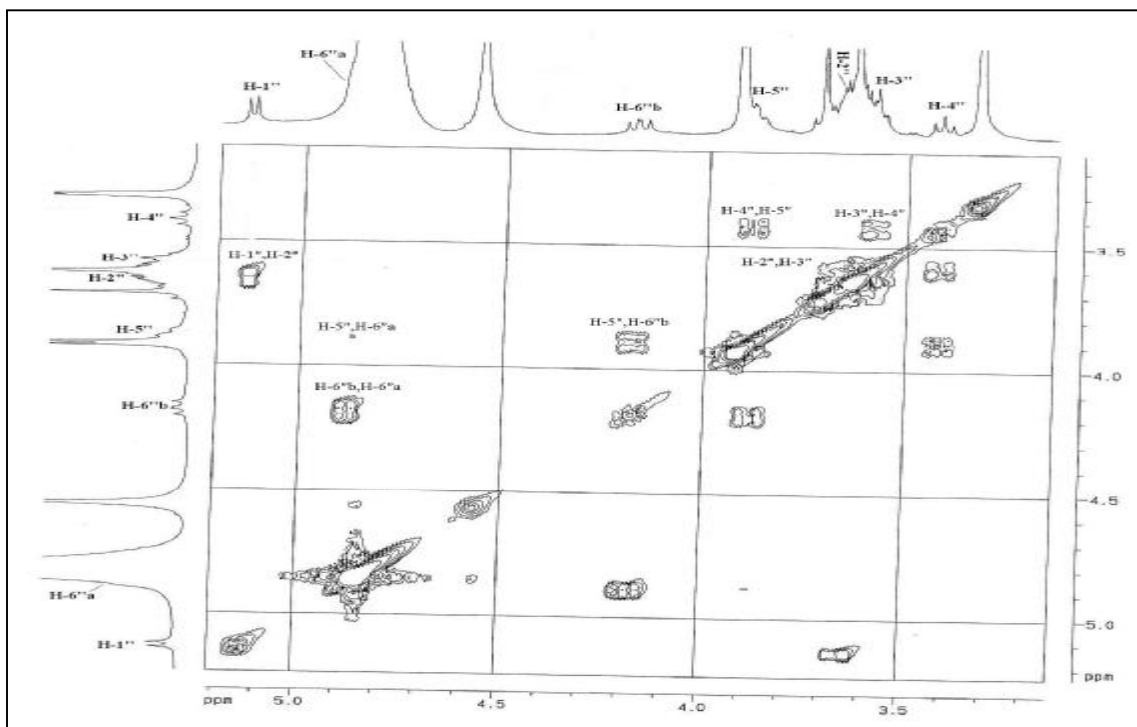
Le réexamen du spectre RMN ¹H (spectre n° IV.1.B13.2) montre la présence d'un signal sous forme de doublet ($J = 7,5$ Hz) à $\delta = 5,13$ ppm caractéristique d'un proton anomérique (H-1'') d'un glycosyle de type glucopyranose ou galactopyranose. Cette hypothèse est appuyée par la présence de groupements CH oxygénés dans ce même spectre.

L'examen du spectre COSY ^1H - ^1H enregistré dans CD_3OD et ses étalements (spectre n° IV.1.B13.4 et n° IV.1.B13.4') permet en effet de mettre en évidence:

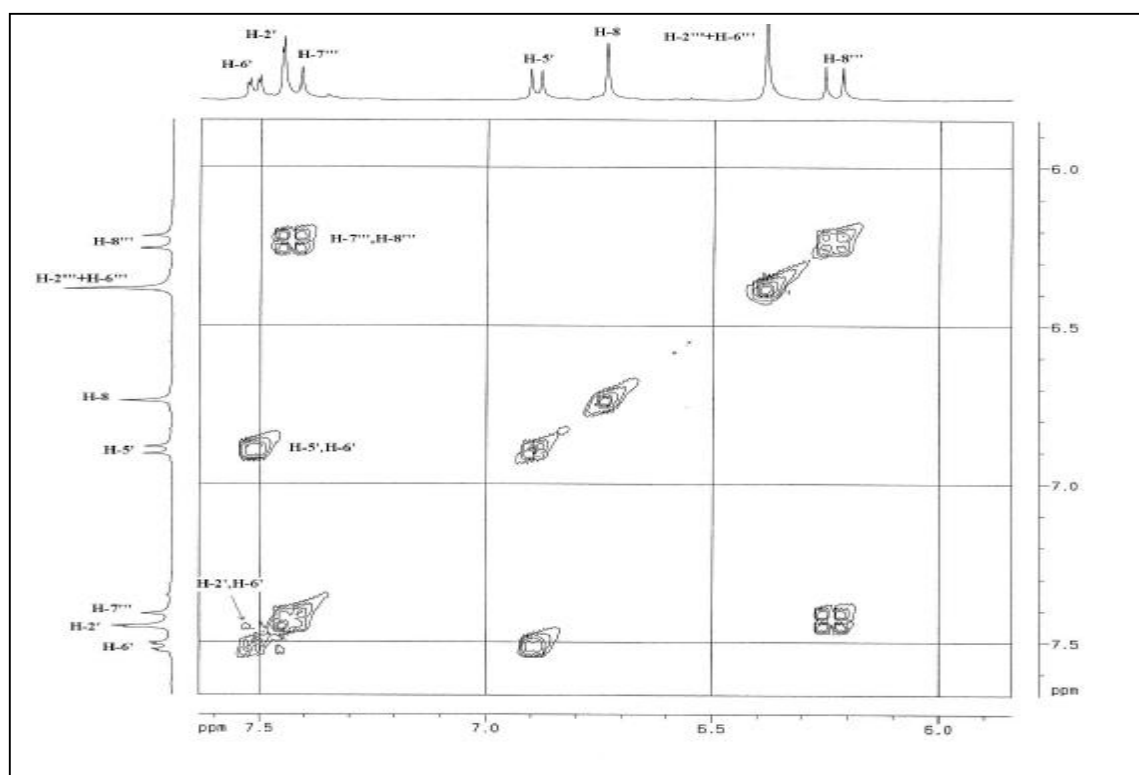
- La présence de H-2'' dans la zone ($\delta = 3,63$ à $3,65$ ppm) sous forme d'un multiplet partiellement recouvert par d'autres signaux, par sa corrélation avec le H-1''.
- La localisation de H-2'' permet d'attribuer H-3'' au signal sous forme de multiplet dans la zone ($\delta = 3,56 - 3,61$ ppm).
- Ce dernier noyau permet par sa corrélation l'attribution de H-4'' à $\delta = 3,42$ ppm. Ce signal apparaissant sous forme d'un triplet ($J = 9,0$ Hz) suppose une orientation axiale pour ce proton. Cette donnée est par conséquent en faveur d'un groupement glucopyranosyle.
- L'attribution de H-4'' permet à son tour de localiser H-5'' sous forme d'un triplet de doublet ($J = 9,0 ; 2,3$ Hz) à $\delta = 3,89$ ppm.
- Ce dernier noyau (H-5'') mène à l'attribution de H-6''b à $\delta = 4,18$ ppm sous forme de doublet de doublets ($J = 11,6 ; 9,0$ Hz) et à H-6''a à $\delta = 4,85$ ppm recouvert par le signal de l'eau de contamination du méthanol deutérié.



Spectre n° IV.1.B13.4: Spectre COSY ^1H - ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé L10-4



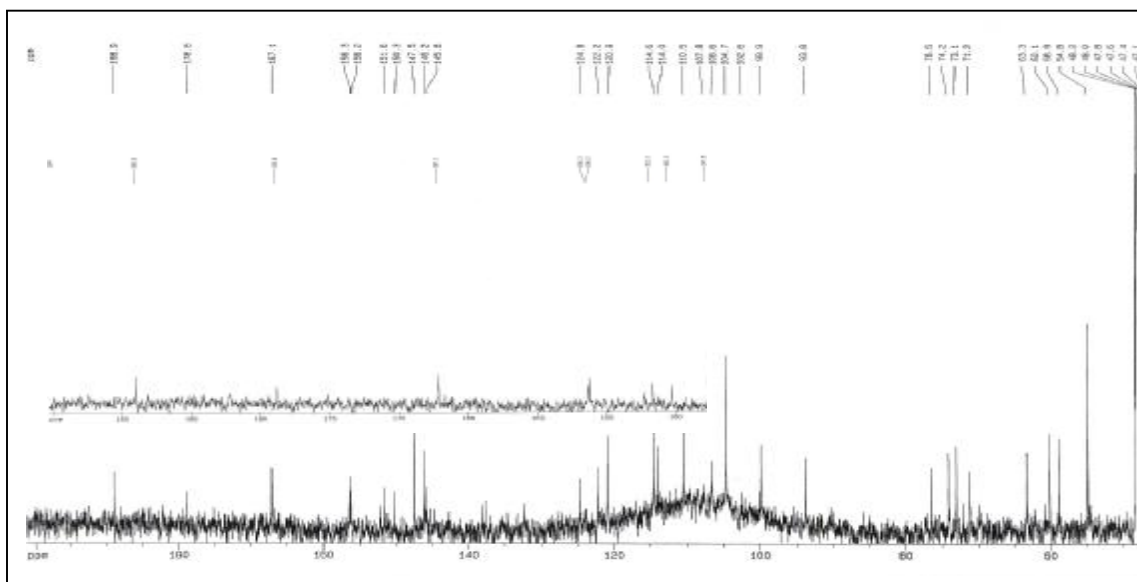
Spectre n° IV.1.B13.4': Spectre COSY ¹H-¹H étalé de 3 à 5 ppm
(400 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé L10-4



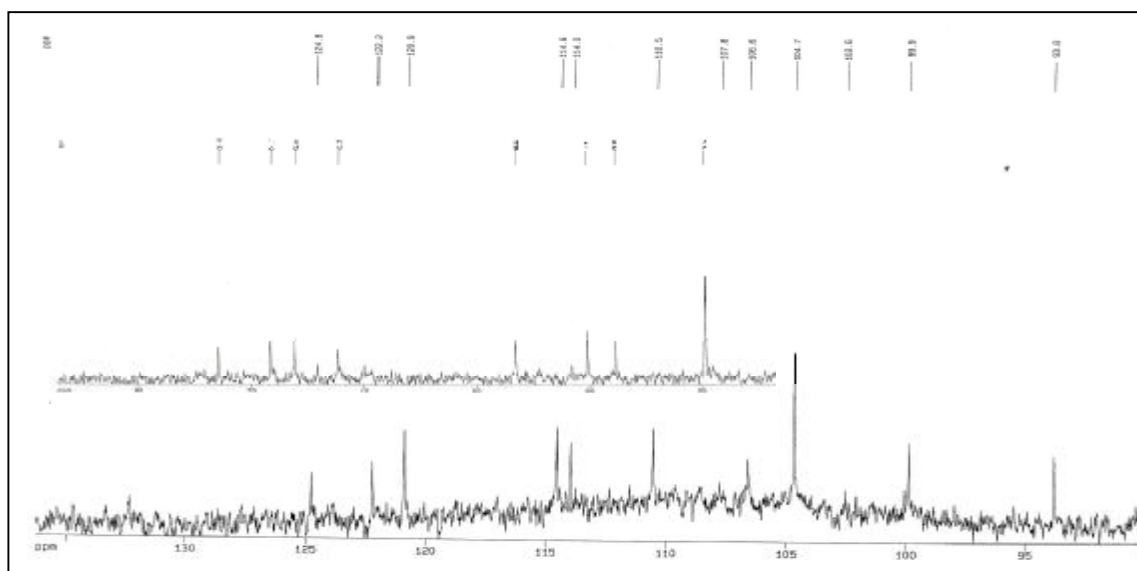
Spectre n° IV.1.B13.4'': Spectre COSY ¹H-¹H étalé de 5 à 8 ppm
(400 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé L10-4

Dans le spectre (RMN¹H) enregistré dans le DMSO-d₆ (spectre n° IV.1.B12.3), le signal de H-6'' apparaît clairement sous forme d'un doublet large ($J = 11,6$ Hz).

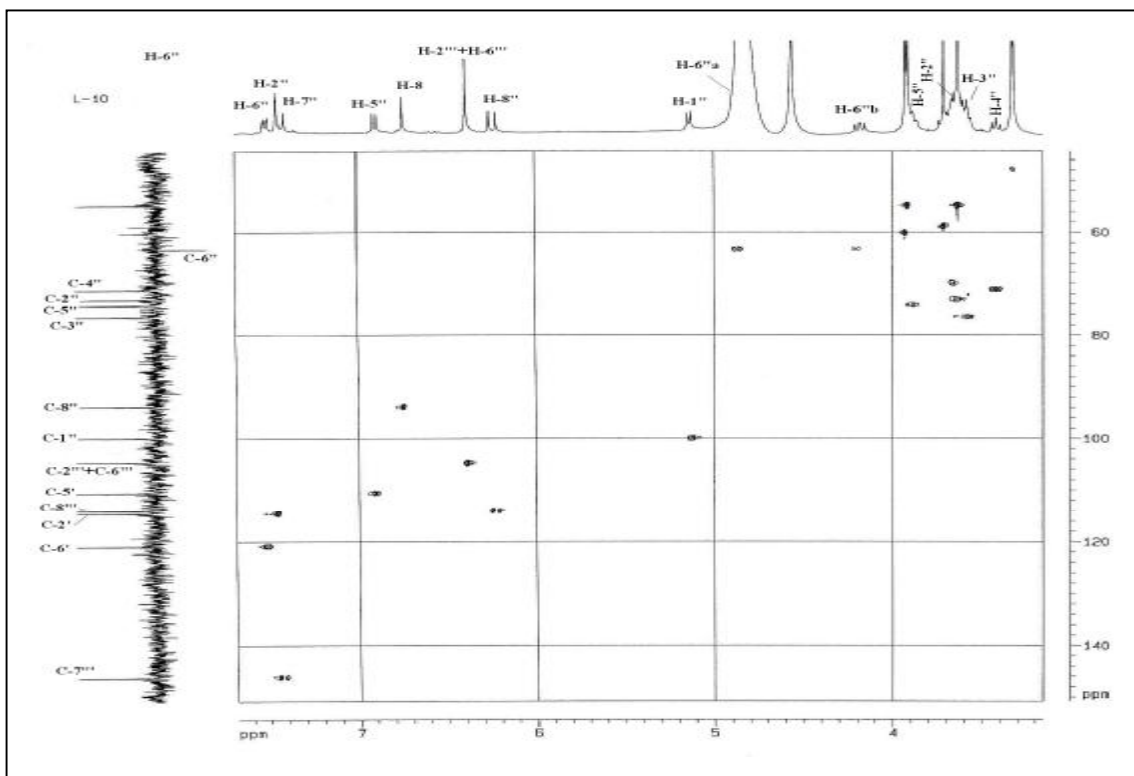
L'examen du spectre RMN ¹³C (spectre n° IV.1.B12.5) et son étalement (spectre n° IV.1.B12.5') ainsi que le spectre de l'expérience HSQC (spectre n° IV.1.B12.6) et son étalement (spectre n° IV.1.B12.6') permet de localiser les noyaux C-2', C-6', C-5' et C-6 ou C-8 du noyau flavonique à $\delta = 114,6$; 120,9 ; 110,5 et 93,8 ppm respectivement et les C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' du glucopyranosyle à $\delta = 99,9$; 73,1 ; 76,5 ; 71,2 ; 74,2 et 63,3 ppm respectivement.



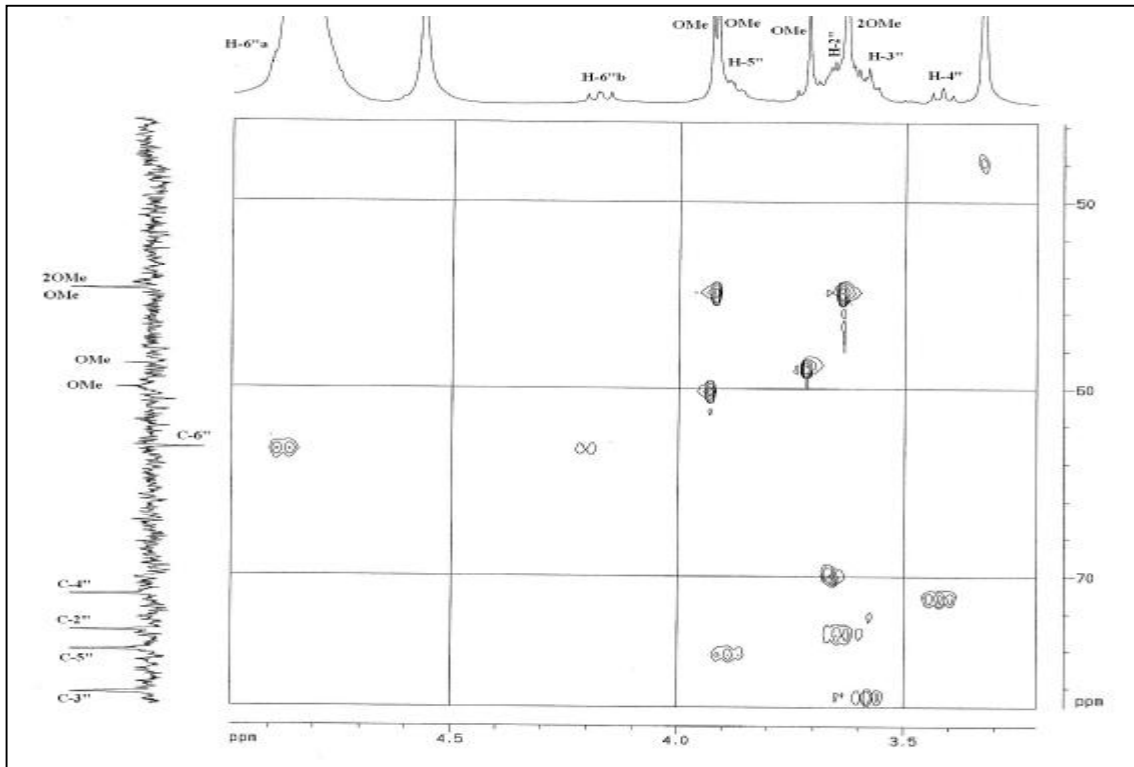
Spectre n° IV.1.B13.5: Spectre ¹³C (100 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé L10-4



Spectre n° IV.1.B13.5': Spectre ¹³C (100 MHz, CD₃OD, δ ppm) étalé ente 90 et 140 ppm du composé L10-4

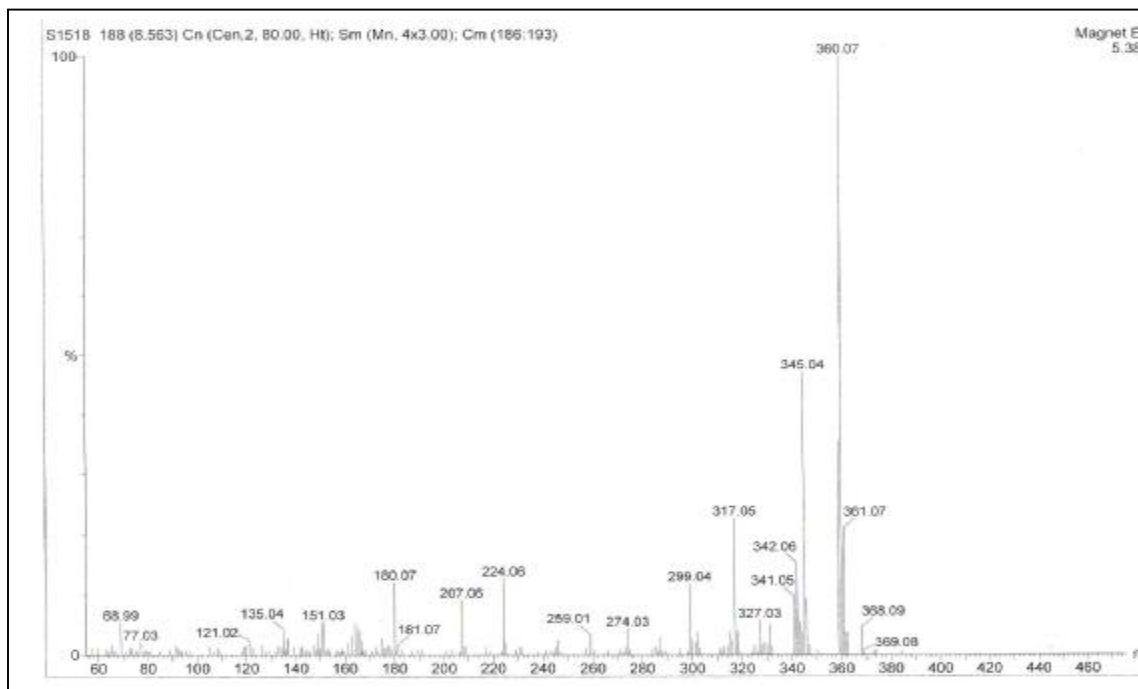


Spectre n° IV.1.B13.6: Spectre HSQC (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé L10-4



Spectre n° IV.1.B13.6': Spectre HSQC (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) étalé entre 3 et 5 ppm du composé L10-4

La valeur du déplacement chimique de C-1'' indique que l'aglycone est relié au sucre par un pont oxygène (-O-). La présence de ce type de jonction peut être déduite du spectre de masse (spectre IV.1.B12.7) enregistré en mode impact électronique à haute résolution donnant un pic $m/z = 360,01818$ Da, correspondant à une formule brute $C_{18}H_{16}O_8$ dont la masse calculée est de 360,0845 soit un flavonoïde triméthoxylé.



Spectre n° IV.1.B13.7: Spectre de masse IE à haute résolution du composé L10-4

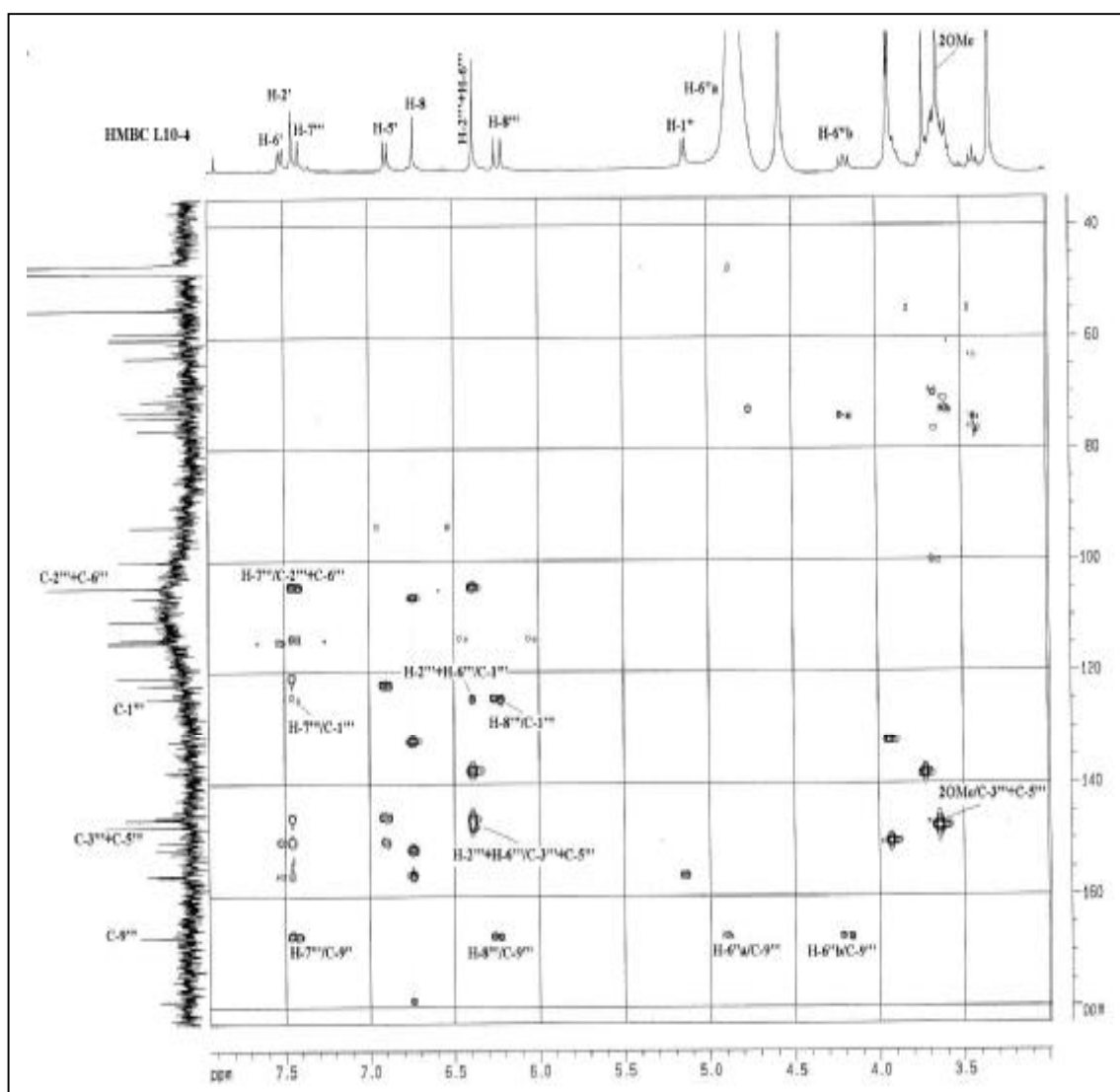
Par ailleurs le spectre HSQC (spectre n° IV.1.B13.6) montre une corrélation des deux protons d'intégration 2H précédemment cité et le carbone à $\delta = 104,7$ ppm supposant la présence de deux atomes de carbone aromatiques non substitués et magnétiquement équivalents dans cette structure.

Cette donnée additionnée au fait que cette molécule comporte deux groupements méthoxyles magnétiquement équivalents suppose la présence d'un cycle aromatique symétriquement substitué par deux groupements méthoxyles et comportant 2 H.

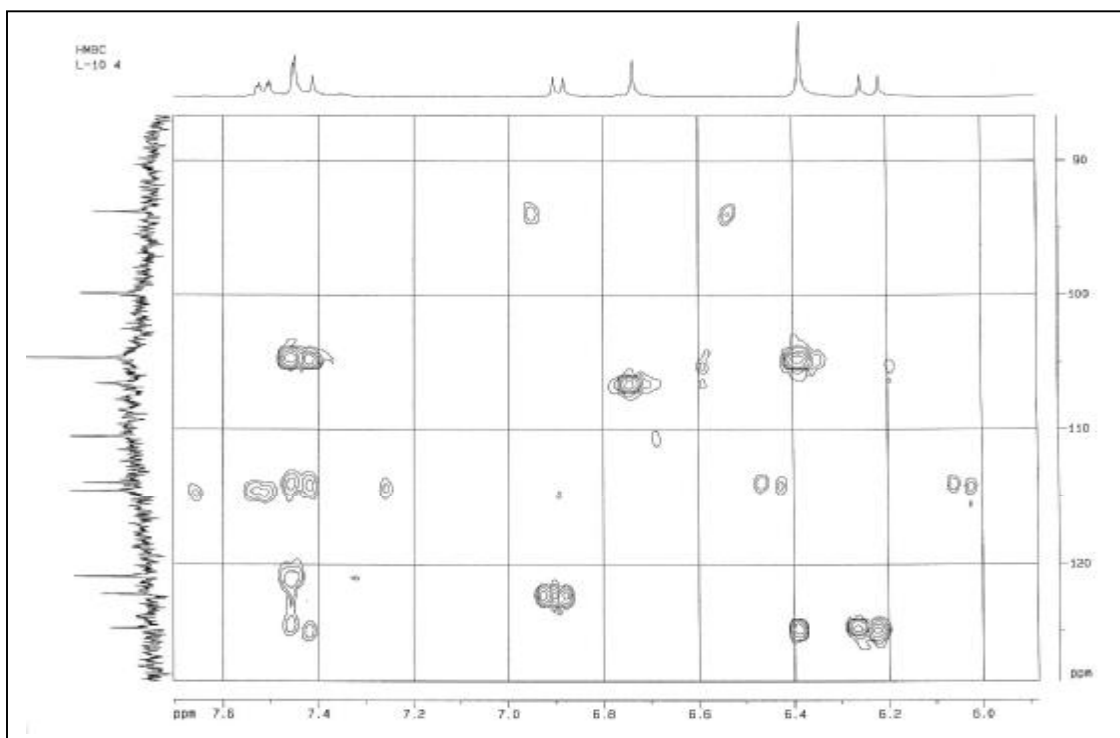
Le carbone en position 4 du cycle aromatique serait substitué par un groupement qui ne peut être qu'un hydroxyle. Le spectre HSQC (spectre n° IV.1.B13.6) permet également d'attribuer les carbones $CH=CH$ aux signaux à $\delta = 114,0$ et $146,2$ ppm. Par ailleurs, le spectre RMN ^{13}C (spectre n°IV.1.B12.5) montre entre autre la présence d'un groupement (C=O) d'ester conjugué à $\delta = 167,1$ ppm.

L'examen du spectre de l'expérience HMBC (spectre n° IV.1.B13.8.1) et son étalement (spectre n° IV.1.B13.8.2) montrent les corrélations entre le proton du groupement CH=CH à $\delta = 7,43$ ppm et les deux atomes de carbone magnétiquement équivalents à $\delta = 104,7$ ppm permettant ainsi de relier la double liaison au noyau aromatique et de positionner les deux méthoxyles substituant le noyau aromatique sur les atomes de carbone C-3''' et C-5'''.

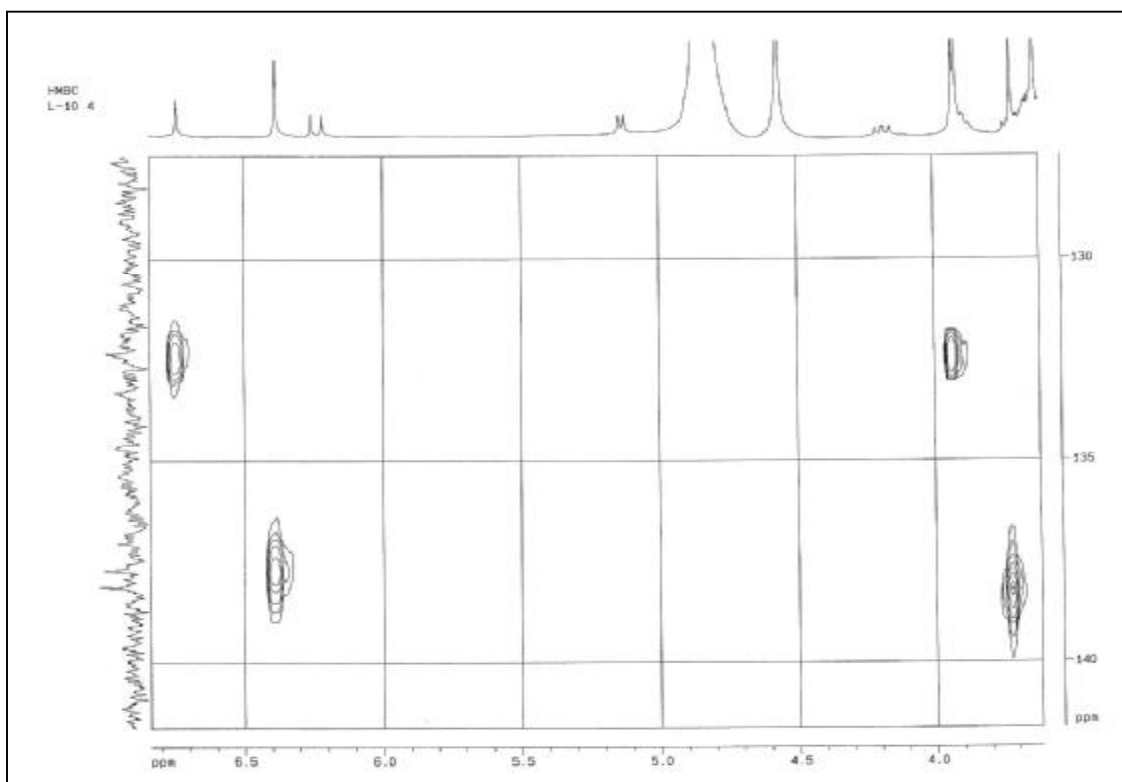
Par ailleurs les deux protons de ce noyau aromatique (H-2''' et H-6''') donnent une tache de corrélation avec le carbone à $\delta = 137,5$ ppm attribuable par conséquent à C-4''' et confirmant ainsi vu la valeur de son déplacement chimique, son hydroxylation (spectre n° IV.1.B12.8.3). Ces protons corrélient également avec un carbone quaternaire à $\delta = 124,8$ ppm, permettant ainsi son attribution à C-1''' (spectre n° IV.1.B13.8.2).



Spectre n° IV.1.B13.8.1: Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé L10-4

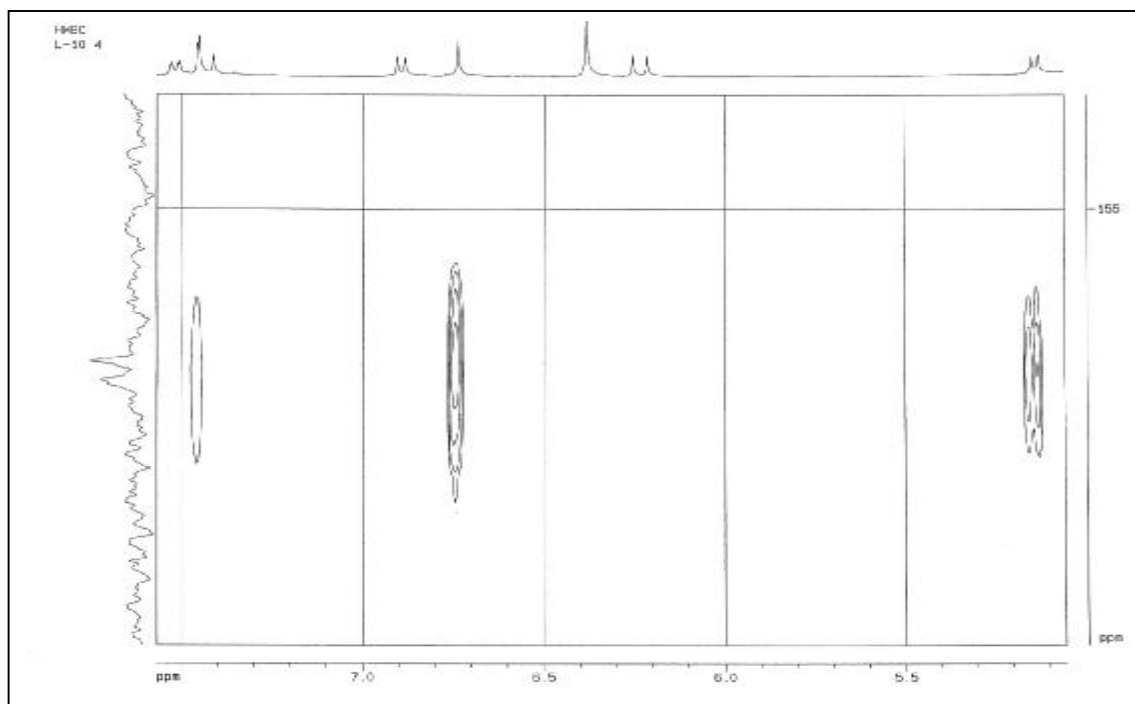


Spectre n° IV.1.B13.8.2: Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) étalé entre 6 et 7,6 ppm du composé L10-4



Spectre n° IV.1.B13.8.3: Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) étalé entre 3 et 7 ppm du composé L10-4

ce noyau par le groupement 6''-sinapyl-*O*- β -D- glucopyranosyle. Par ailleurs, ce carbone montre une tache de corrélation avec le proton supposé être H-6 ou H-8, ceci n'est possible que si le groupement glucoside est sur le cycle A du flavonoïde. Vu la valeur du déplacement chimique de ce carbone et tenant compte de la présence d'un OH libre en position C-5, ce carbone ($\delta = 156,2$ ppm) ne peut être que le C-7. De cette donnée on peut déduire que la position C-3 comporte un groupement méthoxylé.

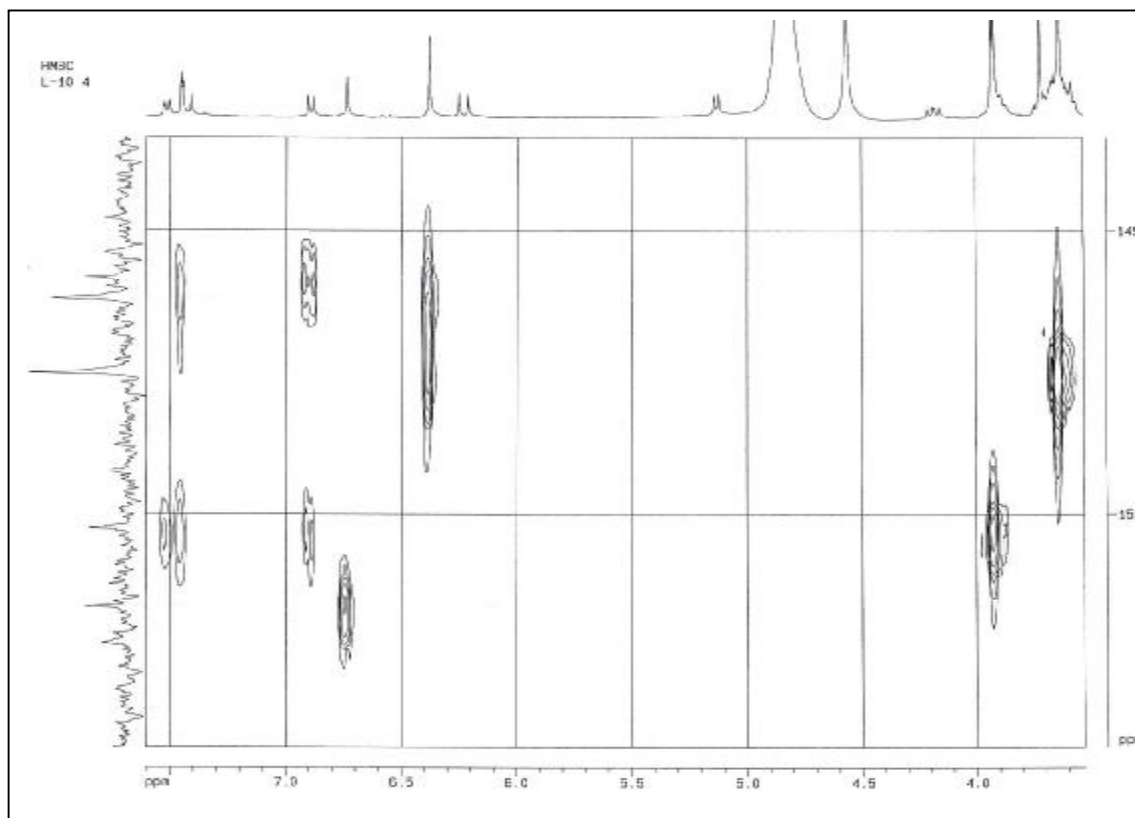


Spectre n° IV.1.B13.8.4: Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) étalé entre 5 et 7,5 ppm du composé L10-4

Un retour au spectre HMBC étalé (spectre n° IV.1.B13.8.3) on observe une corrélation des protons du méthoxyle à $\delta = 3,93$ ppm et le carbone à $\delta = 132,2$ ppm supposant une méthylation de ce carbone. Par ailleurs ce carbone corrèle avec le proton H-6 ou H-8. Ces données orientent vers la présence d'un groupement méthoxyle sur le cycle A, ce groupement ne peut être qu'en C-6 ou C-8.

A ce stade de notre étude, on en déduit la présence d'un groupement hydroxyle et d'un groupement méthoxyle sur le cycle B notamment en position C-3' et C-4'.

Un examen du spectre de l'expérience HMBC étalé (spectre n° IV.1.B12.8.5) permet de placer le groupement méthoxyle en position C-4' grâce à la corrélation des protons du méthoxyle à $\delta = 3,91$ ppm et du carbone quaternaire à $\delta = 150,3$ ppm attribuable à ce noyau grâce à ses corrélations avec H-2' et H-6'. Par conséquent le carbone ($\delta = 145,8$ ppm) repéré grâce à sa corrélation avec H-5' est hydroxylé et attribuable à C-3'.



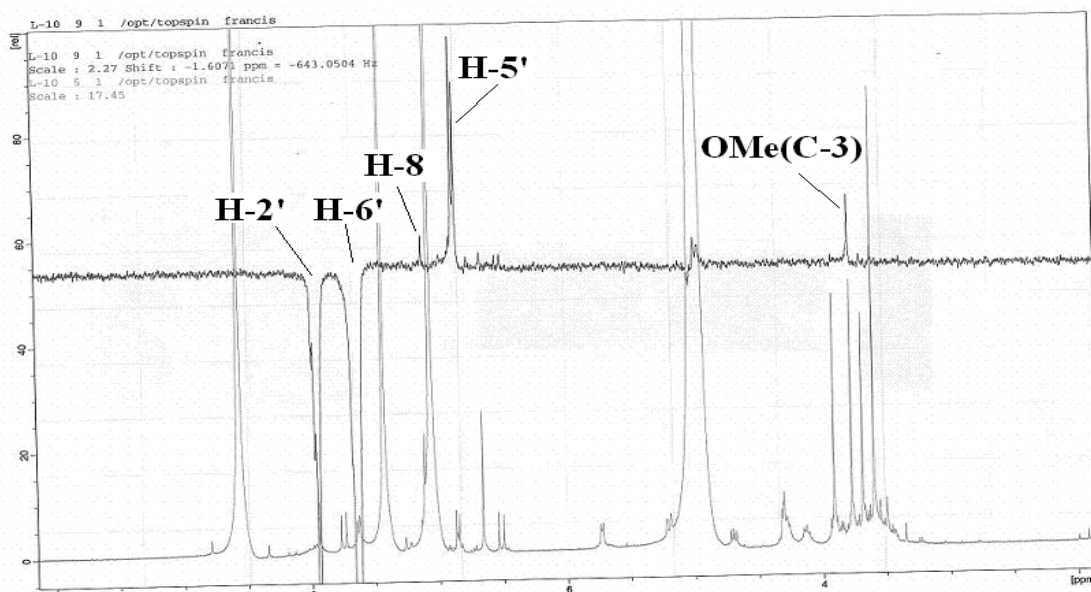
Spectre n° IV.1.B13.8.5: Spectre HMBC (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) étalé entre 3,5 et 7,5 ppm du composé L10-4

Pour compléter l'élucidation structurale de ce composé notamment positionner définitivement le méthoxyle du cycle A du flavonoïde (en C-6 ou C-8), l'examen du spectre de l'expérience GOESY (spectre n° IV.1.B12.10.1 et spectre n° IV.1.B12.10.2) (NOESY sélective avec gradient) enregistré dans la pyridine-d₅. Après irradiation sélective des noyaux H-6' et H-2', une augmentation du signal de H-5' est observée ce qui était attendu, ainsi que l'augmentation du proton du cycle A du flavonoïde. Ceci signifiant la présence d'une corrélation du type NOE entre ces noyaux indiquant que ce proton ne peut être que H-8. Par conséquent le méthoxyle se trouve en position C-6 ($\delta_C = 132,2$ ppm). Par ailleurs, ce spectre montre une augmentation du signal du méthoxyle à $\delta_H = 3,71$ ppm confirmant sa position en C-3.

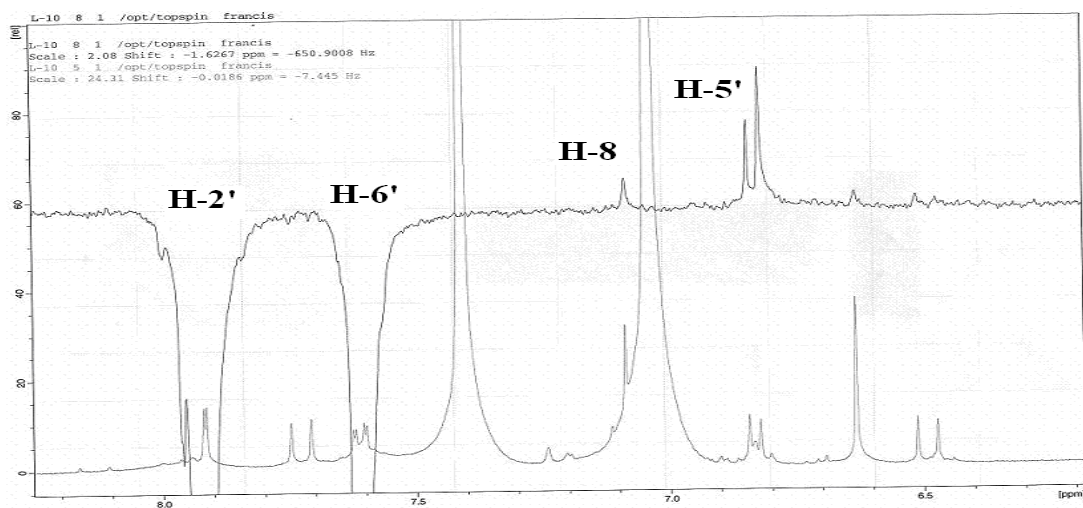
Une étude complète des spectres étalés de l'expérience HMBC et des autres spectres permet d'attribuer les carbones quaternaires restants.

- ü C-3 ($\delta = 138,0$ ppm) grâce à sa corrélation avec les protons du méthoxyle restant ($\delta = 3,71$ ppm) (spectre n° IV.1.B13.8.3),
- ü C-1' ($\delta = 122,2$ ppm) grâce à sa corrélation avec H-5' (spectre n° IV.1.B13.8.2),
- ü C-9 ($\delta = 151,6$ ppm) grâce à sa corrélation avec H-8 (spectre n° IV.1.B13.8.5),

- ü C-2 ($\delta = 156,3$) grâce à sa corrélation avec H-2' (spectre n° IV.1.B13.8.4),
- ü C-10 ($\delta = 106,6$ ppm) grâce à sa corrélation avec H-8 et la valeur de son déplacement chimique (spectre n° IV.1.B13.8.2),
- ü C-4 ($\delta = 178,8$ ppm) grâce à sa corrélation avec H-8 et la grande valeur de son déplacement chimique (spectre n° IV.1.B13.8.1),
- ü C-7''' ($\delta = 146,2$ ppm) grâce à sa corrélation avec H-2''' et H-6''' (spectre n° IV.1.B13.8.5),
- ü C-8''' ($\delta = 114,0$ ppm) du spectre HSQC (CD₃OD, 400 MHz).



Spectre n° IV.1.B13.10.1: Spectre GOESY (400 MHz, pyridine-d₅, δ ppm) du composé L10-4



Spectre n° IV.1.B13.10.2: Spectre GOESY étalé entre (6,5 et 8,5 ppm) (400 MHz, pyridine-d₅, δ ppm)

L'ensemble de ces données mène à la structure reportée dans le schéma (n° IV.1.B13)

L'on peut nommer: **7-(6''-sinapyl-O-β-D glucopyranosyle) centaureidine**

Cette molécule est nouvelle et n'a jamais été décrite dans la littérature. Nous lui proposons le nom d'**Africanine**

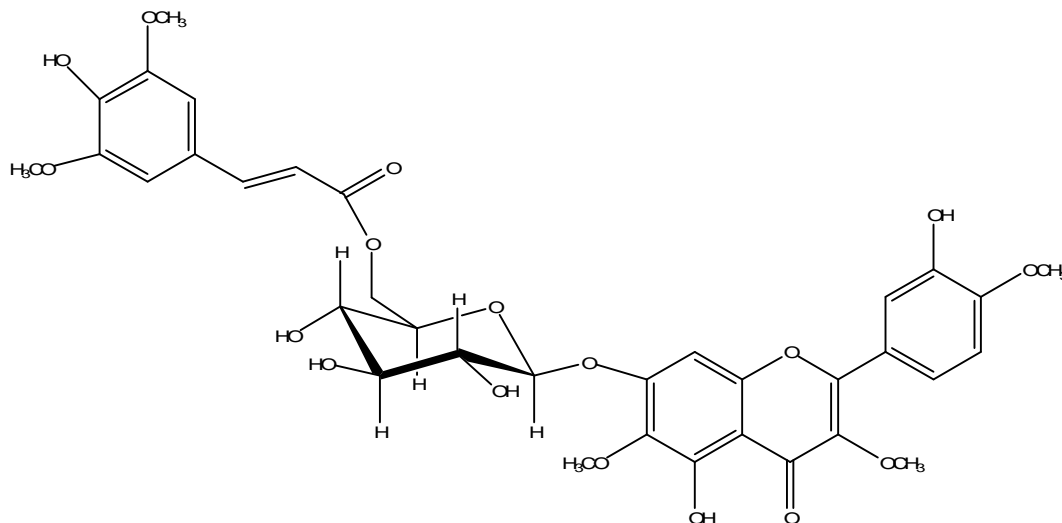


Schéma n° IV.1.B13: 7-(6''-sinapyl-O-β-D- glucopyranosyle) centaureidine (AFRICANINE)

Les tableaux (n° IV.1.B13.a ; n° IV.1.B13.b) rassemblent les données spectroscopiques relatives à cette molécule.

Tableau n°IV.1.B13.a : Données de la RMN ¹H et les corrélations COSY

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution	Couplage ¹ H- ¹ H
7,52	1H	<i>dd</i> (8,7 ; 2,2)	H-6'	H-5' et H-2'
7,45	1H	<i>d</i> (2,2)	H-2'	H-6'
7,43	1H	<i>d</i> (15,6)	H-C=	H-C=
6,90	1H	<i>d</i> (8,7)	H-5'	H-6'
6,74	1H	<i>s</i>	H-3/H-6/H-8	/
6,38	2H	<i>s</i>	H-2'''+H-6'''	/
6,24	1H	<i>d</i> (15,6)	H-C=	H-C=
3,93	3H	<i>s</i>	OCH ₃ - 4'	/
3,91	3H	<i>s</i>	OCH ₃ - 6	/
3,71	3H	<i>s</i>	OCH ₃ - 3	/
3,64	6H	<i>s</i>	2OCH ₃ -5''' et 3'''	/
5,13	1H	<i>d</i> (7,6)	H-1''	H-2''
4,85	1H	<i>d.lar</i> (11,6 ; DMSO)	H-6''a	H-5'' et H-6''b
4,18	1H	<i>dd</i> (11,6 ; 9,0)	H-6''b	H-5'' et H-6''a
3,89	1H	<i>td</i> (9,0 ; 2,3)	H-5''	H-4'' et 2H-6''
3,63-3,65	1H	<i>m</i>	H-2''	H-1'' et H-3''
3,56-3,61	1H	<i>m</i>	H-3''	H-2'' et H-4''
3,42	1H	<i>t</i> (9,0)	H-4''	H-3'' et H-5''

Tableau n°IV.1.B13.b : Données de la RMN ¹³C et corrélation HMBC

Déplacement chimique δ (ppm)	Attribution	HMBC (H – C)
156,3	C-2	H-2', H-6'
138,0	C-3	OCH ₃ (3,71 ppm)
178,8	C-4	H-6
152,3	C-5	/
132,2	C-6	H-8, OCH ₃ (3,91 ppm)
156,2	C-7	H-8, H-1''
93,8	C-8	/
151,6	C-9	H-8
106,6	C-10	H-8
122,2	C-1'	H-2'
114,6	C-2'	H-6'
145,8	C-3'	H-5'
150,3	C-4'	H-2', H-5', H-6', OCH ₃ (3,93 ppm)
110,5	C-5'	/
120,9	C-6'	H-2'
99,9	C-1''	H-2'', H-6''a
73,09	C-2''	H-3'', H-6''a
76,46	C-3''	H-4'', H-5''
71,18	C-4''	H-3''
74,17	C-5''	H-1'', H-4'', H-6''b
63,03	C-6''	H-4''
124,8	C-1'''	H-2''', H-6''', H-7''', H-8'''
104,7	C-2'''	H-6''', H-7'''
147,5	C-3'''	H-2''', OCH ₃ (3,64 ppm)
137,5	C-4'''	H-2''', H-6'''
147,5	C-5'''	H-6''', OCH ₃ (3,64 ppm)
104,7	C-6'''	H-2''', H-7'''
114,0	C-7'''	H-8'''
146,2	C-8'''	H-7'''
167,1	C-9'''	H-6''a, H-6''b, H-7''', H-8'''
63,3	OCH ₃ -4'	/
60,1	OCH ₃ -6	/
58,9	OCH ₃ -3	/
54,8	OCH ₃ - 3'''	/
54,8	OCH ₃ - 5'''	/

IV.1.B14: Elucidation structurale du composé AC 202

La fluorescence noire violette de ce composé sous lumière de Wood est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3 (3-OR).

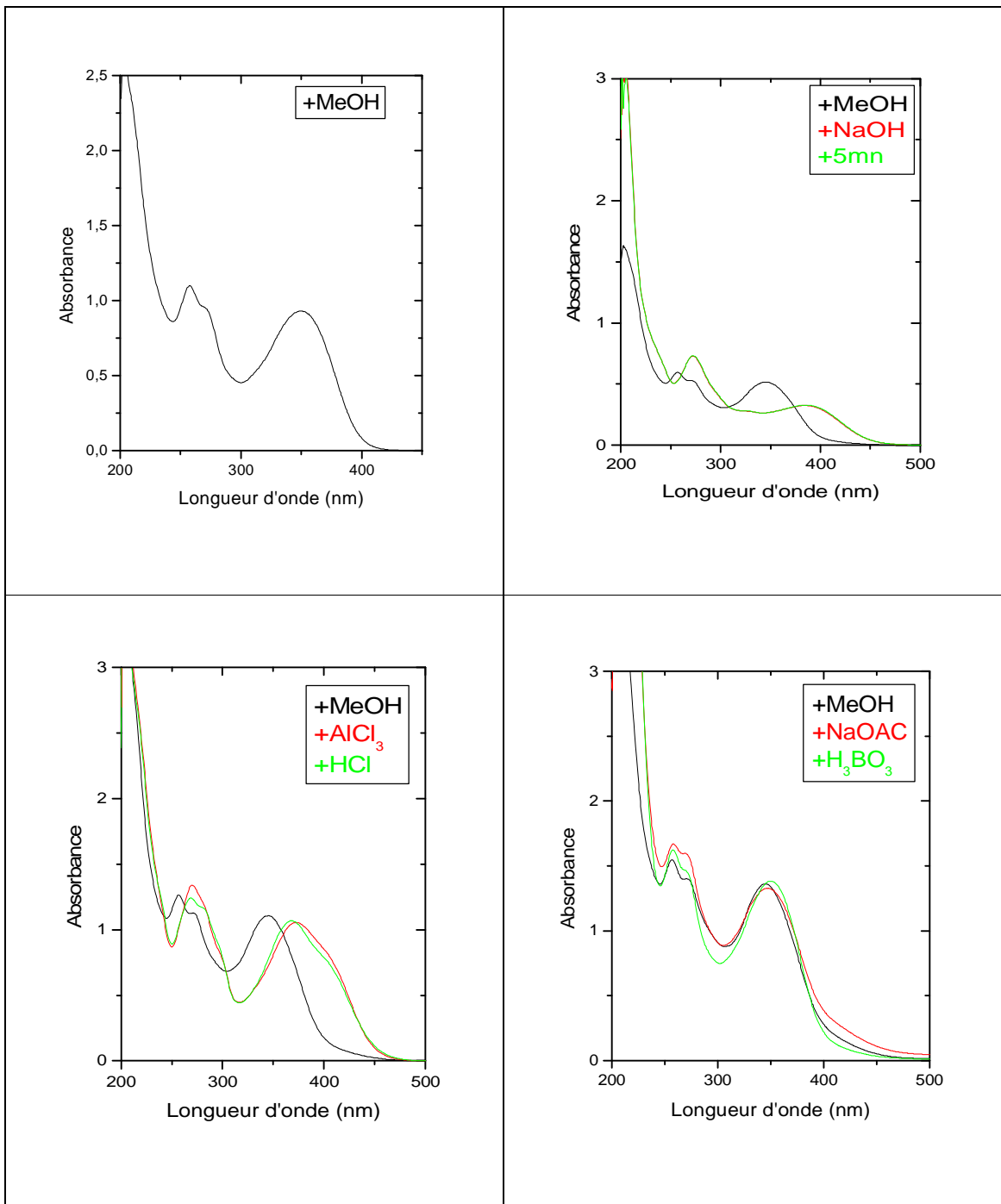
Les données de la série spectrale UV (tableau n° IV.1.B14.a, spectre n° IV.1.B14.1) montrent :

- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +39$ nm) avec diminution de l'intensité lumineuse indiquant la présence d'une substitution en C-4' (4'-OR). L'apparition d'une nouvelle bande dans ce spectre à $\lambda = 324$ nm indique un OH libre en C-7.
- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu (AlCl₃+ HCl) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda_I = + 23$ nm) indique la présence d'un OH libre en 5 et une substitution du carbone C-6 (6-OR) du noyau A.
- Le spectre enregistré dans le milieu NaOAc + H₃BO₃ montre un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le méthanol, ($\Delta\lambda_I = + 5$ nm), signifiant la présence d'un système ortho di-OH sur le cycle A. Vu les données précédentes (6-OR et 5-OH), le système ne peut être qu'en C-7 et C-8.

Les données de la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau n°IV.1.B14.a.

Tableau n° IV.1.B14.a: Données de la série spectrale UV

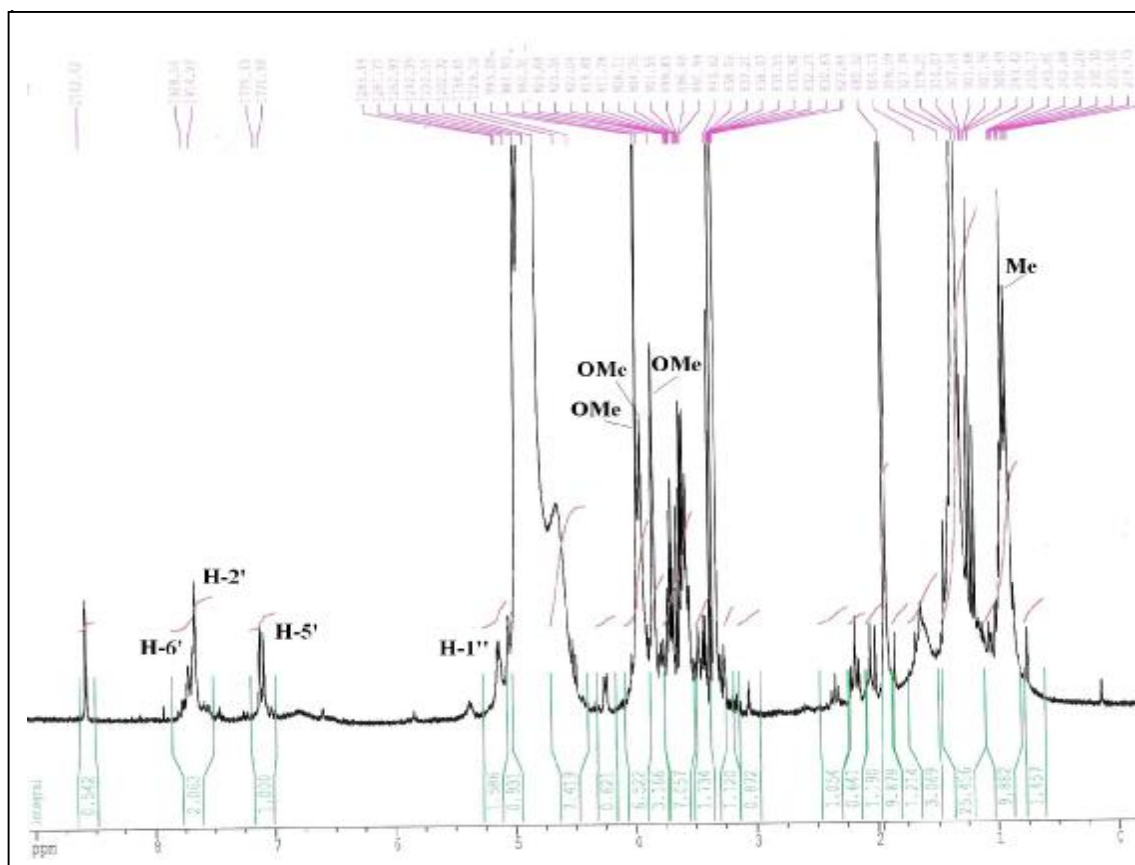
Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaires
MeOH	345	270	257	Flavone ou flavonol(3-OR)
+ NaOH	384	272	324	OR en C-4' OH libre en C-7
+AlCl ₃	374	281	299 ep	OH libre en C-5
+AlCl ₃ /HCl	368	282	299 ep	OR sur C-6
+NaOAc	350	272		
+NaOAc/H ₃ BO ₃	350	272		Ortho di-OH (A) OH-7 et OH-8
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				



Specre n° IV.1.B14.1: Série spectrale UV du composé AC202

L'examen du spectre RMN ^1H enregistré dans le méthanol- d_4 (spectre n° IV.1.B14.2), montre qu'il s'agit d'un flavonoïde:

- Un doublet large d'intégration 1H à $\delta = 7,70$ ppm ($J = 8,2$ Hz) partiellement recouvert par un singlet large à $\delta = 7,66$ ppm attribuables à H-6' et H-2' respectivement.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,15$ ppm ($J = 8,2$ Hz) attribuable à H-5'.
- Trois singlets d'intégration 3H chacun à $\delta = 3,97$, $\delta = 3,93$ et $\delta = 3,84$ ppm, attribuables à trois groupements méthoxyles.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 5,13$ ppm ($J = 3,8$ Hz) caractéristique du proton anomérique d'un sucre lié à l'aglycone par un pont oxygéné.
- Un doublet d'intégration 3H à $\delta = 0,82$ ppm ($J = 6,8$ Hz) caractéristique du méthyl d'un groupement Rhamnosyle.



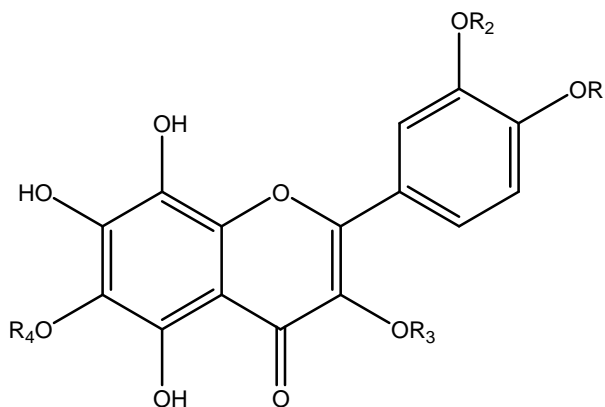
Spectre n° IV.1.B14.2: Spectre RMN ^1H (250 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé AC202

Les données relatives à la RMN 1H (250 MHz) sont rassemblées dans le tableau IV.1.B14.b

Tableau IV.1.B14.b: Données de la RMN ¹H du composé AC202

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7,70	1H	<i>d</i> (8,2) <i>large</i>	H-6'
7,60	1H	<i>s large</i>	H-2'
7,10	1H	<i>d</i> (8,2)	H-5'
3,97	3H	<i>s</i>	OCH ₃
3,93	3H	<i>s</i>	OCH ₃
3,84	3H	<i>s</i>	OCH ₃
5,13	1H	<i>d</i> (3,8)	H-1''
0,82	3H	<i>d</i> (6,8)	CH ₃
3 – 3,8	4H	<i>m</i>	rhamnosyl

Ces données mènent à la structure partielle:



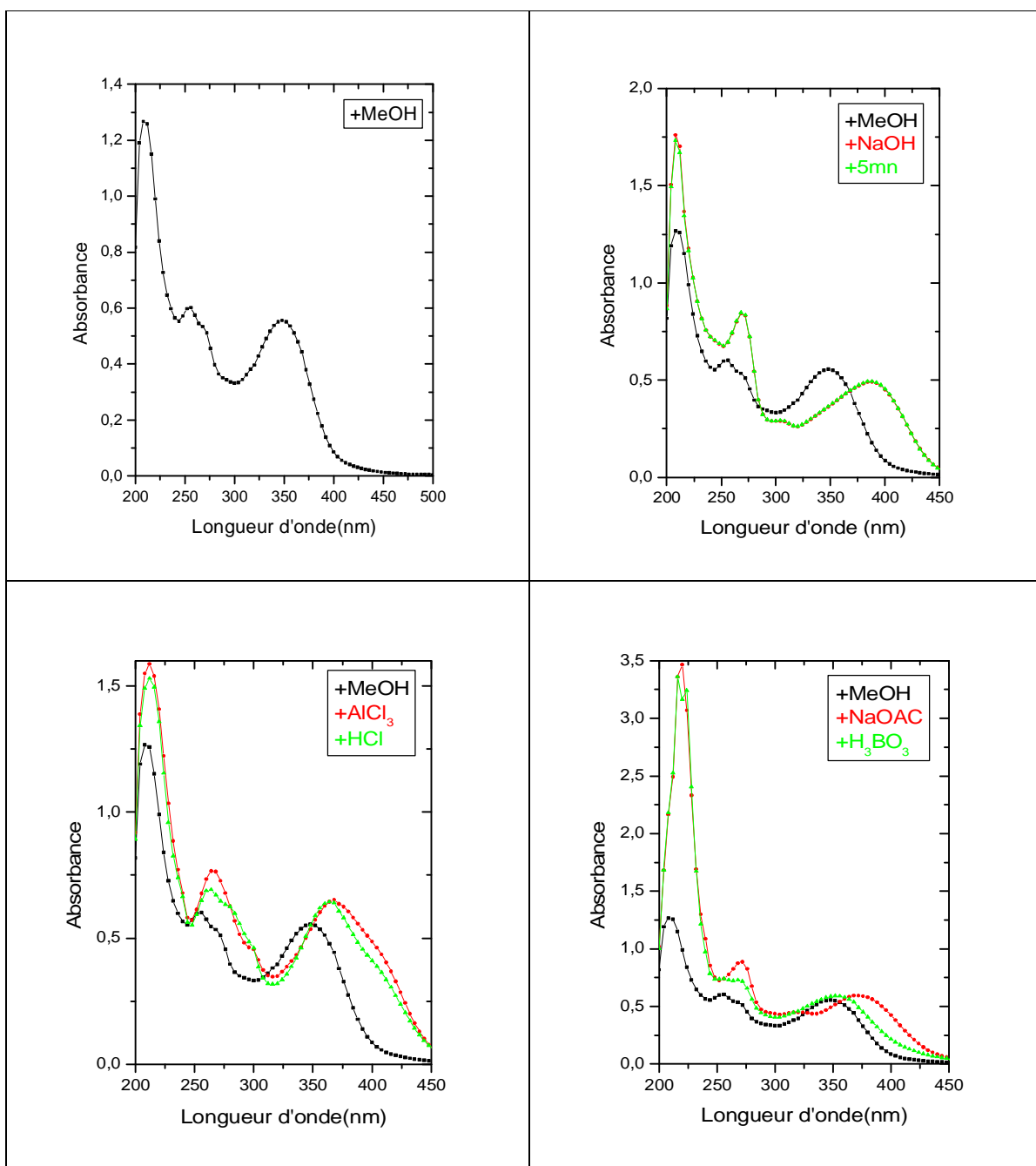
L'hydrolyse acide de ce composé et la co-chromatographie avec des échantillons de référence, confirment que le glycosyle est un rhamnosyle lié à l'aglycone par une jonction de type C-O. La fluorescence noire violette de la génine extraite après hydrolyse acide, oriente vers un flavonol méthoxylé en C-3.

L'enregistrement du spectre UV de cette génine (spectre n°IV.1.B14.3 et tableau n°IV.1.B14.b) en présence des réactifs montre :

- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda_I = +40$ nm) avec diminution de l'intensité lumineuse indiquant la présence

d'une substitution en C-4' (4'-OCH₃). L'apparition d'une nouvelle bande dans ce spectre à $\lambda = 304$ nm indique un OH libre en C-7.

- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu (AlCl₃+HCl) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda_1 = +16$ nm) indique la présence d'un OH libre en 5 et une substitution du carbone C-6 (6-OCH₃).



Spectre n° IV.1.B14.3: Série spectrale UV de la génine extraite après hydrolyse acide du composé **AC202**

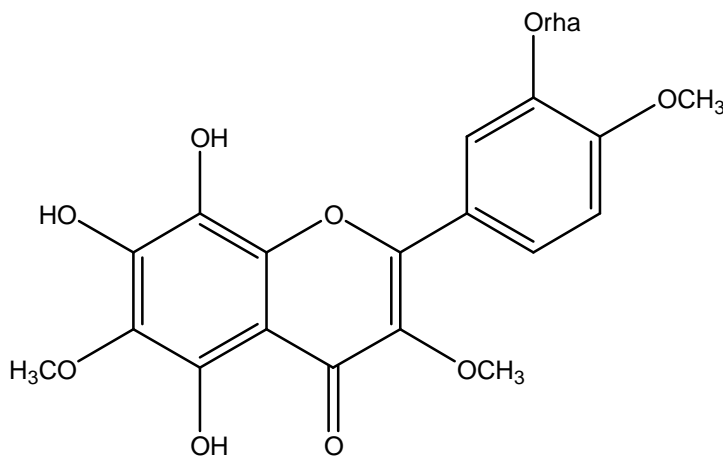
Les données de la série spectrale UV de la génine extraite après hydrolyse sont rassemblées dans le tableau n°IV.1.B14.a.

Tableau n° IV.1.B14.a: Données de la série spectrale UV de la génine extraite après hydrolyse acide du composé **AC202**

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaires
MeOH	348	272	256	Flavone ou flavonol(3-OR)
+ NaOH	388	272	304	OR en C-4'
+AlCl ₃	368	281	404 ep ;299	OH libre en C-5 OR sur C-6
+AlCl ₃ /HCl	364	282	400 ep ; 299	
+NaOAc	368	272		
+NaOAc/H ₃ BO ₃	352	272		Ortho di-OH (A) OH-7 et OH-8
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				

La combinaison de ces dernières données et des précédentes orientant vers la substitution C-3' par le groupement rhamnosyle, permet de proposer la structure de la :

5,7,8-trihydroxy-3'-O-rhamnosylflavone



IV.1.B15: Elucidation structurale du composé L12

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

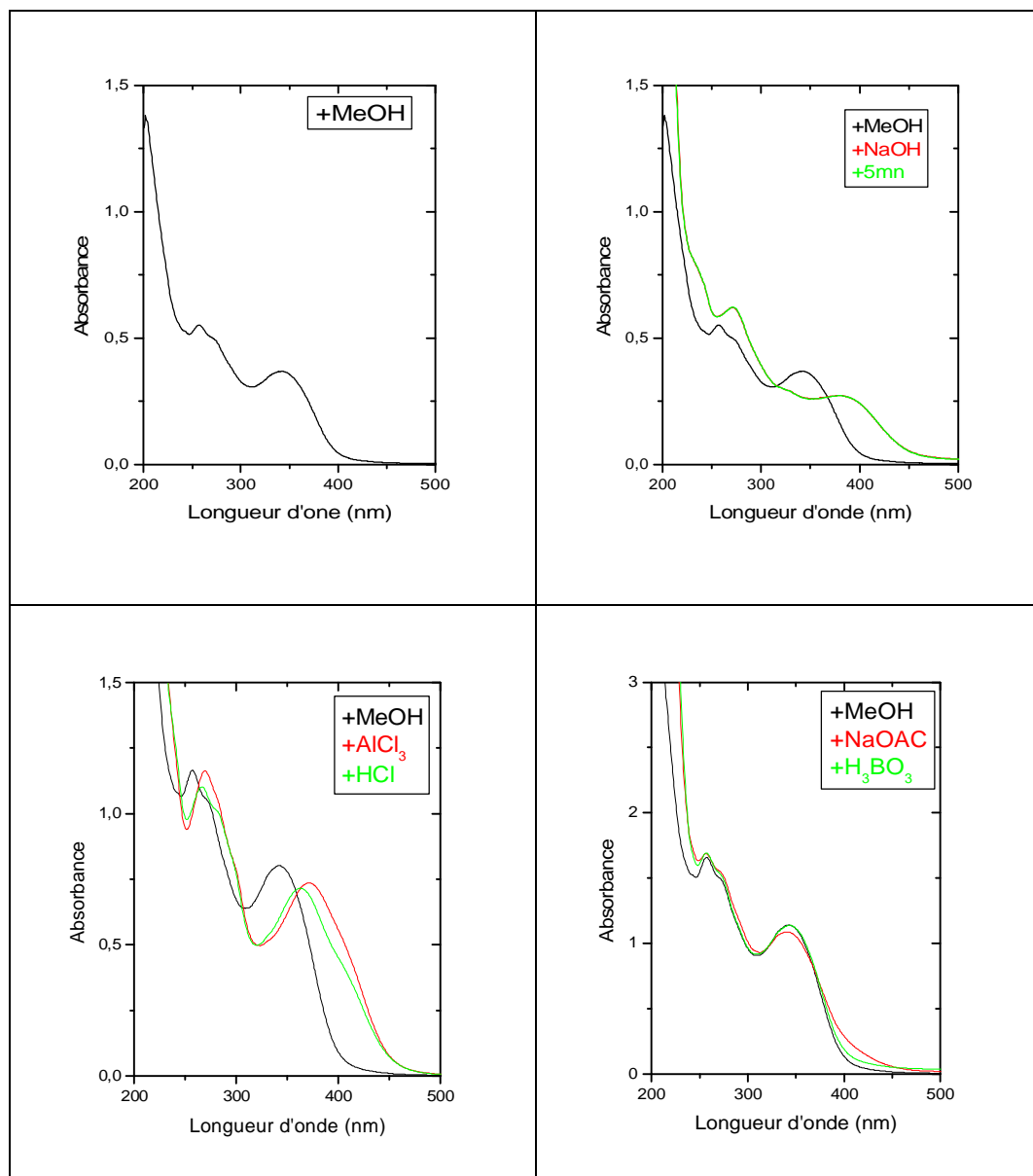
Les données de la série spectrale UV (tableau n° IV.1.B15.a, spectre n° IV.1.B15.1) montrent :

- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 34$ nm) avec diminution de l'intensité lumineuse indique une substitution en position C-4' (4'-OR), l'absence d'une nouvelle bande dans l'intervalle indique une substitution de type OR en position 7.
- L'addition de NaOAc ne provoquant aucun effet sur la bande II ($\Delta\lambda_{II} = + 0$ nm) par rapport au spectre MeOH confirme la substitution 7- OR.
- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans le MeOH ($\Delta\lambda_I = + 19$ nm) confirme la présence d'un OH libre en 5 et une substitution en 6-OR.

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau n° IV.1.B14-a

Tableau n° IV.1.B15.a: Données de la série spectrale UV

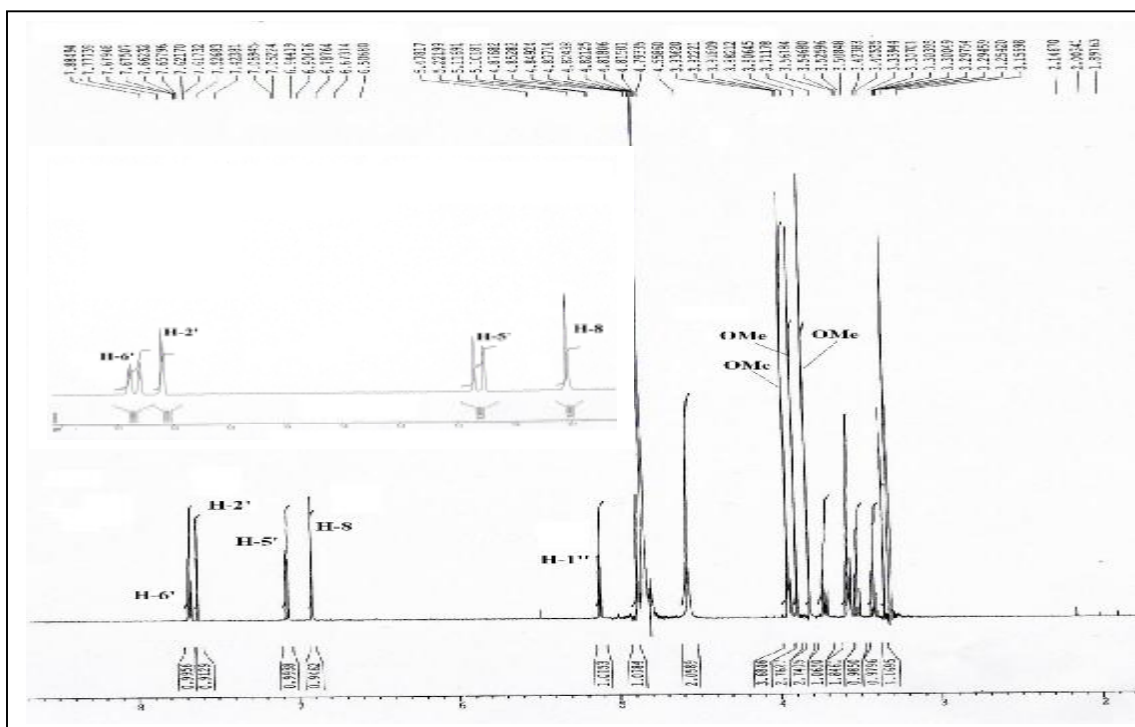
Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaires
MeOH	345	272	257	Flavone ou flavonol (3-OR)
+ NaOH	379	272	257	OR en C-4' Pas de OH libre en 7
+AlCl ₃	370	281	340 299	OH libre en 5 Pas de ortho di-OH sur le cycle B OR sur C-6
+AlCl ₃ /HCl	364	282	341 299	
+NaOAc	343	272	/	OR en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	345	272	/	
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				



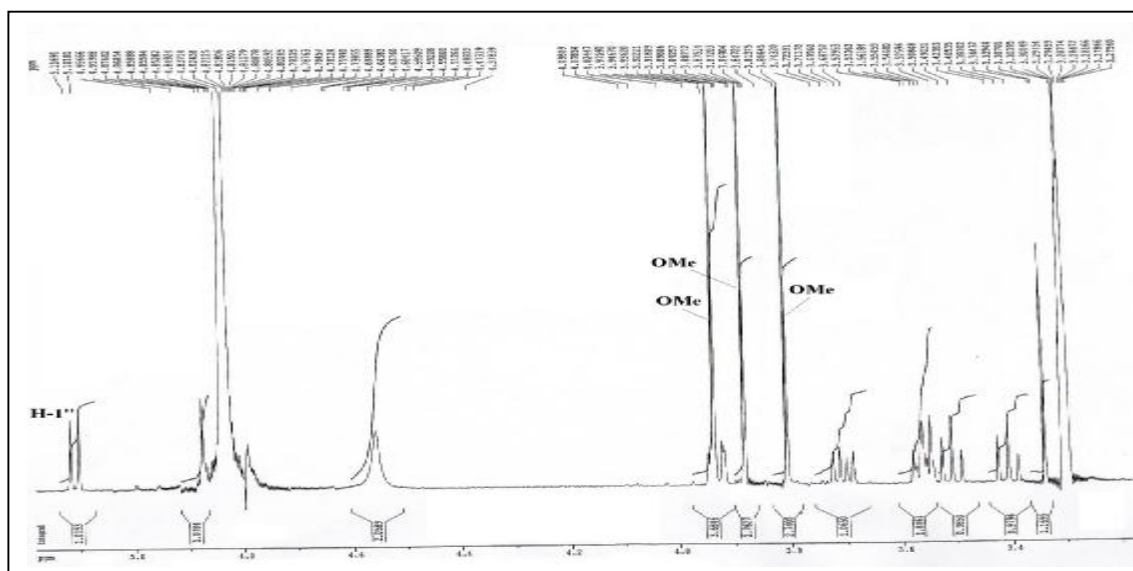
Spectre n° IV.1.B15.1 : Série spectrale UV du composé L12

L'examen du spectre RMN ¹H (spectre n° IV.1.B15.2) et son spectre d'étalement (spectre n° IV.1.B15.2'), montre qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol caractérisé par :

- Un doublet dédoublé d'intégration 1H, à $\delta = 7,66$ ppm ($J = 8,6$ Hz ; 2,2 Hz) (couplage ortho et méta) attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,62$ ppm ($J = 2,2$ Hz) (couplage méta) attribuable à H-2'.



Spectre n°IV.1.B15.2: Spectrale RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé L12



Spectre n°IV.1.B15.2' Spectrale RMN ^1H étalé entre 2,5 et 5,5 ppm (500 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé L12

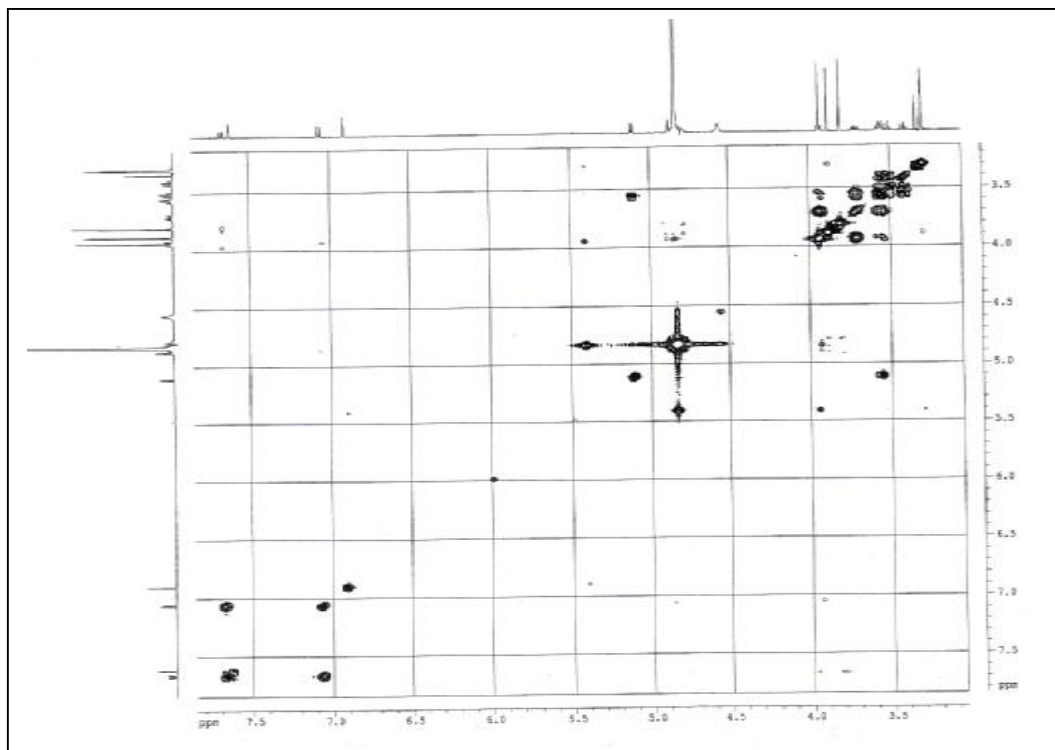
- Un autre signal sous forme d'un doublet à $\delta = 7,06$ ppm avec $J = 8,6$ Hz (couplage ortho) d'intégration 1H attribuable à H-5'.

Ces trois signaux indiquent une disubstitution du noyau B.

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,94$ ppm attribuable à H-8 ou H-3.
- Trois singulets d'intégration 3H chacun à des déplacements chimiques $\delta = 3,94$ ppm, $\delta = 3,88$ ppm et $\delta = 3,81$, attribuables à trois groupements méthoxyles.
- Un doublet à $\delta = 5,12$ ppm ($J = 7,6$ Hz) caractérisant le H-1'' (proton anomérique) d'un sucre lié à l'aglycone par une jonction de type C-O de stéréochimie β .
- Un ensemble de signaux d'intégration totale 6 H attribuables aux protons du sucre.

L'examen du spectre RMN 2D, COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) (spectre n° IV.1.B14.3) montre :

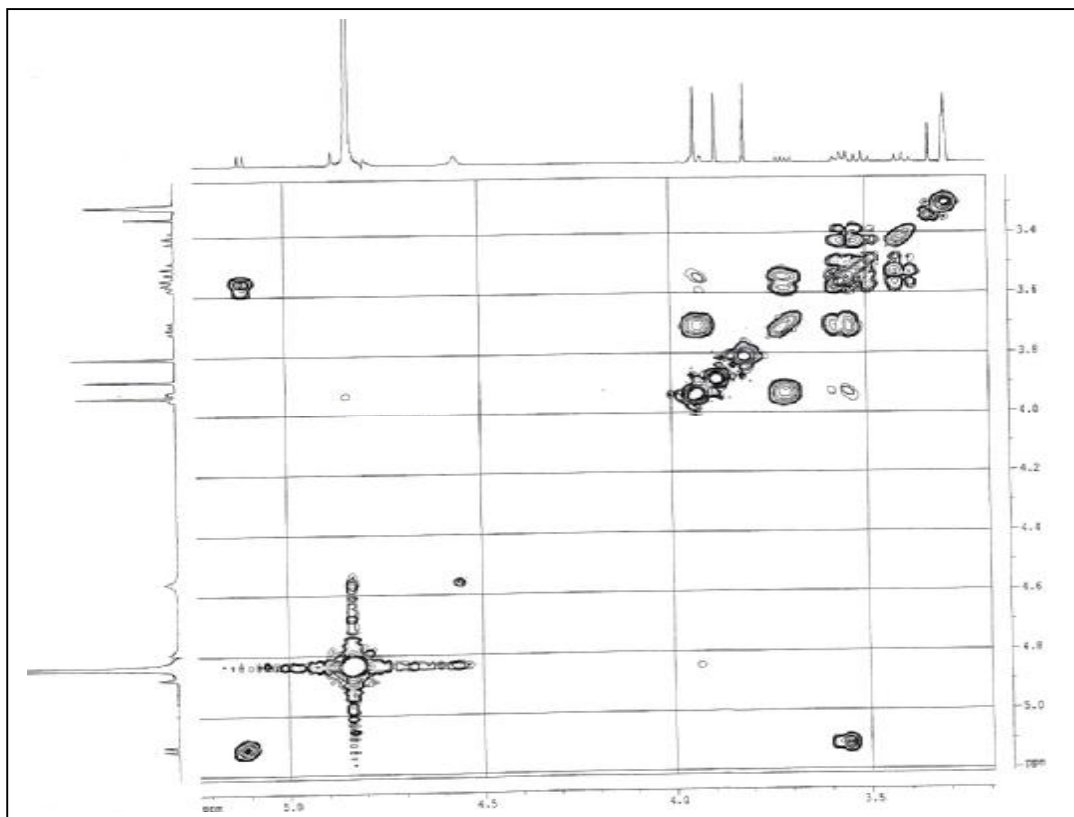
- Une tache de corrélation entre le H-5' et les protons du groupement méthoxyle à $\delta = 3,94$ ppm relative à un couplage lointain. Cela impose que le groupement méthoxyle se trouve sur un carbone voisin de C-5', donc un des groupements méthoxyles est porté par le C-4' du noyau B.
- Une tache de corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 7,66$ ppm et $\delta = 7,62$ ppm confirmant le couplage méta et aussi les attributions de H-6' et H-2'.
- Une tache de corrélation entre les noyaux relatifs des doublets à $\delta = 7,66$ ppm et $\delta = 7,06$ ppm confirmant le couplage ortho et aussi l'attribution de H-6' et H-5' et par conséquent une substitution du noyau B en 3' et 4'.



Spectre n° n°IV.1.B15.3: Spectre COSY ^1H - ^1H du composé L12

Sur le même spectre COSY (^1H - ^1H) on remarque la présence de :

- Une tache de corrélation entre le H-1'' à $\delta = 5,12$ ppm et un multiplet à $\delta = 3,56$ ppm qui ne peut être que le H-2''.
- Une tache de corrélation entre H-2'' et un proton résonant sous forme d'un triplet à $\delta = 3,51$ ppm ($J = 9,2$ Hz) attribuable à H-3''.
- Une tache de corrélations entre H-3'' et un proton résonant sous forme d'un triplet à $\delta = 3,41$ ppm ($J = 9,2$ Hz) attribuable à H-4''.
- Une tache de corrélations entre H-4'' et un proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta = 3,56$ ppm attribuable à H-5''.
- Le H-5'' corrèle avec H-4'' et deux doublets de doublet d'intégration 1H chacun à $\delta = 3,93$ ppm ($J = 12,2 ; 2,1$) et $\delta = 3,71$ ppm ($J = 12,2 ; 6,1$). Ils sont attribuables au deux protons H-6''a et H-6''b du sucre.



Spectre n°IV.1.B15.3': Spectre COSY ^1H - ^1H du composé L12

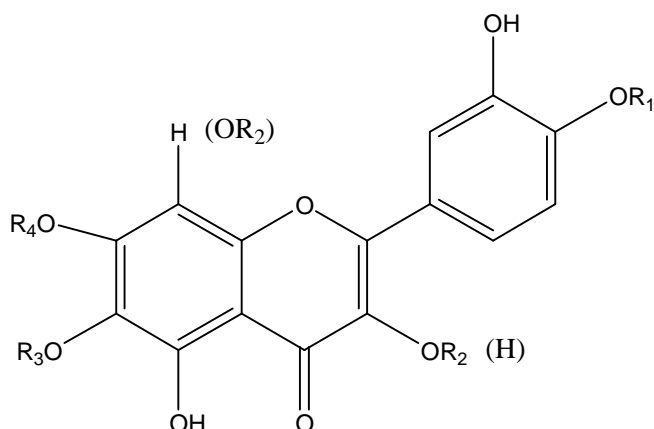
Les données relatives à la RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) ainsi que celles de l'expérience COSY rassemblées dans le tableau n° IV.1.B14.b, permettent de déduire la nature, la nature et la stéréochimie du carbone anomérique du sucre. La multiplicité des signaux relatifs à H-3'' et H-4'' (triplet, $J = 9,2$ Hz) permet d'écarter sans ambiguïté le groupement galactopyranosyle.

Ces données ajoutées au fait que le H-1'' résonant sous forme d'un doublet $\delta = 5,12$ ppm ($J = 7,2$ Hz) exclue le manose et oriente vers un groupement glucopyranosyle d'où la jonction à la génine est faite par le biais d'un pont oxygéné de configuration β .

Tableau n° IV.1.B15.b : Données de la RMN ^1H (500MHz, CD_3OD)

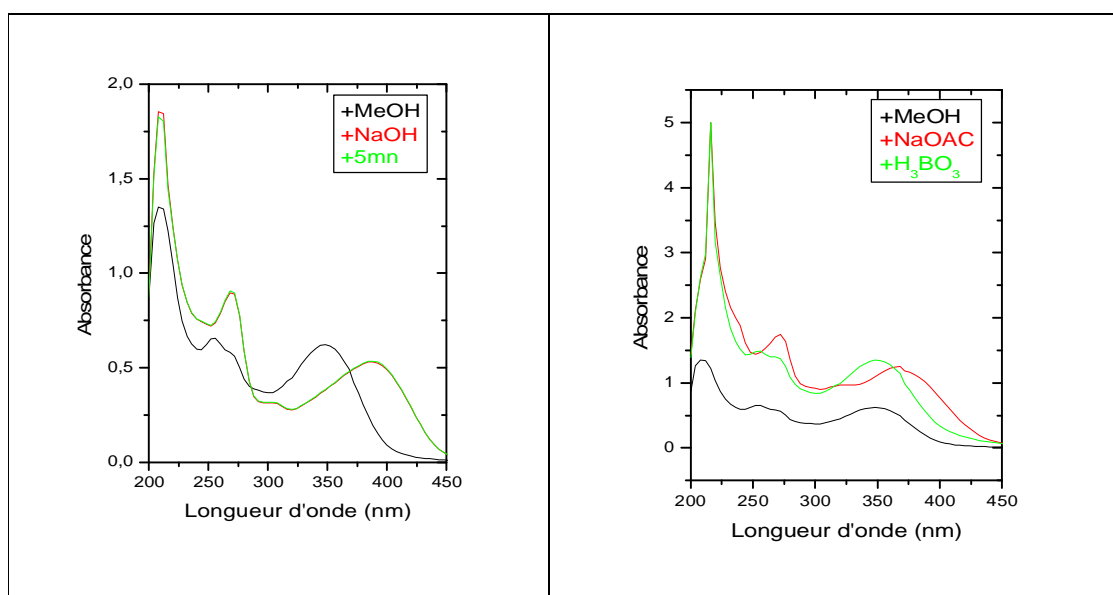
Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution	Couplage COSY ^1H - ^1H
7,66	1H	<i>dd</i> (8,6 ; 2,2)	H-6'	H-5' et H-2'
7,62	1H	<i>d</i> (2,2)	H-2'	H-6'
7,06	1H	<i>d</i> (8,6)	H-5'	H-6' et O-CH ₃
6,94	1H	<i>s</i>	H-8	/
3,94	3H	<i>s</i>	O-CH ₃	H-5'
3,88	3H	<i>s</i>	O-CH ₃	/
3,81	3H	<i>s</i>	O-CH ₃	/
5,12	1H	<i>d</i> (7,6)	H-1''	H-2''
3,93	1H	<i>dd</i> (12,2 ; 2,1)	H-6''a	H-5''
3,71	1H	<i>dd</i> (12,2 ; 6,1)	H-6''b	H-5''
3,56	2H	<i>m</i>	H-2'' et H-5''	1'', 3'' ; 4'', 6''
3,51	1H	<i>t</i> (9,2)	H-3''	H-2'' et H-4''
3,41	1H	<i>t</i> (9,2)	H-4''	H-4'' et H-5''

D'après ces données la structure préliminaire est :



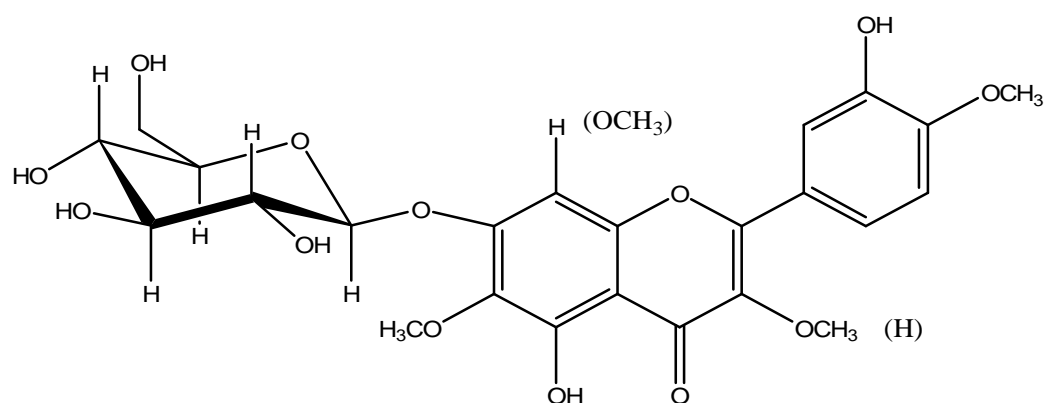
L'hydrolyse acide du composé L12 et la co-chromatographie avec des échantillons de référence, confirment que le sucre est un glucose lié à l'aglycone par un pont oxygéné C-O.

L'examen du spectre UV de la génine extraite après hydrolyse acide (spectre n° IV.1.B14.4) après addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I comparativement avec celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda_I = +40$ nm) avec une diminution de l'intensité optique ce qui suppose une substitution (OR) en 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre à 304 nm révèle la présence d'un OH libre en position 7. Cet OH libre est confirmé après l'ajout de NaOAc qui donne un déplacement bathochrome de la bande II par rapport au spectre enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda_{II} = +4$ nm). Ces données permettent de placer le glucosyl en position C-7. d'où $R_4 = \text{Glucosyle}$ $R_3 = R_2 = R_1 = \text{OCH}_3$.

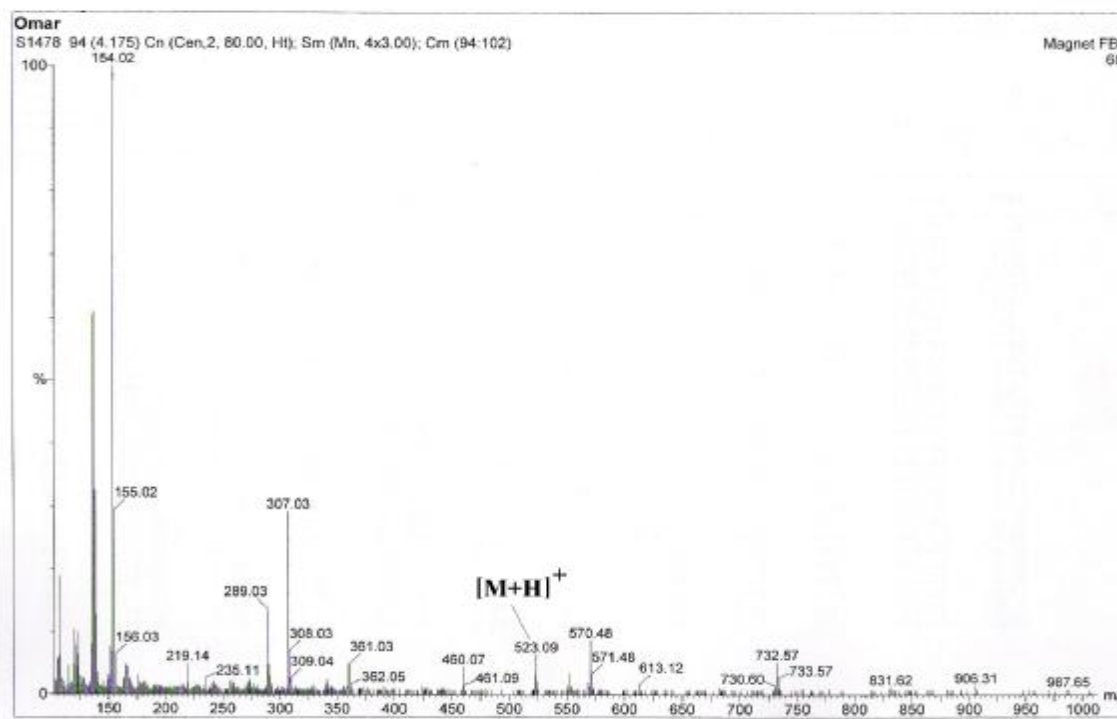


Spectre n° IV.1.B15.4 : Série spectrale UV après hydrolyse acide du composé L12

La structure partielle du composé L12 est :



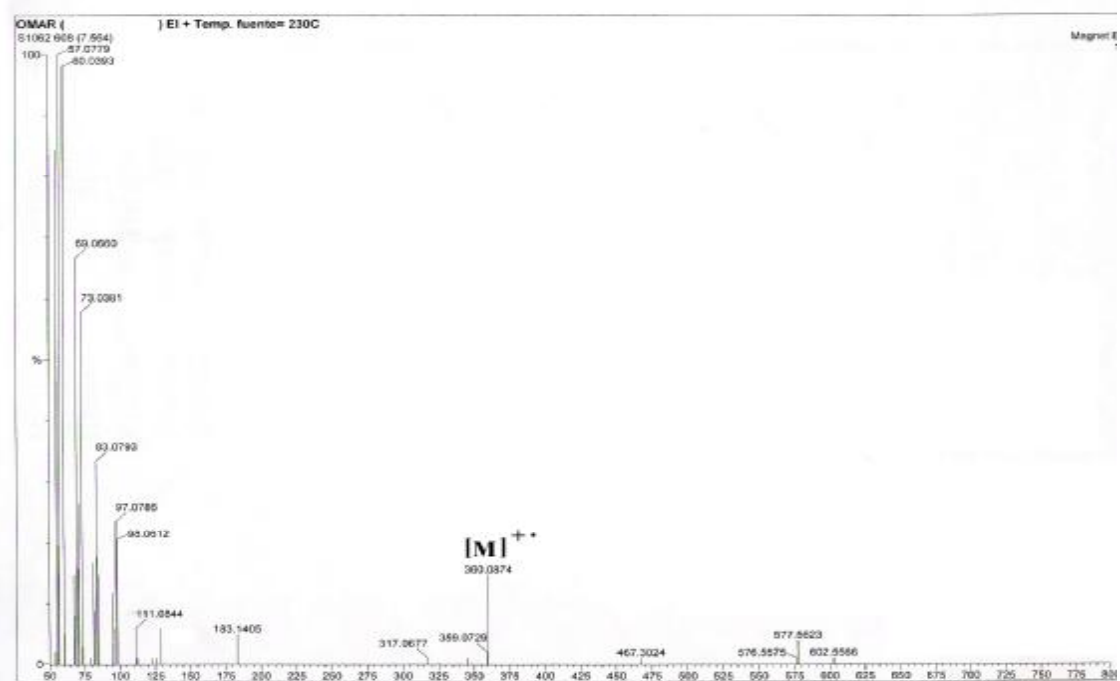
Cette structure est complétée par l'étude de son spectre de masse en mode FAB⁺ avec comme matrice 3-nitrobenzyl-alcool (spectre n° **IV.1.B15.5**) de ce composé montre un pic $m/z = 523$ Da, $[M+H]^+$ correspondant à une de formule brute C₂₄H₂₆O₁₃ d'un flavonoïde substitué par un sucre en C-7 et portant trois groupement méthoxylés.



Spectre n° IV.1.B15.5: Spectre de masse mode FAB+ du composé L12

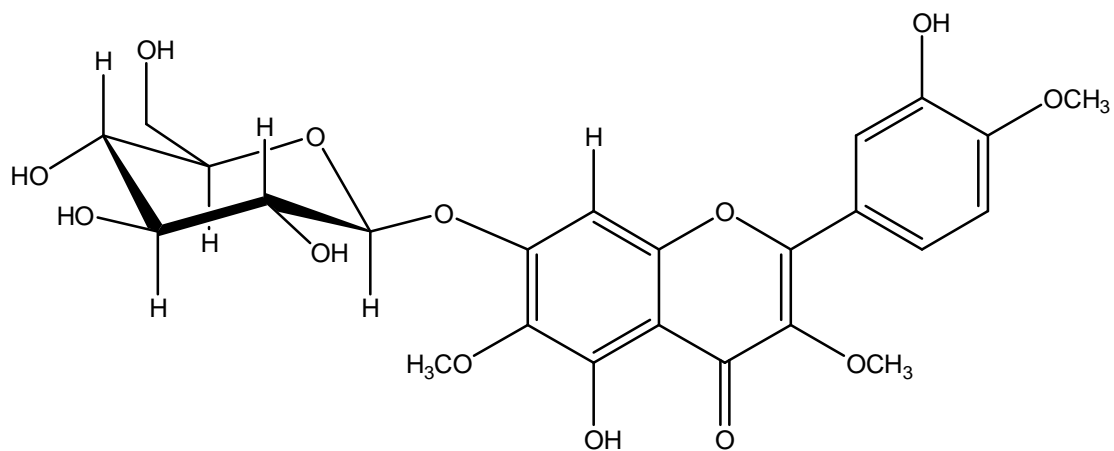
L'étude du spectre de masse en mode impact électronique (SMIE) confirme les substitutions des cycle A et B grâce au signaux (spectre **IV.1.B15.6**) :

- Ø $m/z = 360$ correspondant à $[M]^+$ d'une génine comportant trois méthoxyles et trois hydroxyles,
- Ø $m/z = 345$ correspondant au fragment $[M-15]^+$ indiquant la présence d'un méthoxyle,
- Ø $m/z = 317$ correspondant au fragment $[M-15-28]^+$ caractéristique d'un flavonoïde,
- Ø $m/z = 123$ correspondant au fragment $[^{0,2}B-28]^+$, indiquant la présence d'un hydroxyle et un méthoxyle sur le cycle B,
- Ø $m/z = 183$ correspondant au fragment $[^{1,3}A+H]^+$ indiquant un squelette flavonique dont le cycle A comporte deux hydroxyles et un méthoxyle et un proton, vue la substitution de C-5, C-6 et C-7 alors ce proton ne peut être qu'en position 8 (H-8). Par conséquent le troisième méthoxyle ne peut être qu'en position 3.



Spectre n° IV.1.B15.6 : Spectre HRSMIE du composé L12

L'ensemble de ces données est en accord avec la littérature [26-27] et mène à la structure finale :



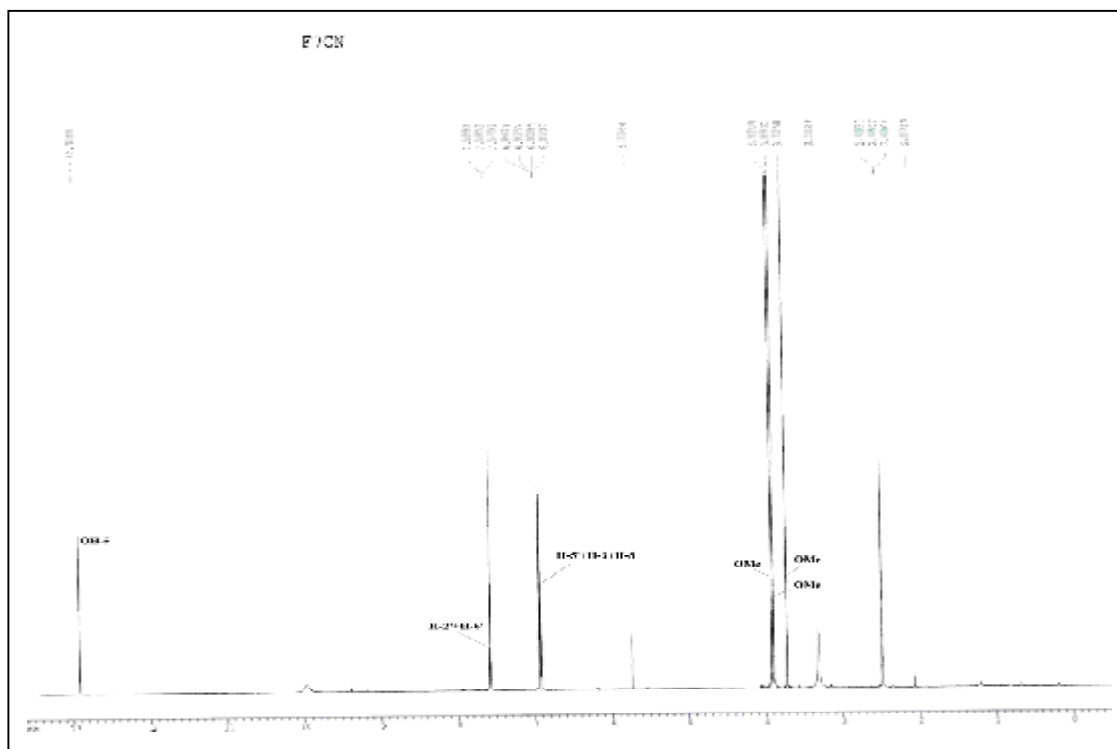
7-O-β-D-glucopyranosyl centaureidine

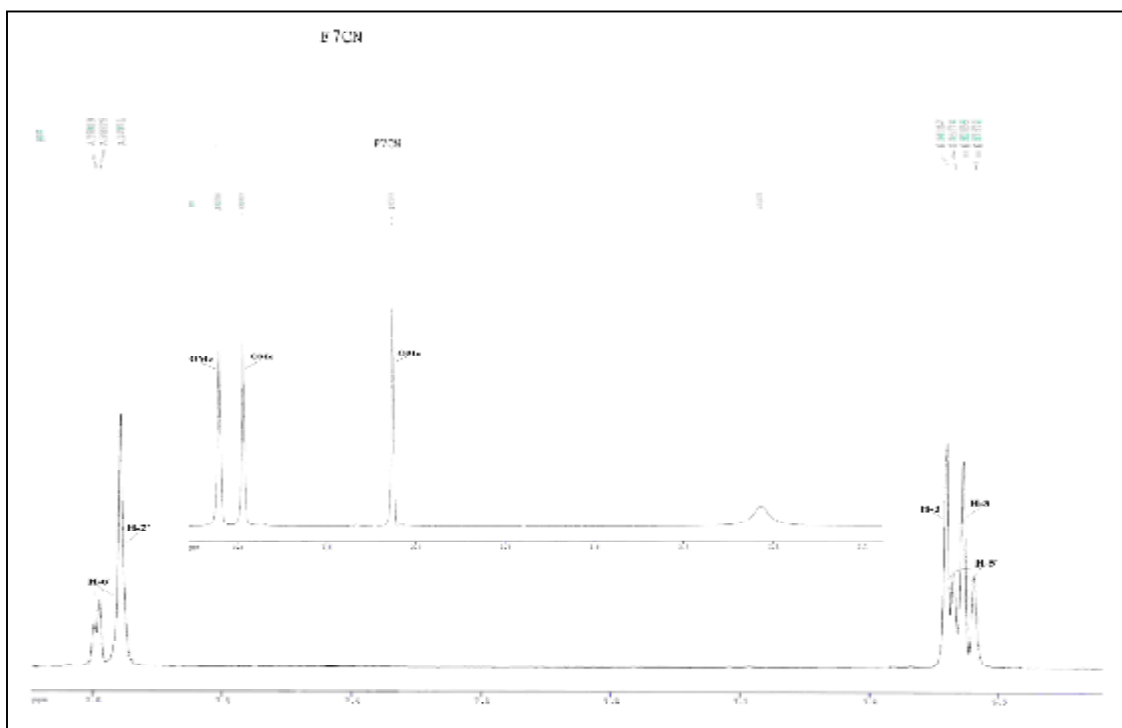
IV.2 : Identification des produits isolés de *C.nicaensis*

IV.2.1 : Elucidation structurale du composé F7 CN

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV.2.1.1) de ce composé, montre qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol caractérisé par :

- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 12,93$ ppm caractéristique d'un OH libre en position C-5
- Un doublet large d'intégration 1H, à $\delta = 7,59$ ppm ($J = 8,0$ Hz) attribuable à H-6'. Ce doublet est partiellement recouvert par un signal sous forme d'un singulet large à $\delta = 7,58$ ppm caractéristique de H-2'.
- Deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta = 6,93$ et $6,94$ ppm attribuables soit à H-3 et H-6 soit à H-3 et H-8.
- Un signal sous forme d'un doublet à $\delta = 6,92$ ppm ($J = 8,0$ Hz) d'intégration 1H attribuable à H-5'.
- Trois singulets d'intégration 3H chacun à $\delta = 3,92$; $3,89$ et $3,73$ ppm montrant la présence de trois groupements méthoxyles.





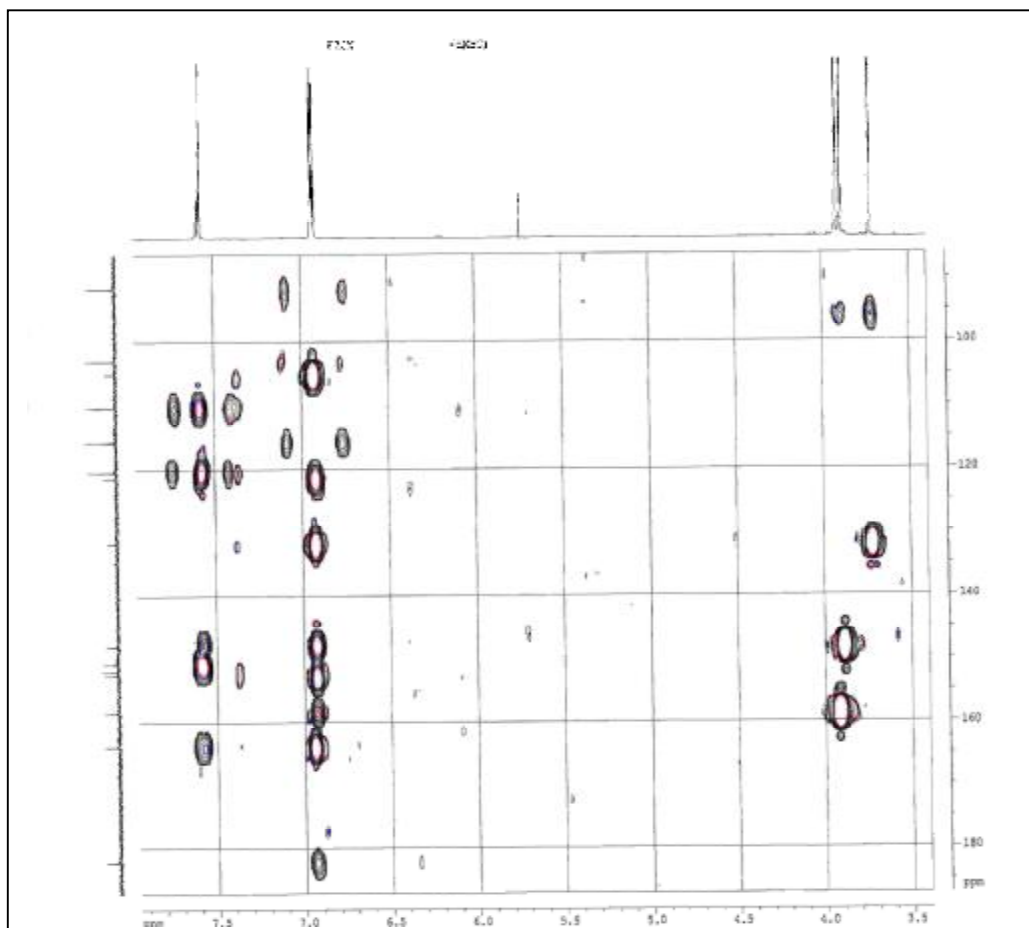
Spectre n° IV.2.1.1': Spectre RMN ^1H (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé F7CN

L'examen simultané du spectre de l'expérience HMBC (spectre n°IV.2.1.2) et ses étalements (spectre n°IV.2.1.2' ; n°IV.2.1.2'') ainsi que le spectre ^{13}C et ses séquences DEPT permettent l'analyse suivante :

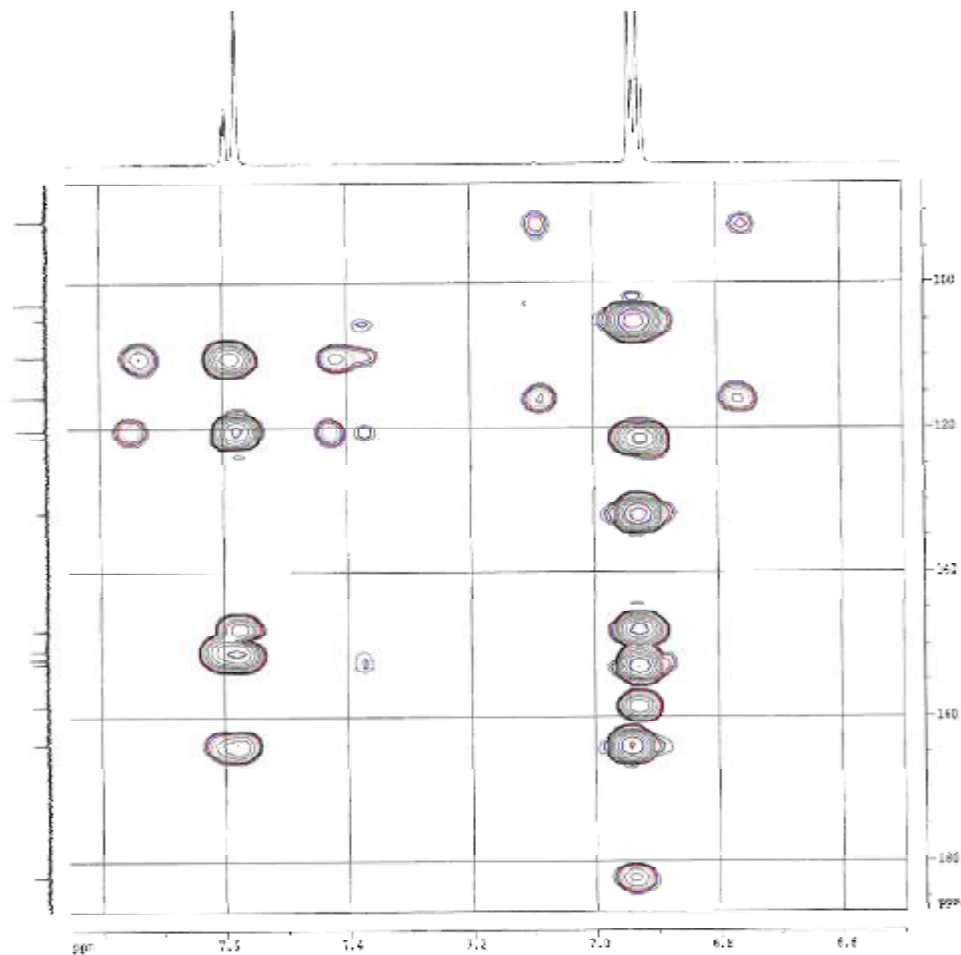
- Trois taches de corrélation entre le H du OH en C-5 et trois atomes de carbone à $\delta = 105,04$; $131,83$ et $152,02$ ppm. D'après la valeur de leurs déplacements chimiques, ces atomes de carbone sont attribuables aux C-10, C-6 et C-5. Sur le même spectre le C-6 corrèle avec les protons du groupement méthoxyle à $\delta_{\text{H}} = 3,73$ ppm indiquant ainsi sa substitution par ce groupement. Par ailleurs le C-6, corrèle avec le proton à $\delta_{\text{H}} = 6,93$ ppm, permettant son attribution à H-8 et par conséquent, le proton résonant à $\delta_{\text{H}} = 6,94$ ppm sera attribué à H-3 ceci est d'ailleurs appuyé par la belle tache de corrélation entre le noyau (H-3) et le carbonyle à $\delta_{\text{C}} = 182,2$ ppm (C-4). L'attribution de H-3, permet de localiser C-2 à $\delta_{\text{H}} = 163,9$ ppm grâce à leur corrélation et la corrélation de cet atome de carbone et les protons H-2' et H-6'.
- Quatre taches de corrélation entre le H-8 avec les quatre atomes de carbone à $\delta = 105,04$; $131,83$; $152,58$ et $158,55$ ppm attribuables à C-10, C-6, C-9 et C-7 respectivement, notant que le C-7 présente aussi une tache de corrélation avec les

Spectre n° IV.2.1.3 : Spectre DEPT (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé F7CN

- Deux taches de corrélation entre π -2 et π -3 avec un atome carbone à $\delta = 148,0$ ppm qui ne peut être que le C-3'.
- Une grande tache de corrélation entre le H-2' et H-6' avec un atome de carbone oxygéné $\delta = 150,83$ ppm, attribuable à C-4'. Ce dernier atome corréle avec les trois protons d'un groupement méthoxyle à $\delta = 3,89$ ppm ce qui impose que C-4' est substitué par un groupement méthoxyle.
- Une tache de corrélation entre H-5' avec un atome de carbone quaternaire à $\delta = 121,37$ ppm attribuable à C-1'.
- Une tache de corrélation entre H-2' avec un atome de carbone à $\delta = 120,41$ ppm attribuable à C-6'.
- Une tache de corrélation entre H-6' avec un atome de carbone à $\delta = 110,2$ ppm attribuable à C-2'.
- Les trois atomes de carbone à $\delta = 115,73$; $102,98$ et $91,56$ ppm sont attribuables à C-5', C-3 et C-8 respectivement.



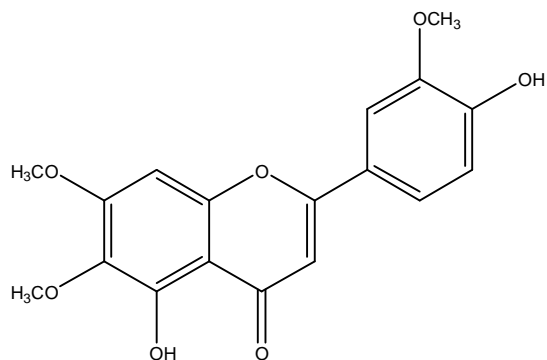
Spectre n° IV.2.1.2': Spectre HMBC (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé F7CN



Spectre n° IV.2.1.2'': Spectre HMBC (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé F7CN

L'analyse de l'ensemble des spectres qui a permis de faire toutes les attributions des noyaux (carbone et hydrogène) qui sont en accord avec la littérature [28-30], mène à la structure du :

5,4'-dihydroxy 6,7,3'-trihydroxyflavone cirsilineol



Les données spectroscopiques RMN-1H et RMN-13C sont reportées dans les tableaux IV.2.1.a. et IV.2.1.b. respectivement :

Tableau IV.2.1.a : Données de la spectroscopie RMN ¹H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
12,93	1H	s	OH-5
7,59	1H	d (8,0) large	H-6'
7,58	1H	s large	H-2'
6,94	1H	s	H-3 ou H-6 ou H-8
6,92	1H	d (8,0)	H-5'
6,93	1H	s	H-3 ou H-6 ou H-8
3,92	3H	s	OCH ₃
3,89	3H	s	OCH ₃
3,73	3H	s	OCH ₃

Tableau IV.2.1.b : Données de la RMN ¹³C et corrélation H-C :

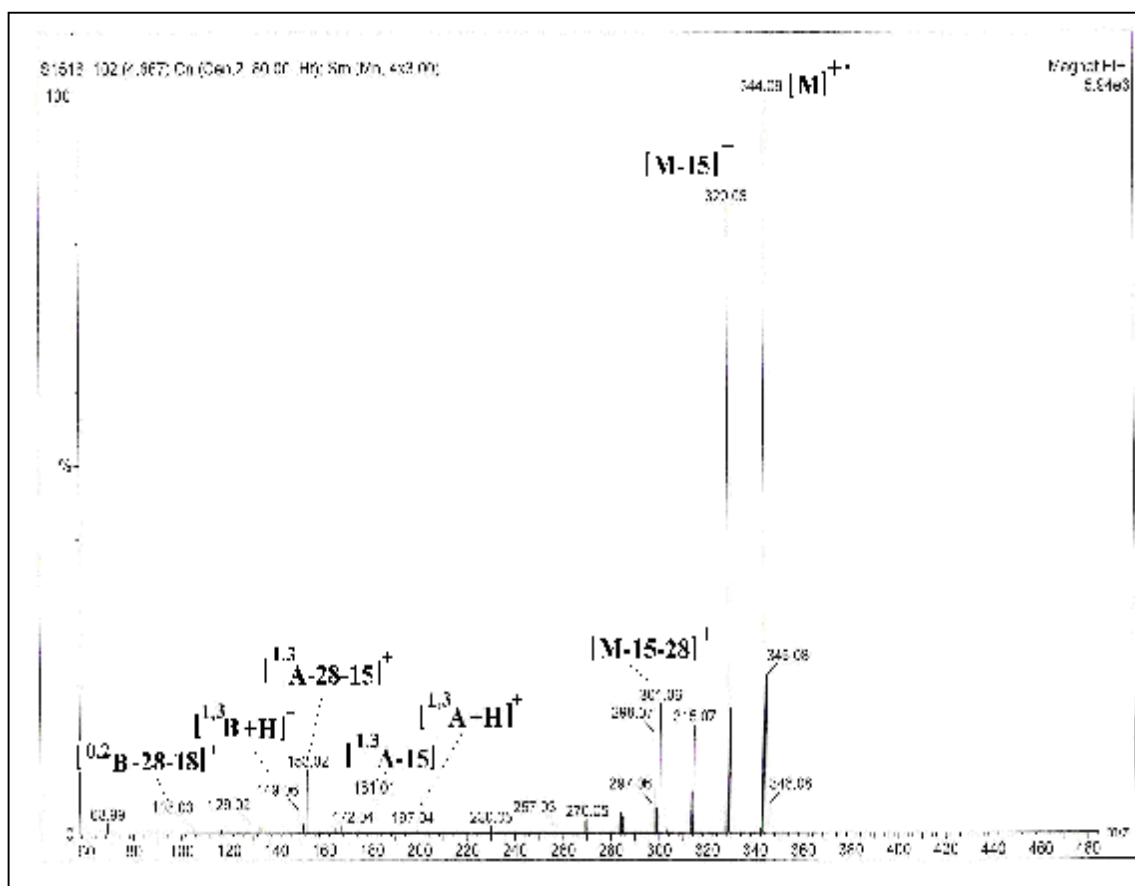
Déplacement chimique δ (ppm)	Attribution	HMBC (H – C)
163,93	C-2	H-3, H-2', H-6'
102,98	C-3	/
182,20	C-4	H-3
152,02	C-5	OH(C-5)
131,83	C-6	H-8, OCH ₃
158,51	C-7	H-8, OCH ₃
91,56	C-8	/
152,58	C-9	H-8
105,04	C-10	H-8
121,37	C-1'	H-5'
110,20	C-2'	H-6'
148,01	C-3'	H-5', H-2'
150,83	C-4'	H-2', H-6'
115,73	C-5'	/
120,41	C-6'	H-2'
59,97	OCH ₃	/
56,41	OCH ₃	/
55,98	OCH ₃	/

Cette structure est confirmée par l'étude de son spectre de masse en mode d'ionisation impact électronique à haute résolution (spectre n° IV.2.1.4) qui montre un pic moléculaire à $m/z = 344$ $[M]^+$ confirmant le squelette d'un flavonoïde de type aglycone de formule brute



Ce spectre montre également les signaux :

- Ø $m/z = 329$ correspondant à $[M-15]^+$ indiquant la présence de méthoxyle,
- Ø $m/z = 301$ correspondant au fragment $[M-15-28]^+$ caractéristique d'un flavonoïde,
- Ø $m/z = 197$ correspondant au fragment $[^{1,3}A+H]^+$ indiquant un squelette flavonique dont le cycle A comporte un hydroxyle et deux méthoxyles,
- Ø $m/z = 181$ correspondant à $[^{1,3}A-15]^+$
- Ø $m/z = 153$ correspondant à $[^{1,3}A-15-28]^+$
- Ø $m/z = 151$ correspondant au fragment $^{0,2}B^+$, indiquant la présence d'un hydroxyle et d'un méthoxyle sur le cycle B.



Spectre n°IV.2.1.4: Spectre HRSMIE du composé F7 CN

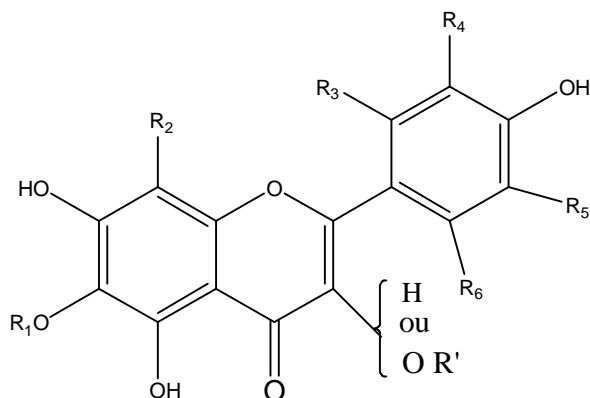
IV.2.2. : Elucidation structurale du composé F11 CN

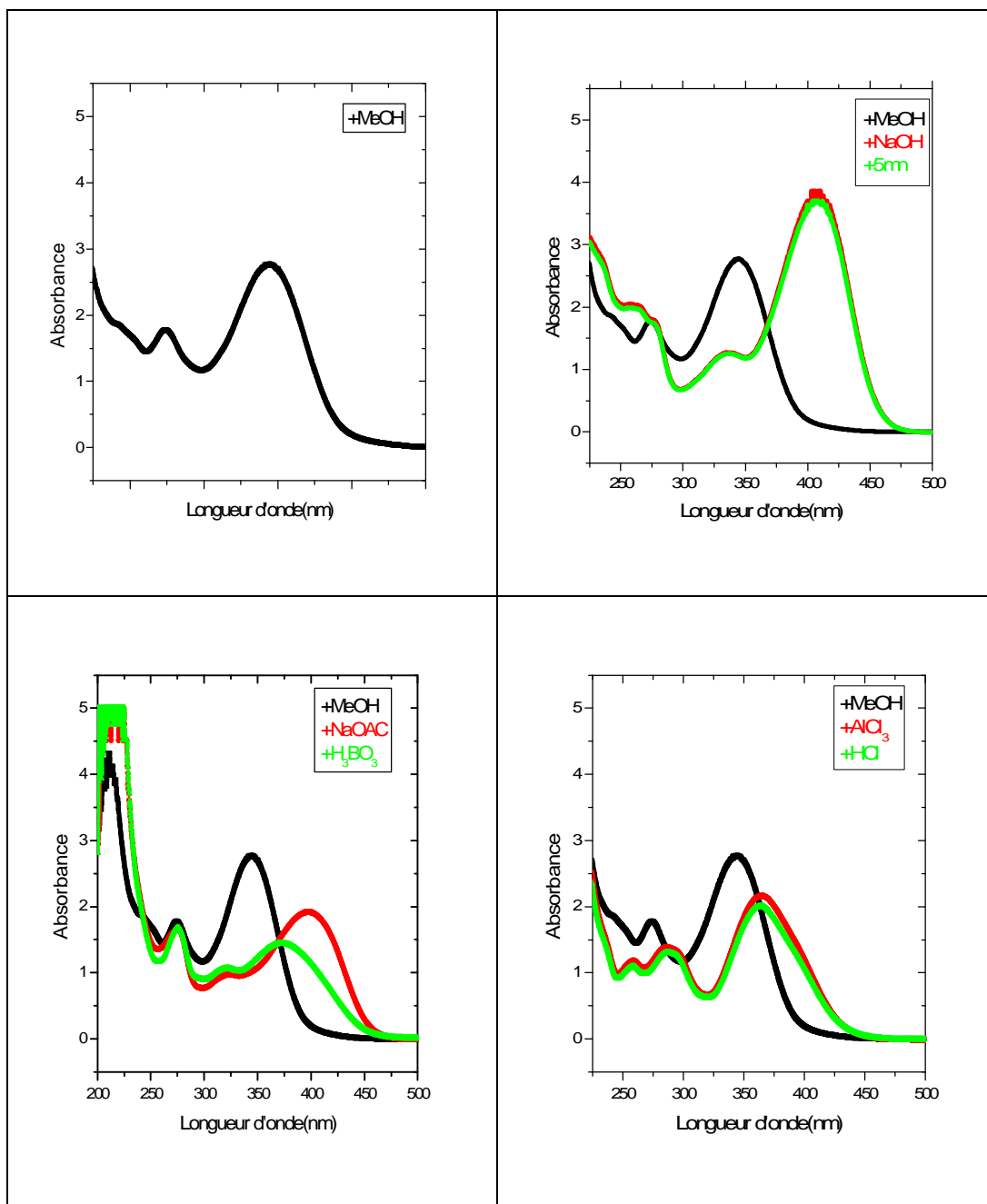
La fluorescence noire violette sous lumière de Wood laisse supposer la structure d'une flavone ou un flavonol substitué en C-3.

L'examen de la série spectrale UV (spectre n° IV.2.2.1) montre :

- Le spectre enregistré dans le méthanol présente deux bandes à 274 nm et l'autre à 345 nm caractérisant un flavonoïde.
- L'ajout de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I comparativement à celui enregistré dans le MeOH ($\Delta\lambda_I = + 64$ nm) avec augmentation de l'intensité, révèle la présence d'un OH libre sur C-4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 336 nm montre la présence d'un OH libre en C-7. Ce spectre est stable avec le temps ce qui exclut les systèmes ortho dihydroxyles sur A.
- Un effet bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le milieu $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ comparativement à celui enregistré dans le MeOH ($\Delta\lambda_I = + 20$ nm) indiquant la présence d'un OH libre en C-5 et une oxygénation (-OR) en C-6.

Ces données mènent à la structure partielle suivante :





Spectre n° IV.2.2.1 : Série spectrale UV du composé F11 CN

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau IV.2.2.a

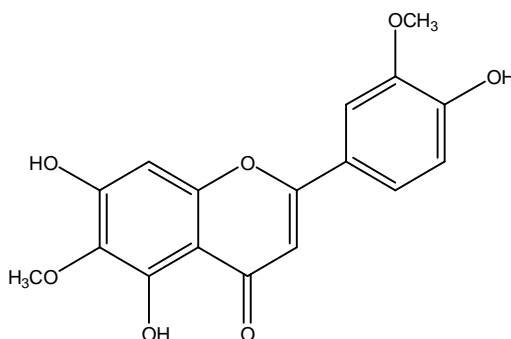
Tableau IV.2.2.a : Données de la série spectrale UV

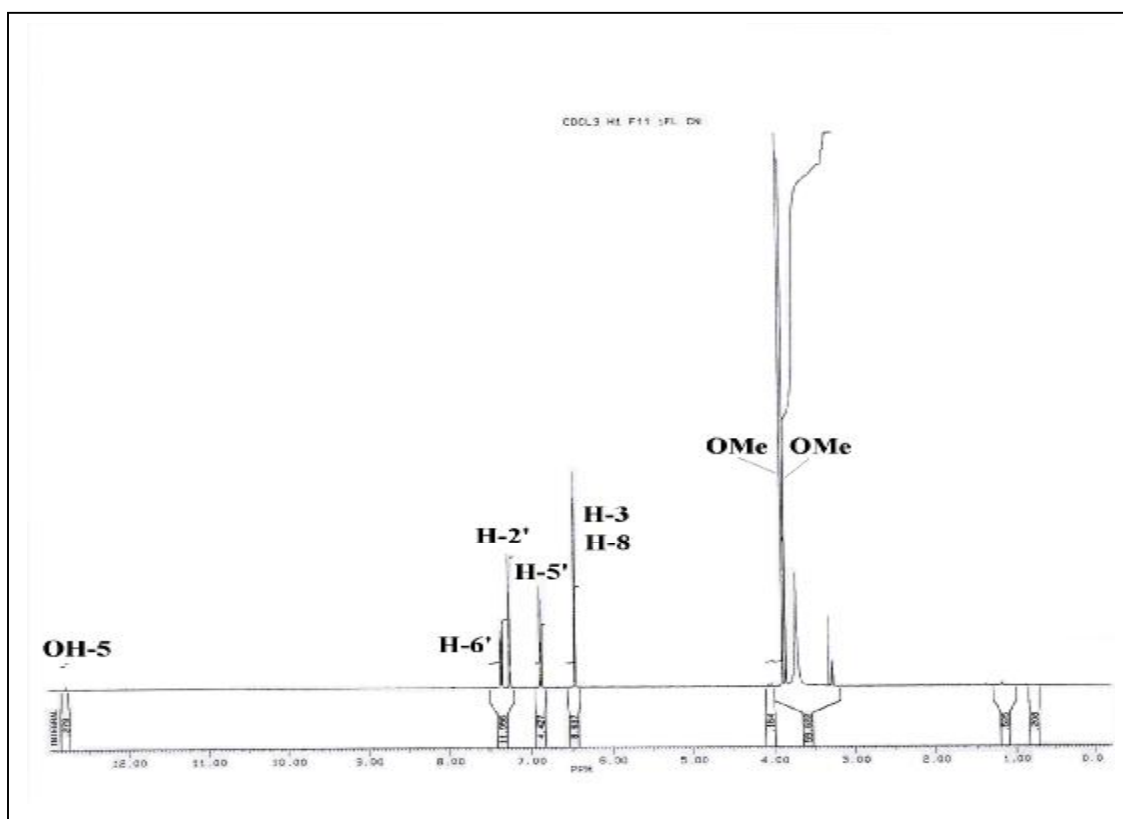
Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	345		274	flavone
+ NaOH	409	338	275	OH en C-4' OH en C-7
+AlCl ₃	365		286	OH en C-5
+AlCl ₃ /HCl	365		286	OR en C-6
+NaOAc	373	317	275	OH en C-7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	356	318	275	
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

L'étude du spectre RMN ¹H donne les indications suivantes (spectre n° IV.2.2.2) :

- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 12,85$ ppm confirme la présence d'un OH libre en position 5 du noyau A.
- Un doublet dédoublé d'intégration 1H à $\delta = 7,45$ ppm ($J = 8,4$ Hz ; 2,1) attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration de 1H à $\delta = 7,32$ ppm ($J = 2,1$ Hz) attribuables à H-2'.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,98$ ppm ($J = 8,4$ Hz) attribuable à H-5'.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,56$ ppm attribuable à H-3.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,54$ ppm attribuable à H-8.
- Deux singulets d'intégration 3H chacun à $\delta = 3,85$ ppm et $\delta = 3,80$ ppm attribuables à deux groupements méthoxyles. Ces deux groupements ne peuvent être qu'en position 3 et 6 compte tenu des résultats de la série spectrale UV.

L'ensemble de ces données, est en accord avec la littérature [31-32] mène à la structure de la **Jacéosidine**.





Spectre n°IV.2.2.2: Spectre RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé F11 CN

Le tableau n° IV.2.2.b. Rassemble les résultats de la RMN ^1H .

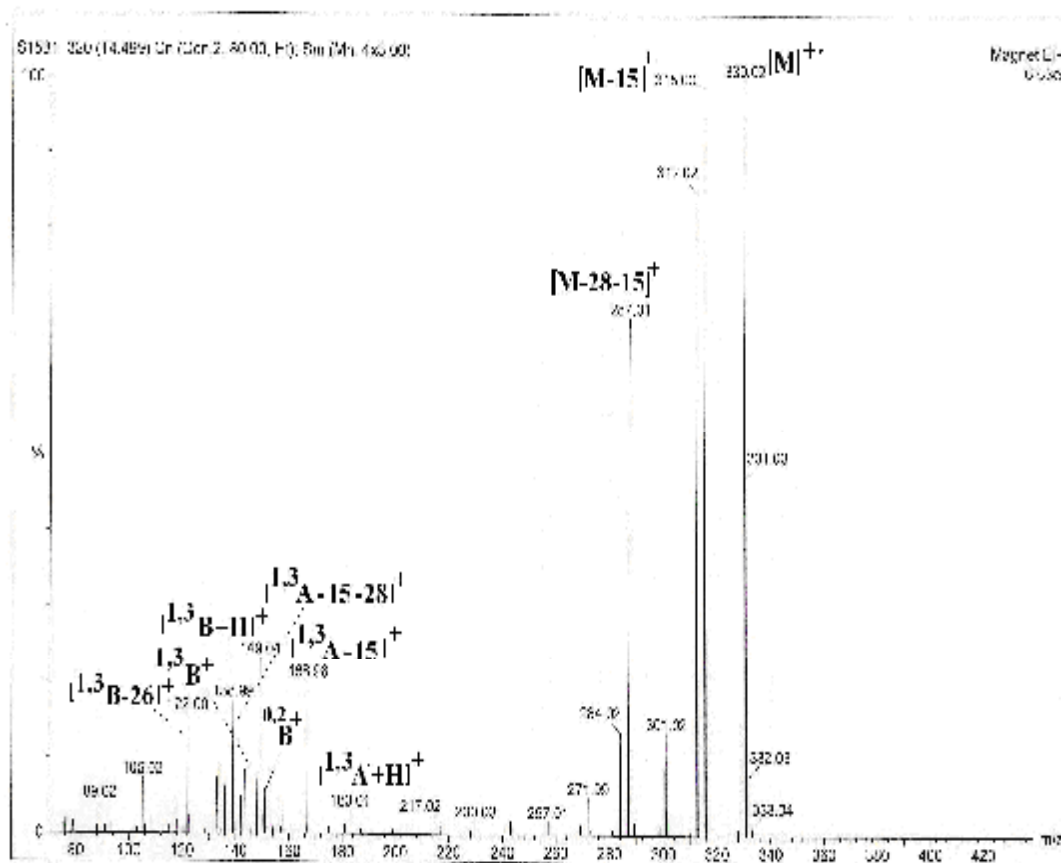
Tableau n° IV.2.2.a. : Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé F11 CN

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
12,85	1H	<i>s</i>	OH en C-5
7,45	1H	<i>dd</i> (8,4 ; 2,1)	H-6'
7,32	1H	<i>d</i> (2,1)	H-2'
6,98	1H	<i>d</i> (8,4)	H-5'
6,56	1H	<i>s</i>	H-3
6,54	1H	<i>s</i>	H-8
3,85	3H	<i>s</i>	OCH_3
3,80	3H	<i>s</i>	OCH_3

La structure du composé F11 CN est confirmée par l'étude de son spectre de masse en mode d'ionisation impact électronique à haute résolution (spectre n° IV.2.2.3) qui montre un pic moléculaire à $m/z = 330$ $[M]^+$ confirmant le squelette d'un flavonoïde de type aglycone de formule brute $C_{17}H_{14}O_7$.

Ce spectre montre également les signaux :

- Ø $m/z = 315$ correspondant à M-15 indiquant la présence de méthoxyles.
- Ø $m/z = 183$ correspondant au fragment $[^{1,3}A+H]^+$ indiquant un squelette flavonique dont le cycle A comporte deux hydroxyles et un méthoxyle.
- Ø $m/z = 167$ correspondant à $[^{1,3}A-15]^+$.
- Ø $m/z = 139$ correspondant à $[^{1,3}A-15-28]^+$.
- Ø $m/z = 151$ correspondant au fragment $^{0,2}B^+$ et $m/z = 148$ correspondant au fragment $^{1,3}B^{++}$ indiquant que le cycle B est substitué par un hydroxyle et un méthoxyle.
- Ø $m/z = 122$ correspondant à $[^{1,3}B-26]^+$ indiquant que c'est une flavone.



Spectre n°IV.2.2.3: Spectre HRSMIE du composé F11 CN

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] González, A.G., Rodríguez Pérez, E. M., Padrón, C. H. and Bermejo, J.,(1997), Phytochemical Investigation of Canary Island lichens. Virtual activity, and Pharmacology. : 49-60.
- [2] Mitaine-Offer, A. C., Tapondjou, L. A., Djoukeng, J. D., Bouda, H. and Lacaille-Dubois, M. A., (2003), *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**: 227-228.
- [3] Wanchai De-Eknakul, Buppachart Potduang, (2002), *Phytochemistry*, **62**, : 389-398.
- [4] Kupchan, M. S. and Bauerschmidt, E. (1971). *Phytochemistry*, **10(3)** : 664-666
- [5] Herz, W., Bhat, S. V. and V. Sudarsanam (1972), *Phytochemistry*, **11(5)** : 1829-1831
- [6] Gottlieb, O. R. and Mors, W. B. (1980), *J. Agric. Food Chem.*: **28(2)**; 196-215.
- [7] Rajbhandari, A. and Roberts, F. M. *J. Nat. Prod.*:(1983); **46(2)**: 194-195
- [8] Roberta M. Ma and P. S. Schaffer (1953).
Archives of Biochemistry and Biophysics, 47(2): 419-423
- [9] Kusano, G., Beisler J. and Sato Y. (1973). *Phytochemistry*, **12(2)**: 397-401
- [10] Flamini, G., Pardini, M. and Moreilli, I. (2001). *Phytochemistry*, **58**: 1229-1233.
- [11] Kadriya, S., El Deeb, R. A. A., Jaber, S. Mossa and Abdel-Monem, A. (2003).
Saudi Pharmaceutical Journal, **11(4)**: 184-191.
- [12] Yoshitaka, T. Kakuda, R., Kikuchi, M., Yaoita, Y and Kikuchi, M. (2003).
Chem. Phrm. Bul. 51(1), 89-91.
- [13] Harborne, J. B. (1963) *Phytochemistry*, **2(4)**: 327-334
- [14] Harborne, J. B. and Hall, E. (1964), *Phytochemistry*, **3(3)** : 421-428
- [15] Kupchan, S. M., Sigel, C. W., Hemingway, R. J., Knox, J. R. and Udayamurthy, M. S. (1969). *Tetrahedron*, **25(8)** 1603-1615
- [16] Rao, M. M., Kingston, D. G. I. and Spittler T. D. (1970). *Phytochemistry*, **9(1)**: 227-228
- [17] Herz, W. and Sudarsanam V. (1970), *Phytochemistry*, **9(4)**: 895-896
- [18] Herz, W., Bhat, S. V., Crawford, H., Wagner, H., Maurer, G. and Farkas, L. (1972).
Phytochemistry, **11(1)**: 371-375
- [19] Tiwari, R. D. and Singh J. (1977) *Phytochemistry*, **16(7)**: 1107-1108
- [20] Aritomi, M. and Kawasaki, T. (1984). *Phytochemistry*, **23(9)**: 2043-2047
- [21] Wagner, H., Rüger, R. and Farkas, L. (1977) *Chem. Ber.* **110**, 737-743
- [22] Agnese, A. M., Chiale, C. A., Cabrera, J. L. and Juliani, H. R. (1986)
J. Nat. Prod.; **49(3)** : 528-529.

- [23] Mashimo, K. and Sato, Y (1970), **26(3)**: 803-812.
- [24] Brieskorn, C. H. and Michel H. (1968). *Tetrahedron Letters* **9(30)**: 3447-3448
- [25] Nezhun Ates, N., Ulubelen, A., Dennis, C. W., Gregory, K., Brown, T., Mabry, J., Dellamonica, G. and Chopin, J (1982) *Journal of Natural Products*, **45(2)**: 189-190.
- [26] Parejo, I., Bastida, J., Viladomat, F. and Codina, C. (2005)
Phytochemistry, **66(19)**: 2356-2362
- [27] Flamini, G., Antognoli, E and IMorelli, I. (2001). *Phytochemistry*, **57(4)** : 559-564.
- [28] Morita, N., Shimizu, M. and Arisawa, M. (1973). *Phytochemistry*, **12(2)**: 421-423
- [29] Van Den Broucke, C. O., Dommissie, R. A., Esmans, E. L. and Lemli, J. A. (1982).
Phytochemistry, **21(10)**:2581-2583.
- [30] Wollenweber, E., Ingrid Schober, I., Clark, W. D. and Yatskievych, G. (1985).
Phytochemistry **24(9)**: 2129-2131.
- [31] Yong-Long, L. and Mabry T. J. (1982). *Phytochemistry*, **21(1)**: 209-214.
- [32] Husni A. A. Twaij, H. A. A., Kery, A. and Niran K. Al-Khazraji, N. K. (1983).
Journal of Ethnopharmacology, **9(2-3)**: 299-314.
- [33] Yang C. H and Wender, S. H. (1962) *Journal of Chromatography A.*, **(8)**: 82-89.
- [34] Gross, G. G., Stöckigt, J., Mansell, R. L. and Zenk M. H. (1973)
FEBS Letters, **31(3, 1)**: 283-286
- [35] Rong, J., Chen, Z., Corvini, P., Kappler, A., Brune, A., Haider, K. and Schäuffer, A.
(2005) *Chemosphere* **(60)**: 1169-1181.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Le but principal de notre travail est d'isoler et d'identifier les métabolites secondaires de type flavonoïde de deux espèces du genre *Centaurea* : *C. africana*. et *C. nicaensis* appartenant à la flore algérienne.

Notre choix pour ces deux espèces est justifié par l'endémisme de la première et leur richesse en métabolites secondaires présentant diverses activités biologiques.

Après extraction hydroalcoolique des parties aériennes des deux espèces, concentration et affrontements successifs au chloroforme, à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol, nous avons soumis les extraits chloroforme et acétate d'éthyle obtenus à la batterie chromatographique notamment la chromatographie sur colonne de gel de silice et sur plaques préparatives de gel de silice. Les structures des produits isolés ont été déterminées par la combinaison des différentes méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN et ses séquences, bidimensionnelle COSY (¹H-¹H), HSQC, HMBC, ainsi que la spectrométrie de masse HRIE et HRFAB.

L'étude phytochimique menée sur *C. africana* a permis l'obtention de 29 produits purs. Parmi lesquels nous avons établi à l'heure actuelle la structure de 19 d'entre eux.

Il s'agit de :

- Ø Huit flavonols dont cinq sous forme d'aglycones parmi lesquels, un original comme produit naturel et trois hétérosides dont un acylé d'originalité absolue.
- Ø Trois flavones méthoxylées pour la plupart.
- Ø Trois esters phénoliques et un acide phénolique
- Ø Deux stéroïdes dont un glucosylé.
- Ø Deux triterpènes (α et β -amyrine en mélange 36% et 64%).

L'étude phytochimique menée sur *C. nicaensis* a permis l'isolement et la détermination structurale de 2 flavones méthoxylées de la phase chloroforme.

Les résultats obtenus montrent que *Centaurea africana* est très riche en composés phénoliques notamment les flavonoïdes dont de nombreuses publications scientifiques soulignent des propriétés biologiques remarquables.

Résumé

Une recherche bibliographique ethnomédicale a montré que les espèces du genre *Centaurea*, largement présentes dans le règne végétal, sont très utilisées en médecine traditionnelle par les populations locales notamment en Algérie.

Appartenant à la famille des composées, ce genre est réputé pour accumuler des substances de type flavonique, molécules connues pour leur activités biologiques diverses notamment anti-oxydante.

Dans ce travail, notre intérêt a porté sur l'isolement de métabolites secondaires à la recherche de nouveaux modèles phénoliques susceptibles d'être bioactifs.

Concernant le choix des espèces à étudier, notre critère principal a été l'endémisme et le fait que certaines espèces n'ont jamais fait l'objet d'investigations phytochimiques. Ainsi nous avons sélectionné deux espèces : *C. africana* Lamk sous-espèce *africana* (Bonnet) M., endémique pour l'Algérie et la Tunisie et *C. nicaensis* variété *williana* M.

Après extraction, séparation et purification, les phases semi-polaires des extraits hydroalcooliques des parties aériennes de ces deux espèces ont mené à l'obtention à l'état pur et natif de 31 composés dont 21 ont été identifiés par la combinaison des données spectroscopiques notamment : la spectroscopie d'absorption UV-Visible, la RMN et ses séquences, bidimensionnelles (COSY ^1H - ^1H , HSQC, HMBC, ROESY et GOESY) ainsi que la spectrométrie de masse HRIE⁺ et HRFAB⁺. Il s'agit de :

- Ø huit flavonols dont cinq sous forme d'aglycones parmi lesquels un, original comme produit naturel et trois hétérosides dont un acylé d'originalité absolue.
- Ø cinq flavones méthoxylées pour la plupart.
- Ø Trois esters phénoliques et un acide phénolique
- Ø Deux stéroïdes dont un glucosylé.
- Ø Deux triterpènes (α et β -amyrine en mélange 36% et 64%).

Ce travail a fait l'objet d'une publication parue et d'une publication soumise. Il est en concordance avec les résultats de la littérature sur les espèces du genre *centaurea* et confirme en effet, la richesse du métabolisme secondaire des espèces de ce genre en composés phénoliques.

Ce travail apporte une nouveauté à ce genre, qui réside dans le fait que c'est la première fois qu'un flavonoïde glucosylé comportant un groupement acyle a été mis en évidence dans ce genre.

ملخص

أكدت نتائج التحقيقات في مجال الاستعمالات الطبية على جنس سنتوريا *centaurea* المتواجد بكثرة في الغطاء النباتي، استعمالاتها في الطب الشعبي التقليدي. و خصوصا الجزائر.

نضرا لانتمائه إلي عائلة المركبة، يمتاز هذا الجنس بغناء اي هه الثانوي بالمركبات الفلافونيدية المعروفة بفعاليتها البيولوجية المتنوعة وخاصة المضادة للأكسدة.

خلال هذا البحث، ركزنا اهتمامنا علي مركبات الايض الثانوي بحثا علي نماذج فينولية جديدة ذات فعالية بيولوجية متوقعة.

اختيارنا للأنواع المدروسة كان مبنيا على محليتها و عدم وجود دراسة فيتوكيميائية مسبقة عليها. هكذا وقع اختيارنا على نوعين من جنس السنتوريا وهما سنتوريا أفريكانا

(*Centaurea africana*, bonnet) (أصيلة بالجزائر و تونس) و سنتوريا نيكيانزيس

(*Centaurea nicaensis*, williana). و عليه ، بعد عملية الاستخلاص، الفصل و

التنقية أدت دراسة الأطوار نصف القطبية لمستخلص الكحول المميه للأجزاء الخارجية للنبتين إلى الحصول على 28 مركب نقي و في حالتها الطبيعية، تم تحديد بنى 20 منها

العمل الذي قمنا به تتمثل في دراسة الأيض الثانوي و خاصة الفلافونيدات، التي تعرف بتنوع فعاليتها البيولوجية لأنواع هذا الجنس.

خلال هذا البحث قمنا بدراسة التنوع البنيوي للفلافونيدات لنوعين من جنس السنتوريا وهما سنتوريا أفريكانا *centaurea africana* (أصيلة بالجزائر و تونس) و سنتوريا نيكيانزيس

(*centaurea nicaensis*).

إنجاز هذا العمل تطلب استعمال طرق الاستخلاص، الفصل و التنقية، تمكنا خلالها من فصل 28 مركب نقي من مستخلصين (كلورفورم، اسيتات الايثيل) لنوع سنتوريا أفريكانا حددنا

بنية 18 مركب. النوع الثاني هو خلال الدراسة، فصلنا منه مركبين و حددنا بنيتهما.

تحديد بنية كل المركبات تم بالاستعانة بطرق التحليل الطيفي و بشكل بارز مطيافية الرنين المغناطيسي بجميع أنواعها، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية ومطيافية الكتلة بتقنيات التأين المختلفة.