

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

Université Mentouri - Constantine
FACULTE DES SCIENCES
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 d'espèces du Genre
Genista (Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox*

Par :
MEKKIOU Ratiba

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. BELATTAR Abdelhamid	Professeur	Univ. Mentouri Constantine	Examineur
Mr. BENKOUIDER Abdelhamid	M.C,	Univ. El Hadj Lakhdar Batna	Examineur
Mr. DENDOUGUI Hocine	M.C,	Univ. Ouargla	Examineur

04 juillet 2005

Dédicaces

♥ *A mes chers **parents** qui m'ont aidé à être ce que je suis, avec tant d'amour et d'affection.*

♥ *A mes chers **frères et sœurs** ainsi que leur petites familles pour leur aide et leur soutien moral, je cite en particulier **Hicham** qui m'a assisté durant la dactylographie de cette thèse avec efficacité et patience ainsi que **Radouane** pour sa disponibilité.*

♥ *A toute ma famille et à tous ceux qui ont contribué un jour à mon éducation.*

Je dédie ce modeste travail.

RATIBA

Remerciements

Je tiens à exprimer mon profond attachement, ma gratitude et ma sincère reconnaissance à Madame **F. Benayache**, Professeur à l'université de Constantine, directrice de thèse, de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie, pour ses conseils et discussions scientifiques, sa compétence et sa grande patience qui ont permis de mener à bon terme ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur **S. Benayache**, Professeur à l'université de Constantine, pour sa disponibilité, ses conseils précieux et pour le grand honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

Je suis sensible à l'honneur que me fait Monsieur **M. Laabassi** professeur à l'université de Batna, Monsieur **A.H. Belattar** Professeur à l'université de Constantine, Monsieur **A. H. Benkouider**, Maître de conférences à l'université de Batna en acceptant de juger ce travail, je leur adresse mes plus vifs remerciements.

A Monsieur **H. Dendougui**, Maître de conférences à l'université de Ouargla, pour ses conseils précieux durant son séjour à Constantine et en acceptant de juger ce travail, je lui adresse mes sincères remerciements.

Les paroles ne suffisent pas pour remercier Madame **A. M. Mariotte** professeur à l'université de Grenoble et Madame **M. G. Franka Dijoux** Maître de conférences à l'université de Grenoble (France) pour leur chaleureux accueil et leur aide précieuse durant mon stage ainsi que l'enregistrement des spectres RMN et SM.

Ma spéciale gratitude et mes grands remerciements sont adressés à Monsieur **M. Rideau** Professeur à l'université de tours (France), Madame **E. Seguin** Professeur à l'université de Rouen (France) pour leur accueil et leur aide durant mes courts stages dans leurs laboratoires.

Mes plus vifs remerciements vont à Monsieur **J. B. Barrera** Professeur à l'université La Laguna (Espagne) pour son accueil, sa disponibilité, ses conseils et surtout pour l'enregistrement des spectres RMN mono et bidimensionnelle et les spectres de masse.

Je remercie spécialement Monsieur **S. Aida**, Professeur à l'université de Constantine, Département de physique, pour m'avoir permis l'utilisation de son appareillage de laboratoire.

Bien que la thèse soit fondamentalement un travail individuel, elle n'aurait pu être menée à bien sans une équipe de collègues qui contribuent au bon fonctionnement du laboratoire, avec lesquels il est possible d'échanger conseils et suggestions, et qui assurent une atmosphère de travail donnant envie de se lever chaque matin. Je remercie pour cela tous mes collègues anciens et actuels de l'institut de Chimie et tous les membres du laboratoire de phytochimie et d'analyses physico-chimiques et biologiques de Constantine, Je cite en particulier Omar, Ouahiba, Hayet, Zaiter, Sabrina, Ouahiba, Hanène, Hanène, Chawki, Souada.

Je tiens à remercier monsieur Djarri, monsieur Menad et Souad pour leur aide précieuse.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Chahrazed, monsieur K. Djebbar et monsieur A. Boulkamh pour leur aide précieuse.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
Références bibliographiques	4

PARTIE SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : La famille des légumineuses et le genre *Genista*

I-1- La famille des légumineuses	5
I-1-1 – Généralités	5
I-1-2 – Classification	5
I-1-2-1 : La sous famille des papilionacées ou fabacées.....	5
I-1-3 : Importance économique des fabacées	6
I-1-4 : Plantes médicinales et utilisation thérapeutique.....	7
I-1-5 : Toxicité de certaines fabacées	9
I-1-6 : Les métabolites secondaires les plus courants chez les fabacées....	11
I-1-6 -1- Les alcaloïdes	11
I-1-6 -2- Les coumarines	14
I-1-6 -3- Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes	15
I-2- Le genre <i>Genista</i>	19
I-2-1 : Introduction	19
I-2-2 : Généralités	19
I-2-3 : Description du genre	19
I-2-4 : Distribution et aire géographique	19
I-2-5 : Caractère chimique du genre <i>Genista</i>	20
I-2-6 : Intérêt biologique du genre <i>Genista</i>	24
Références bibliographiques	25

Chapitre II : Flavonoïdes et Isoflavonoïdes

II-1-Flavonoïdes et Isoflavonoïdes	30
II-1- 1-Généralités	30
II-1-2- Classification	30
II-1-3- La biosynthèse	34
II-1-3-1- Biosynthèse des flavonoïdes	35
II-1-3-2- Biosynthèse des isoflavonoïdes.....	37
II-1-4- Substitution du squelette flavonique	38
II-1-4-1- La <i>O</i> -substitution	38
II-1-4-1a- L'hydroxylation	38
II-1-4-1b- La méthylation	39
II-1-4-1c- La <i>O</i> -glycosylation.....	39
II-1-4-2- La <i>C</i> -substitution	40
II-1-4-2a- La <i>C</i> -méthylation	40
II-1-4-2b- La <i>C</i> -glycosylation.....	40
II-2- Propriétés des flavonoïdes	40
II-3- Influence des polyphénols sur la santé humaine	41
II-4- Relation structure-activité.....	42
II-4- 1- Cas des flavones et flavonols	42
II-4- 2- Cas des isoflavones.....	43
II-4- 3- Autres activités des polyphénols	43
II-5- Etude chimique des flavonoïdes	43
II-5-1- Extraction	43
II-5-2- Séparation et purification	44
II-6- Analyse structurale des flavonoïdes	44
II-6-1- Généralités	44
II-6-2- Facteur de retardement et comportement chromatographique	45
II-6-3- Fluorescence sous lumière de Wood	45
II-6-4- La spectrophotométrie UV-Visible	46
II-6-4-1- Addition de réactifs (Série spectrale UV)	48

II-6-4-1a- Spectre en présence de NaOH	48
II-6-4-1b- Spectre en présence de NaOAc	48
II-6-4-1c- Spectre en présence de NaOAc + H ₃ BO ₃	49
II-6-4-1d- Spectre en présence de AlCl ₃ et AlCl ₃ + HCl	49
II-6-4-2- L'hydrolyse acide des hétérosides.....	50
II-6-5- La spectrométrie de masse.....	51
II-6-6- La résonance magnétique nucléaire	51
Références bibliographiques	52

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III : Partie expérimentale

III-I- Etude chimique de L'espèce <i>G. saharae</i> Coss. & Dur	60
III-1- 1 : Etude bibliographique	60
III-1-2 : Choix du matériel végétal	60
III-1-3 : Place dans la systématique	61
III-1-4: Description botanique	61
III-1-5 : Répartition géographique	61
III-1-6 : Protocole expérimentale	62
III-1-6-1 : Récolte du matériel végétal	62
III-1-6-2 : Extraction	63
III-1-6-3 : Séparation chromatographique	65
III-1-6-3a : Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme	65
III-1-6-3b : Séparation et purification des composants de l'extrait Acétate d'Ethyle	71

III-1-6-3c : Séparation et purification des composants de l'extrait <i>n</i> -butanol	76
III-2- Etude chimique de L'espèce <i>G. ferox</i> Poirret.....	78
III-2-1 : Etude bibliographique	78
III-2-2 : Choix du matériel végétal	78
III-2-3 : Place dans la systématique	78
III-2-4 : Description botanique	79
III-2-5 : Répartition géographique	79
III-2-6 : Protocole expérimentale	80
III-2-6-1 : Récolte du matériel végétal	80
III-2-6-2 : Extraction.....	80
III-2-6-3 : Séparation chromatographique	82
III-2-6-3a : Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme	82
III-2-6-3b : Séparation et purification des composants de l'extrait Acétate d'Ethyle	87
III-2-6-3c : Séparation et purification des composants de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	92
Références bibliographiques.....	97

Chapitre IV : Résultats et Discussions

IV-1- Détermination structurale des produits isolés de l'espèce <i>G. saharae</i> Coss. & Dur.	99
IV-1-1- Le composé SC53.....	99
IV-1-2- Le composé SC71.....	107
IV-1-3- Le composé SC82.....	114
IV-1-4- Le composé SC952.....	122
IV-1-5- Le composé SC96.....	127

IV-1-6- Le composé SA73=SB3	132
IV-1-7- Le composé SB1.....	136
IV-1-8- Le composé SB2.....	140
IV-1-9- Le composé SB4.....	143
Conclusion	157
IV-2- Détermination structurale des produits isolés de l'espèce	
<i>G. ferox</i> Poirret.	158
IV-2-1- Le composé FC112.....	158
IV-2-2- Le composé FC131.....	169
IV-2-3- Le composé FA83	174
IV-2-4- Le composé FA122	179
IV-2-5- Le composé FA132	185
IV-2-6- Le composé FA232	191
Conclusion.....	198
Références bibliographiques.....	199
Conclusion générale	200

ANNEXE

Conclusion générale

Le but principal de notre travail est d'isoler et d'identifier les métabolites secondaires de type flavonoïdes notamment les isoflavonoïdes de deux espèces du genre *Genista*, *G. saharae* Coss. & Dur. et *G. ferox* Poirret, appartenant à la flore algérienne.

Notre choix pour ces deux espèces est justifié par le fait qu'elles sont toutes les deux endémiques et riches en composés phénoliques notamment les isoflavonoïdes connus pour leurs activités biologiques diverses.

Après extraction hydroalcoolique des parties aériennes des deux espèces, concentration et affrontement au CHCl_3 , AcOEt et *n*-butanol successivement, nous avons soumis les divers extraits organiques obtenus à la batterie chromatographique notamment la chromatographie sur colonne de gel de silice, sur plaques préparatives de gel de silice et de polyamide, et sur papier Whatman III. 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 , XHCOR, COLOC ainsi que la spectrométrie de masse IE et FAB.

L'étude phytochimique menée sur *G. saharae* a permis l'obtention de 24 produits purs. Parmi lesquels nous avons établi à l'heure actuelle la structure de neuf.

Il s'agit de :

- cinq isoflavones dont trois C-glucosylées, une de ces isoflavones, d'une originalité absolue a fait l'objet d'une publication internationale.
- trois flavones.
- Un flavonol.

L'étude phytochimique menée sur *G. ferox* a permis l'isolement et la détermination structurale de la composante semi-polaire :

- du phytol,
- du β -sitostérol
- de trois flavones
- d'une isoflavone.

De la composante polaire, nous avons pu obtenir treize produits à l'état pur.

Les résultats obtenus montrent que ces deux espèces sont riches en composés phénoliques notamment les isoflavones (génistéine et ses dérivés) dont de nombreuses publications scientifiques soulignent des propriétés biologiques remarquables (anticancéreux et spécialement phytoestrogène...).

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE :

Depuis les temps les plus reculés, l'Homme a utilisé des plantes, d'abord pour se nourrir, puis pour se soigner. Après de nombreux tâtonnements successifs au cours des siècles, une première distinction a pu être faite entre plantes comestibles et plantes toxiques. Au cours du temps, d'autres constatations ont permis de sélectionner des plantes pour soigner des maladies et d'autres plantes pour soigner d'autres maladies. Les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Jusqu'au début du XX^{ème} siècle, presque tous les médicaments étaient d'origine végétale.

De nos jours, de très nombreuses plantes sont utilisées par une majorité des habitants du globe en **médecine traditionnelle** de façon **empirique** (pas de bases scientifiques, "simplement" l'observation au cours des siècles). Les plantes (entières ou parties) ayant une **activité thérapeutique** reconnue, sont inscrites à la **Pharmacopée** (registre officiel précisant la définition et le contrôle des matières premières utilisées à des fins thérapeutiques). Certaines plantes citées en pharmacopée sont utilisées en :

- ❖ **phytothérapie** (plantes entières ou parties de plantes, ex. tisanes),
- ❖ **aromathérapie** (huiles essentielles ou essences),
- ❖ **gemmothérapie** (bourgeons),
- ❖ **homéopathie** (la plupart des médicaments homéopathiques),
- ❖ **allopathie** (présence d'extraits végétaux dans certaines spécialités, molécules actives extraites de plantes...).

Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont utilisées, les plantes sont extrêmement complexes du point de vue de leur composition chimique. On estime qu'elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents, dont quelques-uns seulement (ou parfois un seul) sont responsables de l'effet thérapeutique ou de l'effet toxique [1]. Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes médicinales afin d'étudier leur efficacité, leur mode d'action et bien entendu leurs effets secondaires sur la santé humaine.

Dans le cadre de la recherche de molécules nouvelles d'origine végétale à activités biologiques, plusieurs critères sont pris en considération, le plus utilisé reste leur emploi en médecine traditionnelle et populaire.

Le chemin qui mène de la plante à ses constituants purs est très long et nécessite un travail d'équipes pluridisciplinaires (botanistes, chimistes, ethnologues etc...), le travail de phytochimiste concerne essentiellement l'isolement, la purification et enfin la détermination structurale du produit isolé, et c'est dans cet axe que notre contribution peut s'inscrire.

Le règne végétal avec ses 400.000 à 500.000 espèces représente une source inépuisable de molécules actives, et le potentiel des plantes comme source de nouveaux médicaments reste immense.

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

Le genre *Genista* appartient à la famille des légumineuses (fabales), sous famille des papilionacées (fabacées), tribu des genistées (genisteeae) a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques. Ces travaux ont permis l'isolement de plusieurs types de produits dont les plus majoritaires sont les alcaloïdes [3-6], et les composés phénoliques notamment les flavonoïdes et les isoflavonoïdes [7-10].

Le sol algérien compte 16 espèces de ce genre dont 11 endémiques [2], nos investigations bibliographiques, ont montré que très peu d'études phytochimiques ont été mené sur ces espèces, c'est ce qui nous a encouragé à entreprendre ce travail à la recherche de nouvelles molécules a activité biologique potentielle.

Les composés phénoliques sont largement présents dans le règne végétal. Parmi eux, les flavonoïdes et les isoflavonoïdes forment une catégorie importante, aux propriétés multiples.

Ces composés issus du métabolisme secondaire font l'objet de nombreuses recherches orientées en particulier sur la connaissance de leurs structures chimiques et de leurs propriétés thérapeutiques.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche lancé par notre laboratoire qui a pour but l'étude systématique des espèces du genre *Genista* et consiste en l'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires notamment les flavonoïdes et les isoflavonoïdes.

La présentation de nos travaux peut être répartie comme suit :

Une première partie, bibliographique, Comportant deux chapitres dont :

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

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

- Le troisième chapitre qui consiste en la présentation des techniques d'isolement, et de purification des flavonoïdes et isoflavonoïdes des deux espèces étudiées: *Genista saharae* Coss. & Dur. et *Genista ferox* Poirret.
- Le quatrième chapitre qui renferme la discussion des résultats obtenus.

Enfin une conclusion générale.

Références bibliographiques

- [1] **Hostettmann, K., Potteray, O. and Wolfender, J. L. (1998b),**
The potential of higher plants as a source of new drugs. *Chimie*, 52, 10-17.
- [2] **Quezel, P. and Santa, S. (1963),**
Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S.
Paris.
- [3] **Pistelli, L., Bertoli, A., Giachi, I., Morselli, I., Rubiolo, P. et Bicchi, C. (2001),**
Quinolizidine alkaloids from *Genista ephedroides*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29 (2), 137-141.
- [4] **Christov, V. and Evstalieva, L. (2000),**
Alkaloid profile of Bulgarian species from genus *Genista*. *Dokladi na Bulgarskata Akademiya na Naukite*, 53(11), 25-28.
- [5] **Van Rensen, L., Wrey, V., Witte, L., Canto, P., Grenwald, R., Veen, G., Veit, M. and Czygan, F. C. (1994),**
Ester alkaloids of *Genista cinerea* subspecies *cinerea*. *Phytochemistry*, 95(2), 421-424.
- [6] **Tosun, F., Tanker, M., Ozden, T. and Tosun, A. (1987),**
Alkaloids of *Genista involucrata* and *Genista albida*. *Planta Med.*, 58, 499-505.
- [7] **Pistelli, L., Bertoli, A., Giachi, I. and Manumata, A. (1998),**
Flavonoids from *Genista ephedroides*. *Journal of Natural Products*, 61(11), 1404-1406.
- [8] **Van Rensen, I., Veit, M., Wrey, V. and Czygan, F. C. (1996),**
Genistein-C-glucoside from *Genista cinerea*. *Natural Products letters*, 6 (3), 203-207.
- [9] **Giachi, I., Manunta, A., Morelli, I. and Pistelli, L. (2002),**
Flavonoids and isoflavonoids from *Genista morisii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(8), 801-803.
- [10] **Pistelli, L., Giachi, I., Potenzs, D. and Morselli, I. (2000),**
A New Isoflavone from *Genista corcica*. *Journal of Natural Products*, 63, 504-506.

I-1- LA FAMILLE DES LEGUMINEUSES

I-1-1 : GENERALITES:

L'origine de cette famille se trouve chez les rosacées à gousse appelées par les premiers botanistes "légume" d'où le nom donné à la famille [1]. Elles ont des feuilles simples ou composées, ordinairement alternes et stipulées, les fleurs sont du type 5 avec 2 verticilles d'étamines mais un seul carpelle qui donnera une gousse bivalve ou légume [2, 3].

L'immense famille des **légumineuses**, communément appelées **fabales** [4] est souvent considérée comme un ordre indépendant. C'est après, les composées et les orchidées, la famille la plus importante du règne végétal, on y compte 700 genres et 17.000 espèces environ, répandus dans le monde entier [3].

I-1-2 : CLASSIFICATION:

En fait, les spécialistes s'accordent à classer cette superfamille en trois groupes se rejoignant sur le principe et ne s'entendant pas sur le rang taxinomique à donner à ces groupes, certains font de l'ensemble une famille "**Leguminosae juss.**" ou "**Fabales**" et le divise en trois sous familles "**Caesalpinioideae, Mimosoideae et papilionoideae ≡ Faboideae**", d'autres font de ces trois groupes des familles "**Caesalpinaceae, Mimosaceae et Fabaceae**" [5]:

- Les deux premières (**Caesalpinaceae et Mimosaceae**) : regroupent surtout des buissons et des arbres tropicaux et sub-tropicaux comme: *Mimosa, Acacia*.
- La troisième (**Fabaceae**) : compte surtout des plantes herbacées, cosmopolites, elle est particulièrement bien représentée dans les zones tempérées comme: Trèfles, pois, haricots,... etc. Cette dernière fait l'objet de notre présente étude.

I-1-2-1 : La sous famille des papilionacées ou fabacées :

C'est une sous famille exceptionnellement homogène, très reconnaissable à l'aspect de ces feuilles alternes, stipulées et composées pennées ; à celui de ses fleurs, à corolle dite en "**papillon**" d'où son nom "**papilionacées**", les dix étamines sont souvent soudées, et les graines sont dépourvues d'albumen [1- 3].

Les fabacées (papilionacées) constituent la sous-famille la plus nombreuse avec 350 genres et 10.400 espèces environ [5, 6]. Elle est subdivisée en nombreuses tribus d'après la nature de l'androécée, les caractères des gousses, des feuilles, etc. Ces tribus sont à leur tour subdivisées en plusieurs genres.

I-1-3 : IMPORTANCE ECONOMIQUE DES FABACEES:

La vaste sous famille des fabacées regroupe de nombreuses plantes utiles recevant des applications industrielles, alimentaires ou encore ornementales [7].

L'intérêt agronomique des fabacées provient en premier lieu de leur aptitude à s'associer à des bactéries du sol (*Rhizobiacées*), spécialement la bactérie « *Rhizobium leguminosafum* », pour former des organes symbiotiques racinaires "nodules" au sein desquels ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante, grâce à quoi, les fabacées peuvent produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée. Pour cela, elles sont dites plantes améliorantes [8, 9].

L'intérêt alimentaire découle du fait que les fabacées constituent une source très importante de protéines et lipides et rentrent dans l'alimentation humaine et animale [1, 10] :

- Protéagineux tels que le Pois (*Pisum*), la Féverole (*Faba*), le Haricot (*Phaseolus*), le Pois chiche (*Cicer*) et les Lentilles (*Ervum*).
- Oléo protéagineux comme le Soja (*Soja*) et l'Arachide (*Arachis*).
- Fourrages tels que les Luzernes (*Medicago*), le Sainfoin (*Onobrychis*) et le Trèfle (*Trifolium*).

L'intérêt industriel résulte du fait que beaucoup d'espèces de cette famille fournissent des produits industriels tels que le Soja qui est utilisé à grande échelle dans l'élevage industriel, les *Derris* et les *Lonchocarpus* qui donnent les roténoïdes insecticides [1].

On peut citer comme exemple les *Derris*, dont l'espèce *Derris elliptica* Benth. est utilisée contre les parasites des animaux domestiques, des habitations et des végétaux [11].

D'autres espèces produisent des substances colorantes, et d'autres sont utilisées en parfumerie comme *Pterocarpus santalinus* [12]. Certaines espèces sont ornementales tels que le Robinier, faux Acacia, Cytise, Glycine, ... etc. [6].

L'intérêt pharmaceutique des fabacées est à son tour très important vu le nombre élevé d'espèces figurant dans les pharmacopées et donnant de nombreux produits utilisables en thérapeutique [11-19].

I-1-4 : PLANTES MEDICINALES ET UTILISATION

THERAPEUTIQUE :

Beaucoup d'espèces de fabacées ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance alimentaire et ayant des propriétés médicinales : [13, 14].

- ❖ *Trigonella foenum graecum* (**fenugrec**) : Son nom vernaculaire **halba**. C'est une plante herbacée originaire du Proche Orient, aujourd'hui largement cultivée. Le fenugrec est utilisé dans le traitement des plaies, diarrhées, acné, déshydratation, anémie, bronchite, rhumatismes, maux d'estomac, hypertension artérielle, constipation. Cette plante est également consommée comme fortifiante par les femmes après l'accouchement. Les graines ont des propriétés nutritives importantes et des effets hypocholestérolémiants, elles sont traditionnellement utilisées comme stimulant de l'appétit et pour la prise de poids.
- ❖ *Cicer arietinum* (pois chiche) : Le pois chiche a des propriétés stimulantes, il peut aussi soigner les plaies, la diarrhée et l'acné.
- ❖ *Vicia faba* (fève) : Les graines en usage interne soignent les gastralgies et le pyrosis, en usage externe elles sont mâchées puis appliquées localement pour soigner les abcès.
- ❖ Les lentilles sont utilisées pour soigner les brûlures.
- ❖ *Ceratonia siliqua* dont le nom vernaculaire est « Kharrouba » (graine de caroube), cette espèce est connue pour ces propriétés antidiarrhétiqes et émoullients.
- ❖ *Arachis hypogaea* L. (Arachide) : l'huile d'Arachide est utilisé comme solvant médicamenteux. Il a également des propriétés vitaminiques P : action antihémorragique au niveau des capillaires [11].
- ❖ *Glycine soja* Siebold et Zucc. : c'est une espèce de très grande richesse en protides. Pour cette raison, la farine de Soja est un élément diététique intéressant et entre dans la constitution de milieux de culture destinés à la production

d'antibiotiques. L'huile de Soja d'une très grande importance économique est utilisée en thérapeutique pour l'alimentation parentérale [11].

Par ailleurs, on peut signaler que beaucoup d'autres espèces non alimentaires ont des applications médicales telles que :

- ❖ *Mucuna pruriens* : il existe peu d'emplois traditionnels de cette plante, cependant : - Des trichomes, ont été isolées la sérotonine et surtout la mucunaïne, enzyme libérant de l'histamine et responsable de l'action urticante [15].
- Des graines, ont été obtenues plusieurs bases indoliques en particulier la L-DOPA (dihydroxyphénylalanine) qui permet de soigner la maladie de Parkinson et des maladies mentales [16]. Par ailleurs, ces graines ont montré une activité hypoglycémiant et hypocholestérolémiant [17].
- ❖ *Pterocarpus soyauxii* : Le décocté d'écorces est recommandé dans tous les cas de dysenterie (diarrhée), dans certaines affections des voies respiratoires et pour guérir les plaies en usage externe [12].
- ❖ *Crotolaria podocarpa* D. C.: L'infusé de la partie aérienne est prescrit contre les affections génitales [18].
- ❖ Melilot : C'est une plante herbacée commune dans toute l'Europe. Deux espèces du mélilot sont très abondantes, le *Melilotus alba* à fleurs blanches et le *Melilotus officinalis* à fleurs jaunes (schéma I-1). L'extrait de mélilot a des propriétés thérapeutiques, il diminue l'œdème et augmente le débit veineux et lymphatique, il est indiqué pour améliorer les symptômes dans les cas des phlébites et autres troubles circulatoires. Il est aussi utilisé pour le soulagement des crises d'hémorroïdes [19].

En médecine traditionnelle, on attribue au mélilot des propriétés diurétiques, antispasmodiques et antiseptiques des voies urinaires [19].



Melilotus alba



Melilotus officinalis

Schéma I-1 : Photos des deux espèces de *Méllilot*

I-1-5 : TOXICITE DE CERTAINES FABACEES :

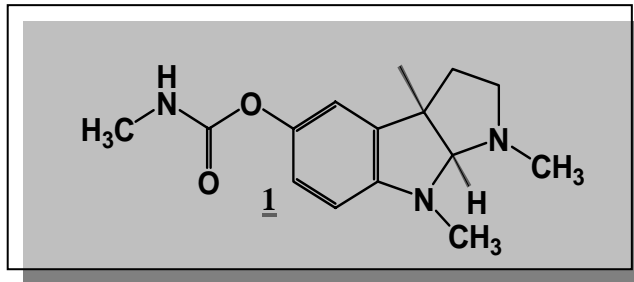
Un nombre non négligeable de fabacées est toxique et il est important de noter que son ordre comporte plus de 16000 espèces dangereuses [5]. Après avoir cité quelques espèces d'intérêt thérapeutique, il serait utile d'attirer l'attention sur un certain nombre d'espèces dangereuses. Les parties le plus souvent incriminées dans les empoisonnements sont les graines où sont accumulés les principes toxiques.

- ❖ *Physostigma venenosum* : (fève de Calabar) (schéma I-2), elle est spontanée en Afrique occidentale et est utilisée par les habitants locaux comme poison d'épreuve. Le principal principe actif de cette espèce est la physostigmine **1** ou ésérine isolée dès 1864. C'est un inhibiteur réversible des cholinestérasés. Elle empêche la destruction de l'acétylcholine et se comporte comme un parasymphomimétique provoquant bradycardie, hypotension et autres effets comme vertiges, convulsions, paralysie respiratoire [20].

Cependant la physostigmine reste intéressante dans la myasthénie et dans les soins à donner aux malades empoisonnés par les organophosphates. Il a été reporté que la prise par voie orale ou intraveineuse de physostigmine redonnait la mémoire aux patients atteints de la maladie d'Alzheimer [21].



Schéma I-2 : Photo de *Physostigma venenosum*



Physostigmine ou *ésérine* isolée de *Physostigma venenosum*

- ❖ *Tephrosia vogelii* : elle est utilisée comme poison de pêche. Les feuilles, les gousses et les graines sont grossièrement pilées et jetées dans les cours d'eau préalablement barrés. Les poissons meurent et remontent à la surface. Possédant des propriétés insecticides, elle est utilisée pour la désinfection des animaux domestiques et les habitations [22].
- ❖ Certaines espèces du genre *Coronilles*, sont toxiques à certains moments de leur développement. Spontanément, le bétail évite de les consommer à ces périodes [3].
- ❖ Le mélilot, déjà cité, pour ses propriétés thérapeutiques devient toxique à de très fortes doses, il provoque divers troubles et se montre émétique. Lorsque le mélilot moisit, la coumarine se transforme en dicoumarol, substance toxique utilisée pour tuer les rats et les souris par hémorragie interne [23].

I-1-6 : LES METABOLITES SECONDAIRES LES

PLUS COURANTS CHEZ LES FABACEES :

La recherche bibliographique réalisée sur cet axe montre que la majorité d'études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces de la famille des fabacées certifie la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites secondaires tels que : les **alcaloïdes** [24-26], les **coumarines** [27], les **composés phénoliques** de type **flavonique** et **isoflavonique** [28-35], et en petites quantités les **stéroïdes** [36] et les **saponosides** [37].

Pour notre part, nous allons parler des métabolites secondaires les plus distribués dans les différentes espèces de la famille et qui sont les alcaloïdes, les coumarines, les flavonoïdes et les isoflavonoïdes, ainsi que de leurs rôles pharmacologiques.

I-1-6 - 1- Les alcaloïdes :

Le terme **alcaloïde** a été introduit au début du XIX^{ème} siècle par Meisner [4]. Ce sont des substances organiques d'origine naturelle (le plus souvent végétale), renfermant de l'azote, généralement incorporé dans un système hétérocyclique. La plupart ont des propriétés basiques. Il existe plusieurs types d'alcaloïdes, certains ont de structures très simples, d'autres de structures beaucoup plus complexes.

D'une manière générale, les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques très variées ainsi que par leur toxicité [38- 40]. Ils agissent en tant que :

- ❖ Dépresseurs au niveau du système nerveux central (morphine, scopolamine)
- ❖ Stimulants (caféine, strychnine)
- ❖ Anesthésiques locaux (cocaïne)
- ❖ Ganglioplégiques (spartéine, nicotine)
- ❖ Parasymphomimétique (physostigmine ou ésérine, pilocarpine).

Concernant la famille des fabacées, la production d'alcaloïdes est orientée vers trois types :

- Alcaloïdes pyrrolizidiniques issus de *Crotalaria* spp.

- Alcaloïdes indolizidiniques extraits des genres : *Astragalus*, *Oxytropis*, *Swainsona*.
- Alcaloïdes quinolozidiniques qui caractérisent un grand nombre de genres de cette famille tels que : *Anagyris*, *Cytisus*, *Genista*, *Laburnum*, *Lupinus*, *Spartium*, etc. [5].

Ces alcaloïdes sont responsables, dans un certain nombre de cas de l'activité et / ou de la toxicité de ces espèces. Dans ce qui suit nous allons citer certaines espèces de la famille de fabacées contenant des alcaloïdes.

- ❖ Diverses espèces de *Crotalaria* sont toxiques par la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques comme la pyrrolizidine **2**, la supinidine **3**, qui provoquent des intoxications marquées par la toxicité hépatique et pulmonaire [41].
- ❖ Genêt à balais, *Cytisus scoparius* L. Link., (Schéma I-3), cette espèce est une source de la (-) spartéine **4**, alcaloïde quinolizidinique ganglioplégique et analeptique cardiaque. Les autres alcaloïdes sont la lupanine **5** et ses dérivés ainsi que l'ammodendrine **6** et ses dérivés [27].
- ❖ Cytise : (*Cytisus laburnum* L = *Laburnumanagyroides* Med) toutes les parties de la plante renferment des alcaloïdes quinolizidiniques. Les graines sont caractérisées par la présence majoritaire de la cytisine **7** à côté de l'anagyrine **8** et l'ammodendrine **6** qui sont le plus souvent responsables d'intoxications [7].



Schéma I-3 : Photo de *Cytisus scoparius*

- ❖ Lupins, *Lupinus* spp. (schéma I-4) : plusieurs espèces de ce genre renferment dans leurs organes, surtout dans les graines, des alcaloïdes quinolizidiniques tels que : la lupanine **9**, la lupanine **5**, l'anagyrine **8** [42]. De nombreuses espèces de Lupins doivent leur toxicité à l'anagyrine **8**, alcaloïde responsable d'une activité tératogène chez les bovins [43].



Fleurs de *Lupinus*



Lupinus angustifolius

Schéma I-4 : Photo de *Lupinus*

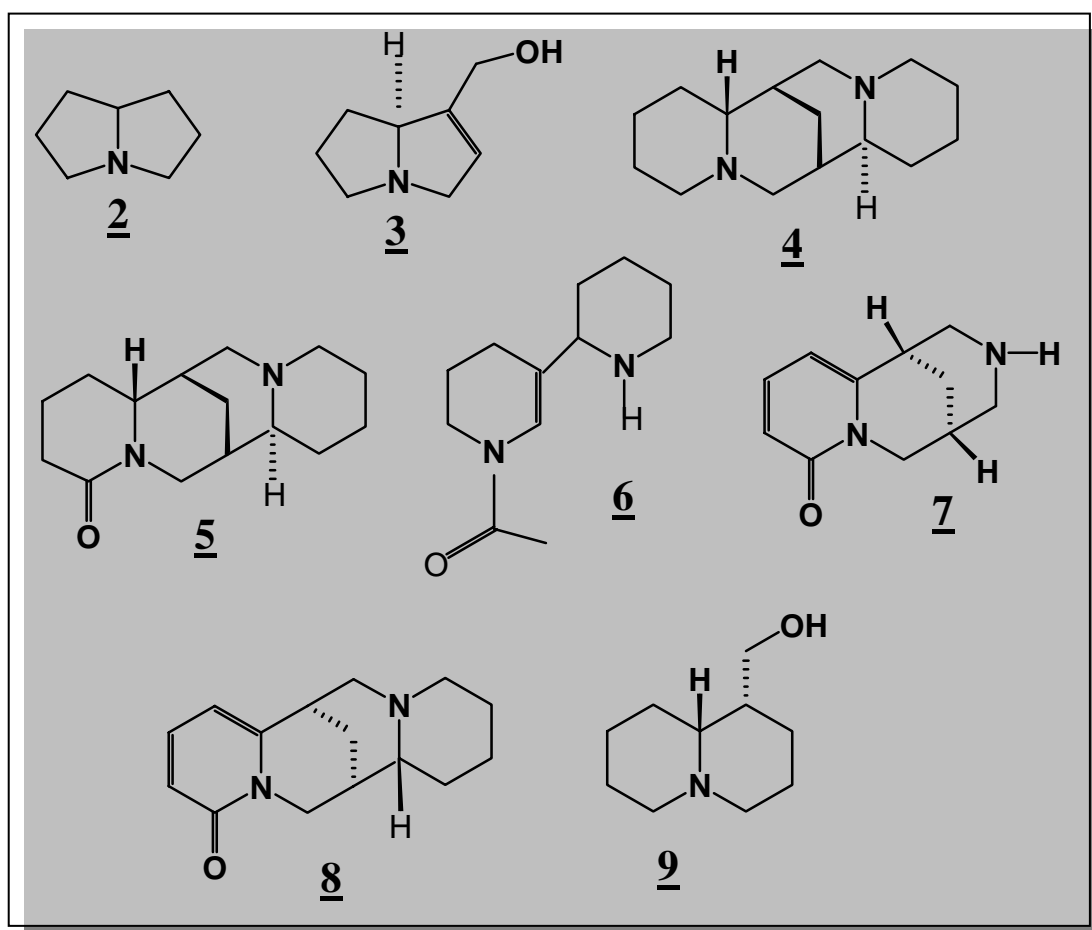
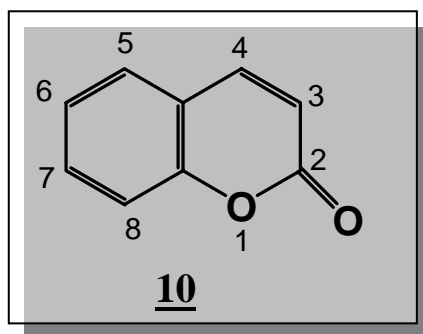


Schéma I-5 : Structures chimiques de quelques alcaloïdes isolés de certaines espèces de la famille des fabacées.

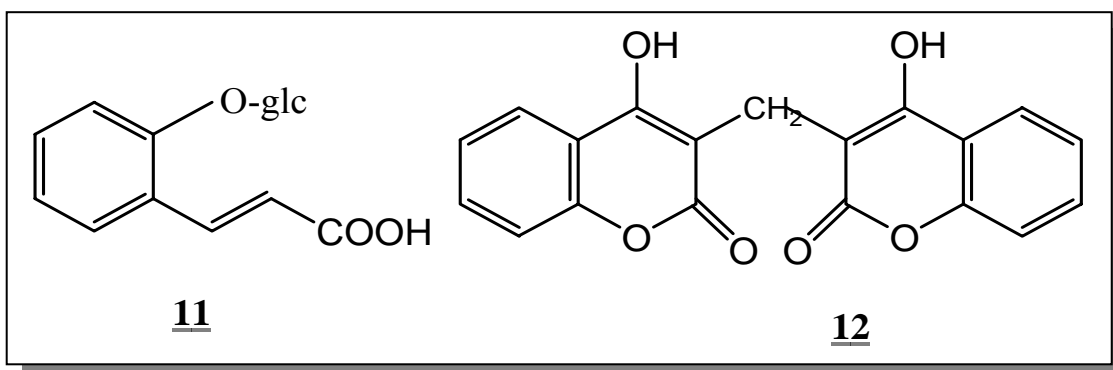
I-1-6 - 2- Les coumarines :

Le nom de **coumarine** vient de « coumarou », nom vernaculaire de la « fève Tonka » qui est le fruit d'un arbre de la Guyane (*Dipteryx odorata* Willd, syn. *Coumarouna odorata* Aubl., Fabaceae). De ce fruit fût isolée en 1820 pour la première fois une substance cristalline odorante appelée **coumarine 10** [44].



Les coumarines, des molécules largement répandues dans tout le règne végétal, sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, considérées comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-7-cinnamiques [4]. Elles existent sous forme libre ou encore liées à des sucres (hétérosides). La coumarine et ses dérivés ont des actions photo biologiques [44], bactériostatiques et anti fongiques [45- 47], comme ils ont un effet anti-oedémateux [48].

Toutes les espèces de mélilot renferment – surtout dans les jeunes feuilles – du mélilotoside **11**, acide facilement hydrolysable par des enzymes pour donner la coumarine. En cas de contamination par des champignons, les mélilots produisent un produit susceptible d'être métabolisé en un composé anticoagulant, le dicoumarol **12**. C'est d'ailleurs à partir du modèle de ce composé végétal qu'on synthétise actuellement les anticoagulants coumariniques utilisés en médecine [4, 49].



I-1-6 - 3- Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes :

L'une des particularités importantes de la famille des fabacées est la production des métabolites secondaires spécifiques appelés **isoflavonoïdes** impliqués dans la signalisation symbiotique, dans les réactions de défense et présentant un grand intérêt pharmaceutique [50].

Ce sont des substances polyphénoliques d'une diversité structurale importante. Dans ce qui suit nous allons nous limiter à citer quelques exemples de flavonoïdes et d'isoflavonoïdes isolés d'espèces de cette famille.

Tableau N° I-1: Quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés d'espèces de la famille des fabacées.

Nom de l'espèce	Nom du produit isolé	N° de structure		Réf.
<i>Dalbergia sissou</i>	7-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→5)-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside] biochanine A	<u>13</u>	<u>13a</u>	28
	7-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→5)-β-D-glucopyranoside] tectorégénine		<u>13b</u>	
<i>Retama sphaerocarpa Boissier</i>	7--O-β-glucoside 6'-methoxy-3',4'-methylènedioxyisoflavone.	<u>14</u>	<u>14a</u>	29
	7-O-β-glucoside génistéïne		<u>14b</u>	
	7-O-β-glucoside daïdzéïne		<u>14c</u>	
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	3-O-[β-D-glucosyl (1→2)- β-D-galactoside] kaempférol.	<u>15</u>	<u>15a</u>	30
	3-O-[β-D-glucosyl (1→2)- β-D-galactoside]		<u>15b</u>	
	7-O-β-D-glucoside kaempférol.		<u>15c</u>	
	3-O-[β-D-glucosyl (1→2)(6''-O-acetyl)-β-D-galactoside] 7-O-β-D-glucoside kaempférol		<u>15d</u>	
	3-O-[β-D-glucosyl (1→2)-β-D-galactoside] 7-O-β-D-glucoside quercétine			

Tableau N°I-1: Quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés d'espèces de la famille des fabacées (suite).

Nom de l'espèce	Nom du produit isolé	N° de structure		Réf.
<i>Lupinus luteus</i>	8-C- β -D-glucopyranoside génistéine	<u>16</u>	<u>16a</u>	31
	8-C- β -D-glucopyranoside orobol		<u>16b</u>	
<i>Lupinus luteus</i>	8-C-glucopyranoside 4'-O-glucopyranoside génistéine	<u>17</u>	<u>17a</u>	32
	5-methoxy 4',7-di-O-glucopyranoside génistéine		<u>17b</u>	
	8-C- β -D-glucopyranoside génistéine		<u>17c</u>	
	7-O-glucopyranoside génistéine		<u>17d</u>	
	4',7-di-O-glucopyranoside génistéine		<u>17e</u>	
<i>Lupinus polyphyllus xarborens</i>	2'-hydroxy 7-O- glucopyranoside 8-C- β -D-glucopyranoside génistéine	<u>18</u>	<u>18a</u>	33
	7-O- β -D-glucopyranoside génistéine		<u>18b</u>	
	4',7-di-O-glucopyranoside génistéine		<u>19c</u>	
	4'-O-glucopyranoside génistéine		<u>18d</u>	
	2'-hydroxy génistéine		<u>18s</u>	
	2'-hydroxy7-O- β -D-glucopyranoside génistéine		<u>18f</u>	
<i>Dalbergia olivari</i>	2', 5' diméthoxy génistéine	<u>19</u>	<u>19a</u>	34
	8-C-geranyl 4'-méthoxy génistéine		<u>19b</u>	
	7-hydroxy 4'-methoxy isoflavone		<u>19c</u>	
	5, 7-dihydroxy 4'-methoxy isoflavone		<u>19d</u>	
	4', 5, 7-trihydroxyisoflavone		<u>19e</u>	
<i>Spartium junceum</i>	5, 8-dihydroxy 4'-methoxy-6, 7-méthylène dioxyisoflavone	<u>20</u>	<u>20a</u>	35
	4', 5, 8-trihydroxy 7-O- α -L-rhamnopyranoside flavone		<u>20b</u>	

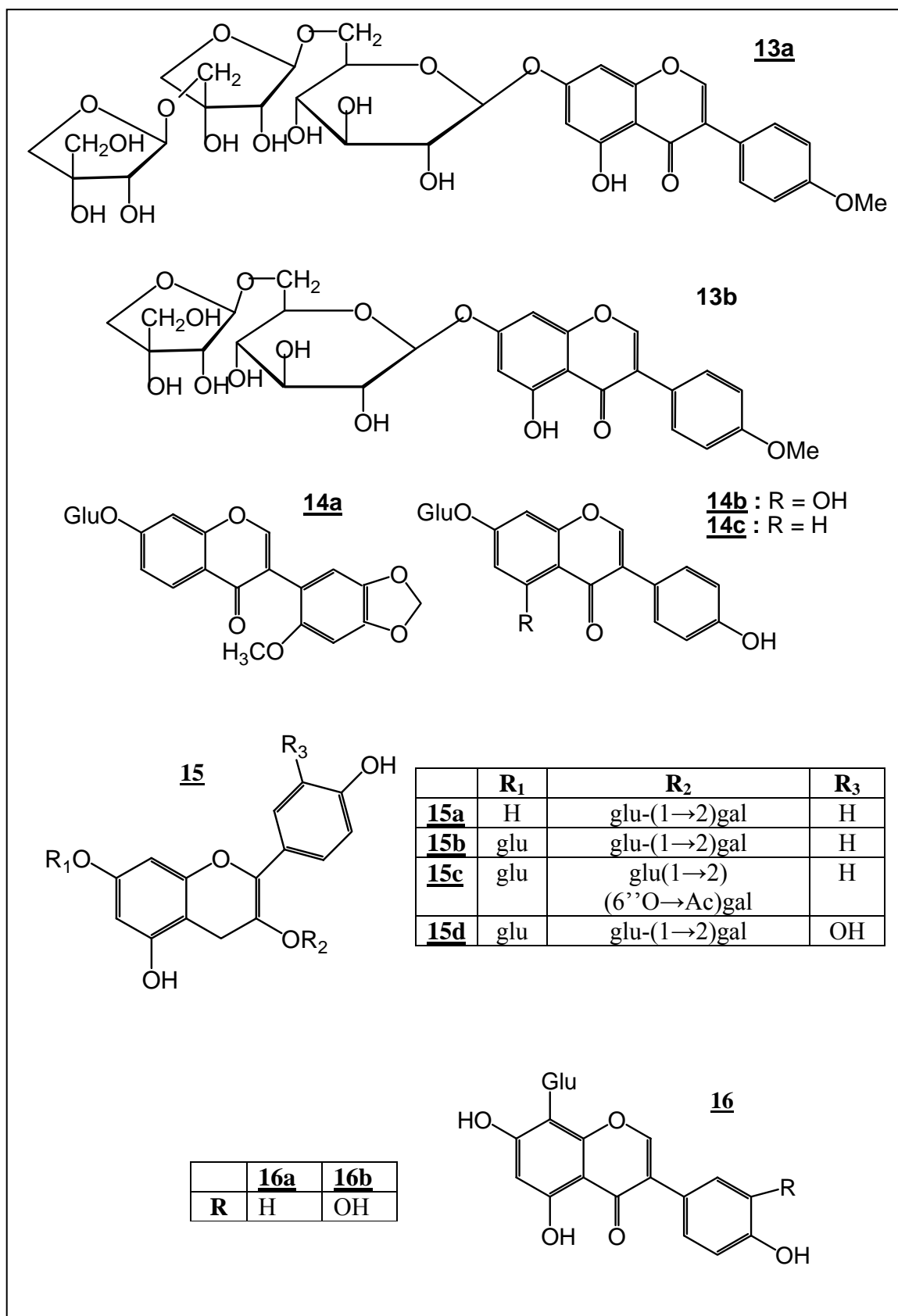
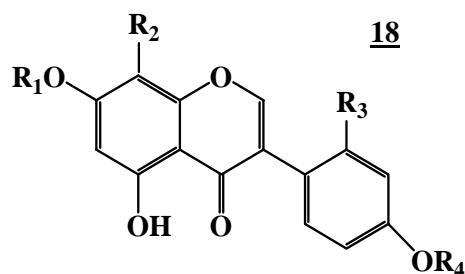
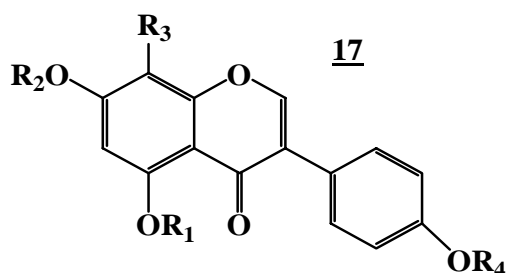
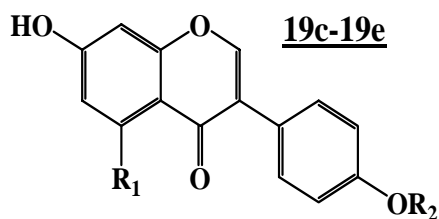
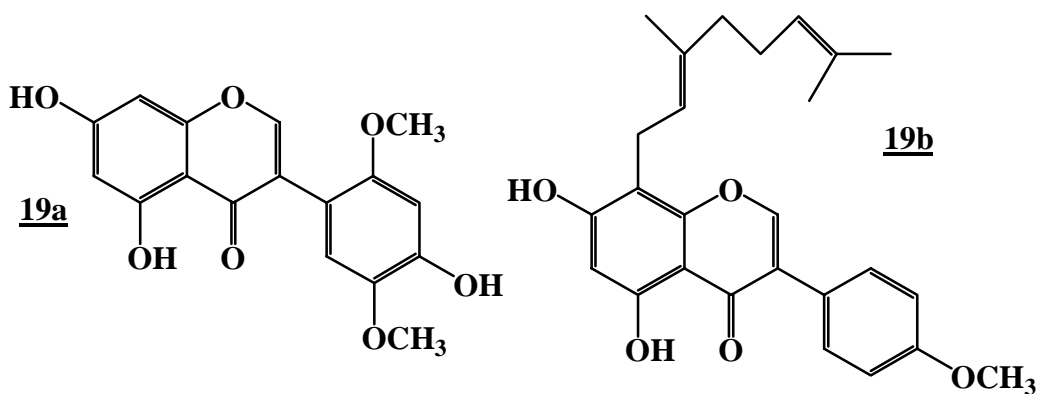


Schéma I-6 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de certaines espèces de la famille des fabacées

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
17a	H	H	glu	glu
17b	CH ₃	glu	H	glu
17c	H	H	glu	H
17d	H	glu	H	H
17e	H	glu	H	glu



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
18a	glu	glu	OH	H
18b	glu	H	H	H
18c	glu	H	H	glu
18d	H	H	H	glu
18e	H	H	OH	H
18f	glu	H	OH	H



	R ₁	R ₂
19c	H	CH ₃
19d	OH	CH ₃
19e	OH	H

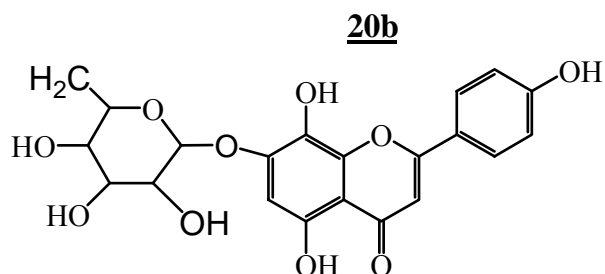
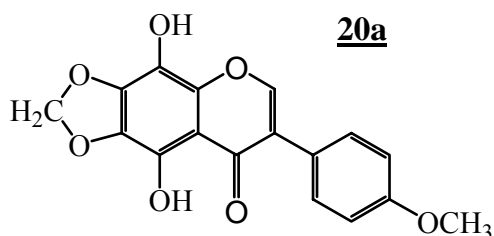


Schéma I-6 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de certaines espèces de la famille des fabacées (suite).

I-2- LE GENRE GENISTA

I-2-1 : INTRODUCTION :

Parmi les 700 genres de la famille des fabacées, en Algérie on trouve environ 53 genres et 337 espèces [2]. Pour notre part, nous nous sommes intéressés dans ce travail au genre *Genista* qui compte environ 150 espèces réparties en Europe et en région méditerranéenne [51]. D'après la bibliographie, ce genre montre une richesse en composés phénoliques, notamment les isoflavonoïdes connus pour leurs activités biologiques diverses.

I-2-2 : GENERALITES :

Le genre *Genista* a été décrit pour la première fois par LINNE en 1753, il appartient à la famille des légumineuses (fabales), sous-famille des papilionacées (fabacées) et à la tribu des génistées [51].

Quezel et Santa en 1963 comptent pour ce genre 16 espèces en Algérie dont 11 endémiques [2].

I-2-3 : DESCRIPTION DU GENRE :

Calice à 5 segments, les deux supérieurs libres ou soudés, les trois inférieurs formant une lèvre à 3 dents profondes, rarement calice campanulé à 5 dents subégales. Carène oblongue, droite ou presque, biggibeuse latéralement. Etendard étroit, 10 étamines monadelphes en tube non fondu, 5 longues et 5 courtes. Stigmate oblique. Gousse déhiscente, variable. Arbrisseaux épineux ou parfois aphyllés et junciformes. Feuilles 1-3 folioles, stipulées ou non, graines non arillées [2].

I-2-4 : DISTRIBUTION ET AIRE GEOGRAPHIQUE :

Le genre *Genista* est largement distribué dans le bassin méditerranéen, en Europe et en Afrique du nord (Libye, Tunisie, Algérie et Maroc). En Algérie, il est localisé dans la région est et sud est et au grand Sahara [52].

I-2-5 : CARACTÈRE CHIMIQUE DU GENRE

GENISTA :

D'après l'étude bibliographique que nous avons menée, les travaux phytochimiques effectués sur le genre *Genista* ont permis essentiellement l'isolement d'alcaloïdes [53-56], et de flavonoïdes notamment les isoflavonoïdes [57- 60]. Le tableau I-2 rassemble un nombre d'espèces du genre *Genista* et leur contenu flavonique, les structures respectives sont données dans le schéma I-7.

Tableau N°I-2: Quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista*.

Nom de l'espèce	Nom du composé isolé	N° de la structure		Réf.
<i>G. ephedroïdes</i>	Génistéïne	21	<u>21a</u>	57
	Isoprunétine		<u>21b</u>	
	Wighteone		<u>21c</u>	
	Génistine		<u>21d</u>	
	Génisteone		<u>21e</u>	
	8-C-glucoside génistéïne		<u>21f</u>	
	Alpinumisoflavone		<u>21g</u>	
	Hydroxyalpinumisoflavone		<u>21h</u>	
	Apigénine		<u>21i</u>	
	Ephedroïdine		<u>21j</u>	
	Isokaempféride		<u>21k</u>	
<i>G. cinerea</i>	8-C-glucoside génistéïne	22	<u>22a</u>	58
	6-C-glucoside génistéïne		<u>22b</u>	

Tableau N°I-2: quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista* (suite).

Nom de l'espèce	Nom du composé isolé	N° de la structure	Réf
<i>G. morisii</i>	Daidzéine	<u>23</u>	59
	Génistéine		
	Isoprunétine		
	7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside genistéine		
	7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside isoprunétine		
	7,4'-di- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside genistéine		
	7,4'-di- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside isoprunétine		
	Lutéoline		
	7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside lutéoline		
	Orientine		
	Vitexine		
	Eriodictyol		
	<i>G. corcica</i>		
Isoprunétine			
Isoderrone			
Ficuisoflavone			
Dihydroisoderrondiol			
Lutéoline			
7- <i>O</i> - β - glucoside lutéoline			
4'- <i>O</i> - β -glucoside luteoline			
Toxifoline			
5-methoxytoxifoline			

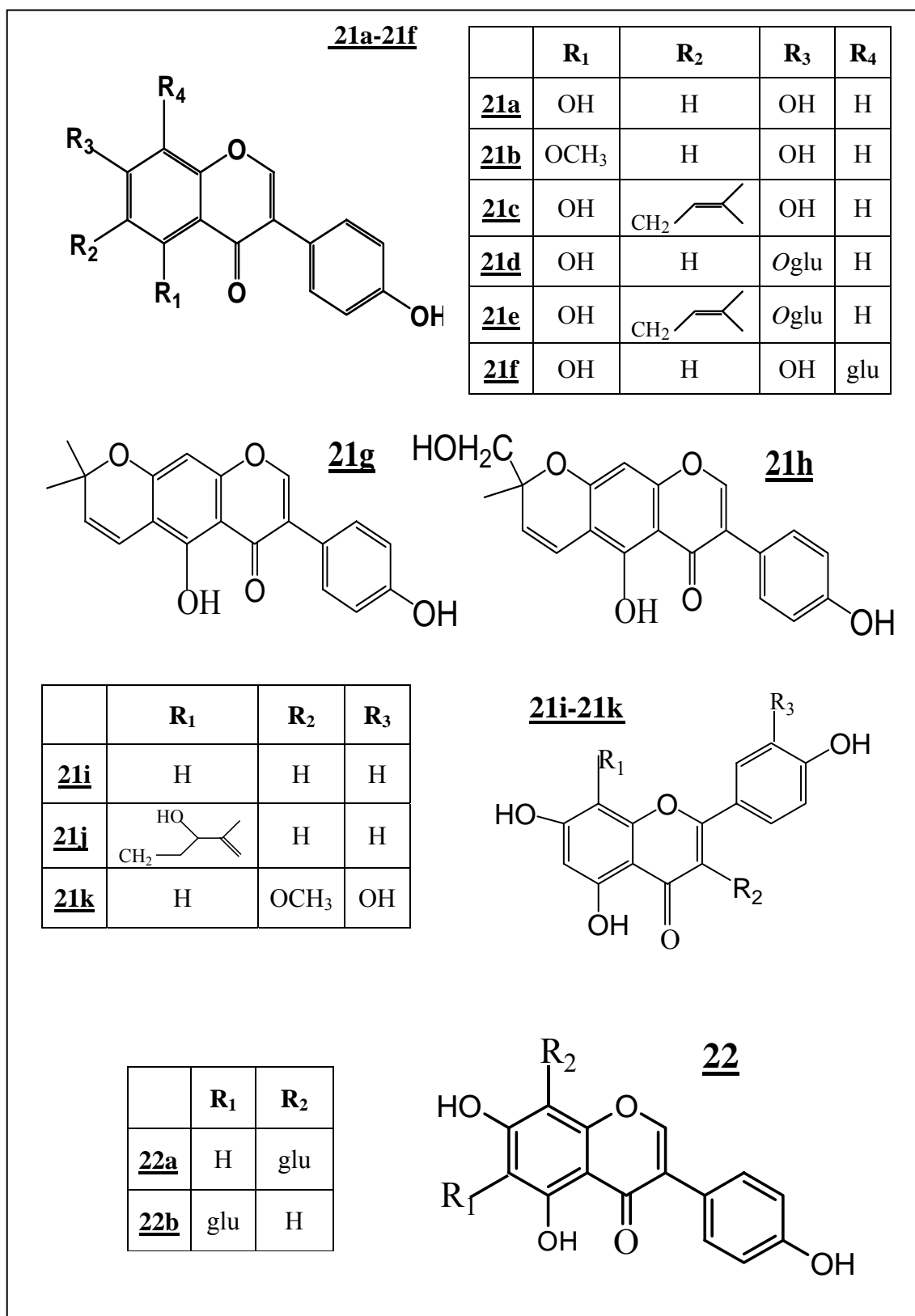


Schéma I-7 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista*.

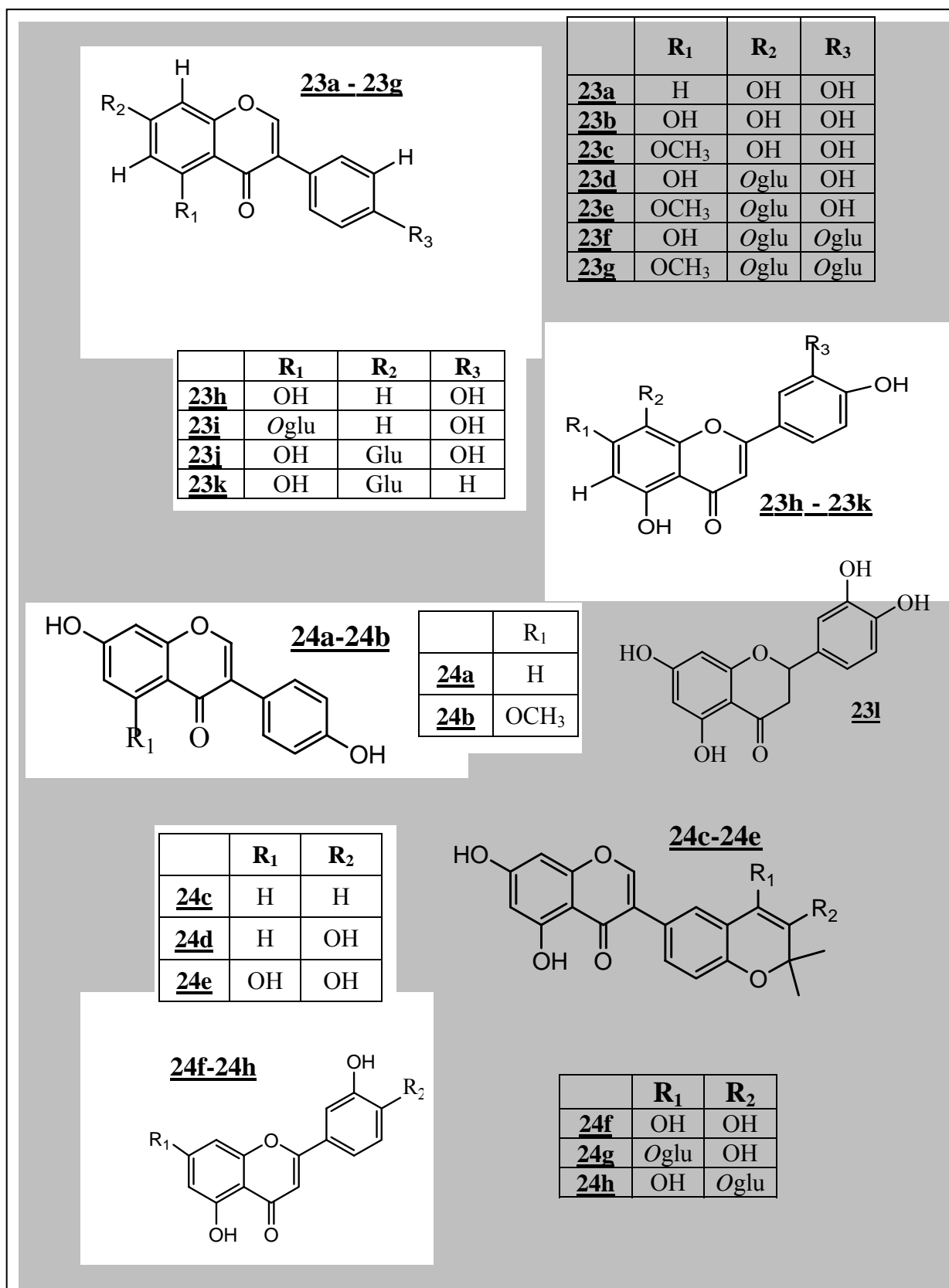


Schéma I-7 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista* (suite).

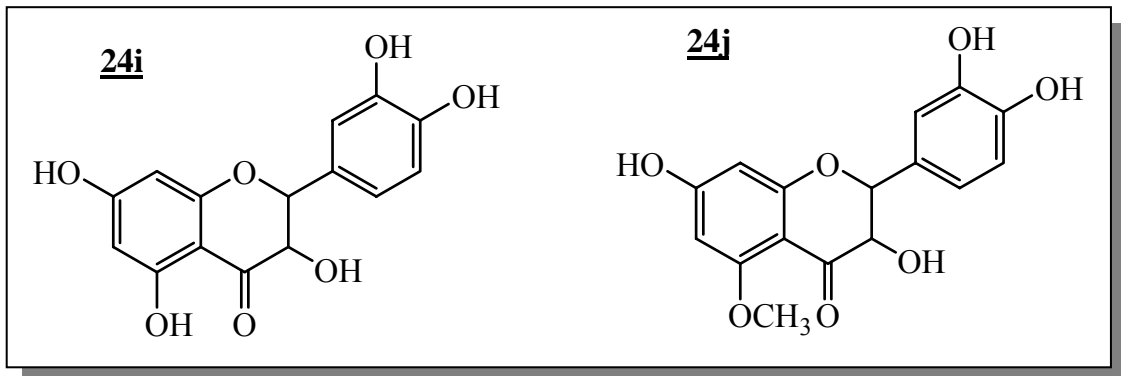


Schéma I-7 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de différentes espèces du genre *Genista* (suite).

I-2-6 : INTÉRÊT BIOLOGIQUE DU GENRE GENISTA :

La recherche bibliographique menée sur l'intérêt biologique des espèces du genre *Genista* montre peu d'investigations réalisées dans ce domaine. Par ailleurs, ces travaux ont pu mettre en évidence quelques intérêts pharmacologiques dont on peut citer :

- Une étude faite par Harionov (1988) [61], qui a montré :

- que les extraits flavoniques des deux plantes médicinales, *G. tinctoria* et *G. sessilifolia* ne sont pas toxiques à des doses ≤ 2000 mg/Kg.
- Aucune action oestrogénique ni androgénique n'a pu être mise en évidence pour une dose de 100 mg/Kg.
- le mélange flavonique de *G. sessilifolia* a une forte action anabolique et anti-inflammatoire alors que celui de *G. tinctoria* ne montre aucune action.

- Une autre étude réalisée par Korpachov et ses collaborateurs (1995) [62] sur la fonction de la thyroïde a pu montrer que l'extrait flavonique de l'espèce médicinale *G. tinctoria* provoque une augmentation de la thyroxine de 19 à 31% chez les rats sains pour une dose de 20 à 60 mg/Kg et garde un niveau normal chez les rats hypothyroïdiens.

Références bibliographiques

- [1] **Guignard, J.I. (1994),**
Abrégé de botanique, 9^{ème} édition, éditeur Masson, 276p.
- [2] **Quezel, P. and Santa, S. (1963),**
Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S..
Paris
- [3] **Deyson, G. (1979),**
Cours de botanique générale, Organisation et classification des plantes vasculaires 2^{ème}
partie systématique, tome II 347p.
- [4] **Bruneton, J. (1999),**
Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} édition, éditeur Technique et
Documentation, Paris.
- [5] **Bruneton, J. (2001),**
Plantes toxiques, végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. 2^{ème} édition, éditeur
Technique et Documentation, Paris.
- [6] **Guignard, J.L. (2004),**
Botanique systématique moléculaire 13^{ème} édition, éditeur Masson 284p.
- [7] **Debelmas, A.M. and Delaveau, P. (1983),**
Guide des plantes dangereuses, II^{ème}, édition. Paris, 200p.
- [8] **Mylona, P., Pawlowski, K. et Bisseling, T. (1995),**
Plant. Cell. 7, pp. 869-885.
- [9] **Echevin, R. (1964),**
Angiospermes I, éditeur Doin pp.496.
- [10] **Journet, E.P. (2001),**
Ecole thématique Biologie végétale.
- [11] **Bézanger-beauquesne, L., Pinkas, M., et Torck, M. (1986),**
Les plantes dans la thérapeutique moderne. Editeur Maloine.469p.
- [12] **Arnone, A., Camarda, L., Merlini, L., Nasini, G. and Taylor, D. A. H. (1977),**
Colouring matters of the West Africa red woods *Pterocarpus osun* and *P. santalinus*.
J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 19, 2116-2118.
- [13] **Haieb, I., Harzallah-Skhiri, F. and Chemli, R. (1999),**
Contribution à une étude ethnobotanique de la flore en Tunisie (cas de la région de
Sfax); travaux de fin d'études E.S.H.E.

- [14] **Mahmoudi, Y. (1980),**
La thérapeutique par les plantes communes en Algérie. Palais de livre Blida.
- [15] **Shelley, W.B. and Arthur, R.P. (1955),**
“Studies on cowhage (*Mucuna pruriens*) and its pruritogenic proteinase, mucunain”,
arch. Dermatol .U.S.A., 72, pp. 399-406.
- [16] **Bell, E.A. and Janzen, D.H. (1971),**
“Medical and ecological considerations of L-DOPA and 5-HTP in seeds”, Nature, 229,
pp. 136-137.
- [17] **Pant, M.C., Uddin, I., Bhardwaj, U.R. and Tewari, R.D. (1968),**
“Blood sugar and total cholesterol lowering effects of *Glycine soja* , *Mucuna pruriens*
and *dolichos biflorus* seed diets in normal fasting albino rats” ,Ind. J. Med. Res., 56, 12.
- [18] **Baux, H., Fany, J. and Bessi re, J. M. (1976),**
Essais phytochimiques préliminaires sur quelques plantes médicinales du Niger Plantes
Méd. Et Phytothérapie, Tome X N  4, pp. 251-256.
- [19] **Bruneton, J. (1993),**
Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{eme} édition, Tech. et Doc. 915 p.
- [20] **Pousset, J. L. (1992),**
Plantes médicinales Africaines. Tome II édition marketing 159 p.
- [21] **Takano, S. and Ogasawara, K. (1989),**
The Alkaloids. Vol. 36 edited .by Brossi, New York, Academic press.
- [22] **Marston, A., Msonthi, J. D. and Hostettman, K. (1984),**
On the reported molluscicidal activity from *Tephrosia vogelii* leaves. Phytochemistry,
23(8), pp. 1824-1825.
- [23] **Hostettmann, K. (1997),**
Tout savoir sur le pouvoir des plantes sources de médicaments. Editions Favre SA,
Lausanne, 240 p.
- [24] **Huxtable, R.J. (1990),**
Activation and pulmonary toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids, Pharmac. Ther., 47,
pp. 371-389.
- [25] **Jouglard, J., Airaudo, C.B., Richardo, R., et Botta, A. (1973),**
Intoxications accidentelles par ingestion de graines de « mimosa du Japon », Bull.
Méd. L g. Et Toxicol., 16, pp. 55-58.

- [26] **Keeler, R F. (1989),**
 Quinolizidine alkaloids in Range and Grain Lupins in « Toxicants of Plant Origin »
 (Cheeke P. R. éd.), vol.1: Alkaloids, pp. 133-168, CRC Press, Boca Raton.
- [27] **Estévez-Braun, A. et Gonnzalles, A.G. (1997),**
 Coumarine. Nat. Prod. Rep. 14, pp. 465-475.
- [28] **Salwa, F.Farag, Amany, S. Ahmed, Kenji, T., Yoshiaki T. and Messatake N. (2001),**
 Isoflavonoids glucosides from *Dalbergia sissoo*. Phytochemistry 57, pp. 1263-1268.
- [29] **L'opez Lazaro, M., Martin-Cordero, C., Iglesias-Guerra, F. and Ayuso González, M.J. (1998),**
 An isoflavone glucoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier, Phytochemistry, vol. 48
 N° 2, pp. 401-402.
- [30] **Yingmei, H., Sansei, N., Yukari, N. and Zhexiong, J. (2001),**
 Flavonol glycosides from the stems of *Trigonella foenum-graecum*, Phytochemistry,
 58, pp. 577-580.
- [31] **Zapesochnaya , G.G . and Laman, N.A. (1977),**
 Vses. Nawchn-Issled . INST .LEK. RAST Moscow ,USSR Khim .Prir. Soedin .(6),
 pp. 862 -864
- [32] **Leda Mathias , Ivoj.C. Vieira ,Raimundo Braz –Filha and Edson R.–F. (1998),**
 J.Nat .Product . 61, pp. 1158-1161 .
- [33] **Kazutaka, W., Junei, K., and Toshihiro, N. (1993),**
 Chem .Pharm .Bull. 41(2) 394 –396.
- [34] **Chihiro, I., Masataka, I., Tetsufumi, K., Nijisiri, R., Teruo, M., Harukumi, T., Hoyoku, N., and Hirochi, F. (2003),**
 Phytochemistry 64, pp.1265-1268.
- [35] **Bilia, A.R. , Flammioni, F., Fammini, G., Morelli, I. and Masili, A. (1993),**
 phytochemistry, vol. 34, N° 1, pp. 847-852.
- [36] **Muhammad, S. A., Faman, A. and Vqai, U. A. (2001),**
 Unusual chemical constituents of *Lotus garcinii* (Fabaceae), Turk. J. Chem. 25,
 pp. 107-112.
- [37] **Ibraheim, Z. Z.and Khalifa, A. A. (2000),**
 Bull. Pharm. Sci. 23 (2), pp. 177-186.

- [38] **Richter, G. (1993),**
 Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
- [39] **Phillipson, J. D., Roberts, M. F. et Zenk, M. H. (1985),**
 The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids. Springer Verlag, Berlin.
- [40] **Pelletier, S. W. (1983),**
 Alkaloids. Chemical and biological perspectives. Edition John Wiley, New York.
- [41] **kellerman, T. S., Coestzer, J. A. W. et Naudé T. W. (1988),**
 Plant poisonings and mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa, Oxford University Press., Cape town.. 183-186.
- [42] **Ortega, A.D., et Lazerson, J. (1987),**
 Anagryne-induced Red Cell Aplasia, Vascular Anomaly, and Skeletal Dysplasia, J. Pediatr., 111,87-89.
- [43] **Panter, K. E., James, L. F. et Gardner, D. R. (1999),**
 Lupines,Poison hemlockand *Nicotiana* spp. Toxicity and Teratogenicity in Livestock. J. Nat. Toxins, 8, pp. 117-134.
- [44] **Hostettmann, K. (1992),**
 Les plantes sources de médicaments phlébotropes, la lettre de la phlébologie. Zyma SA, Nyon, 25.
- [45] **Rufini, L. and Sampaolo, G. (1977),**
 Plants Off. Aromi.Saponi., Cosmétol. Aerosol., vol.59, pp. 9-32 et 64-75.
- [46] **Duquenois, P., Haag-Berrurie, M. et Grellb, E. Bull. (1965),**
 Acad. Méd. 3éme série, vol.149, pp. 451-453.
- [47] **Ficher, F. C., Van Doorne, H. Lim, M. I. et Svendsen, A. B. (1976),**
 Phytochemistry, vol. 30, pp. 1078-1079.
- [48] **Houft, J. R. S. and Paya, M. (1996),**
 Pharmacological and Biochemical actions of simple coumarine: Natural Products with Therapeutic potential, Gen. Pharmac., N° 27, pp.711-722.
- [49] **Matis, P. et Mayer, W. (1979),**
 Zur Geschichte der «klassischen» Antikoagulantien Heparin und Dicumarol, Medizinische Welt. 30 pp. 845-848.
- [50] **Dixon, R. A. (1999),**
 In Comprehensive Natural Products Chemistry. Sankawa U., ed. (Elsevier Oxford UK) Vol. 1, pp. 773-823.

- [51] **Maire, R. (1987),**
 La flore de l'Afrique du nord. Les légumineuses, Lechevalier Ed. Paris XVI,
- [52] **Lograda, T. (1996),**
 Variabilités cariologiques et biochimiques de quatre espèces endémiques du genre *Genista* L. Thèse de magister en biologie végétale. Université Ferhat Abbas –Sétif.
- [53] **Pistelli, L., Bertoli, A., Giachi, I., Morselli, I., Rubiolo, P. et Bicchi, C. (2001),**
 Quinolizidine alkaloids from *Genista ephedroides*. Biochemical systematics and ecology, 29(2), pp. 137-141.
- [54] **Christov, V. and Evstalieva, L. (2000),**
 Alkaloid profile of Bulgarian species from genus *Genista*. Dokladi na Bulgarskata Akademiya na Naukite, 53(11), pp.25-28.
- [55] **Kirch, J., Veit, M., Wätzig, H., Grenwald, R. and Czygan, F.-C. (1995),**
 Alkaloidal variation in *Genista lobelii*. (Fabaceae). Biochemical systematics and ecology, vol. 23 n°6, pp. 636-643.
- [56] **Van Rensen I., Wrey V., Witte, L., Canto P., Grenwald, R., Veen, G., Veit, M., and Czygan, F.-C. (1994),**
 Ester alkaloids of *Genista cinerea* subspecies *cinerea*. Phytochem.95(2), 421-424.
- [57] **Pistelli, L., Bertoli, A., Giachi, I., and Manumata, A. (1998),**
 Flavonoids from *Genista ephedroides*. Journal of Nat. Prod/, 61 (11), 1404-1406.
- [58] **Van Rensen I., Veit, M., Wrey V. and Czygan, F.-C. (1996),**
 Genistein-C-glucoside from *Genista cinerea*. Nat. Prod. letters, 6 (3), 203-207.
- [59] **Giachi, I., Manunta, A., Morelli, I., and Pistelli, L. (2002),**
 Flavonoids and isoflavonoids from *Genista morisii*. Biochemical Systematics and Ecology, 30(8), pp. 801-803.
- [60] **Pistelli, L., Giachi, I., Potenzs, D., and Morselli, I. (2000),**
 A New Isoflavone from *Genista corcica*. Journal of Natural Products, 63, pp. 504-506.
- [61] **Harionov, I. (1988),**
 Pharmacomogic effects on the reproductive system and anti-inflammatory action of the Total flavonoides mixtures contained in *G.tintoria* and *G. sessilifolia*. Farmatsiya (Sofia Bumgaria) 38(1), pp: 47-51.
- [62] **Korpachov, V. V., Lifvinenko, O. O. and Paster, I. P. (1995),**
 Effect of *Genista tinctoria* extracts on the function of thyroid gland of intact rats and rats with experimental hypothyroidism Ukraine, farmatsevtichnii zhurnal (Kiev), (5) pp: 82-86.

CHAPITRE II
LES FLAVONOÏDES
ET LES ISOFLAVONOÏDES

II- 1-FLAVONOÏDES ET ISOFLAVONOÏDES

II-1- 1-GENERALITES:

- **Les flavonoïdes** : Cette catégorie de substances naturelles forme une grande partie des métabolites secondaires d'un grand nombre de variétés de plantes supérieures. Ce sont des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, formant ainsi l'ensemble des substances les plus répandues. Ils possèdent une diversité structurale très importante. En effet, plus de 6500 structures ont été identifiées [1].

Ces diverses structures se rencontrent aussi bien sous la forme libre (aglycone) que sous forme de glycosides. Ils jouent un rôle important dans la protection des plantes [2].

La structure chimique des flavonoïdes est basée principalement sur un squelette de 15 atomes de carbone constitué de deux noyaux benzéniques A et B reliés par une chaîne en C₃ [3] (schéma II-1).

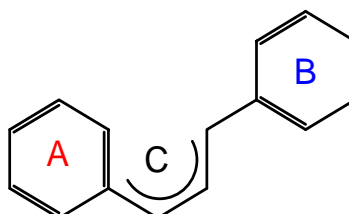


Schéma II-1: squelette de base des flavonoïdes

- **Les isoflavonoïdes** : Ils forment une sous classe très large et très distinguée des flavonoïdes, toutes les molécules de ce groupe sont caractérisées par un squelette de 15 atomes de carbone comme les flavonoïdes mais réarrangé selon un motif 1, 2-diphénylpropanique [4]. La distribution des isoflavonoïdes dans le règne végétal est très restreinte, elle est presque spécifique à la famille des fabales (légumineuses), sous famille des fabacées (papilionacées) [4 - 6].

II-1-2- CLASSIFICATION:

Tous les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du cycle pyranique central (la chaîne en C₃) [7], le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4 (schéma II-2):

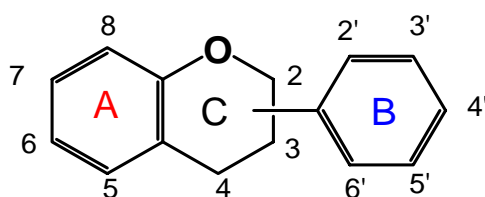


Schéma II-2 : différentes positions du cycle B sur l'hétérocycle C.

- ❖ Dans la position 2, le flavonoïde est appelé **flavane**.
 - Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle, le flavonoïde est appelé **flavanone**.
 - Si la liaison C₂-C₃ dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé **flavone**.
 - Si ce dernier est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle, il est désigné par le nom de **flavonol**.

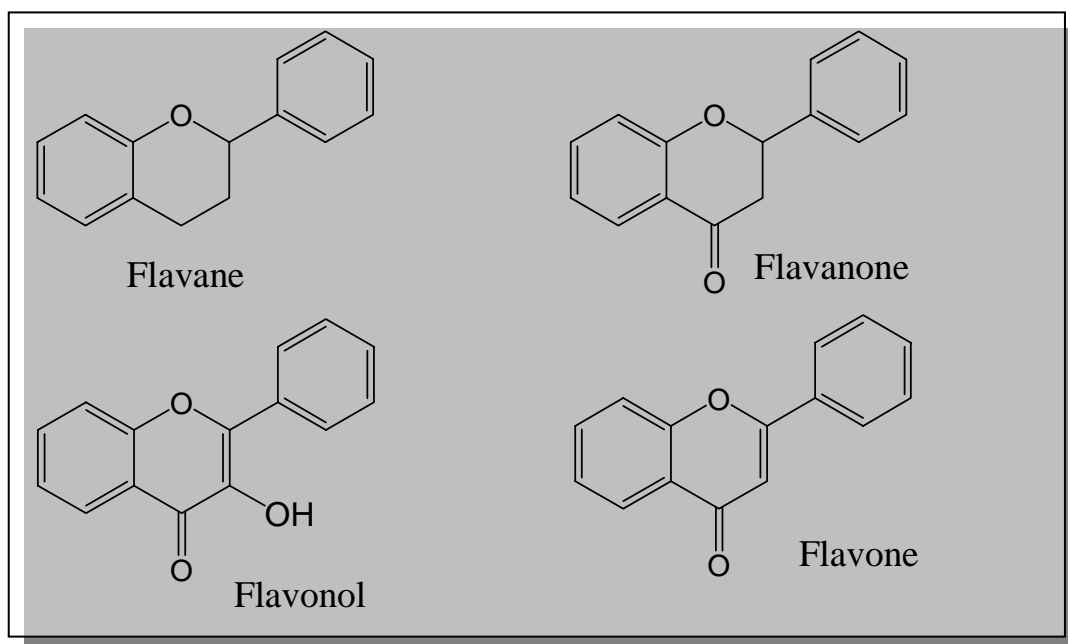


Schéma II-3 : structures de base de principaux types de flavonoïdes

- ❖ Dans la position 3, le flavonoïde est désigné par le terme **isoflavane**.
 - Si la position 4 de l'isoflavane porte un groupement hydroxyle, le composé est désigné par le nom **isoflavanol**.

- Si la position 4 de l'isoflavane porte un groupement carbonyle, le composé est appelé **isoflavanone**.
- Si la liaison C₂-C₃ dans le squelette de l'isoflavanone est insaturée le composé est nommé **isoflavone**.

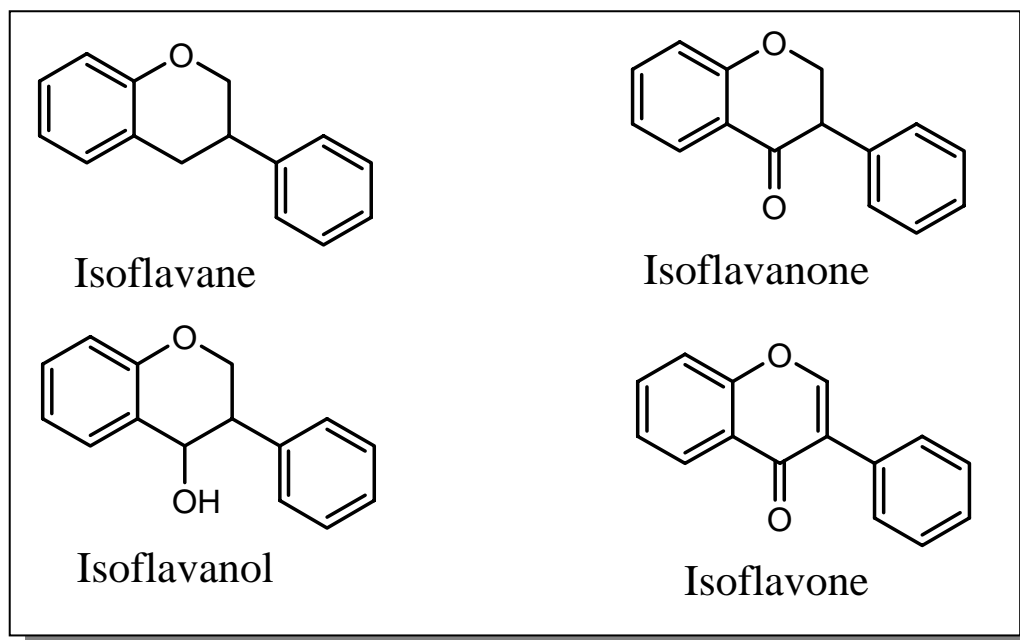
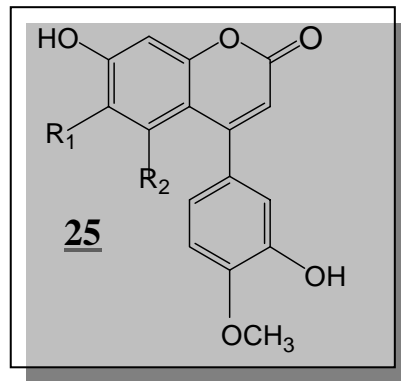


Schéma II-4 : structures de base de principaux types d'isoflavonoïdes

Parmi ces différents types de composés isoflavoniques, les plus distribués dans le règne végétal sont les isoflavones. Ces derniers peuvent être classés en une douzaine de types structuraux différenciés par leur degré d'oxydation et par l'existence d'hétérocycles complémentaires. Diverses structures d'isoflavones ont été isolées d'un nombre important d'espèces de la famille des fabacées [8].

- ❖ Dans la position 4 avec un carbonyle en C-2 et une insaturation entre C-3 et C-4, le composé est dit **néoflavone**, ce type de composés est également appelé **4-aryl coumarine**. Il a été isolé de plusieurs espèces de la famille des fabacées [9], comme exemple on peut citer quelques néoflavonoïdes isolés de *Dalbergia volubilis* (fabacées) [10] :
 - **25a**: 3', 7-dihydroxy-4'-méthoxy 4-phenyl-2H-1-benzopyrane-2-one.
 - **25b**: 3', 7-dihydroxy-4', 5-diméthoxy 4-phenyl-2H-1-benzopyrane-2-one.
 - **25c**: 6-formyl-3', 7-dihydroxy 4', 5-diméthoxy 4-phenyl-2H-1-benzopyrane-2-one.



	R ₁	R ₂
25a	H	H
25b	H	OCH ₃
25c	CHO	OCH ₃

Schéma II-5 : quelques structures de néoflavonoïdes isolés de l'espèce *Dalbergia volubilis* (fabacées).

Par ailleurs, selon le degré d'hybridation des carbones de la chaîne en C-3 et le mécanisme de cyclisation de cette chaîne, on distingue d'autres squelettes flavoniques telles que les chalcones, les dihydrochalcones et les aurones.

Le schéma II-6 résume les différents groupes et sous groupes dérivés des flavonoïdes.

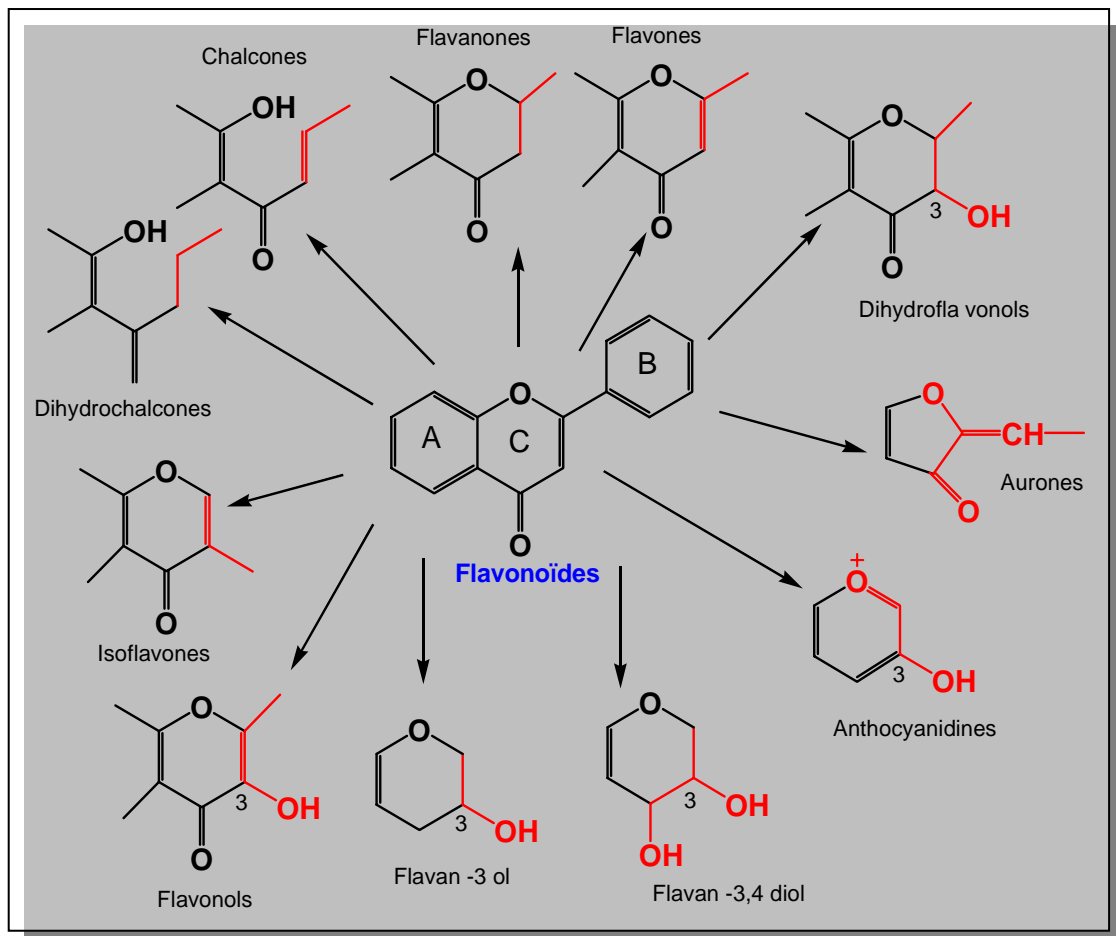


Schéma II-6: Représentation des principaux groupes de flavonoïdes.

II-1-3- LA BIOSYNTHESE :

Les connaissances actuelles sur la biosynthèse et la production des flavonoïdes catalysée par des enzymes proviennent de plusieurs études réalisées par de nombreux chercheurs [10-13]. Malgré leur diversité structurale importante, tous les flavonoïdes semblent avoir une voie biosynthétique commune.

II-1-3- 1- BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES :

L'enzyme clé pour la formation du squelette flavonoïque est la chalcone synthase (CHS) qui catalyse l'étape de condensation de trois unités acétate à partir de malonyl-CoA avec la 4-coumaroyl-CoA pour donner l'intermédiaire en C15, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone [13]. Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des différentes classes de flavonoïdes.

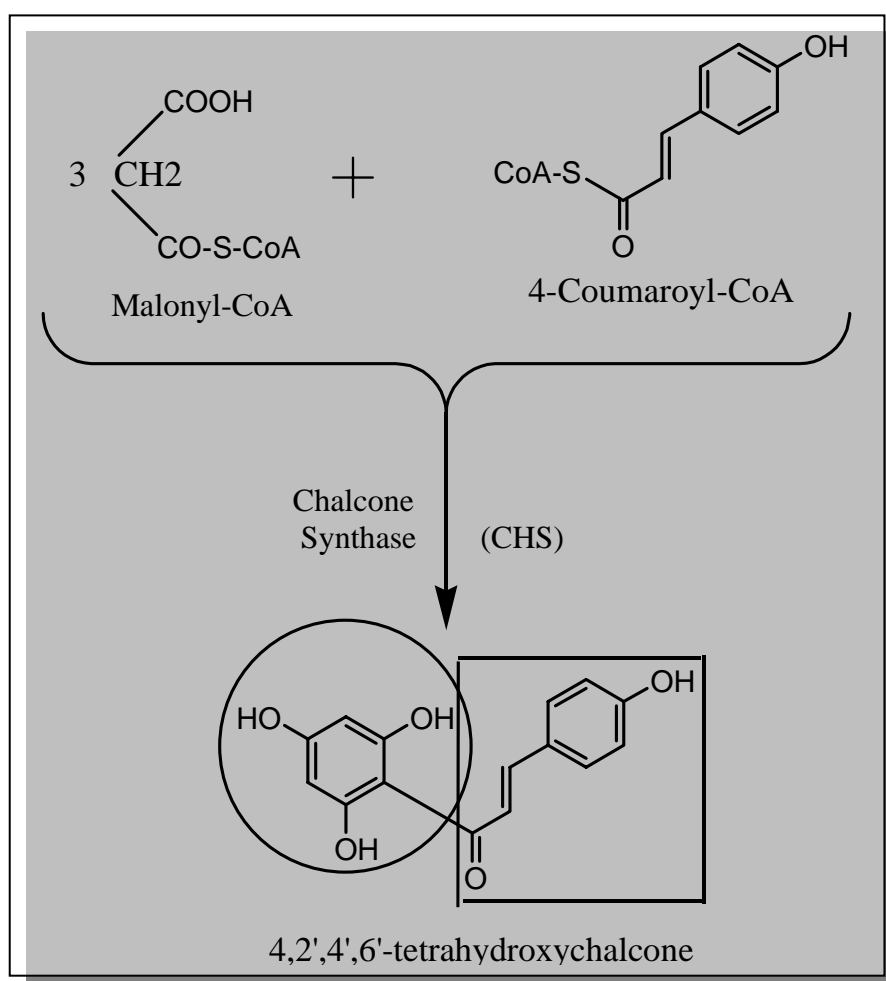


Schéma II-7: Voie biosynthétique conduisant aux chalcones.

Dans les conditions physiologiques normales, la chalcone tend à s'isomériser spontanément en flavanone. Cette isomérisation est catalysée par l'enzyme chalcone isomérase (CHI). Des étapes ultérieures, surtout de méthylation, de glycosylation et d'acylation emmènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle ils se trouvent *in vivo* [2].

Le tableau II-1 rassemble la liste des enzymes impliquées dans les différentes étapes de biosynthèse des flavonoïdes présentées dans le schéma II-8.

Tableau II-1 : Liste des enzymes.

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

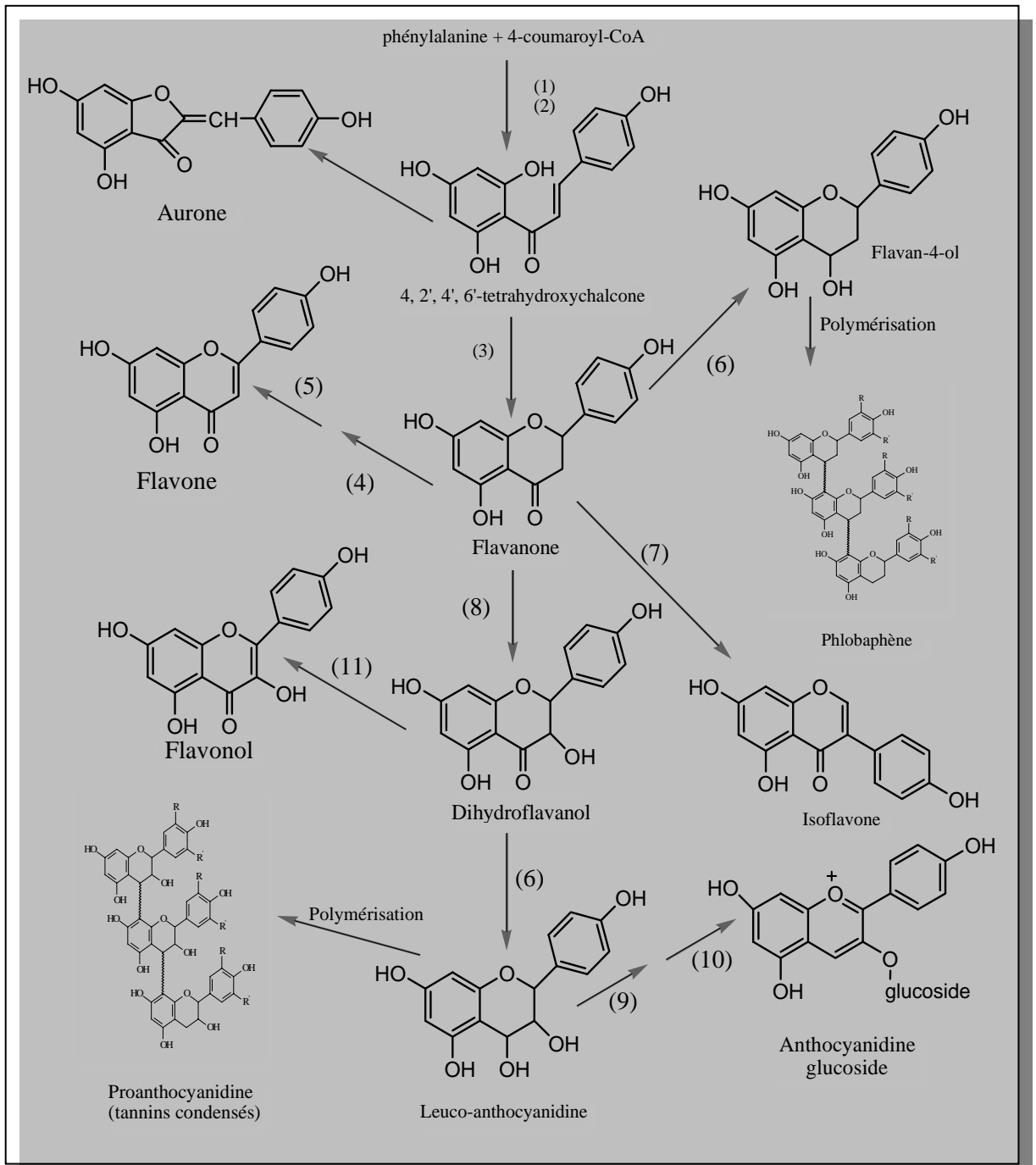


Schéma II-8 : Schéma illustrant la biosynthèse des flavonoïdes

II-1-3- 2-BIOSYNTHESE DES ISOFLAVONOÏDES :

Des progrès remarquables ont été fournis ces quelques dernières années dans le but d'élucider la biosynthèse des isoflavones [14-18]. Le mécanisme proposé pour la biosynthèse des isoflavonoïdes forme une branche de la voie biosynthétique des flavonoïdes.

Les isoflavonoïdes proviennent de la flavanone intermédiaire centrale « naringénine (4', 5, 7-trihydroxyflavanone) dans le cas de la génistéine » et « liquiritigénine (4', 7-dihydroxy-flavanone) dans le cas de la daidzéine » qui sont omniprésentes dans les plantes. Pour entrer dans la voie biosynthétique des isoflavonoïdes, la flavanone subit en premier lieu le départ d'un radical hydrogène à C-3 suivi de la migration du cycle B sous forme radicalaire de C-2 à C-3 et l'hydroxylation du radical C-2. L'enzyme responsable de cette transformation est l'isoflavonesynthase (IFS) [19, 20]. Le schéma II-9 montre les différentes étapes de formation de la génistéine.

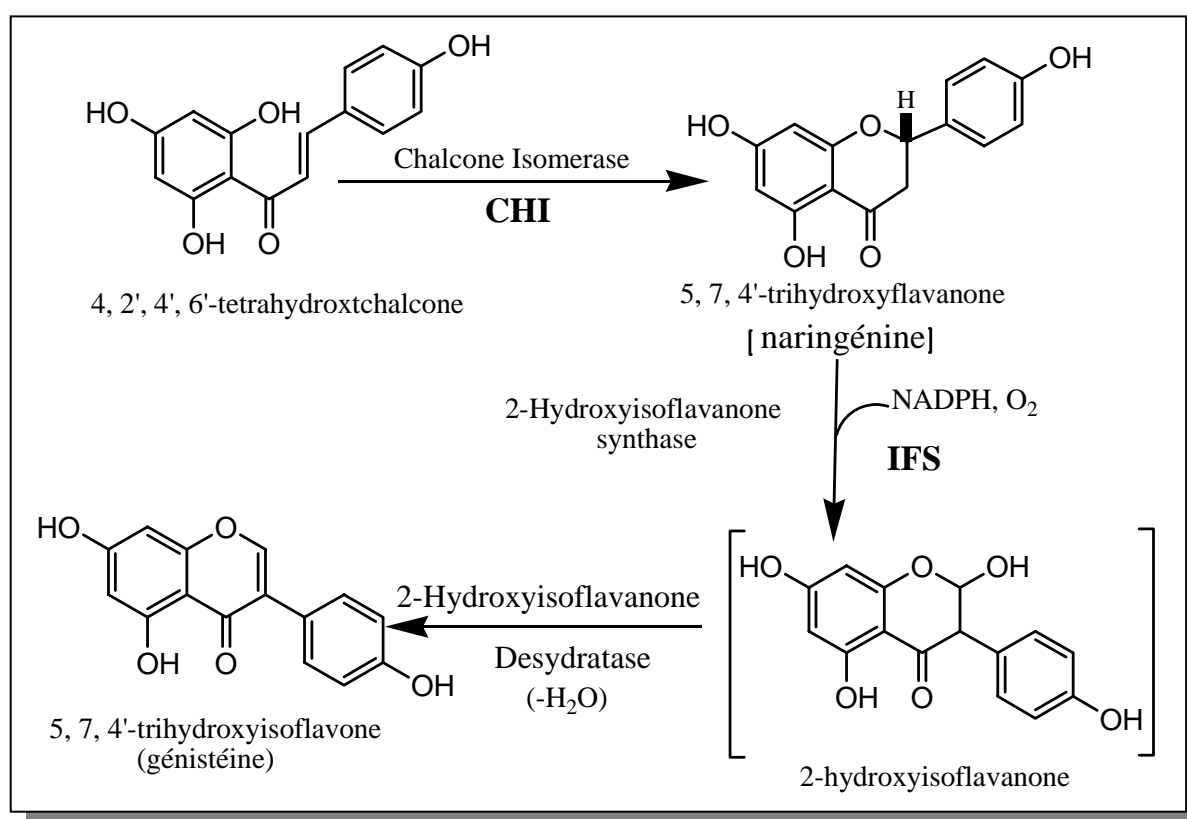


Schéma II-9 : Schéma illustrant le mécanisme réactionnel de la biosynthèse de la génistéine par catalyse enzymatique [17-20]

II-1-4- SUBSTITUTION DU SQUELETTE

FLAVONIQUE :

Les substitutions du squelette flavonique sont très diversifiées, on y trouve notamment des hydroxylations, des méthoxylations et des glycosylations. Les composés de chaque sous groupe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire [21].

II-1-4-1- La O-substitution :

II-1-4-1a- L'hydroxylation :

D'une manière générale pour les flavones et les flavonols, et d'après les réactions de biogenèse, les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone [22].

L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la fermeture de l'hétérocycle C, c'est-à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3', 4', 5') se fera par le biais des enzymes (hydroxylases) [14, 23].

Les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylés [24].

Dans le cas des isoflavones, l'hydroxylation de la position 2' du cycle B conduit le plus souvent en présence des enzymes spécifiques à la formation du **ptérocarpane** [25].

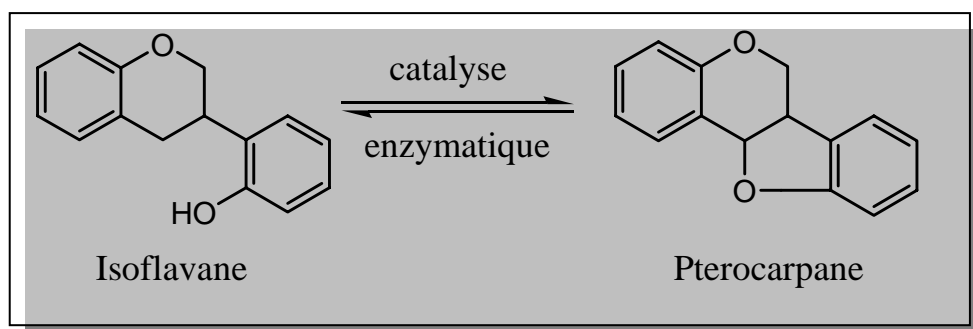


Schéma II-10 : Transformation de l'isoflavane en pterocarpane

II-1-4-1b- La méthylation :

La fixation du groupement méthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (O-méthyltransferase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la S-adenosyl-méthionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone [14, 26].

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 [14].

Cependant, très peu de rapports parlent de la relation isoflavone-méthyltransferase. Par ailleurs la méthylation de la position 5 du cycle A et la position 4' du cycle B dans le cas de l'isoflavone se fait grâce à une enzyme séparée et purifiée par Khouri de l'espèce *Lupinus luteus* (fabacées) [27], on peut citer à titre d'exemple les deux isoflavones méthoxylés en positions 4' et 5 [28, 29].

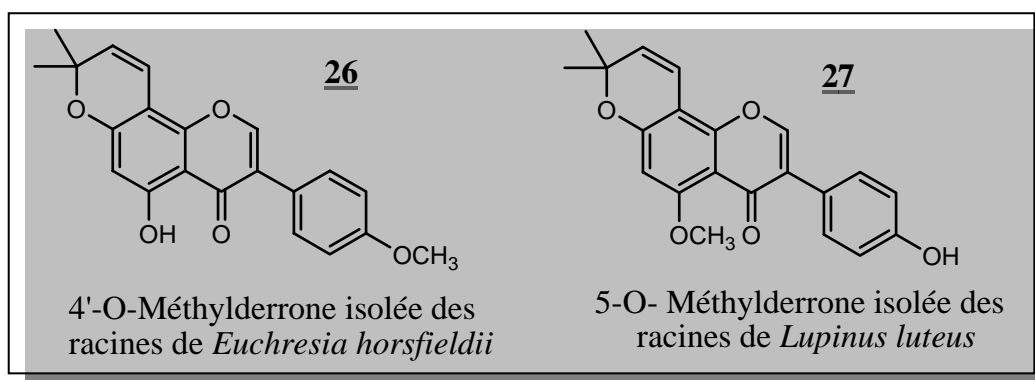


Schéma II-11 : Exemples d'isoflavones méthoxylées.

II-1-4-1c- La O-glycosylation :

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

D'une manière générale, l'hydroxyle de la position 7 constitue le site préférentiel de la glycosylation dans le cas des flavones alors que dans le cas des flavonols c'est l'hydroxyle de la position 3 [30].

II-1-4-2- La C-substitution :

II-1-4-2a- La C-méthylation :

Le radical méthyle dans ce type de substitution va se lier directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison est rencontrée en position C-6 ou en position C-8, ou encore en position C-6 et C-8. L'enzyme catalysant la C-méthylation en position 6 et / ou en position 8 est toujours inconnue [31].

II-1-4-2b- La C-glycosylation :

Les flavonoïdes C-glycosylés ne sont pas rares, on y trouve plus de 350 hétérosides [5]. 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 [32].

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

II-2- PROPRIÉTÉS DES FLAVONOÏDES :

Connus pour leurs multiples rôles, les composés phénoliques ont attirés l'attention d'un grand nombre de chercheurs de différentes disciplines (biologistes, chimistes, pharmaciens et médecins) ces deux dernières décennies.

Des travaux ont montré que les flavonoïdes sont associés à de nombreux processus physiologiques tels que la croissance cellulaire, la dormance des bourgeons, la floraison, etc...[33, 34]. Un certain type de ces substances est responsable de la coloration des fleurs et des fruits [35], d'autres dont l'absorption en UV est importante protègent la plante vis-à-vis des rayons UV-B de la lumière solaire [36].

D'autres études ont montré que les flavonoïdes interviennent dans la défense des plantes comme agents protecteurs contre les invasions microbiennes [37, 38]. Certaines études ont étendu cet effet à une activité antifongique [39]. Par ailleurs, beaucoup d'isoflavonoïdes sont considérés comme des phytoalexines, connues pour leur réponse à l'attaque microbienne [40].

Des recherches ultérieures ont montré que la présence d'un type de substances ou d'un groupe de substances forme un caractère spécifique d'un genre ou d'une famille de plantes [41]. Il a été remarqué la présence de certains groupes de flavonoïdes dans une famille de plantes bien définie, comme les isoflavones qui caractérisent la famille des fabales, sous famille des fabacées [42-44]. Cette caractéristique à pousser les botanistes à relier la distribution de ce type de molécules et la classification systématique de ces plantes [42].

II-3- INFLUENCE DES FLAVONOÏDES SUR LA SANTÉ HUMAINE :

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'une alimentation riche en polyphénols diminue le risque de cancers, d'affections cardiovasculaires et d'autres maladies chroniques.

Ces effets sont confirmés dans diverses études :

- En ce qui concerne le cancer, il est établi qu'une consommation régulière de fruits et de légumes diminue le risque de cancer jusqu'à 50% [45].
- En ce qui concerne les maladies cardiovasculaires, les données relatives à l'influence des flavonoïdes restent fragmentaires [46, 47], et les résultats ne sont pas concluants [48].
- Leur intérêt comme antioxydants se manifeste également dans le domaine de la protection contre le stress photo-oxydant cutané induit par l'exposition aux rayons solaires [49].

De plus en plus de travaux tentent à l'heure actuelle de cerner les effets protecteurs de certains aliments particuliers. C'est ainsi que le thé est l'objet de plusieurs études [50 - 55], c'est l'une des principales sources d'apport de flavonoïdes [56].

Parmi les flavonoïdes dont les activités sont reconnues, on a des flavonols comme la quercétine, le kaempférol, la myricétine et des flavones comme l'apigénine et la lutéoline. Ces composés existent dans 28 légumes et 9 fruits dont les pommes, les oignons...etc. [57].

Les **isoflavones**, sont des molécules qu'on trouve en abondance dans les espèces des légumineuses et en particulier dans les grains de Soja [58- 61]. En effet, il a été montré que 1 g de poudre de soja renferme environ 800 µg de daidzéïne et plus de 500 µg de génistéïne [62].

Des études épidémiologiques sur des femmes chinoises (420 personnes saines et 200 malades ayant le cancer du sein) ont montré qu'une alimentation riche en soja diminue considérablement les risques d'attaque du cancer du sein [63].

Ces molécules, appelées aussi **phyto-oestrogènes**, ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche. En effet, des études épidémiologiques ont prouvé l'action de ce type de molécules sur les risques de certains cancers et maladies du cœur [63, 64].

II-4- RELATION STRUCTURE-REACTIVITE :

II-4-1- Cas des flavones et flavonols:

La preuve des effets protecteurs des anti-oxydants est fondée sur diverses études. Il a été montré que les flavonoïdes agissent comme des fixateurs de plusieurs espèces oxydantes ; tel que l'anion peroxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ou les radicaux peroxydes. Les données de la littérature montrent une mise en évidence de certaines relations entre la structure chimique du flavonoïde et l'activité antioxydante :

- La présence du groupe hydroxyle 3-OH lié à la double liaison $C_2=C_3$, et son emplacement adjacent au groupement carbonyle de l'hétérocycle (C) en position C-4 est exigé pour la grande efficacité de l'activité antioxydante [65]. Cette activité atteint son maximum quand le noyau B est substitué par un système orthodihydroxyle.
- La O-méthylation des substituants hydroxyles du squelette flavonique réduit l'activité antioxydante des flavonoïdes [66, 67].
- Les groupements hydroxyles en position 3, 5, 7, 3', 4' participent dans l'inhibition de la peroxydation lipidique [56].
- La capacité antioxydante des flavonoïdes revient à leur aptitude à former des chélates métal-ion, par l'ensemble (3-hydroxy, 4-oxo) ou (5-hydroxy, 4-oxo) [68].
- Les groupes hydroxyles 5-OH, 7-OH, et la double liaison $C-2=C-3$ qui sont des sites potentiels de réactivité, sont essentiels pour l'activité inhibitrice des flavonoïdes de l'enzyme Xanthine oxydase et du radical peroxyde produit par ce dernier [69].

II-4-2 : Cas des isoflavones :

Les activités biologiques diverses de la génistéine (4', 5, 7-trihydroxyisoflavone) ont fait l'objet de nombreuses études publiées durant les dix dernières années. La majorité de ces études ont porté sur les activités pharmacologiques de la génistéine comme inhibiteur de la tyrosine kinase, des activités chimiopréventives contre les maladies du cancer et les maladies cardiovasculaires et essentiellement l'activité phytoestrogénique [76, 40].

II-4-3- Autres activités des polyphénols :

Les polyphénols, métabolites exclusivement d'origine végétale, apparaissent comme des molécules d'un grand intérêt. Ils démontrent des propriétés préventives contre un nombre important de maladies. En effet, un nombre considérable d'études a mis en évidence leurs diverses activités : anti-oxydantes ; antiradicalaires [70 - 72], anti-inflammatoires [73, 74], antihypertenseurs [75], anticancéreux [76], antiallergiques [77], antivirales [78], et activité phytoestrogène [40].

II-5 L'ETUDE CHIMIQUE DES FLAVONOÏDES

II-5-1- EXTRACTION :

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes [5, 79]. L'une de ces méthodes est adoptée par notre laboratoire, les étapes essentielles sont :

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

II-5-2- SEPARATION ET PURIFICATION :

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

- la chromatographie liquide sur colonne (CC) : elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le silicagel, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités de mélanges importantes et complexes [80].
- la chromatographie préparative sur papier (CP) : basée sur l'utilisation d'une surface plane de cellulose considérée comme support maintenant par imprégnation une phase stationnaire liquide, les systèmes de solvants les plus utilisés dans cette technique sont :
 - L'acide acétique **15** et **30 %** t constitue le système aqueux.
 - Le *n*-butanol / Acide acétique/ Eau (BAW) **4 /1/ 5** constitue le système Organique [81].
- la chromatographie préparative sur couche mince (CCM), très simple et très rapide, elle est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification en utilisant les diverses phases stationnaires et les systèmes de solvants appropriés.

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

II-6- ANALYSE STRUCTURALE DES FLAVONOÏDES :

II-6-1- Généralités :

L'identification des structures flavoniques est basée essentiellement sur les différentes techniques spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) avec ses différents modes (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, etc...), la spectrométrie de masse (SM) avec différents types d'ionisation : impact électronique (IE), ionisation chimique (IC) et bombardement des atomes accélérés (FAB) ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible qui reste la méthode de choix pour ce type de composés [81, 82,]. 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.

II-6-2- Facteur de retardement et comportement chromatographique :

Ce facteur symbolisé par R_f est défini comme étant le rapport de la distance entre la tâche du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part.

La valeur du R_f varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la forme du produit lui-même (aglycone ou glycosyle), ainsi que de la disposition des différents substituants sur le squelette flavonique [80, 81, 83]. Le tableau suivant montre l'influence de la substitution du squelette flavonique sur la valeur du R_f .

Tableau II-2 : La relation entre le R_f et la structure flavonique.

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

II-6-3- La fluorescence sous lumière de Wood :

L'absorption des substances flavoniques sous lumière de Wood à la longueur d'onde de 365 nm donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique. Le tableau suivant montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [81].

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

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

II-6-4- La spectrophotométrie UV-Visible :

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales [84] (voir figure II-6).

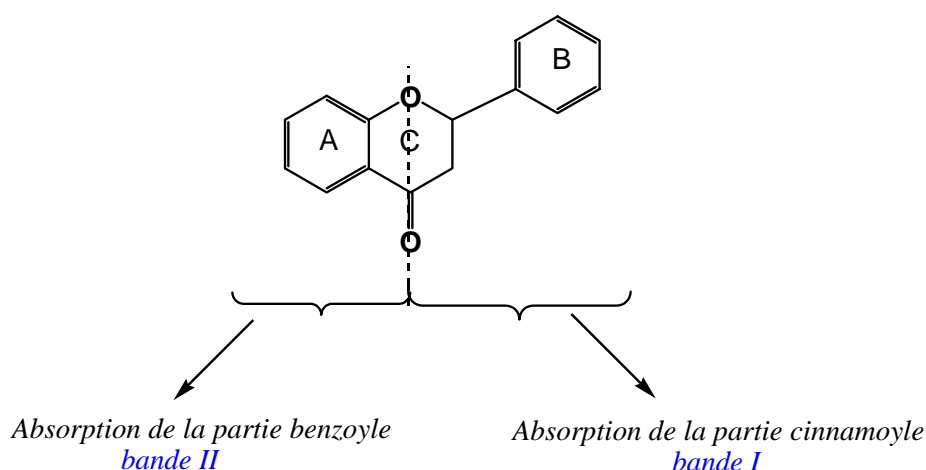


Figure II-6 : Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

- **Bande I** : présentant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2-C3) et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.
- **Bande II** : présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [80].

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

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

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 ou méthoxyles sur le squelette flavonique. L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacé le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosyles fait déplacé ce maximum vers des longueurs d'onde plus faibles [85].

Le spectre méthanolique d'un **isoflavonoïde** est caractérisé par l'apparition de la bande I sous forme d'un épaulement due à l'absence de la conjugaison entre le groupement carbonyle et le noyau B [81].

II-6-4-1- 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.

II-6-4- 1a- 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 [80]. 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 hydroxylés sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est orthodihydroxylée en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [81]

II-6-4- 1b- 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 [81].

Dans le cas des isoflavones, le **NaOAc** ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7 [81], 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 [81].

II-6-4- 1c- Spectre en présence de NaOAc +H₃BO₃ :

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (**H₃BO₃**) est additionné à l'échantillon en présence de **NaOAc**. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système orthodihydroxyle sur le cycle B (3', 4') ou sur le cycle A (6, 7 ou 7, 8) suite à la formation des chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande I [81].

II-6-4- 1d- 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** [85], par contre, ceux formés entre **AlCl₃** et les hydroxyles **5-OH** ou **3-OH** et la fonction carbonyle sont stables [86, 87]. 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**.

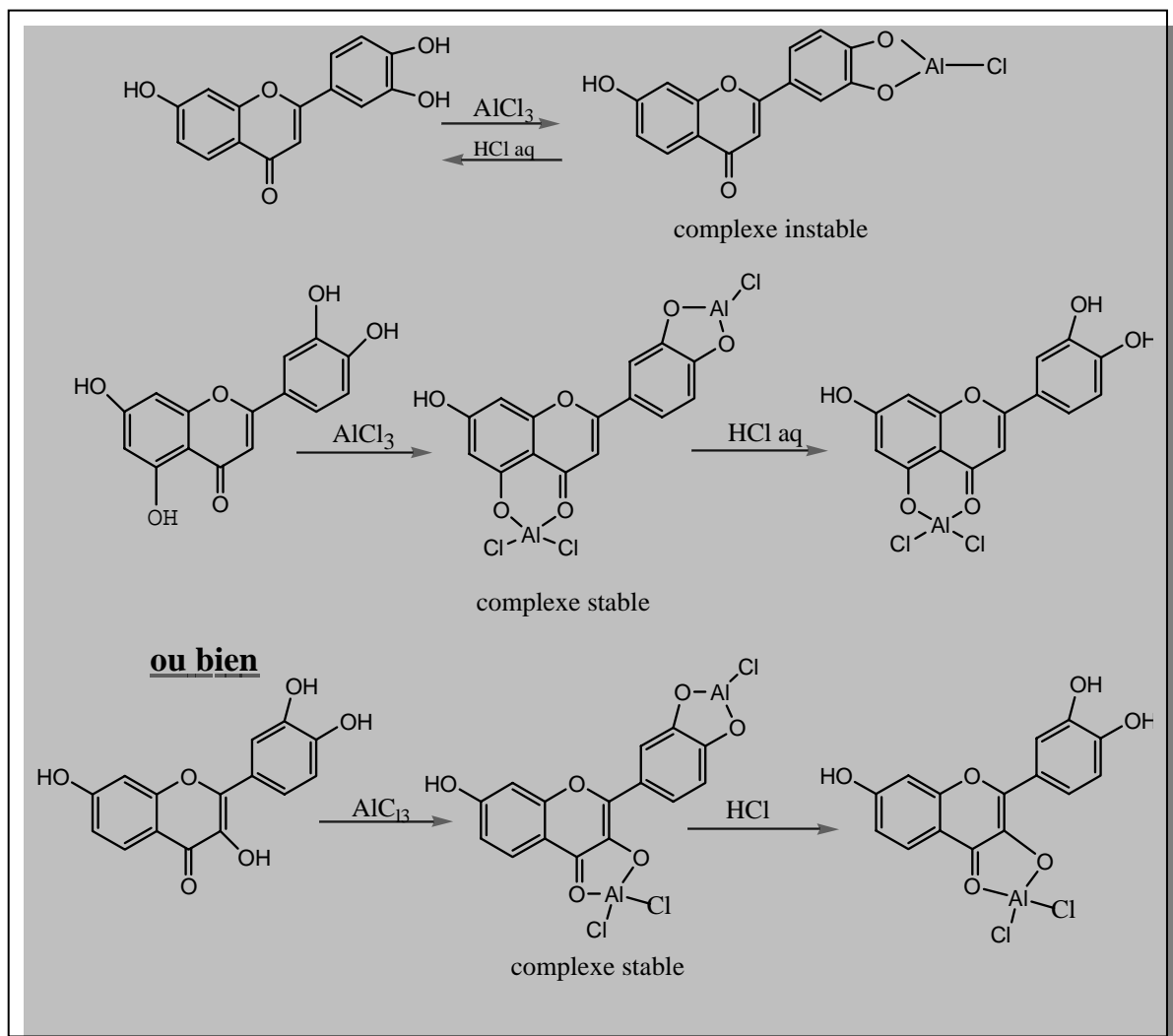


Figure II-7: Formation des différents types de complexes après addition de AlCl_3 et en présence de HCl

II-6-4-2 L'hydrolyse acide des hétérosides :

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

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

II-6-5- La Spectrométrie de masse :

Cette technique permet la détermination du pic moléculaire des aglycones qui donne globalement le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles [88, 89]. Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements utiles, notamment sur les structures de substitution des noyaux A et B [90]. Cette technique connaît un véritable succès dans ce domaine avec le développement de divers mode d'ionisation permettant l'analyse des structures glycosylés à l'état natif tels que la FAB, et l'électrospray.

De nos jours, la spectrométrie de masse trouve diverses applications grâce au couplage avec les techniques chromatographiques. Ces techniques de couplage permettent des analyses très rapide et très rigoureuses.

II-6-6- La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.):

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire trouve un grand emploi pour la détermination des structures flavoniques [91]. C'est une méthode précise et efficace, mais nécessite une grande quantité du produit ce qui limite son utilisation par rapport aux autres méthodes d'analyses.

- **La RMN du proton (RMN ¹H) :** elle informe sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonent généralement entre 6 et 8 ppm elle permet de connaître [91-95] :

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

- **La RMN du carbone 13 (RMN ¹³C) :** donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telles que [80, 95] :

- le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement,
- la connaissance de type des liaisons -C et / ou -O sucres,

Références Bibliographiques

- [1] **Harborne, J.B. and Baxter, H. Eds. (1999),**
The handbook of natural flavonoids. Vol.1, John Wiley and Sons, Chichester.
- [2] **Bruneton, J. (1993),**
Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2^{ème} édition, Lavoisier, Paris.
- [3] **Harborne, J.B. (1964),**
Biochemistry of phenolic compounds, Academic press, New York.
- [4] **Dewick, P. M. (1993),**
Isoflavonoids. The Flavonoids Advances in research since 1986. Edited by J. B. Harborne, Chapman & Hall. London pp.117-238.
- [5] **Bruneton, J. (1999),**
Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3^{ème} édition. 3, lavoisier, Paris.
- [6] **Mann, J. (1987),**
Secondary metabolism, édition. 2, Clarendon press, Oxford.
- [7] **Guignard, J. L (1974),**
Abrégé de biochimie à l'usage des étudiants de pharmacie.p.165.
- [8] **Harborne, J.B. (1994),**
The Flavonoids Advances in research since 1986. Edited by J. B. Harborne, Chapman & Hall.
- [9] **Donnelly, D. M. X. and Boland, G. (1994),**
Neoflavonoids, in The Flavonoids Advances in research since 1986. Edited by J. B. Harborne, Chapman & Hall. London. .239-258.
- [10] **Forkman, G, (1992),**
Structure and biosynthesis of flavonoids. Proceedings International Conference of Group Polyphenol. V. 16, N°1, 19-27.
- [11] **Stafford, H., A. (1990),**
Flavonoids metabolism. CRC., Press, Boca Rason.
- [12] **Harborne, J.B. (1988),**
In plant pigments, édition T. W. Goodwin, Academic Press. London, pp. 299-343.
- [13] **Richter, G. (1993),**
Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie). Presses polytechniques et universitaires romandes, Lansanne CH-1015.

- [14] **Heller, W. and Forkmann, G. (1988),**
In the flavonoids advances in research since 1980. ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, London, 399-425.
- [15] **Crombie, L., Holden, I., van Bruruggen, N., and Whitting, S. A. (1986),**
J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1063
- [16] **Dewick, P. M. (1988b),**
In the flavonoids advances in research since 1980. edited by J.B. Harborne, Chapman and Hall, London pp. 125-209.
- [17] **Dixon, R. A. (1995),**
Métabolisme provoqué par la tension de phénylpropanoïde de Paiva NL 1995. *Cellule 7 d'Usine* : 1085-1097.
- [18] **Dixon, R. A., et Steele, C. L. (1999),**
Flavonoïdes et isoflavonoïdes – une mine d'or pour la technologie métabolique. *Usine Sci.* 4 De Tendances: 394-400.
- [19] **Jung, W., Yu, O., Lau, S.M.C., O'Keefe, D.P., Odeli, J., Fader, G. and McGonigle, B. (2000),**
Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature biotechnol.* 18, 208-212.
- [20] **Steele, C.L., Gijzen, M., Qutob, D. and Dixon, R.A. (1999),**
Molecular characterization of the enzyme catalysing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. *Arch. Biochem. Biophys.* 367, pp.147-150.
- [21] **Ikan, R. (1991),**
Natural products. Department of organic chemistry. Hebrew University, Jerusalem. II^{ème} édition, 3, Academic Press.
- [22] **Harborne, J. B. (1975),**
Flavonoids in phytochemistry, Vol. II, Edition Lawrence, P. L., Vol. II, Litton Educational Publishing.
- [23] **Deluca, V. and Ibrahim R. K. (1985b),**
Arch. Biochem. Biophysics, p. 606.
- [24] **Iinuma, M. and Mizuno, M. (1989),**
Phytochemistry, 28, 681
- [25] **Kochs, G. and Grisebach, H. (1986),**
Eur. J. Biochem. 155, 311.

- [26] **Ebel, J. and Hahlbrock, K. (1982),**
In the flavonoids advances in research eds J. B. Harborne and T. J. Mabry, Chapman and Hall, London pp.641-659.
- [27] **Khouri, H.E., Tahara, S. and Ibrahim R.K (1988),**
J. Chromatography, 487, p. 291.
- [28] **Tahara, S., Hashidoko, Y., Ingham, J.L. and Mizutani, J. (1986),**
Agric. Biol. Chem. 50, 1899.
- [29] **Mizuno, M., Tanaka, T., Tamura, K.-I., Matsuura, N., Iinuma, M. and Phengkklai, C. (1990),**
Phytochemistry 29, 2663.
- [30] **Harbone, J.B. and Williams, C.A. (1988),**
In the flavonoids advances in research since 1986. ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall. Ltd. P. 303.
- [31] **Heller, W. and Forkmann, G. (1993),**
In the flavonoids advances in research since 1986. ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, London 1993 pp. 499-535.
- [32] **Chopin, J. (1966),**
Actualité de phytochimie fondamentale, IIème série, édition Masson, Paris, p.119.
- [33] **Nitsch, J.P. et Nitsch, C. (1961),**
Synergistes naturels des auxines et des gibberelilines. *Bull. Soc. Fr.* 26 : pp.2237-2240.
- [34] **Alibert, G. Ranjeva, R. et Boudet, M.A. (1977),**
Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiol. Veg.* 15 :pp. 279-301.
- [35] **Markakis, P. (1982),**
Anthocyanins as food colors. Ed. Academic Press. New York.
- [36] **Harborne, J.B., and Williams, C.A. (2000),**
Advences in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55, pp. 481-564.
- [37] **Harborne, J.B. (1985),**
Phenolics and plant defence; In: Van Sumere-C.F. Lea P.J. Ed. *Annual Proceedings of the phytochemical society of Europe*. Oxford: Clarendon Press,pp.393-408.
- [38] **Cowan, N. M. (1999),**
Plant products as anti microbial agents. *Clinical microbiology Reviews*, 12,4, pp.564-582.

- [39] **Gafner, S., Wolfender, E.F., Mavi, S. and Hostettman, K. (1996),**
Antifungal antibacterial chalcones from *Myrica serrata*. *Planta Medica*, 62, pp. 67-69.
- [40] **Dixon, R.A. (2004),**
Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, pp. 225-261.
- [41] **Barrau, J., Corbasson, M., Le roux, G. Loison, G., Tonnier, J.P., Baretts, R. and Hugueni, B. (1966),**
Phytocide et plantes médicinales des terres du pacifique. Edition du Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Paris.
- [42] **Harborne, J. B. (1969),**
Chemosystematics of the leguminosae, Flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe Genisteeae. *Phytochemistry*, Vol. 8, pp. 1449-1456.
- [43] **Mann, J., (1987),**
Secondary metabolisme, ed. 2, Clarendon press, Oxford.
- [44] **Cronquist, A. (1988),**
Anintegrated System of Classification of Flawring Plants, 2nd ed. New york, Botanical Garden.
- [45] **Block, G., Patterson, B. and Subar, A. (1992),**
Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer*, 18, pp.1–29.
- [46] **Faggiotto, A., Poli, A. and Catapano, A. (1998),**
Anti-oxidants and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol*;9:541–9.
- [47] **Van de Vijer, L.P., Kardinaal, A.F., Grobbee; D.E., Princen, H.M. and van den Poppel, G. (1997),**
Lipoprotein oxidation, anti-oxidants and cardiovascular risk: epidemiologic evidence. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*;57, 479–87.
- [48] **Hollmann, P.C.H. and Katan, M.B. (1998),**
Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man, *Arch. Toxicol. Suppl.*, 20, pp. 237-248.
- [49] **Fuchs, J. (1998),**
Potentials and limitations of the natural anti-oxidants RRR-alpha-tocophérol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. *Free Rad Biol Med.* ;25, pp.:848–873.

- [50] Weisburger, J. (1998),**
Chemoprevention of cancer by tea. In: Prasad KN, Cole WC, editors. *Cancer and nutrition*. New York: IOC Press; p.167–71.
- [51] Ahmad, N. and Mukhtar, H. (1999),**
Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. *Nutr. Rev.* ;(57), 78–83.
- [52] Kata, M. (1997),**
Flavonoids and heart disease. *Am J Clin Nutr.*;65: pp.1542–1543.
- [53] Bushman, J.L. (1998),**
Green tea and cancer in humans: a review of the literature. *Nutr Cancer*;31: 151–159.
- [54] Van Het Hof, K.H., de Boer, H.S., Wiseman, S.A., Lien, N., Westrate, A., and Tijburg, L.B. (1997),**
Consumption of green or black tea does not increase resistance of LDL to oxidation in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66:pp.1125–1129.
- [55] van het Hof, K., Wiseman, S., Yang, C., and Tijburg L. (1999),**
Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proc Soc Exp Biol Med*;220. pp.:203–209.
- [56] Cook, N.C. and Samman, S. (1996),**
Flavonoids-chemistry, Metabolism, cardioprotectives effects and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, vol. 7 (février).
- [57] Hertog, M.G.L., Hollmann, P.C.H., Katan, M.B. and Kromhout, D. (1993),**
Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer*, 20, pp. 21-99.
- [58] Murphy, P.A. and Wang, H. J. (1993),**
Total genistein and daidzein content of soyfoods. *FASEB Journal*: 7 3 Pt II, Abstract 4283.
- [59] Franke, A.A., Hankin, J.H., Yu, M. C., Maskarinec, G., Low, S.H. and Custer, L.J. (1999),**
Isoflavone levels in soyfoods consumed by multiethnic populations in Singapore and Hawaii. *J Agr Food Chem* 47, pp. 977-986.
- [60] Fakutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (1996),**
Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products Food, *Chem Tox.* 34: pp. 457-461.

- [61] **Kaufman, P. B., Duke, J.A., Brielmann. H., Boik, J. and Hoyt, J.E. (1997)**
Comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. *J Altern Compl Med* 3: pp. 7-12.
- [62] **Richard, A.D. and Daneel, F. (2002),**
Molecules of Interest, Genistein. *Phytochemistry*, 60, pp. 205-211.
- [63] **Lee, H.P., Gourley, L., Duffy, S.W., Esteve, J., Lee, J. and Day, N.A. (1991),**
Dietary effects on breast cancer risk in Singapore. *Lancet* 337, pp. 1197-1200.
- [64] **Clarkson, T.B., Anthony, M.S. and Hughes, C.L. (1995),**
Estrogenic soybean isoflavones and chronic disease -risks and benefits. *Trends Endocrin Met* 6: 11-16,.
- [65] **Hahida, F. and Wanasundara, P.K.J.P.D. (1992),**
Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32 (1), pp. 67-103.
- [66] **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.
- [67] **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.
- [68] **Kitta, K., Hagiwara, Y. and Shilamoto, T. (1992),**
Antioxidative Activity of an Isoflavonoid, 2''-O-Glycosylisovitexin Isolated from *Green barley leaves*, *J. Agric. Food.Chem.*, 40, pp. 1843-1845.
- [69] **Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J. and Berphe, D.V. (1998),**
Structure- Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide scavengers, *J. Nat. Prod.*, 61, pp. 71-76.
- [70] **Gutteridg, J.M.L., and Halliwell, B. (1994),**
Antioxidants in nutrition, Health and Disease. Oxford University Press. Oxford.
- [71] **Néve, J. (2002),**
Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants, *Nutrition Clinique et Métabolisme*.16, pp. 292-300.

- [72] Colette, N., Bernier, J.L., Henichart, J.P., Catteau, J.P., Gaydou, E.M., Wallt, J.C. (1992),
Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic Flavones. *Free Radical Biology and Medicine*. 13, pp. 211-219.
- [73] 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.
- [74] Emin, J.A., Oliveira, A.B. and Lapa, A.J. (1994),
Pharmacological Evaluation of the anti-Inflammatory activity of a *Citrus* Bioflavonoids, Hesperidin, and the isoflavonoids, Durtin and Claussequinone in rats and mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, pp. 118-122.
- [75] 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.
- [76] Gordon, H.M. (1996),
Dietary Antioxidants in Disease Prevention. *Natural Product Reports*, pp. 265-273.
- [77] 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, pp. 193-198.
- [78] Shahat, A.A., Cos, P., Bruyne, T.D., Apers, S., Hammouda, F.M., Ismail, S.I., Azzam, S. Claeys, M., Goovaets, E., Pieters, L., Bergue, D.V. and Vlietinck, A.J. (2002),
Antiviral and Antioxidant activity of Flavonoids and Proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*, *Planta Med.*, 68, pp. 539-541.
- [79] Ribereau-Gayou, J.B. (1968),
The phenolic compounds of vegetables, Edition Dundo, Paris.
- [80] Markham, K.R. (1982),
Technique of flavonoides identification, Academic press, London.
- [81] Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970),
The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254p.
- [82] Harborne, J.B. (1966),
In «Comparative Phytochemistry» (Goodwin, T.W.ed), Academic Press London.

- [83] **Berthillier, A. (1972),**
La chromatographie et ses applications», Dunod paris.
- [84] **Jurd, L. and Horowitz, R. (1962),**
Spectral properties of flavonoid compounds, pergamon press, Oxford, 107-2055.
- [85] **Markham, K.R. and Mabry, T.J. (1968),**
Phytochemistry, 7, pp. 1197.
- [86] **Horhammer, L. and Hänsel, R. (1952),**
Arch. Pharm., 285, 438.
- [87] **Jurd, L. and Geissman, T.A. (1956),**
J. Org. Chem., 21, 1395.
- [88] **Audier, H. (1966),**
Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse.
- [89] **Nielsen, J. G. and Moller, J. (1970),**
Acta Chem. Scand., 24, 2665.
- [90] **Combier, H. (1968),**
Thèse de doctorat, université de Lyon.
- [91] **Markham, K.R. and Geiger, H. (1993),**
The Flavonoids Advances in research since 1986. Edited by J. B. HARBORNE,
Chapman & Hall. London..
- [92] **Wilson, R.G., Bowie, J.H. and Williams, D.H. (1986),**
Tetrahedron, 24, 1407.
- [93] **Rodriguez, E., Carman, N.J. and Mabry, T.J. (1972),**
Phytochemistry, 11, 409.
- [94] **Markham, K.R. (1989),**
Flavones, flavonols and their glycosides, in *Methods in Plant biochemistry*, P.M. Dey
and J.B. Harborne, Academic Press pp. 197-262.
- [95] **Markham, K.R. (1976),**
¹³C NMR of flavonoides-II, Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones.
Tetrahedron, 32, pp. 2607-2612.

*PARTIE
EXPERIMENTALE*

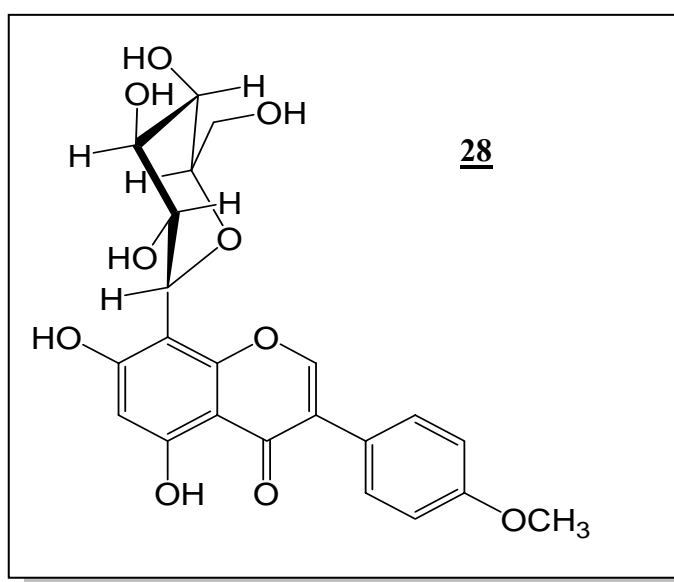
CHAPITRE III

TRAVAUX PERSONNELS

III-1- ETUDE CHIMIQUE DE GENISTA SAHARAE

III- 1-1 : Etude bibliographique :

La recherche bibliographique que nous avons menée sur *Genista saharae* Coss. & Dur. Section Spartidium Spach (Fabaceae), espèce endémique du Sahara, a montré une étude sur celle poussant en Algérie montrant sa richesse en alcaloïdes [1]. Une investigation de celle poussant en Libye a permis la description de deux isoflavones : la 4'-O-methyl-8-C- β -D-glucopyranosylgénistéine **28** et la 8-C- β -D-glucopyranosylgénistéine, dont une nouvelle **28** ainsi que deux alcaloïdes [2].



III-1- 2 : Choix du matériel végétal :

Pour notre étude, plusieurs critères ont guidés notre choix, parmi lesquels :

- L'endémisme de l'espèce *G. saharae* Coss. & Dur. au Sahara dont le climat et le type d'écosystème offrent des caractéristiques et des spécificités non négligeables à la végétation,
- Notre intérêt prononcé au genre *Genista* pour leur capacité d'accumulation de molécules à activité biologique potentielle, notamment les isoflavonoïdes.

III- 1- 3 : Place dans la systématique :

Embranchement	—————>	Spermaphytes
Sous-embranchement	—————>	Angiospermes
Classe	—————>	Dicotylédones
Ordre	—————>	Rosales
Famille	—————>	Légumineuses (Fabales)
Sous-famille	—————>	Papilionacées (Fabacées)
Tribu	—————>	Genisteeae
Genre	—————>	<i>Genista</i>
Espèce	—————>	<i>Saharae</i> Coss. & Dur.

III-1- 4 : Description botanique :

D'après Quezel et Santa (1963) [3], *G. saharae* Coss. & Dur. est une plante endémique du Sahara à calice campanulé à 5 dents courtes subégales, presque glabre. Plante à longs rameaux cylindriques et dressées, haute de 1-2 mètres. Inflorescence en grappe simple ou composée, à fleurs très espacées. Gousse polysperme, comprimée, stipulée, de 25-50 mm de long. (Voir photo). Son nom vernaculaire « Tellegit ».

III-1- 5 : Répartition géographique :

Elle est commune au Sahara de l'Algérie et de la Libye.



Figure III-1 : Photo de *Genista saharae* Coss. & Dur.

III-I- 6 : Protocole expérimental :

III- I- 6-1 : Récolte du matériel végétal :

La plante a été récoltée de la région de Boussaâda (sud algérien), au mois de mai 1998. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées (680 g).

III-I- 6 -2 : Extraction :

La quantité de matériel végétal obtenue (680g) a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau ; 70 : 30 ; v/v) pendant 72 heures. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite et une température modérée (environ 35 °C). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures.

Les trois extraits hydroalcooliques récupérés sont réunis et concentrés. A la solution concentrée obtenue, on ajoute sous agitation magnétique 260 ml d'eau distillée et du tétraacétate de plomb $Pb(OAc)_4$ jusqu'à disparition de la coloration verte au profit d'une coloration marron. La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette décantation permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable, etc.... Après filtration on obtient une solution aqueuse claire. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Les trois phases organiques récupérées sont séchées avec du Na_2SO_4 anhydre puis filtrées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. On obtient 4,85 g d'extrait pour la phase chloroforme, 1,8 g d'extrait pour la phase acétate d'éthyle.

Durant la concentration de la phase *n*-butanol, nous avons constaté la formation d'un précipité blanc que nous avons récupéré par filtration (2 g). Le filtrat est concentré pour donner un extrait *n*-butanol de 30 g.

L'organigramme N° III-2 montre les différentes étapes du processus d'extraction.

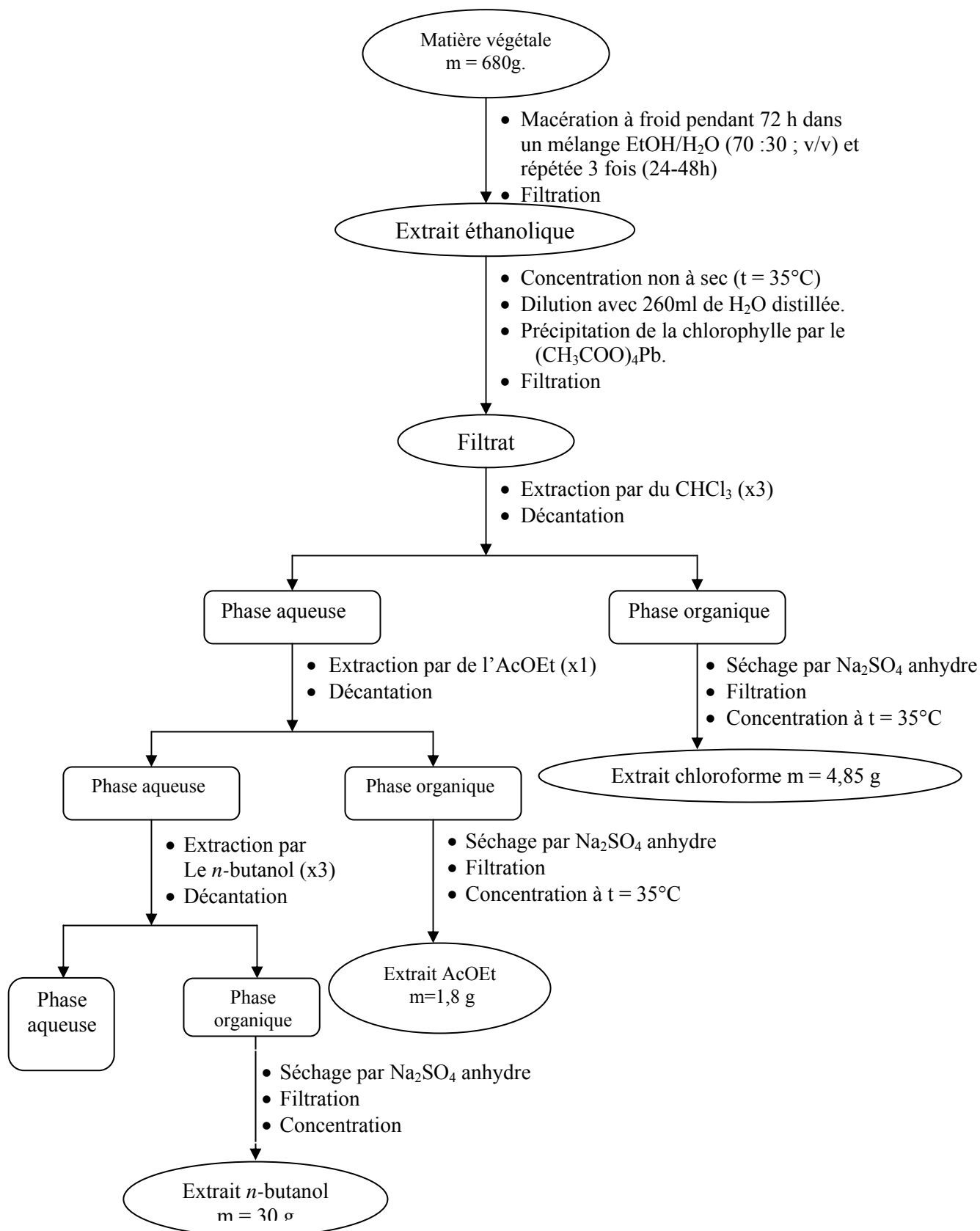


Figure III-2 : Protocole d'extraction de *G. saharae* Coss. & Dur.

III-I- 6-3 : Séparation chromatographique :

III-I- 6-3a : Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme :

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de cet extrait, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'Aluminium, la meilleure séparation obtenue était avec le système de solvant **Ether de pétrole/ Acétate d'éthyle (7 :3)**.

➤ *Séparation sur colonne :*

Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. Le résultat des tests chromatographiques nous a conduit à utiliser comme système d'élution **l'Ether de pétrole / Acétate d'éthyle / Acétone** en gradient de polarité.

Une masse d'environ 3,8 g d'extrait chloroforme est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans de l'éther de pétrole. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système **Ether de pétrole / Acétate d'éthyle / Acétone** en commençant par de l'éther de pétrole pur et en terminant par de l'acétone pur avec un fractionnement tous les 25 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'acide sulfurique et chauffées pendant 3 mn à 100°C. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III-1.

Tableau III-1: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroforme de *G. saharae* Coss.& Dur.

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'élution		
		% Ether de pétrole	% Acétate d'éthyle	% Acétone
1-19	1	100	0	/
20-55	2	98	2	/
56-99	3	96,5	3,5	/
100-110	4	96	4	/
111-132	5	95,5	4,5	/
133-140	6	95	5	/
141-158	7	90	10	/
159-174	8	85	15	/
175-178	9	80	20	/
179-182	10	80	20	/
183-188	11	80	20	/
189-193	12	80	20	/
194-203	13	75	25	/
204-212	14	75	25	/
213-224	15	75	25	/
225-231	16	70	30	/
232-234	17	70	30	/
235-240	18	70	30	/
241-244	19	60	40	/
245-259	20	60	40	/
260-277	21	50	50	/
278-290	22	40	60	/
291-308	23	30	70	/
309-326	24	20	80	/
327-361	25	20	75	5
362-385	26	20	65	15
386-397	27	20	60	20
398-402	28	20	45	35
403-404	29	20	45	35
405-412	30	0	60	40
413-420	31	0	0	100

Après rassemblement selon les résultats du suivi analytique, les fractions sont testées dans deux systèmes différents qui sont : **Cyclohexane / AcOEt** et **CH₂Cl₂ / Acétone** avec différentes proportions. Ces tests nous ont permis de réaliser un second regroupement qui est présenté dans le tableau III-2.

Tableau III-2 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique. de l'extrait chloroforme de *G. saharae* Coss.& Dur.

N° des fractions	Nom de la fraction	Observations
1-3	SCI	Graisses et cires
4-9	SC2	Mélange complexe + chlorophylle
10-12	SC3	Mélange complexe
13-14	SC4	Mélange complexe + chlorophylle
15-16	SC5	Mélange séparable
17	SC6	Mélange séparable (non traité car en quantité faible)
18	SC7	Mélange séparable
19-21	SC8	Mélange séparable
22-23	SC9	Mélange séparable
24	SCI0	Mélange complexe
25-27	SCI1	Mélange séparable
28-29	SCI2	Mélange séparable (non traité car en quantité faible)
30	SCI3	Mélange complexe
31	SCI4	Mélange complexe + chlorophylle

Parmi les 14 fractions obtenues, on a procédé à la séparation des fractions SC5, SC7, SC8, SC9 et SC11 à cause soit de leur simplicité soit de leur poids relativement important. Pour les fractions SC5, SC7, SC8 et SC9 la séparation a été effectuée sur couche mince quant à la fraction SC11, nous avons procédé à une autre séparation sur colonne suivie de purification sur couche mince.

➤ *Séparation sur couche mince :*

Fraction SC5 :

La fraction SC5 de masse 21 mg a subi une séparation sur plaque de gel de silice, en utilisant comme système d'éluion : **Nafta (hexane) / AcOEt (5 :1)**, les résultats obtenus sont reportés sur le tableau III-3.

Tableau III-3 : Résultat de séparation de la fraction SC5

Sous fraction	Remarques
SC51	(1,5 mg), produit pur
SC52	(0,8 mg), produit pur
SC53	(1.6 mg), produit pur de fluorescence orange sous 365 nm

Fraction SC7 :

De masse 12 mg, la fraction SC7 a subi une séparation sur plaque de gel de silice avec le même système d'éluion que la fraction SC5 **Nafta (hexane) / AcOEt (5 :1)**, les sous fractions obtenues sont données dans le tableau III-4:

Tableau III-4 : Résultat de séparation de la fraction SC7

Sous fraction	Remarques
SC71	(2,4 mg), produit pur de fluorescence violette sous 365 nm
SC72	(1,6 mg), produit pur
SC73	(1,4 mg), mélange de deux produits
SC74	(0,8 mg), mélange de deux produits

Fraction SC8 :

Une quantité de cette fraction de masse 71 mg a subi une séparation sur plaque de gel de silice, en utilisant comme système d'éluion : **CH₂Cl₂ / Acétone (9 :1)**, les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau III-5

Tableau III-5: Résultat de séparation de la fraction SC8

Sous fraction	Remarques
SC81	(1,3 mg) identique à SC71
SC82	(14,7 mg), produit pur de fluorescence violette sous 365 nm
SC83	(1,7 mg), produit pur
SC84	(5,4 mg), mélange de deux produits

Fraction SC9 :

Nous avons opté pour cette fraction à une première séparation sur couche mince de gel de silice en utilisant comme système éluant CH_2Cl_2 / Acétone (9 :1), Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau III-6.

Tableau III-6 : Résultat de séparation de la fraction SC9

Sous fraction	Remarques
SC91	(1,3 mg) \equiv SC82
SC92	(3 mg), produit pur, observable après révélation
SC93	(1,5 mg), produit pur observable après révélation.
SC94	(10 mg), mélange de deux produits
SC95	(15 mg), mélange.
SC96	(4,3 mg), produit pur de fluorescence jaune sous 365 nm

La sous fraction **SC94** a subit une autre séparation sur couche mince de gel de silice avec le système éluant CH_2Cl_2 /Acétone (9 :1), pour donner le SC941 (1 mg) produit pur et le SC942 (5mg) produit pur également.

La sous fraction **SC95** a été purifiée sur couche mince avec le même système que précédemment, après trois éluations successives, nous avons obtenu quatre autres produits qui sont:

- Le **SC951** identique à SC82 et à SC91.
- Le **SC952** produit pur.
- Le **SC953** produit pur à fluorescence violette sous 365 nm.
- Le **SC954** produit pur identique à SC96.

Fraction SC11 :

C'est la fraction la plus importante du point de vue masse (165 mg), c'est la raison pour laquelle nous avons procédé directement à une deuxième séparation sur colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) avec le système éluant **CH₂Cl₂ / Acétone** en gradient de polarité. Le tableau III-7 montre les résultats de cette colonne après regroupement des pots selon les tests chromatographiques sur couche mince.

Tableau III-7 : Résultat de la séparation de la fraction SC11

Lot	Nom de la fraction	Système éluant		Observations
		% CH ₂ Cl ₂	% Acétone	
1-10	SC111	100	0	Mélange de produits en très faible quantité
11-13		95	5	
14-17		90	10	
18-23	SC112	90	10	Produit pur observable après révélation
24-28		85	15	
29-36	SC113	80	20	Produit pur correspond à SC954
37-47	SC114	75	25	Mélange de produits en très faible quantité
48-52		70	30	
53-58		70	30	
59-63	SC115	50	50	Produit pur
64-70	SC116	70	30	Produit insoluble dans l'acétone et dans le méthanol
71	SC117	0	100	Mélange de deux produits

En conclusion, l'extrait chloroforme de l'espèce *G.saharae* Coss. & Dur. a permis l'obtention de 16 produits purs.

III-1- 6-3-6 : Séparation et purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle :

Une étude chromatographique analytique par CLHP a été réalisée sur cet extrait en utilisant une colonne Nucléosill C18 éluée par un système binaire eau / acétonitrile à diverses proportions (phase inverse) aux valeurs successives 250, 340. La meilleure détection a été obtenue à la longueur d'onde $\lambda = 340$ nm et la proportion 70 : 30 pour le système d'élution (voir figure III-3).

Le chromatogramme correspondant montre d'une part un contenu moyen de cet extrait en composé polaire et d'autre part, que ces composés polaires absorbent bien à la longueur d'onde utilisée.

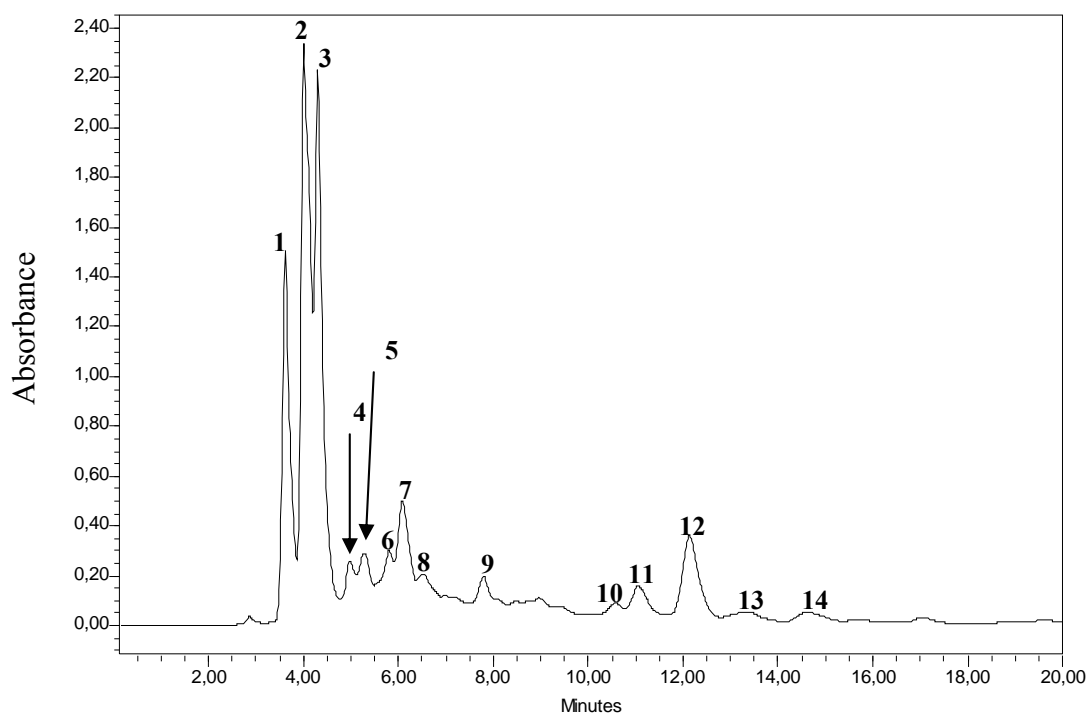


Figure III-3 : Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de *G. saharae* Coss. & Dur.
(Conditions chromatographiques : système d'élution Acétonitrile / Eau 70 :30 ;
lampe de détection $\lambda = 340$ nm)

Par ailleurs, l'enregistrement des spectres UV des pics : n°1 ($t_r = 3,53$ mn), n°2 ($t_r = 3,90$ mn), n°3 ($t_r = 4,31$ mn), n°7 ($t_r = 6,06$ mn) montre que tous ces produits sont du type flavonique (figure III-4).

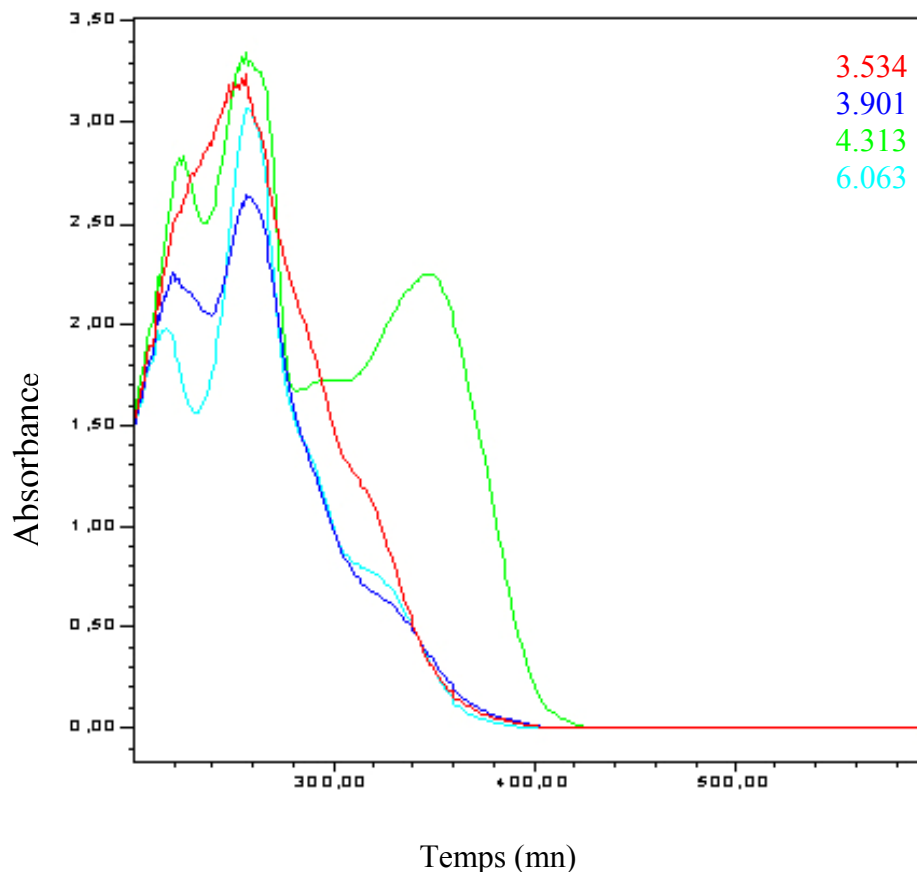


Figure III-4 : Spectres UV de quelques pics du chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de *G. saharae* Coss. & Dur.

➤ *Séparation sur colonne :*

Le résultat des tests chromatographiques obtenu en vue de la séparation sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle ont conduit à l'utilisation du système d'élution **Cyclohexane / Acétate d'éthyle / MeOH** en gradient de polarité.

Environ 1,5 g d'extrait acétate d'éthyle sont déposés sur une colonne de gel de silice (70-230 mesh, Merck) préparée dans le mélange **cyclohexane / acétate d'éthyle (7 : 3)**. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III-8.

Tableau III-8 : Résultat de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *G. saharae* Coss. & Dur.

Lot de fractions	Système d'éluion		
	% Cyclohexane	% Acétate d'éthyle	% Méthanol
1-19	70	30	/
20-45	60	40	/
46-71	55	45	/
72-96	50	50	/
97-121	40	60	/
122-139	30	70	/
140-163	20	80	/
164-181	10	90	/
182-204	/	100	/
205-232	/	95	5
233-256	/	90	10
257-281	/	85	15
282-308	/	80	20
309-326	/	50	50
327-350	/	/	100

Le suivi de la composition des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), puis révélées avec de l'acide sulfurique et chauffées à 100 °C pendant 3 mn. Les pots de même composition sont rassemblés, on obtient 13 fractions (voir tableau III-9).

Tableau III-9 : Résultat du rassemblement des fractions de la colonne de l'extrait Acétate d'éthyle de *G. saharae* Coss. & Dur.

Pots	Fractions	Observations
1-27	SA1	Graisses et cires
28-37	SA2	Quantité insuffisante
38-63	SA3	Ce ne sont pas des flavonoïdes
64-121	SA4	Mélange séparable
122-214	SA5	Mélange séparable
215-222	SA6	Mélange complexe
223-227	SA7	Mélange séparable
228-250	SA8	Mélange séparable
251-262	SA9	Mélange complexe
263-286	SA10	Mélange séparable
287-294	SA11	Mélange complexe
295-326	SA12	Mélange complexe
327-350	SA13	Mélange complexe

➤ ***Séparation sur couche mince :***

Pour des raisons de quantité, seules les fractions SA4, SA5 et SA7 ont été traitées.

Fraction SA4 :

Cette fraction a subi une séparation sur couche mince en utilisant comme système éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ dans les proportions 7 :1. Le tableau III-10 montre le résultat de la séparation :

Tableau III-10 : Résultat de séparation de la fraction SA4

Sous fraction	Remarques
SA41	(4,6 mg), mélange de trois produits
SA42	(2,5 mg), mélange de deux produits
SA43	(6 mg), mélange de deux produits
SA44	(1,4 mg), produit pur

SA45	(2,6 mg), mélange de deux produits
------	------------------------------------

Fraction SA5 :

Avec le même système d'élution $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (5 :1), nous avons procédé à une séparation sur plaque CCM avec 3 éluions successives. Le tableau III-11 montre le résultat de la séparation :

Tableau III-11 : Résultat de séparation de la fraction SA5

Sous fraction	Remarques
SA51	(0,9 mg), mélange de trois produits
SA52	(2,2 mg), produit pur
SA53	(1,4 mg), produit pur
SA54	(1,8 mg), mélange de deux produits

Fraction SA7 :

Cette fraction a subit une séparation sur couche mince en utilisant comme système éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ dans les proportions 5 :1. Les résultats relatifs à cette séparation sont rassemblés dans le tableau III-12

Tableau III-12 : Résultat de séparation de la fraction SA7

Sous fraction	Remarques
SA71	(3,1 mg), mélange de trois produits
SA72	(1,9 mg), mélange de deux produits
SA73	(10,4 mg), produit pur
SA74	(2,3 mg), produit pur
SA75	(2,4 mg), mélange de deux produits
SA76	(3,1 mg), mélange de trois produits

Ainsi l'extrait acétate d'éthyle de *G. saharae* a permis l'obtention de 5 produits à l'état pur et qui sont : SA44, SA52, SA53, SA73, SA74.

*III-1- 6-3c : Séparation et purification des composants du précipité de l'extrait *n*-butanol :*

Comme signalé précédemment, au cours de la concentration du précipité *n*-butanol, nous avons constaté la formation d'un précipité blanc que nous avons immédiatement récupéré, filtré et rincé au dichlorométhane additionnée de quelques gouttes de méthanol pour obtenir un produit pur sous forme d'une poudre blanche (SB0) .

La solution de rinçage (**CH₂Cl₂ / MeOH**) a été concentrée pour donner une masse de 1.1 g. Cette masse a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) en gradient de polarité avec **Hexane / AcOEt / MeOH**. Les résultats de cette colonne sont regroupés dans le tableau III-13.

Tableau III-13 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la solution de rinçage du précipité *n*-butanol de *G. saharae* Coss. & Dur.

Pots	Eluant		
	%Hexane	%AcOEt	%MeOH
1-57	15	80	5
58-78	10	80	10
79-102	15	70	15
103-136	15	65	20
137-161	5	70	25
162-185	0	70	30
186-203	0	50	50
204-244	0	0	100

Le regroupement de ces fractions a été fait sur la base des données de la chromatographie sur couche mince avec des systèmes adéquats. Le tableau III-14 résume les résultats de cette opération.

Tableau III-14 : Le résultat du regroupement des fractions issues de la colonne de la solution de rinçage du précipité *n*-butanol de *G. saharae* Coss. & Dur.

N° des pots	Nom de la fraction	Observations
1-72	SB1	Produit pur
73-100	SB2	Produit pur
101-112	SB3	Produit pur
113-121	SB4	Produit pur
122-210	SB5	Mélange séparable
211-227	SB6	Mélange séparable
228-240	SB7	Mélange complexe
241-244	SB8	Mélange complexe

Ainsi cette colonne a permis d'isoler à l'état pur quatre produits : SB1, SB2, SB3 et SB4. Une co-chromatographie sur couche mince de gel de silice et les spectres de RMN 1H ont permis de constater que SB0 et SB4 sont identiques et que SB3 est identique à SA73.

Fractions SB5+SB6 :

Les fractions SB5 et SB6 de faible poids et de composition similaire ont été rassemblées et chromatographiées sur plaques préparatives de polyamide DC6.6 éluées par le système aqueux **eau / méthanol / méthylethylcétone / acétylacétone** (13 : 3 : 3 : 1) pour donner trois produits à l'état de traces.

Concernant cette partie de l'extrait *n*-butanol de *G. saharae* Coss. & Dur., nous avons pu isoler à l'état pur quatre produits qui sont SB1, SB2, SB3 et SB4. SB4 se trouve être le même que SB0 isolé précédemment sous forme de poudre blanche, on note également que SB3 est identique à SA73 déjà isolé de l'extrait acétate d'éthyle.

En résumé, d'après nos résultats, nous pouvons dire que l'espèce *G. saharae* est riche en métabolites secondaires. Son étude phytochimique a permis l'obtention de 24 produits purs dont 21 produits de la composante semi-polaire (CHCl₃ et AcOEt) et 3 produits purs d'une partie de la composante polaire (*n*-butanol). Parmi les trois produits, le SB0 se trouve être le mieux accumulé par cette espèce, en effet, il faut noter l'obtention d'une quantité d'environ 1,1g.

III-2- ETUDE CHIMIQUE DE GENISTA FEROX

III-2- 1 : Etude bibliographique :

L'étude bibliographique menée sur *G. ferox* Poirret, espèce endémique de l'Afrique du nord, a montré que cette plante n'a fait l'objet que d'une seule étude phytochimique qui a révélée la présence d'alcaloïdes [4].

III-2- 2 : Choix du matériel végétal :

Pour l'ensemble de nos études et de celle-ci en particulier notre choix est guidé par :

- L'endémisme de *G. ferox* Poirret au nord africain.
- L'insuffisance si ce n'est l'absence d'études phytochimiques concernant cette espèce. En effet, comme signaler plus haut, seule une investigation sommaire a été réalisée [4].
- L'utilisation des parties aériennes de cette plante en médecine traditionnelle notamment comme substance cicatrisante dans la région d'El-kala.
- Notre intérêt prononcé, comme signalé précédemment, au genre *Genista* pour leur capacité d'accumulation de molécules à activité biologique potentielle, notamment les isoflavonoïdes.

III-2- 3 : Place dans la systématique :

Embranchement	—————>	Spermaphytes
Sous-embranchement	—————>	Angiospermes
Classe	—————>	Dicotylédones
Ordre	—————>	Rosales
Famille	—————>	Légumineuses (Fabales)
Sous-famille	—————>	Papilionacées (Fabacées)
Tribu	—————>	Genisteeae
Genre	—————>	<i>Genista</i>
Espèce	—————>	<i>ferox</i> Poirret

III-2- 4 : Description botanique :

Calice presque glabre, caduc en entier ou en partie sur la gousse, se coupant circulairement au-dessus de la base, celle-ci longue de 3-4 cm, folioles ovales larges de 3 à 4 mm. Arbuste 3 m. Vieux rameaux transformés en énormes épines très vulnérantes. Feuilles stipulées à stipules transformées en petits aiguillons [3], (Voir figure III-5). Son nom commun est Guendoul dans la région d'El- Kala et Taguendla dans d'autres régions.

III-2- 5 : Répartition géographique :

Elle est commune au nord africain.



Figure III-5 : Photo de *Genista ferox* Poirret.

III-2- 6 : Protocole expérimentale :

III- 2- 6 -1 : Récolte du matériel végétal :

La plante a été récoltée de la région d'El-kala (est algérien), au mois de mai 2000. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées (1800g).

III-2- 6 -2 : Extraction :

Les parties aériennes de *G. ferox* (m=1800g) sont mises à macérer dans un mélange EtOH / H₂O (70 :30 ; v/v) pendant 3x48h.

Après filtration, concentration à une température n'excédant pas 35°C, on ajoute 600 ml de H₂O distillée et le mélange est filtré. Le filtrat ainsi obtenu formant la phase aqueuse est épuisé une seule fois par de l'éther de pétrole, la phase organique est séchée par le Na₂SO₄ anhydre, filtrée et concentrée à sec donnant 5 g d'extrait éther de pétrole.

La phase aqueuse est reprise et épuisée successivement par du chloroforme, de l'acétate d'éthyle, puis le *n*-butanol. Les trois phases organiques sont séchées avec du Na₂SO₄ anhydre, filtrées et concentrées à sec donnant les extraits :

- chloroforme (27 g).
- acétate d'éthyle (11 g).
- *n*-butanol (43 g).

La figure III-6 montre les différentes étapes d'extraction de l'espèce *G. ferox* Poirret.

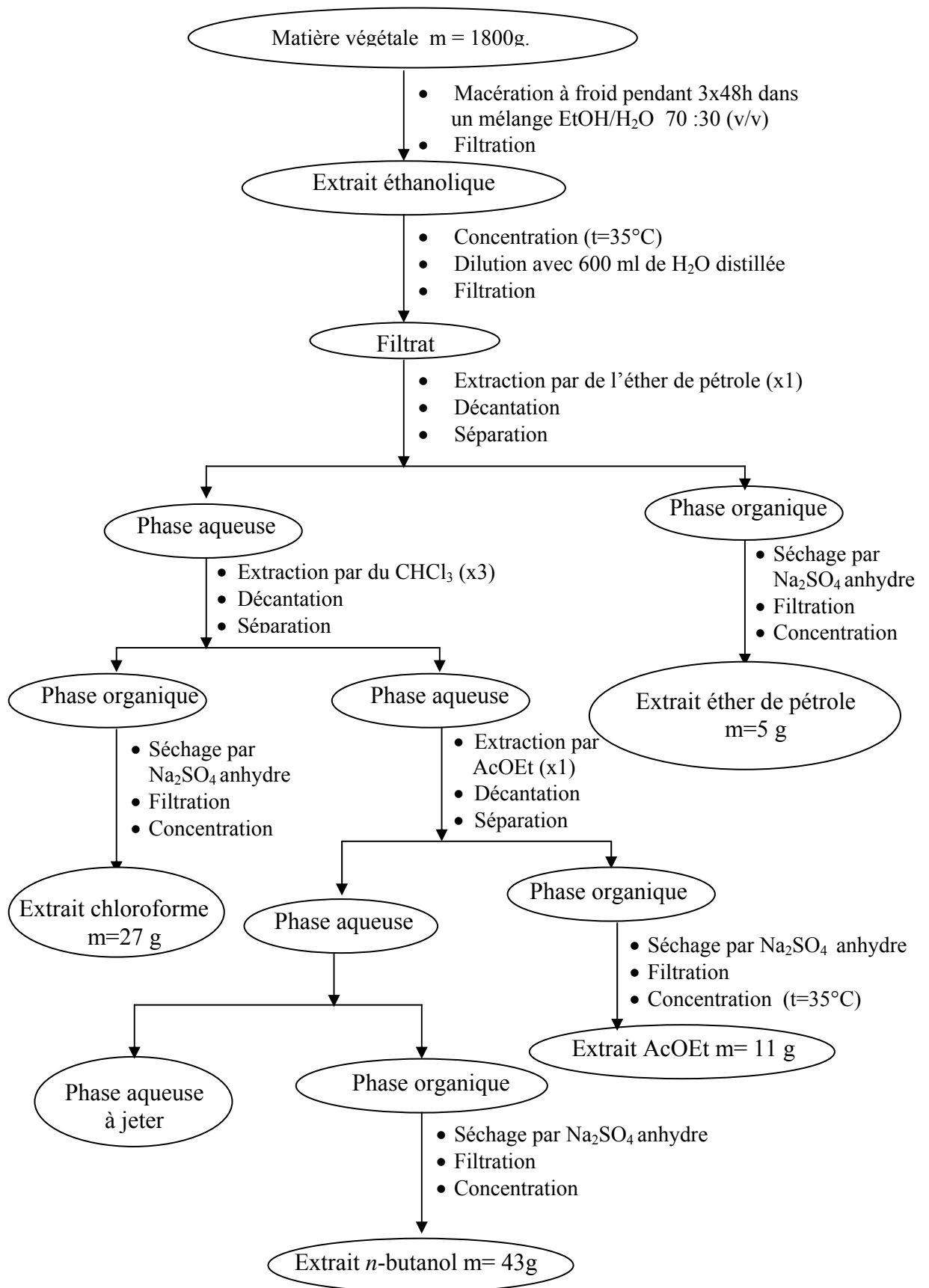


Schéma III-6: Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction de l'espèce *G. ferox* Poirret

III-2- 6-3 : Séparation chromatographique :

III-2- 6-3a : Séparation et purification des composants de l'extrait chloroforme :

Malgré l'affrontement à l'éther de pétrole, l'extrait chloroforme était de couleur vert sombre témoignant de la présence de la chlorophylle. Ainsi les tests chromatographiques réalisés sur cet extrait ont confirmés la présence de chlorophylle et ont permis le choix du système d'éluion : **Nafta** / **AcOEt** en gradient de polarité.

➤ *Séparation sur colonne :*

Environ 27 g d'extrait chloroforme sont déposés sur une colonne de gel de silice normale (230-400 mesh) préalablement montée dans le **Nafta** pur. Après dépôt de l'échantillon, la colonne a été éluee par deux litres de **nafta** pur pour favoriser l'élimination de la chlorophylle et des cires en premier lieu, après quoi l'acétate d'éthyle est introduit en gradient de polarité avec un fractionnement tous les 250 ml environ.

Le suivi de ces fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'acide sulfurique et chauffées pendant 3 mn à 100°C. Les résultats de cette colonne sont rassemblés dans le tableau III-15.

Tableau III-15 : Les résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroforme de *G. ferox* Poirret.

Lots	Système d'éluion	
	% Nafta	% ACOEt
1	100	0
2-9	95	5
10-16	90	10
17-27	85	15
28-35	80	20
36-39	75	25
40-50	70	30
51-59	60	40
60-71	50	50
72-79	30	70
80-89	0	100

Le regroupement des fractions a été effectué selon les données de la chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium, les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), puis révélées avec l'acide sulfurique et chauffées à 100 °C pendant 3 mn (voir tableau III-16).

Tableau III-16 : Regroupement des fractions de l'extrait chloroforme de *G. ferox* Poirret.

N° du lot	Nom de la fraction	Observations
1	FC1	Graisses et cires
2-3	FC2	Produits + chlorophylle
4-6	FC3	Mélange de produits et de chlorophylle
7-8	FC4	Mélange de produits et de chlorophylle
9	FC5	Mélange de produits et de chlorophylle
10	FC6	Graisses
11	FC7	Mélange de produits et de graisses
12-15	FC8	Mélange séparable + chlorophylle
16-17	FC9	Mélange séparable + chlorophylle
18	FC10	Mélange séparable
19	FC11	Mélange séparable
20	FC12	Un produit majoritaire + chlorophylle
21	FC13	Un produit majoritaire + chlorophylle
22-23	FC14	Mélange complexe
24-29	FC15	Mélange complexe
30	FC16	Mélange séparable
31-36	FC17	Mélange séparable
37-50	FC18	Mélange séparable
51-59	FC19	Mélange de produits et de chlorophylle
60-70	FC20	Mélange de produits et de chlorophylle
71-80	FC21	Mélange de produits et de chlorophylle
81	FC22	Mélange de produits et de chlorophylle

Dans la majorité des fractions obtenues, la présence de la chlorophylle était prédominante par rapport aux produits existants c'est la raison pour laquelle la séparation était très délicate et on n'a pas pu aboutir à un nombre important de produits purs.

➤ *Séparation et purification sur couche mince :*

Malgré la présence signalée de la chlorophylle dans la majorité des fractions , nous avons entrepris l'investigation des fractions FC10 à FC17 en prenant le soin de rassembler celles de composition similaire.

Fraction FC11 \equiv FC10+FC11 :

Après regroupement, la fraction résultante a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice avec le système éluant **Nafta / CH₂Cl₂** (2 : 8) pour donner :

- FC111 : Produit pur observable après révélation.
- FC112 : Produit pur majoritaire.
- FC113 : Produit pur en très faible quantité.

Fraction FC13 \equiv FC12+FC13 :

L'ensemble de ces deux fractions a donné un produit majoritaire par une simple recristallisation avec l'acétone, c'est le produit FC131.

Fraction FC17 :

C'est la fraction la moins chargée en chlorophylle et de plus grande masse (136 mg). Cette fraction a subi une séparation sur colonne chromatographique sur support d'alumine (Alumine 90 activé, neutre, 70-230 mesh).

Avant d'être déposée en haut de la colonne ainsi préparée, la fraction FC17, est dissoute dans du méthanol. Quelques grammes de silice 60 sont ajoutés à cette solution. Le mélange est ensuite séché sous vide. La poudre obtenue (FC17+silice) est éluee dans un premier temps par un gradient **Nafta / acétate d'éthyle** puis par un gradient **acétate d'éthyle/méthanol**. Les résultats de cette colonne sont résumés dans le tableau III-17

Tableau III-17 : Les résultats de la séparation par chromatographie sur colonne d'Alumine de la fraction FC17 de *G. ferox* Poirret.

Lots	Système d'élution		
	% Nafta	% ACOEt	% MeOH
1-6	100	0	0
7-12	95	5	0
13-25	90	10	0
26-32	85	15	0
33-39	80	20	0
40-44	70	30	0
45-54	50	50	0
55-62	30	70	0
63-73	0	100	0
74-87	0	95	5
88-94	0	90	10
95-101	0	80	20
102-108	0	70	30
109-115	0	50	50
116-120	0	0	100

Le regroupement des fractions a été effectué de la même façon que précédemment et a donné 13 sous fractions. Seule la fraction FC17 (12) \equiv (95-101) a subi une séparation par chromatographie sur couche mince avec le système d'élution **Nafta/ACOEt** (1 :1) et a permis d'obtenir trois produits purs soient :

- **FC17 (12) 1** : (2mg) absorbe uniquement à 254 nm et devient jaune terne après révélation avec l'ammoniac.
- **FC17 (12) 2** : (2,3 mg) produit pur.
- **FC17 (12) 3** : (10,8 mg) produit pur, fluorescence bleue sous 365nm.

A raison de la complexité de cet extrait, les résultats de la séparation effectuée ne sont qu'à leur début. En effet à l'issue de cette étude seuls cinq produits ont pu être isolés et purifiés de cet extrait chloroforme.

III-2- 6-36 : Séparation et purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle :

Nous avons effectuée une étude chromatographique analytique par CLHP sur cet extrait en utilisant une colonne Nucleosill C18 éluée par un système binaire eau / acétonitrile 70/30 ; v/v (phase inverse) en utilisant un détecteur UV. La meilleure détection a été obtenue pour $\lambda = 340$ nm.

Le chromatogramme obtenu (figure III-8) montre d'une part une composition assez riche de cet extrait et notamment en composé polaire et d'autre part, que ces composés polaires ont une bonne absorbance à la longueur d'onde utilisée. Ces données laisse prévoir une bonne composition de type flavonique.

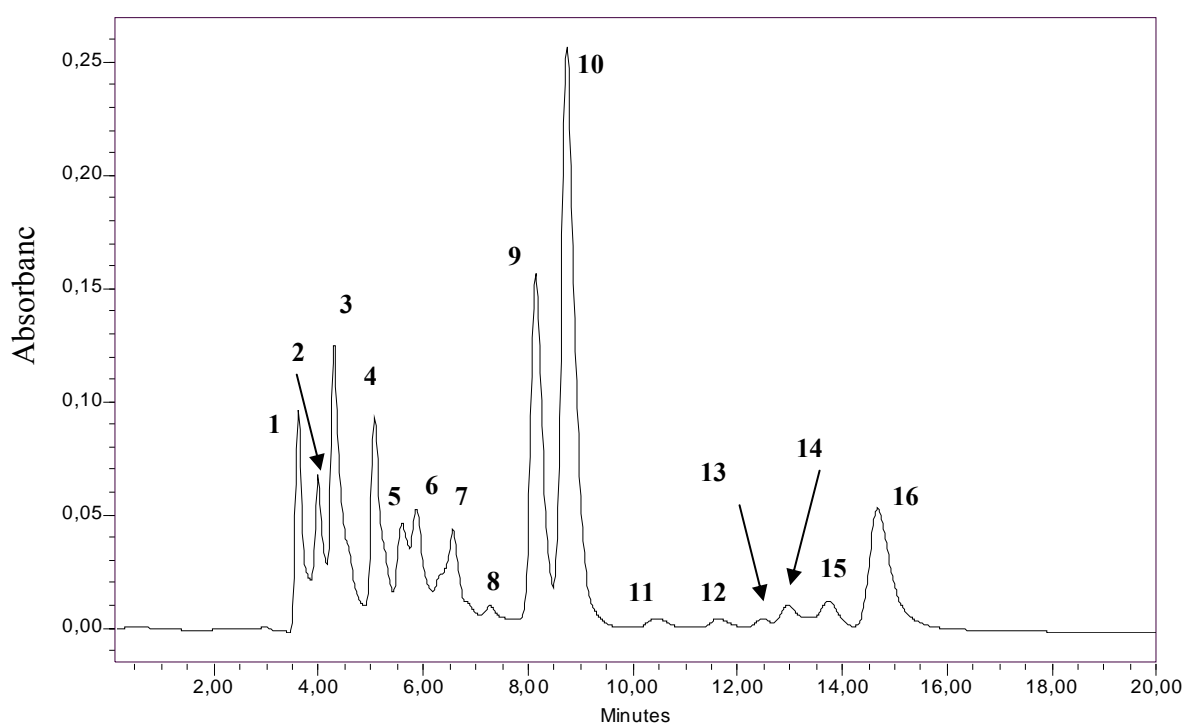


Figure III-8 : Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de *G. ferox* Poirret.

(Conditions chromatographiques : système d'élution Acétonitrile/Eau 70 :30 ;

lampe de détection $\lambda = 340$ nm)

En effet l'enregistrement des spectres UV de quelques pics du chromatogramme notamment les pics : n° 1 ($t_r = 3,57$ mn), n°3 ($t_r = 4,30$ mn), n°9 ($t_r = 8,12$ mn), n°10

($t_r = 8,77$ mn) et n°16 ($t_r = 14,654$ mn) montrent que tous ces produits sont du type flavonique (figure III-9)

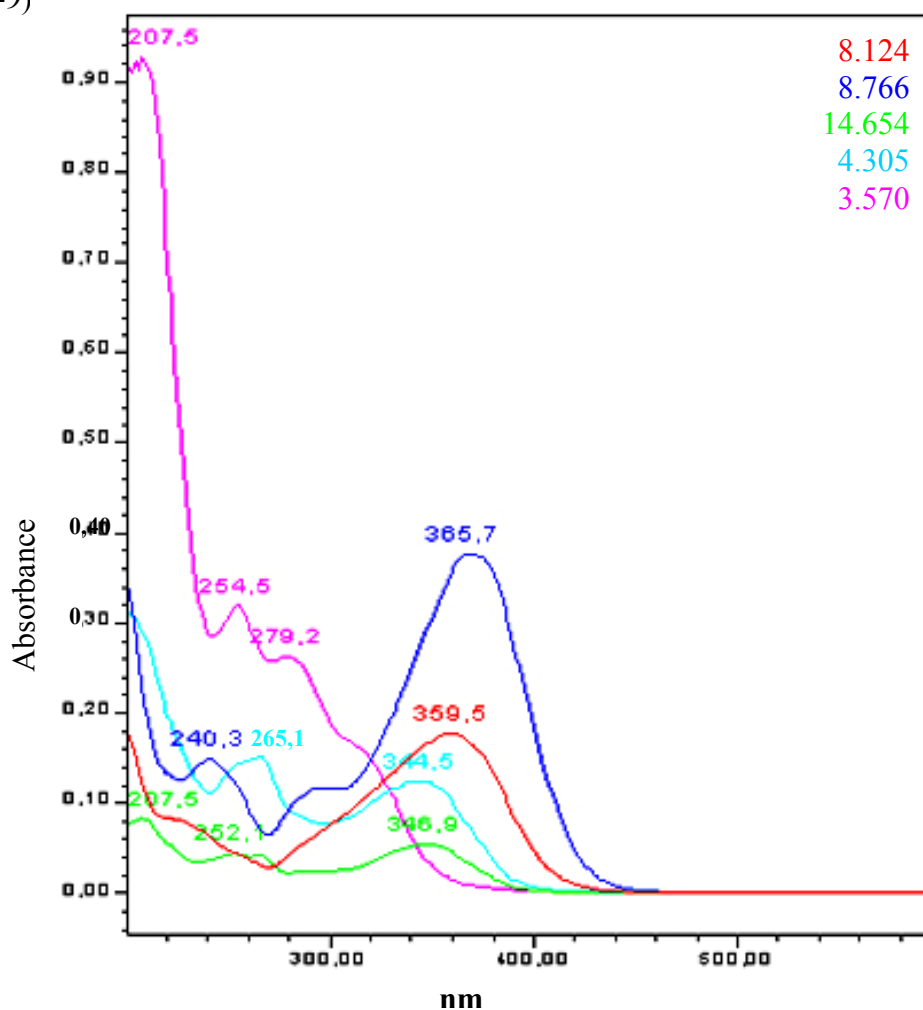


Figure III-9 : Spectres UV de quelques pics du chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de *G. ferox* Poirret.

Ces données nous ont encouragé à entreprendre des séparations par chromatographie sur colonne.

➤ *Séparation sur colonne :*

Plusieurs systèmes de solvants ont été essayés sur cet extrait, seul le système d'élution **Ether de pétrole /AcOEt (1 : 1)** a donné une assez bonne séparation.

Environ 5 g de cet extrait sont déposés sur une colonne de gel de silice (type Merck, 230-400 mesh), préparée dans de l'éther de pétrole. L'élution a été faite en gradient de polarité en introduisant de l'acétate d'éthyle et vers la fin de l'acétone et en fractionnant tous les 25 ml.

Le rassemblement de ces fractions est effectué sur la base des données de la chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), révélées par l'anisaldéhyde puis chauffées à 100 °C pendant 3 min. Le nombre total des fractions était de 22 (voir tableau III-18)

Tableau III-18 : Résultat de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle de *G. ferox* Poirret.

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'élution		
		% Ether de pétrole	% Acétate d'éthyle	% Acétone
1-19	FA1	100	0	/
20-55	FA 2	98	2	/
56-99	FA 3	96,5	3,5	/
100-110	FA 4	96	4	/
111-132	FA 5	95,5	4,5	/
133-140	FA 6	95	5	/
141-158	FA 7	90	10	/
159-174	FA 8	85	15	/
175-178	FA 9	80	20	/
179-182	FA 10	80	20	/
183-188	FA 11	80	20	/
189-193	FA 12	80	20	/
194-203	FA 13	75	25	/
204-212	FA 14	75	25	/
213-224	FA 15	75	25	/
225-231	FA 16	70	30	/
232-234	FA 17	70	30	/
235-240	FA 18	70	30	/
241-244	FA 19	60	40	/
245-259	FA 20	60	40	/
260-277	FA 21	50	50	/
278-290	FA 22	40	60	/
291-308	FA 23	30	70	/
309-326	FA 24	20	80	/
327-361	FA 25	20	75	5
362-385	FA 26	20	65	15
386-397	FA 27	20	60	20
398-402	FA 28	20	45	35
403-404	FA 29	20	45	35
405-412	FA 30	0	60	40
413-420	FA 31	0	0	100

➤ *Séparation sur couche mince :*

Pour des raisons de quantité les fractions FA1 à FA6 n'ont pas été étudiées.

Après de nombreux tests, les fractions FA7, FA8 et FA23 ont subi des séparations chromatographiques sur plaques préparatives de gel de silice de type HF254 avec les systèmes d'élution **CHCl₃ / Acétone** (12:1) et (9 : 1) et **CHCl₃ / MeOH** (15 :1) respectivement. Les fractions FA9, FA12, FA13 et FA15 ont subi une séparation sur plaques préparatives de polyamide (DC6.6) en utilisant comme système d'élution le **Toluène / Ethanol / Méthylethylcétone** (4 :3 :3), alors que la fraction FA27 a été chromatographiée sur papier whatman élué par l'**acide acétique** 15%. Les produits de quantité intéressante ont été purifiés sur colonne de Sephadex LH-20 élué par du méthanol pur.

La fraction FA7 :

La fraction FA7 a été séparée sur plaques préparatives de gel de silice avec le système éluant **CHCl₃ / Acétone** (12:1) pour donner trois produits purs : FA71, FA72 et FA73.

La fraction FA8 :

La séparation a été faite sur plaques préparatives de gel de silice avec le système éluant **CHCl₃ / Acétone** (9:1) pour donner quatre produits purs : FA81, FA82, FA83 et FA84.

Une co-chromatographie des produits issus de ces deux fractions a montré que FA71 est le même que FA81, FA72 est identique à FA82 et FA73 est identique à FA83, ce qui donne 4 produits purs qui sont : FA84, FA83 \equiv FA73, FA82 \equiv FA72 et FA81 \equiv FA71.

La fraction FA9 :

La séparation de cette fraction n'a pas été possible sur gel de silice malgré l'essai de nombreux types de système d'élution, aussi nous avons eu recours à l'utilisation de polyamide comme phase stationnaire déposée sur plaques préparatives et éluées par le système organique **Toluène / Ethanol / Méthylethylcétone** (4 :3 :3). Cette opération a menée à deux produits : FA91 et FA92. Le produit FA91 est pur et est identique à FA84, par contre le produit FA92 contient toujours le FA91.

La fraction FA12 :

Dans ce cas également, la séparation a été réalisée sur plaques préparatives de polyamide éluées par le système organique : **Toluène / Ethanol / Méthylethylcétone** (4 :3 :3) donnant ainsi deux produits purs : FA121 et FA122.

La fraction FA13 :

Pour les mêmes raisons que précédemment, nous avons utilisé des plaques préparatives de polyamide et le système organique **Toluène / Ethanol / Méthylethylcétone** (4 :3 :3), trois produits purs ont été obtenus : FA131, FA132 et FA133.

Une co-chromatographie a montré que FA131 est identique à FA122.

La fraction FA15 :

De la même manière et en utilisant toujours le système **Toluène / Ethanol / Méthylethylcétone** (4 :3 :3) sur plaques préparatives de polyamide, nous avons pu obtenir quatre produits : FA151, FA152, FA153 et FA154 dont la purification était délicate à cause de leur faible quantité.

La fraction FA23 :

Cette fraction a subi une séparation par chromatographie préparative sur gel de silice avec le système **CHCl₃ / MeOH** (15 :1) et trois éluions successives pour obtenir le produit FA232 majoritaire et à l'état pur à côté de FA234 et FA236 en très faible quantité.

La fraction FA27 :

La séparation de cette fraction a été effectuée sur du papier whatman III en utilisant comme système d'éluion l'**acide acétique** 15% pour aboutir à trois produits purs : FA271, FA272, et FA273 à l'état de traces.

En conclusion, nous pouvons dire que l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *G. ferox* Poirret est très riche en métabolites secondaires ce qui rend la séparation délicate. Les produits purs obtenus se trouvent en très faible quantité à l'exception du composé FA91 ≡ FA83 ≡ FA72 dont la quantité est remarquable.

III-2- 6-3c : Séparation et purification des composants de l'extrait *n*-butanol :

De même que l'extrait acétate d'éthyle, une étude chromatographique analytique par CLHP a été effectuée sur l'extrait *n*-butanol en utilisant toujours une colonne Nucleosill C18 éluee par le même système binaire eau / acétonitrile 70 :30, v/v (phase inverse) et en utilisant un détecteur UV après avoir fixé la longueur d'onde à 340 nm.

Le chromatogramme obtenu (voir figure III-10) montre une composition assez riche de cet extrait en composés polaires qui paraissent avoir une bonne absorbance à 340 nm.

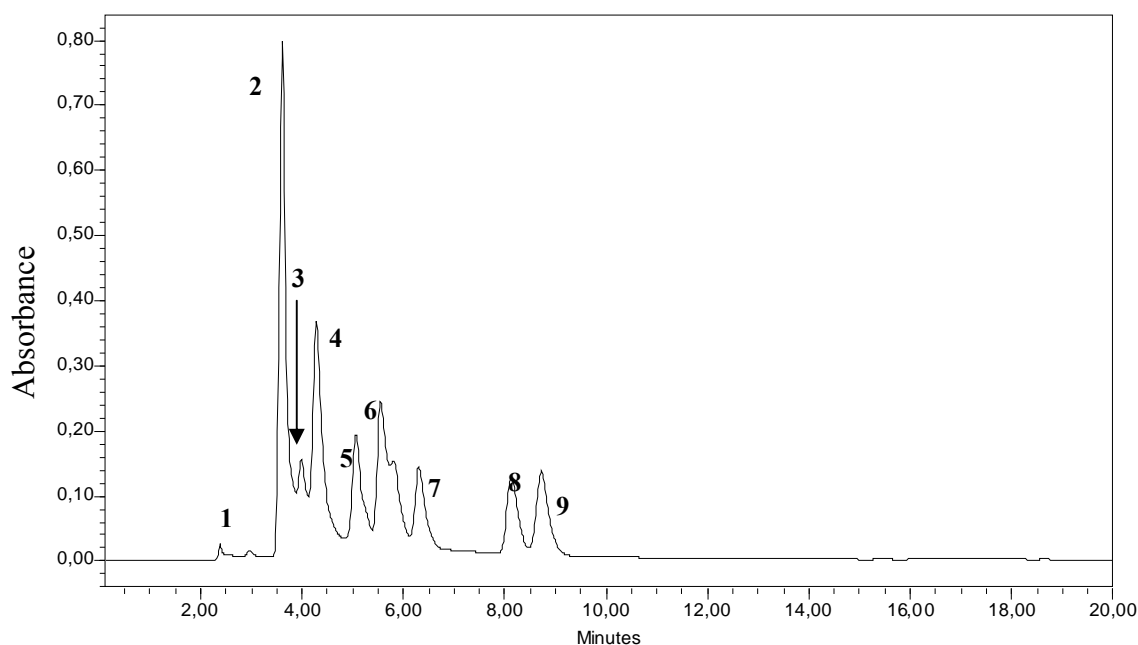


Figure III-10 : Chromatogramme de l'extrait *n*-butanol de *G. ferox* Poirret.

(Conditions chromatographiques : système d'élution Acétonitrile/Eau 70 :30 ;
lampe de détection $\lambda = 340$ nm)

Ces constatations indiquent la présence des composés polaires de type flavonique.

L'enregistrement des spectres UV des pics n°2 ($t_r = 3,53$ mn), n°4 ($t_r = 4,31$ mn), n°5 ($t_r = 5,04$ mn), n°6 ($t_r = 5,60$ mn) et n°9 ($t_r = 8,77$ mn) du chromatogramme montre que tous ces produits sont du type flavonique (figure III-11). Ces données nous ont encouragé à entreprendre des séparations par chromatographie sur colonne.

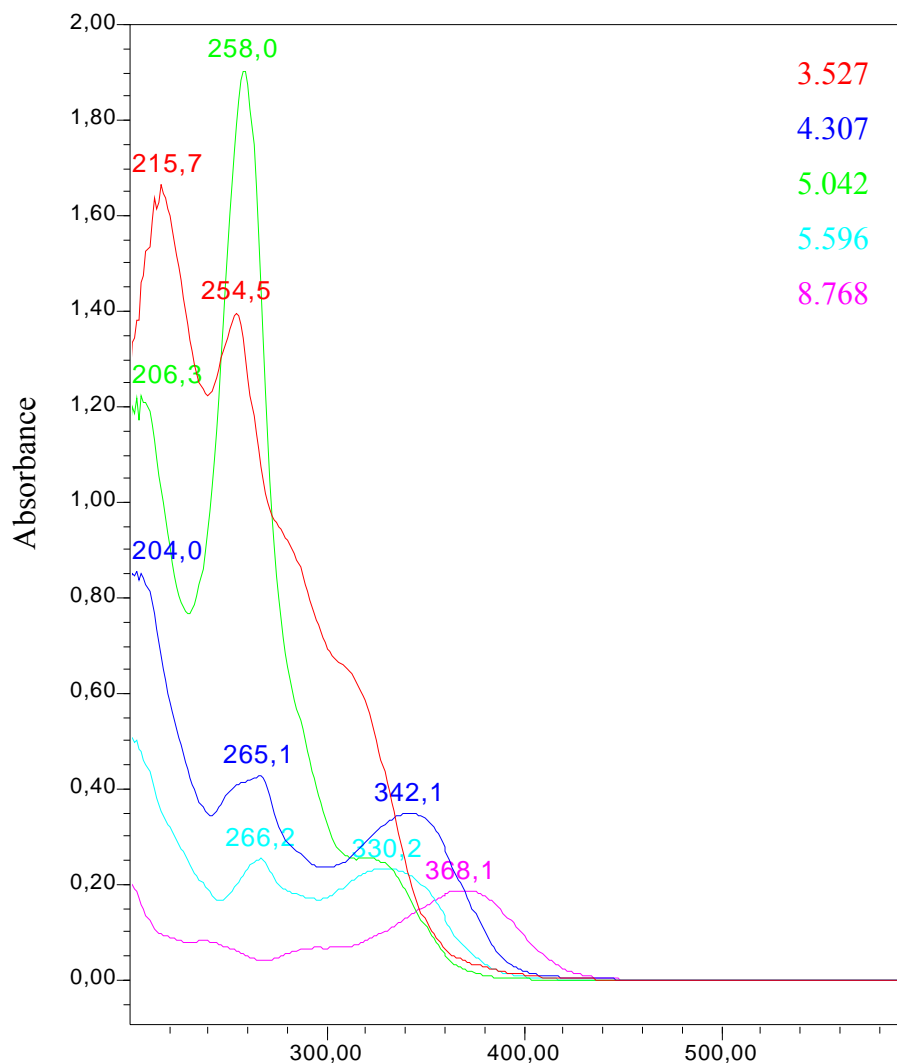


Figure III-11 : Spectres UV de quelques pics du chromatogramme de l'extrait *n*-butanol de *G. ferox* Poirret.

➤ *Séparation sur colonne :*

Environ 14 g de l'extrait *n*-butanol sont déposés sur une colonne de gel de silice (type Merck, 230-400 mesh), préparé dans le mélange **Hexane / ACOEt** (4 : 1). L'élution est réalisée par un gradient de polarité du type **Hexane / ACOEt / MeOH / Eau** en commençant par de l'**Hexane / ACOEt** (4 :1) et se terminant par **MeOH / Eau** (5 :5). Le fractionnement a été fait tous les 50 ml. Le suivi des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), révélées par l'anisaldéhyde puis chauffées à 100 °C pendant 3 min. Le rassemblement des pots effectué sur la base des données analytique des plaques a permis l'obtention de 19 fractions. Le tableau III-19 regroupe la progression de cette colonne.

Tableau III-19 : Résultat de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol de *G. ferox* Poirret.

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'éluion				Observations
		Hexane	Acétate d'éthyle	MeOH	H ₂ O	
1-6	FB1	20	80	/	/	/
7-8	/					
9-10	FB2	15	80	5	/	Mélange complexe
11-12	/					
13	FB3	10	80	10	/	Produit majoritaire
14-16	FB4	10	80	10	/	Mélange complexe
17-23	FB5	10	80	10	/	Mélange séparable
24-30	FB6	10	80	10	/	Mélange séparable
31-39	FB7	15	70	15	/	Mélange séparable
40-46	FB8	15	65	20	/	Mélange complexe
47-52	FB9	5	70	25	/	Mélange séparable
53-61	FB10	5	70	25	/	Mélange complexe
62-74	FB11	5	60	35	/	Mélange séparable
75-85	FB12	/	50	50	/	Mélange séparable
86-92	FB13	/	45	50	5	Mélange complexe
93-99	FB14	/	35	50	15	Mélange complexe
100-103	FB15	/	/	50	50	Mélange complexe

Il est à remarquer que la fraction FB3 est composée d'un seul produit pur et abondant.

➤ *Séparation par chromatographie sur couche mince :*

Fraction FB3 :

L'examen par chromatographie sur couche mince du produit majoritaire constituant la fraction FB3 montre qu'il est identique à FA232 isolé déjà la phase acétate d'éthyle.

Fraction FB5 :

Cette fraction a été purifiée sur plaques préparatives de gel de silice éluées par le système **CHCl₃ / MeOH** (1 :2) pour donner le composé FB5 à l'état pur.

➤ *Séparation sur papier Whatman et sur plaques préparatives de polyamide :*

La recherche des conditions optimales de séparation des fractions FB6, FB8 et FB11 nous a orienté vers l'utilisation du papier Whatman III et les systèmes **butanol /acide acétique / eau** (BAW), (4 :1 :5) et **acide acétique** (15%). Ce dernier semble être le plus adéquat. Cette séparation a été suivie par des purifications sur plaques préparatives de polyamide DC6.6 éluées par les systèmes **Eau / MeOH / Methylethylcétone / Acétylacétone** (13 :3 :3 :1) et **MeOH / Acide acétique / Eau** (18 :1 :1).

Le cheminement des opérations est décrit ci-dessous.

Fraction FB6 :

Cette fraction a subi une première séparation sur papier Whatman III dans le système **acide acétique** 15% donnant cinq bandes.

- **La bande 1 :** a subi une séparation sur plaques préparatives de polyamide éluées par le système **Eau / MeOH / Methylethylcétone / Acétylacétone** (13 :3 :3 :1) donnant trois produits FB61a, FB61b et FB61c à l'état pur.

- **La bande 2 :** a subi une séparation sur plaques préparatives de polyamide éluées par le système **MeOH / Acide acétique / Eau** (18 :1 :1) donnant deux Produits purs FB62a et FB62b.

- **La bande 3 :** dans ce cas également, une séparation a été réalisée sur plaques préparatives de polyamide éluées par le système **MeOH / Acide acétique / Eau** (18 :1 :1) donnant deux produits purs FB63a et FB63b.

- **La bande 4 :** de même que précédemment, la bande 4 donne quatre produits purs à savoir FB64a, FB64b, FB64c et FB64d.

Fraction FB8 :

De même que la fraction FB6, cette fraction a subi une première séparation sur papier Whatman III dans le système acide acétique 15% donnant FB81, FB82 et FB83 à l'état pur, alors que FB84, FB86 et FB87 se trouvent sous forme de mélange séparable. Ces dernières fractions ont subi une séparation sur plaques préparatives de polyamide éluées par le système **MeOH / Acide acétique / Eau** (18 :1 :1) donnant ainsi FB84a et FB84b pour la fraction FB84, FB86a et FB86b pour la fraction FB86 et enfin, FB87a, FB87b pour la fraction FB87.

Fraction FB11 :

Dans ce cas également, une première séparation sur papier Whatman III a été réalisée par le système acide acétique 15% pour donner sept bandes (FB111 - FB117). Seules les bandes FB112, FB113 et FB115 ont subi des séparations sur plaques préparatives de polyamide éluées par le système **MeOH / Acide acétique / Eau** (18 :1 :1) donnant FB112a, FB112b, FB113a et FB113b sous forme de produits purs. La bande FB115 a permis d'obtenir FB115a, FB115b et FB115c pas très purs.

Une co-chromatographie des produits purs issus de la fraction FB11 a conduit à FB112a, FB112b \equiv FB113a, FB113b.

Les produits identiques ont été regroupés selon leur R_f sur papier Whatman (acide acétique 15%) et sur plaques préparatives de polyamide (MeOH / Acide acétique / Eau ; 18 :1 :1) pour arriver à treize produits purs.

En résumé, d'après nos résultats, nous pouvons dire que l'espèce *G. ferox* est assez riche en métabolites secondaires. Son étude phytochimique a permis l'obtention de dix produits purs de la composante semi-polaire et treize produits purs de la composante polaire.

Références bibliographiques

- [1] **Bourquin, D., Brenneisen, R. and Wicky, K. (1987),**
Alkaloids of *Spartidium saharae* Coss. et Dur.(Fabaceae). *Pharm. Acta Helv.* 62,.
pp. 297-301.
- [2] **Osama B. Abdel-Halim, Hosny A. Abdel-Fattah, Fathi T. Halaweish and Ahmed F. Halim (2000),**
Isoflavonoids and Alkaloids from *Spartidium saharae*. *Natural Product Sciences*; 6(4) :
pp. 189-192.
- [3] **Quezel, P. and Santa, S. (1963),**
Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1 C.N.R.S.
Paris.
- [4] **Faugeras, G. and René, R. (1966),**
The alkaloids content of some *Genista* species and other legumes. *Klasse fuer Chemie, Geologie und Biologie.* (3), 235-236.

CHAPITRE IV
RESULTATS ET DISCUSSIONS

Appareillage utilisé pour la détermination structurale des produits isolés

- ❖ Les spectres UV-Visible sont réalisés sur un appareil **Spectrophotometer SCHIMADZU** (190-3200 nm, UV-3101PC, UV-Vis-Nir scanning).
- ❖ Les spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C et ses séquences DEPT (90 et 135) sont réalisés sur des appareils **BRUKER**, de fréquences 200, 250, 300, et 400 MHz.
- ❖ Le spectre de masse (SMIE) sur un appareil spectromètre quadripolaire R200C, (P2A)MSCAN : Wallise R Computer.
- ❖ Le spectre de masse VG. Autospect Magnetic sector EI^+ (70 eV)

IV-1-IDENTIFICATION DES PRODUITS ISOLÉS DE *G. SAHARÆ COSS. & DUR.*

IV-1-1 : Le composé SC53 :

Interprétation :

L'examen du spectre RMN ^1H (spectres n° IV-1, IV-1bis) montre :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 8,10$ ppm attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,38$ ppm ($J = 2,2$ Hz) attribuable à H-8, le second à $\delta = 6,25$ ppm ($J = 2,2$ Hz) attribuable à H-6 indiquant ainsi la substitution des positions 5 et 7.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun, à $\delta = 6,85$ ppm, et à $\delta = 7,40$ ppm, ($J = 8,8$ Hz), attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement indiquant ainsi une oxygénation du cycle B en position 4'. L'absence d'autres signaux sur le spectre RMN ^1H laisse supposer la présence d'un OH libre en position 4'. Les données relatives à la RMN ^1H sont reportées dans le tableau IV-1.

Tableau IV-1 : Données de la spectroscopie RMN ^1H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	multiplicité J (Hz)	Attribution
8,10	1H	s	H-2
7,40	2H	d (8,8)	H-2' ; H-6'
6,85	2H	d (8,8)	H-3' ; H-5'
6,38	1H	d (2,2)	H-8
6,25	1H	d (2,2)	H-6

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

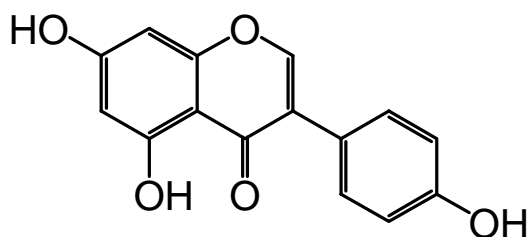
- La bande I sous forme d'un épaulement à environ 324 nm et la bande II à 261 nm ainsi que la fluorescence Orange sous lumière de Wood confirment le squelette de type isoflavone.

- Le déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc ($\Delta\lambda = +8$ nm) comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en position 7.
- Le déplacement bathochrome de la bande II enregistré après addition de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un OH libre en 5 ($\Delta\lambda = +12$ nm)..
- La stabilité du spectre enregistré après addition de NaOH avec le temps comparativement à celui enregistré dans le MeOH laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Tableau IV-2 : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaire
MeOH	324 Ep.	261	/	Isoflavone
+ NaOH	321 Ep.	274	/	/
+ NaOH + 5 mn	321 Ep.	274	/	/
+ AlCl_3	373	273	305	/
+ AlCl_3/HCl	373	273	305	OH libre en 5
+ NaOAc	328 Ep.	269	/	OH libre en 7
+ NaOAc/ H_3BO_3	322 Ep.	261	/	/

Les données de la RMN ^1H est celles de la série spectrale UV permettent de proposer la structure suivante :



Le spectre de masse en mode d'ionisation impact électronique (spectre n° IV-3) montre un pic moléculaire à $m/z = 270 [M]^+$. Confirmant le squelette d'un flavonoïde de type aglycone de formule brute $C_{15}H_{10}O_5$.

Ce spectre montre également un signal à $m/z = 242$ correspondant au réarrangement caractéristique des flavonoïdes, soit la perte d'un CO $[M-28]^+$ et un signal à $m/z = 153$ correspondant à la formation de l'ion $[A_1+H]^+$, connu pour ce type de composé. La valeur 153 confirme bien un cycle A dihydroxylé.

Le spectre RMN ^{13}C (spectre n° IV-4) confirme les données des analyses précédentes par les signaux à $\delta = 164,5$ ppm (C-7), $\delta = 123,3$ ppm (C-3), $\delta = 129,9$ ppm (C-2' ; C-6'), $\delta = 114,8$ ppm (C-3' ; C-5') et $\delta = 98,7$ ppm (C-6) etc.

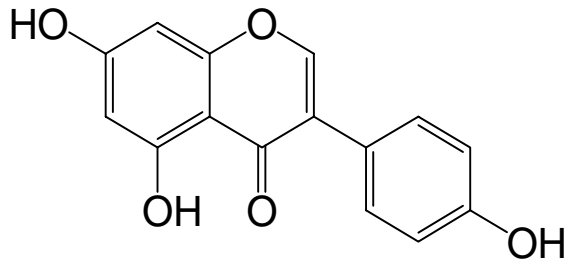
Ces données complétées par celles de la littérature [1] sont reportées dans le tableau IV-3.

Tableau IV-3 : Données de la spectroscopie RMN ^{13}C

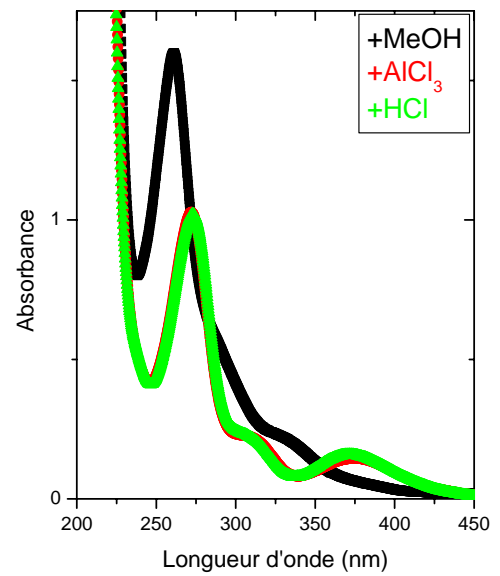
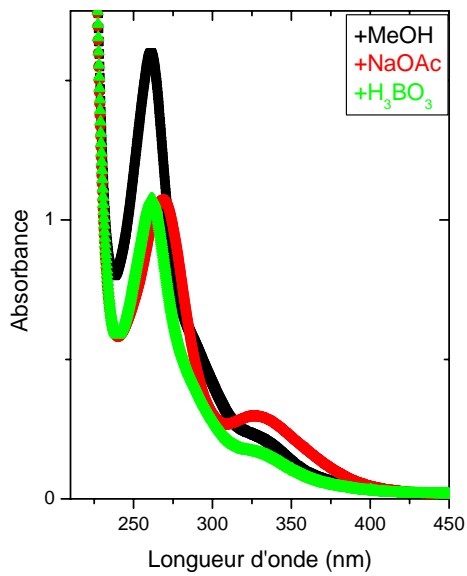
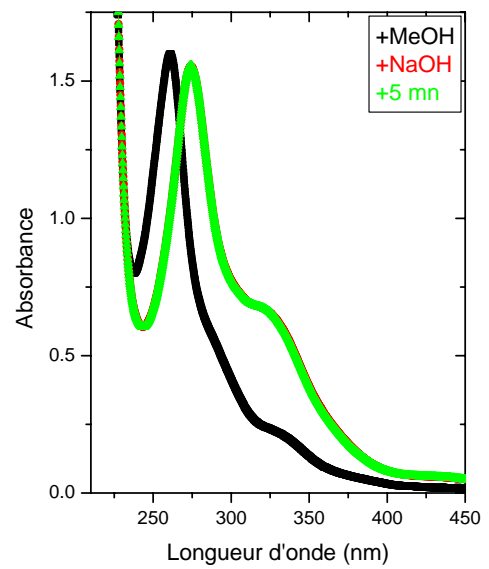
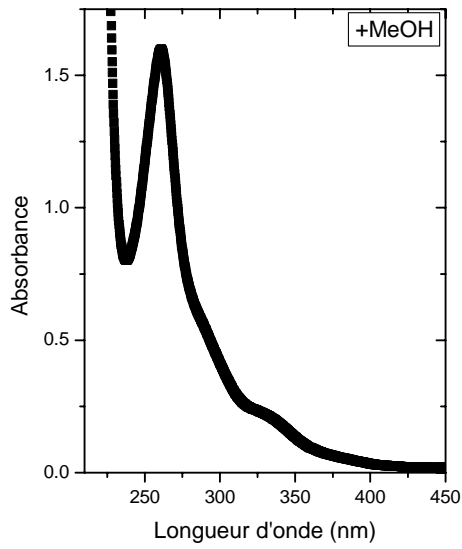
Déplacement chimique δ (ppm)	Attribution
153,8	C-2
123,5	C-3
162,0	C-5
98,7	C-6
164,5	C-7
93,6	C-8
157,4	C-9
104,4	C-10
121,8	C-1'
129,9	C-2' ; C-6'
114,8	C-3' ; C-5'
158,9	C-4'

L'ensemble de ces données est en faveur de la structure du composé qui est le :

4', 5, 7-trihydroxyisoflavone connue sous le nom de la **Génistéine**.

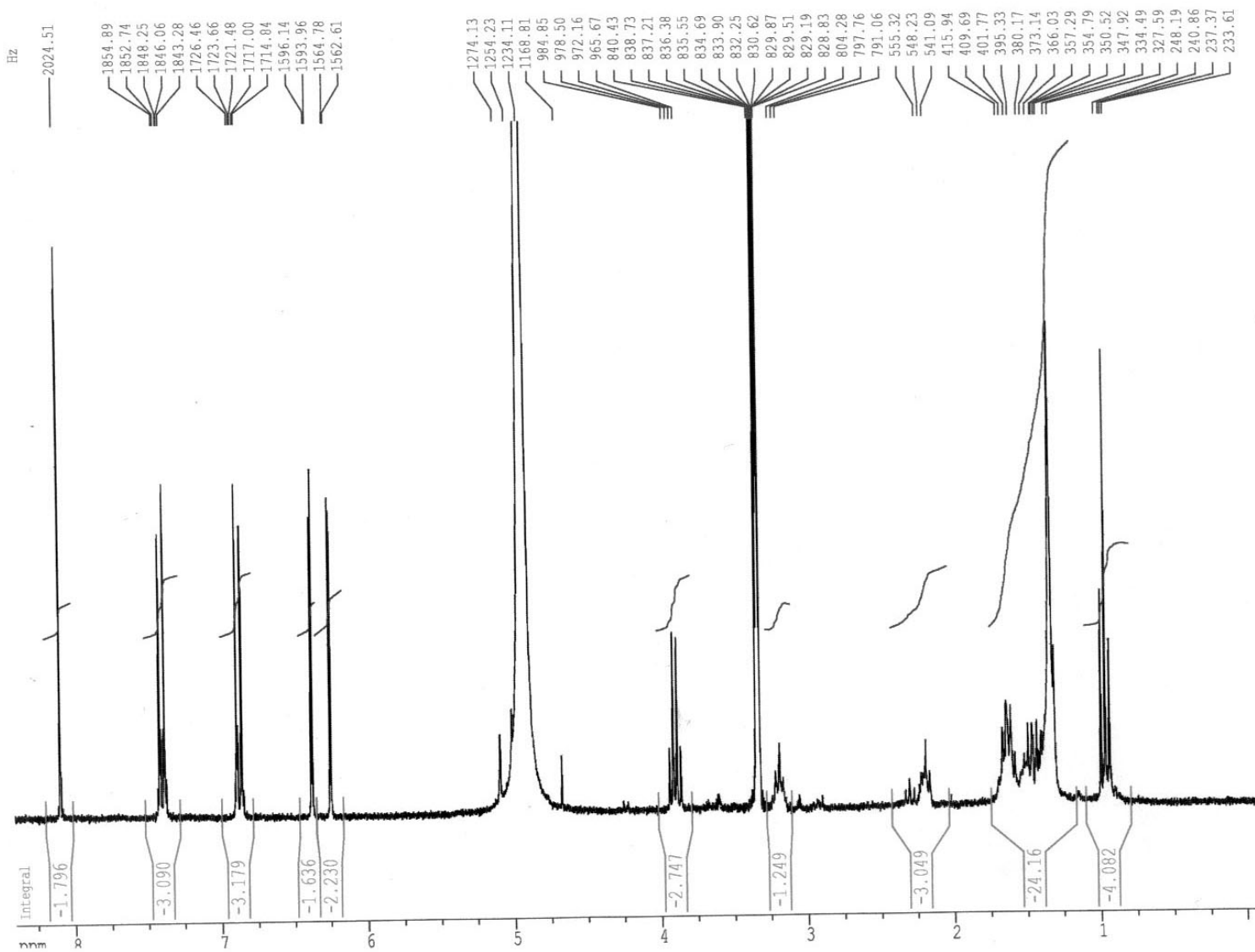


4', 5, 7-trihydroxyisoflavone
Génistéine.

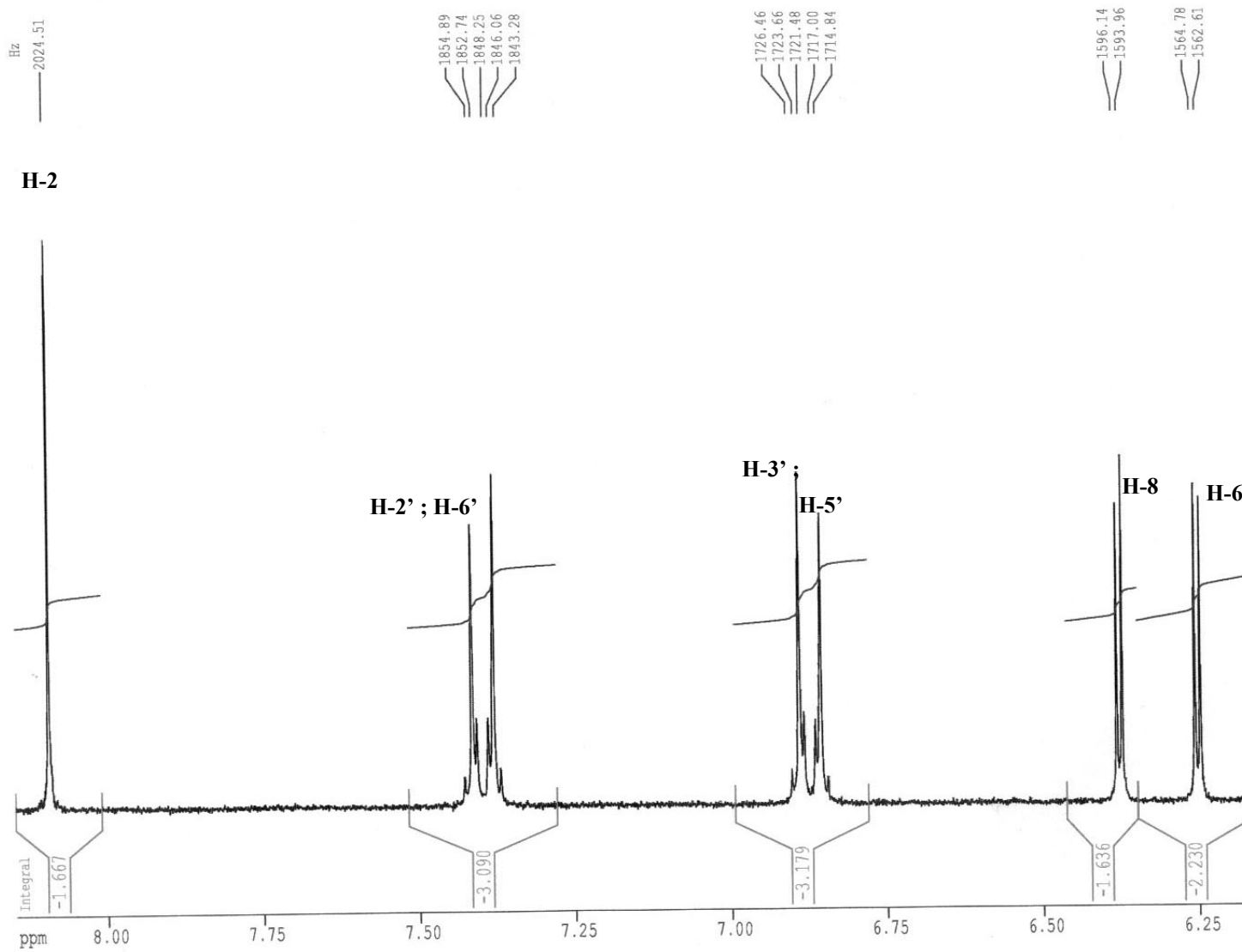


Spectre N°IV-2 : Série spectrale UV du composé SC53

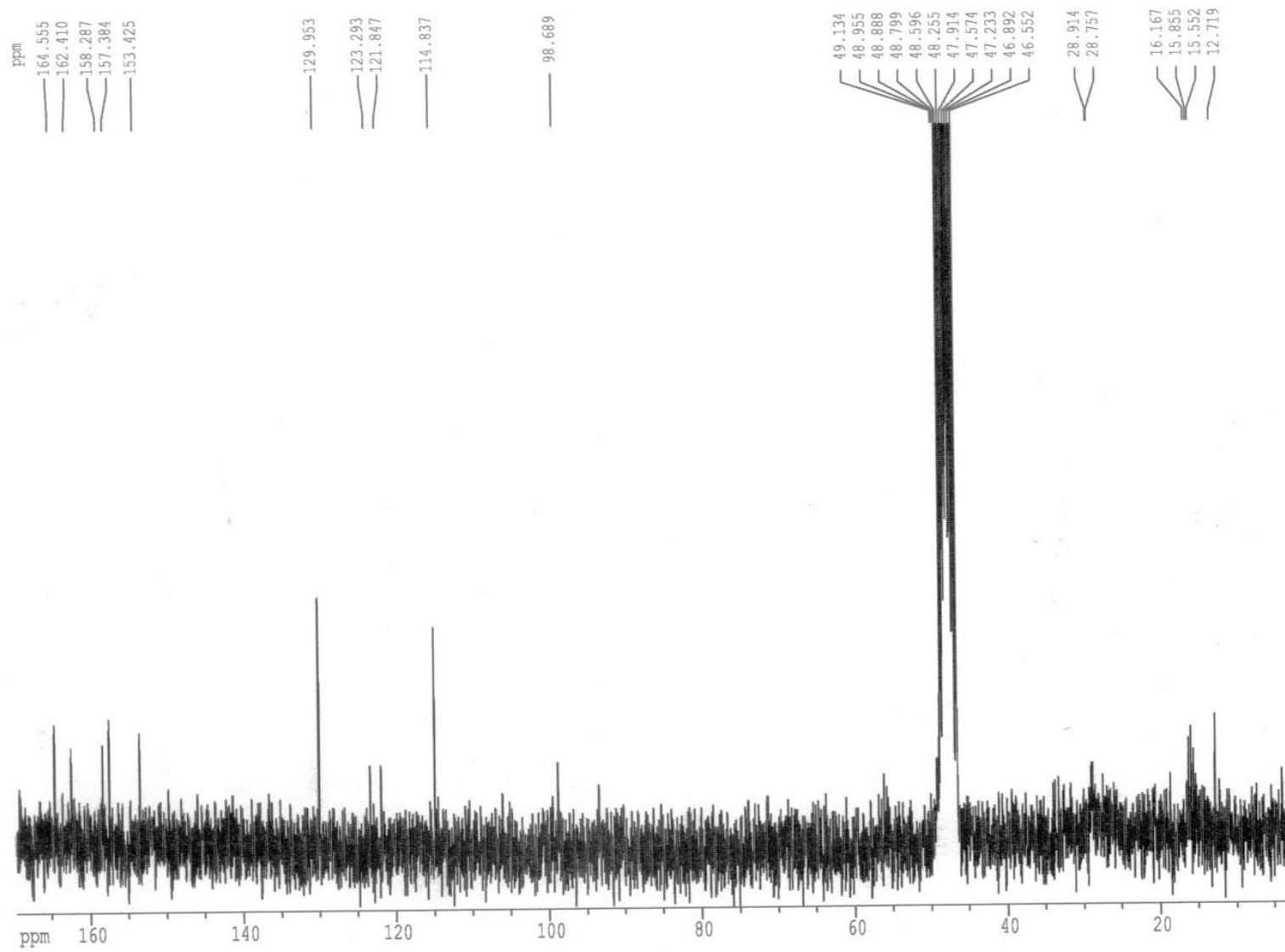
**Spectre n° IV-1 : RMN ¹H (250 MHz, CD₃OD)
du composé SC53**



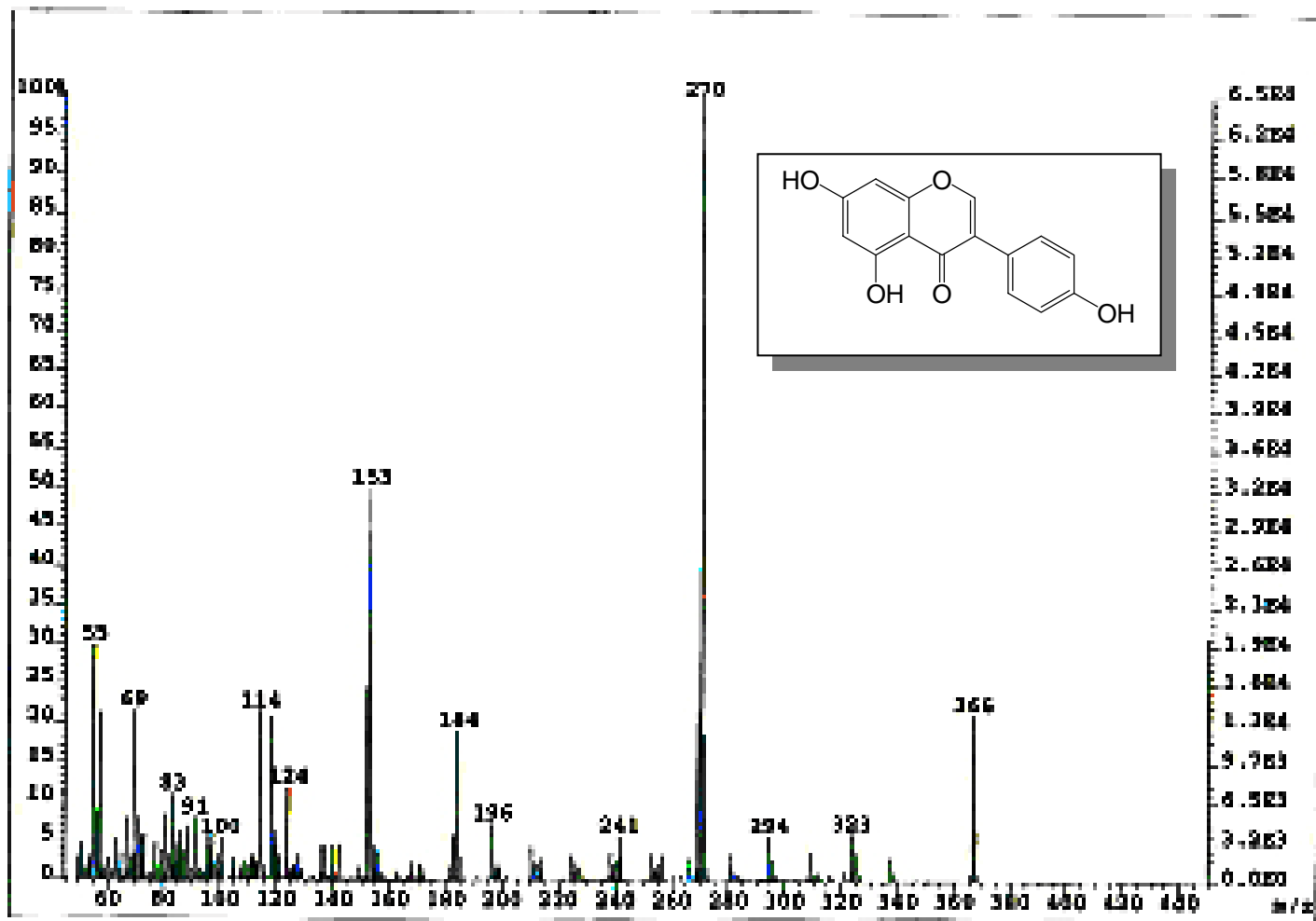
**Spectre n° IV-1bis : RMN ¹H étalé (6.2 à 8.1 ppm)
du composé SC53**



**Spectre n° IV-4 : RMN ^{13}C (63 MHz, CD_3OD)
du composé SC53**



Spectre n° IV-3 : Spectre SMIE du composé SC53



IV-1-2 : Le composé SC71:

Interprétation :

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV-5) montre la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone qu'on peut identifier par :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,59$ ppm attribuable à H-3,
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,48$ ppm, le second à $\delta = 6,21$ ppm avec une constante de couplage $J = 1,9$ Hz (couplage méta) attribuables à H-8 et H-6 respectivement, indiquant ainsi une substitution des carbones 5 et 7. Concernant la position 5, le signal d'intégration 1H à $\delta = 12,93$ ppm attribuable à un OH formant une chélation avec le carbonyle montre que cette position est hydroxylée.
- Un doublet dédoublé ($J = 8,6$ Hz ; $J = 2,1$ Hz), indicateur d'un couplage méta et d'un couplage ortho à $\delta = 7,81$ ppm attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H ($J = 2,1$ Hz), indicateur d'un couplage méta à $\delta = 7,76$ ppm attribuable à H-2'.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,88$ ppm ($J = 8,6$ Hz), indicateur d'un couplage ortho attribuable à H-5'.

La présence de ces trois derniers signaux est en faveur d'un cycle B substitué en positions 3' et 4'.

- Deux doublets à $\delta = 6,53$ ppm ($J = 9,9$ Hz), et à $\delta = 5,87$ ppm ($J = 9,9$ Hz), caractéristiques d'un cycle pyranique disubstitué en position 6''. Ces deux substituants sont en fait deux groupements méthyles dont le signal apparaît sous forme d'un singulet d'intégration 6H à $\delta = 1,45$ ppm.

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

Tableau IV-4 : Données de la spectroscopie RMN ¹H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
12.93	1H	s	5-OH
7.81	2H	dd (8,6 – 2,1)	H-6'
7,78	1H	d (2,1)	H-2'
6.88	1H	d (8,6)	H-5'
6.59	1H	s	H-3
6.53	1H	d (9,9)	H-4''
6,48	1H	d (1,9)	H-8
6.21	1H	d (1,9)	H-6
5.85	1H	d (9,9)	H-5''
1.45	6H	s	CH ₃ -6''

Cette structure flavonique est confirmée d'une part par une fluorescence violette sous lumière de Wood et d'autre part par l'étude de la série spectrale UV, (spectre n° IV-6), de laquelle on peut tirer les indications suivantes :

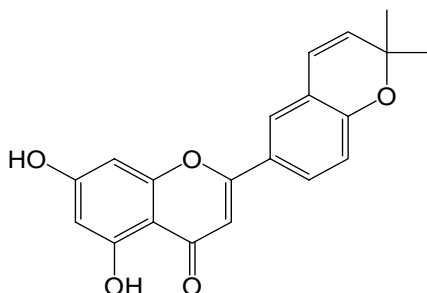
- Le spectre enregistré dans le méthanol montre deux bandes d'absorption, une bande II à 268 nm et une bande I à 345 nm confirmant la structure d'une flavone.
- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +26$ nm) avec une faible augmentation de l'intensité optique ce qui suppose l'absence d'un OH libre en 4'. L'apparition d'une nouvelle bande dans ce même spectre à 314 nm révèle la présence d'un OH libre en position 7.
- Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +21$) enregistré après addition de AlCl₃ comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un –OH libre en 5.
- Pas de déplacement hypsochrome de la bande I en comparant les spectres AlCl₃ + HCl et AlCl₃, ce qui prévoit l'absence de système orthodihydroxyle sur le noyau B.

Les données relatives à la série spectrale UV du composé SC71 sont rassemblées dans le tableau IV- 5.

Tableau IV-5 : Données de la série spectrale UV.

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	345	/	268	Flavone
+ NaOH	371	314	265	Pas de OH libre en 4' OH libre en 7
+AlCl ₃	366	/	267	OH libre en 5 Pas de ortho di-OH sur le cycle B
+AlCl ₃ /HCl	360	389	275	
+NaOAc	363	316	267	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	348	/	269	/
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

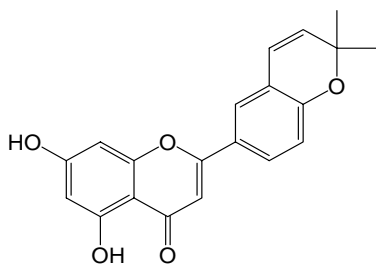
La combinaison des résultats de la spectroscopie RMN ¹H et la série spectrale UV mènent à la structure suivante



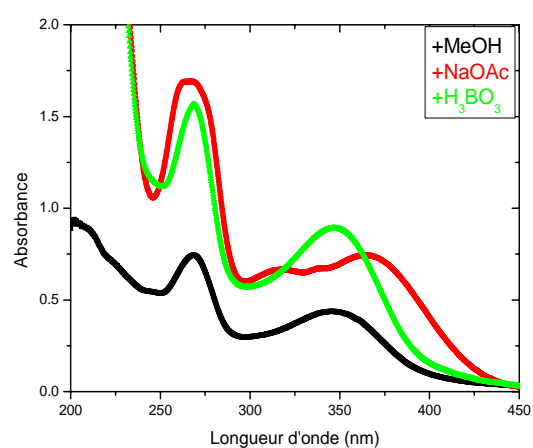
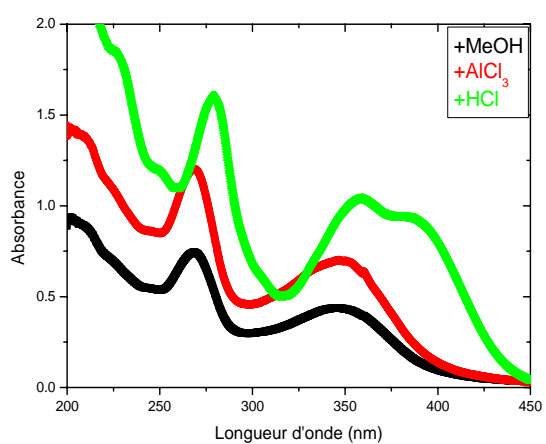
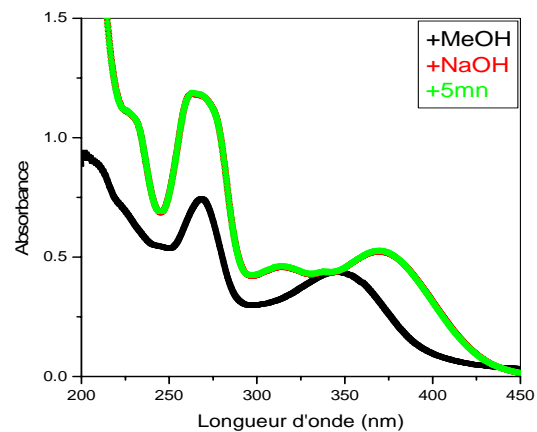
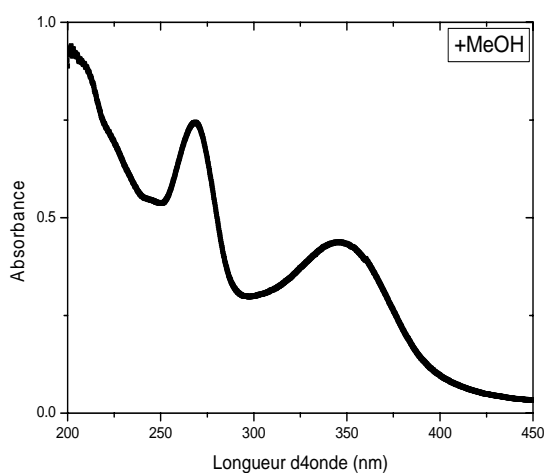
Cette structure est confirmée par l'étude du spectre de masse (spectre n° IV-7) sous impact électronique (SMIE) qui montre une masse exacte à 336,0977 correspondant à la formule brute C₂₀H₁₆O₅ dont la valeur calculée est de 336,0998. Ce spectre montre par ailleurs un pic de base à $m/z = 321$ correspondant à la perte d'un groupement méthyle (-CH₃), le fait que ce groupement correspond au pic de base consolide l'hypothèse de la présence de deux méthyles en position allylique dans la structure proposée. Le pic à $m/z = 152,9835$ [A+H]⁺ conforte bien le fait que le noyau A soit dihydroxylé.

L'ensemble de ces résultats mène à la structure dont le nom est :

5,7-dihydroxy-6'', 6''-diméthylpyrano[2'', 3'' : 4', 3']flavone, à notre meilleure connaissance, cette molécule n'a été isolée que de *Vancouveria hexandria* [1], et donc elle est nouvelle pour le genre.

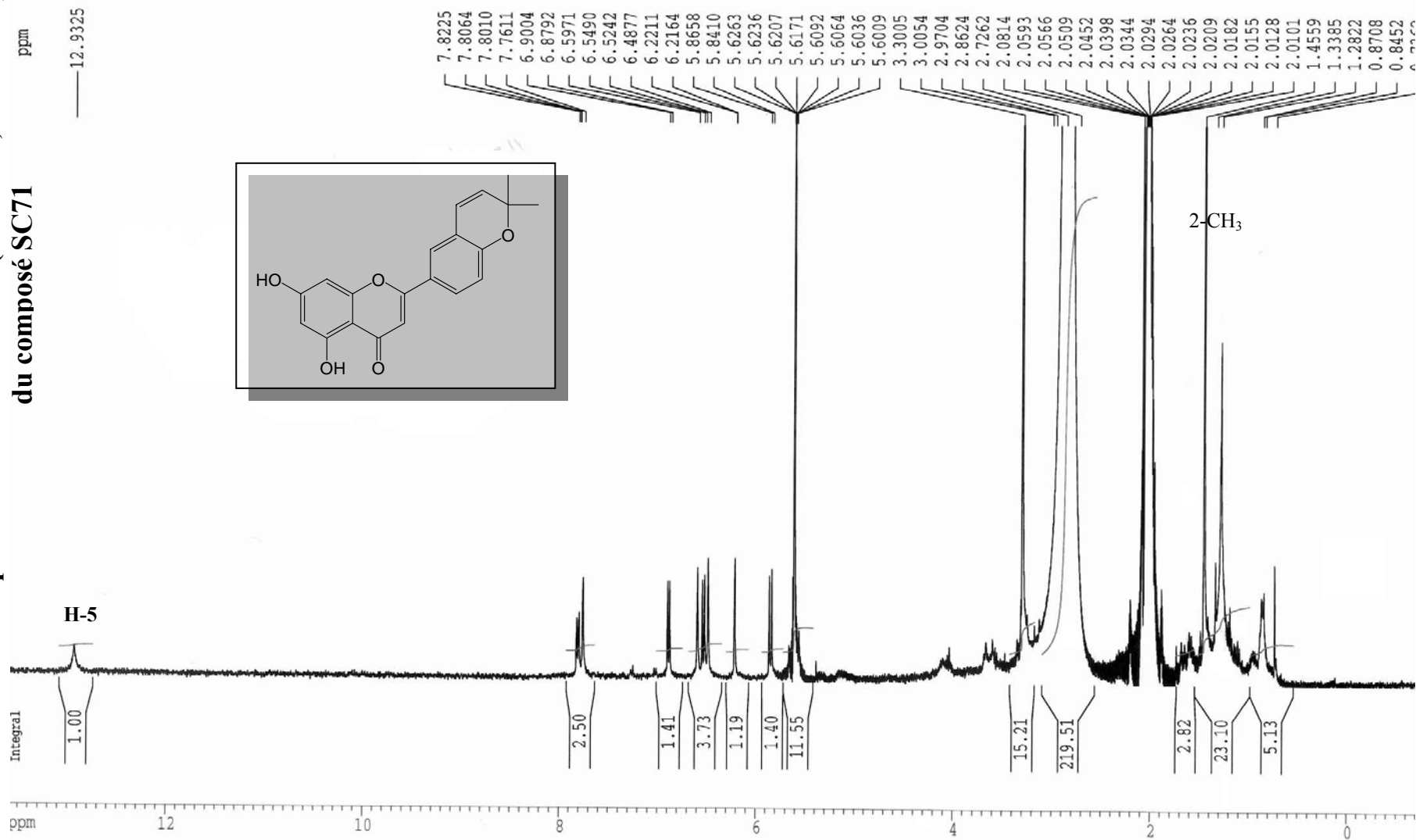


5,7-dihydroxy-6'', 6''-diméthylpyrano [2'', 3'':4', 3']flavone

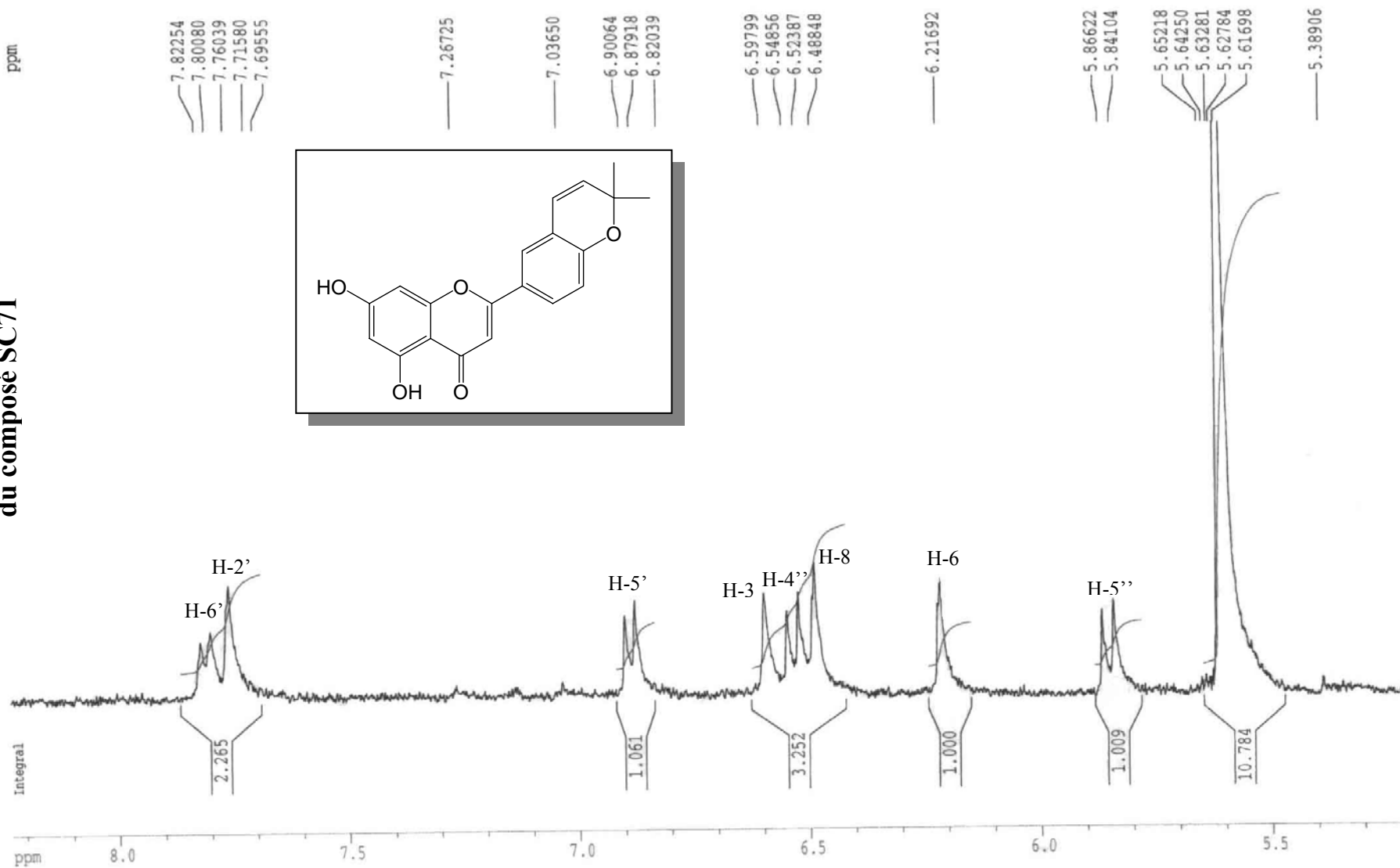


Spectre N°IV-6 : Série spectrale UV du composé SC71

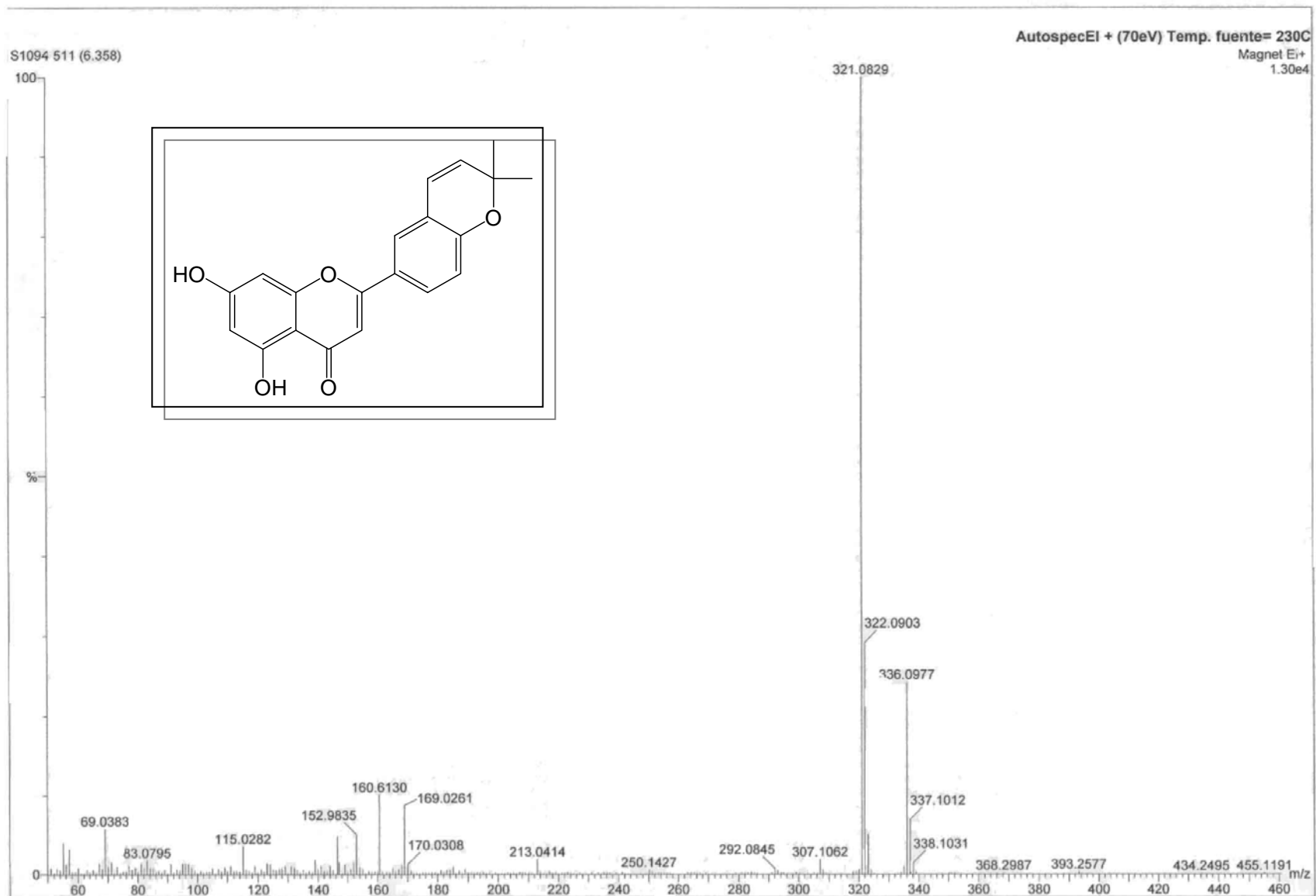
**Spectre n° IV-5 : RMN ¹H (400 MHz, acétone d6)
du composé SC71**



**Spectre n° IV-5bis : RMN ¹H étalé (5.5-8 ppm)
du composé SC71**



**Spectre n° IV-7 : Spectre de MSIE
du composé SC71**



IV-1-3 : Le composé SC82 :

Interprétation :

L'étude du spectre RMN ^1H (spectre n° IV-8, IV-8 bis) montre la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone reconnaissable par :

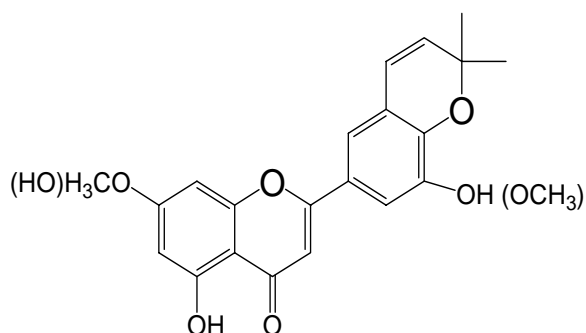
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,72$ ppm attribuable à H-3,
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,56$ ppm, le second à $\delta = 6,24$ ppm de même constante de couplage $J = 1,8$ Hz (couplage méta) attribuables à H-8 et H-6 respectivement indiquant ainsi une substitution des carbones 5 et 7. Concernant la position 5, le signal d'intégration 1H à $\delta = 12,95$ ppm attribuable à un OH formant une chélation avec un carbonyle, montre qu'elle est hydroxylé.
- Deux doublets d'intégration 1H ($J = 2,1$ Hz), montrant un effet de toit à $\delta = 7,54$ ppm et $\delta = 7,48$ ppm attribuables à H-2' et H-6' respectivement indiquant ainsi une substitution des carbones 3', 4' et 5' du noyau B.
- Deux doublets d'intégration 1H ($J = 9,9$ Hz), à $\delta = 6,51$ ppm et à $\delta = 5,87$ ppm, caractéristique d'un cycle pyranique disubstitué en position 6''. Ces deux substituants sont en fait deux groupements méthyles, dont le signal apparaît sous forme d'un singulet d'intégration 6H à $\delta = 1,51$ ppm.
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,91$ ppm caractéristique d'un groupement méthoxyle.

L'ensemble des données relatives à la RMN ^1H de ce composé est reproduit dans le tableau IV- 6.

Tableau IV-6 : Données de la spectroscopie RMN ¹H.

Déplacement chimique (δ ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
12,95	1H	s	OH en 5
7,54	1H	d (2,1)	H-2'
7,48	1H	d (2,1)	H-6'
6,72	1H	s	H-3
6,56	1H	d (1,8)	H-8
6,24	1H	d (1,8)	H-6
6,51	1H	d (9,9)	H-4''
5,87	1H	d (9,9)	H-5''
3,91	3H	s	O-CH ₃
1,51	6H	s	CH ₃ -6''

Jusque là, les données de la RMN ¹H associées à la biogenèse des flavonoïdes laissent supposer la structure partielle suivante :



Cette structure flavonique est confirmée d'une part par une fluorescence violette sous lumière de Wood et d'autre part par l'étude de la série spectrale UV (tableau IV-7, spectre n° IV-9) dont on peut tirer les indications suivantes :

- Le spectre enregistré dans le méthanol montre deux bandes d'absorption, une bande II à 262 nm et une bande I à 352 nm prévoyant soit un flavonol substitué en 3, soit une flavone avec une extension de la conjugaison.
- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 22$ nm) avec une diminution de l'intensité optique ce qui suppose l'absence d'un OH libre en position 4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 322 nm prouve l'existence d'un OH libre en position 7.

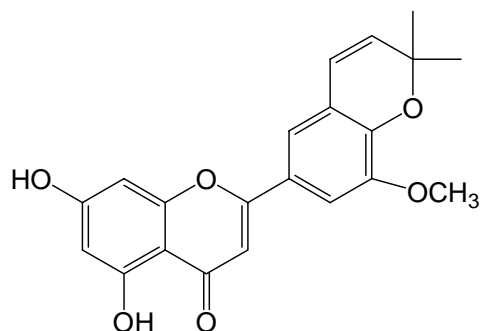
- L'addition de NaOAc qui provoque un déplacement bathochrome de la bande II par rapport au spectre pris dans le méthanol confirme la présence d'un OH libre en 7 ($\Delta\lambda = + 8 \text{ nm}$).
- Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +36$) enregistré après addition de AlCl_3 comparativement à celui enregistré dans le méthanol confirme la présence d'un -OH libre en position 5.

Tableau IV-7 : Données de la série spectrale UV.

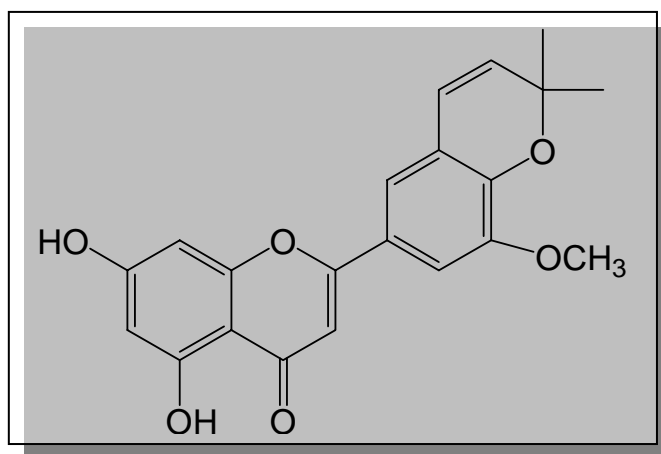
Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaires
MeOH	352	262	247	flavone
+ NaOH	374	273	322	OH libre en 4' OH libre en 7
+ AlCl_3	388	274	250	/
+ AlCl_3/HCl	364	274	250	OH libre en 3
+NaOAc	364	270	327	OH libre en 7
+NaOAc/ H_3BO_3	353	/	263	/
Spectre stable avec NaOH + 5 mn				

Ces résultats permettent ainsi de localiser le groupement méthoxyle en position 3' d'où la structure :

5, 7-dihydroxy-3'-methoxy-6'', 6''-diméthylpyrano[2'', 3'' : 4', 5'] flavone.

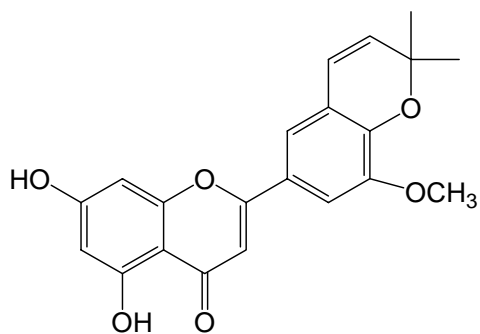


Cette structure est confirmée par l'étude du spectre de masse à haute résolution (SMHR) (spectre n° IV-10) qui montre une masse exacte à $m/z = 366,1101$ correspondant à la formule brute $C_{21}H_{18}O_6$ dont la valeur calculée est de 366,11034 g/mole et montre par ailleurs un pic de base à $m/z = 351$ correspondant à la perte d'un groupement méthyle, le fait que ce fragment correspond au pic de base (100%) consolide l'hypothèse de la présence de deux méthyles en position allylique dans la structure proposée. Le pic à $m/z = 152,9835 [A+H]^+$ conforte bien le fait que le noyau A soit dihydroxylé.

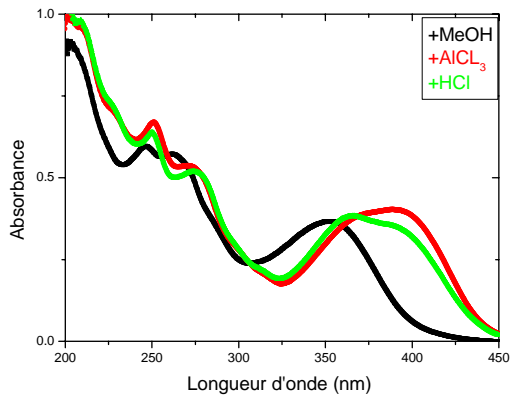
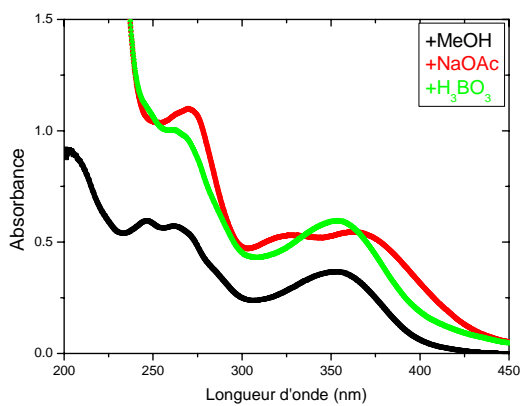
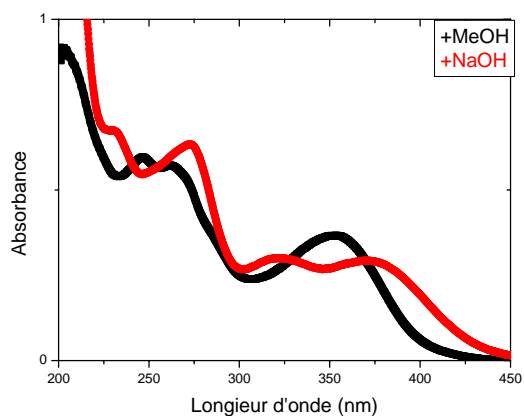
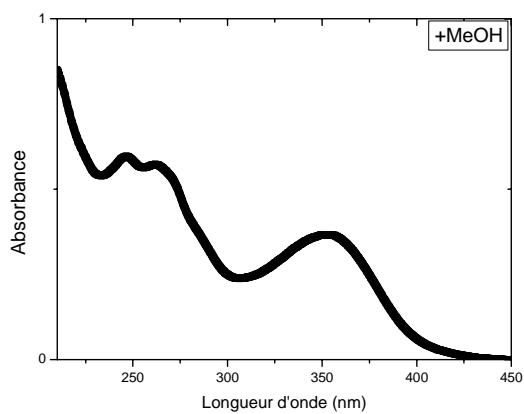


5, 7-dihydroxy-3'-methoxy-6'', 6''-diméthylpyrano [2'', 3'' :4', 5'] flavone.

A notre meilleure connaissance, cette molécule n'a pas été décrite dans la littérature.

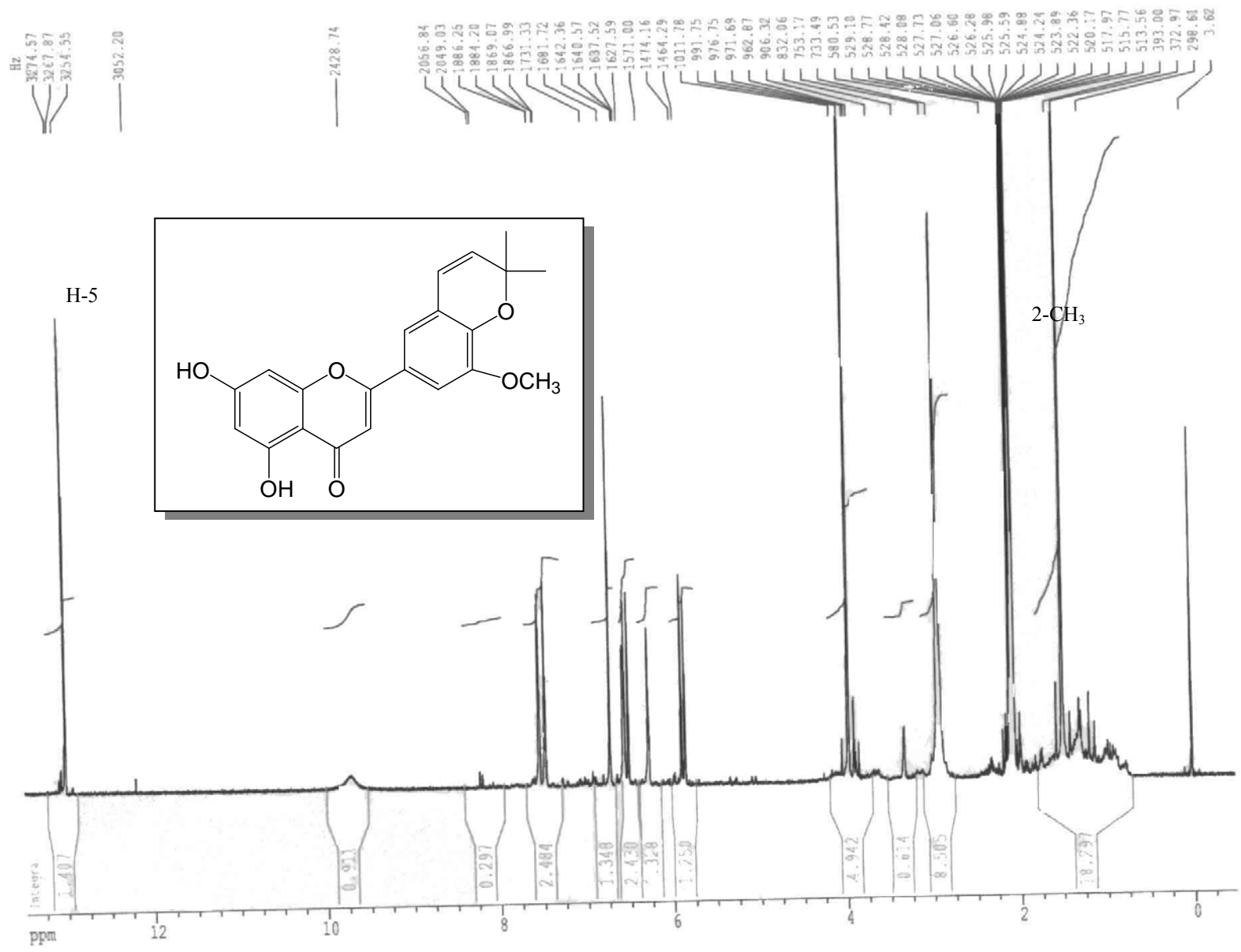


5, 7-dihydroxy-3'-methoxy-6'', 6''-
diméthylpyrano[2'', 3'' : 4', 3'] flavone

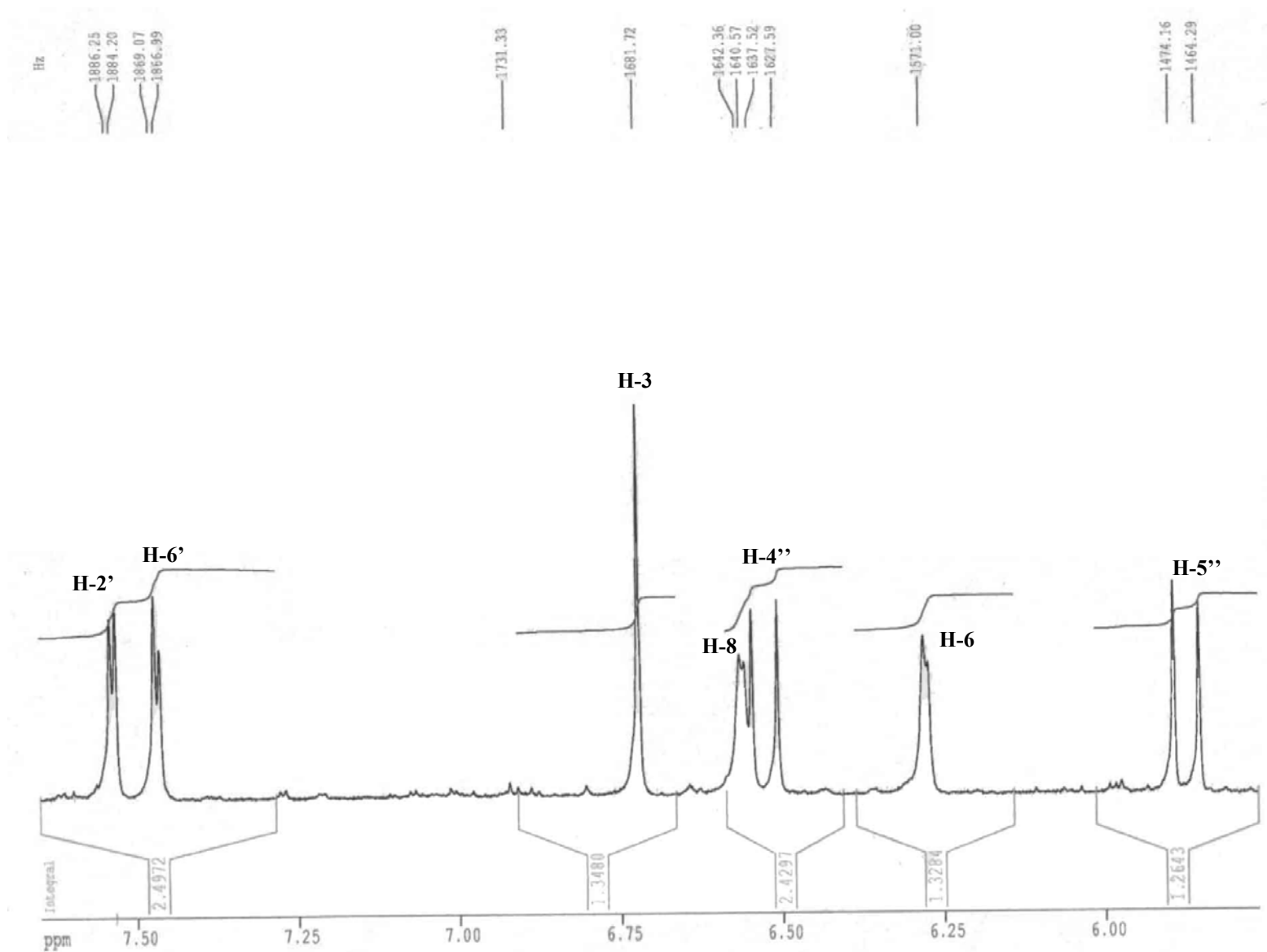


Spectre n° IV-9 : Série spectrale UV du composé SC82

**Spectre n° IV-8 : RMN ¹H (400 MHz, acétone-d₆)
du composé SC82**

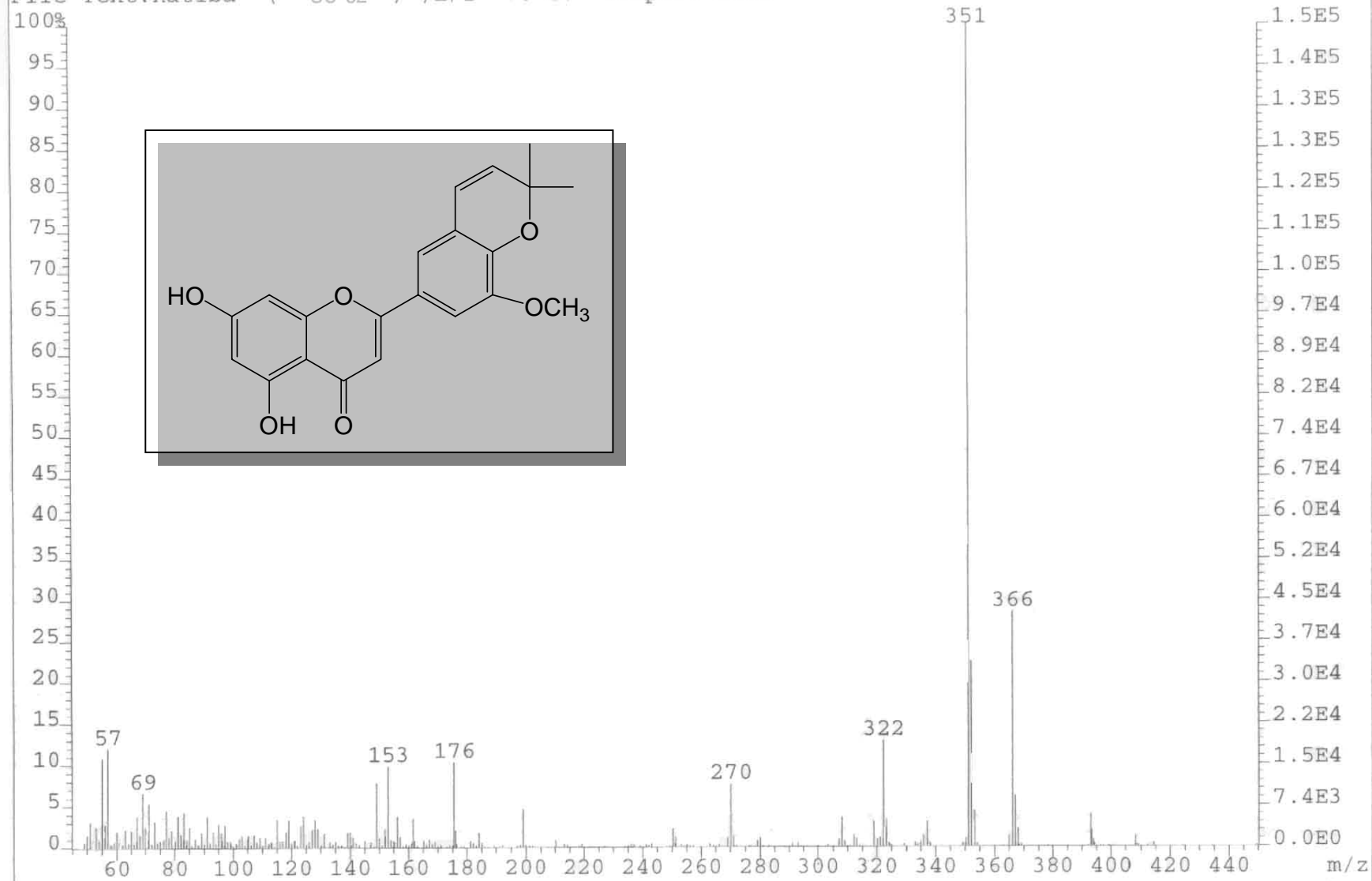


**Spectre n° IV-8 bis : RMN ¹H étalé (5.5 – 8 ppm)
du composé SC82**



Spectre n°IV-10 : Spectre SMIE du composé SC82

File:H8072 Ident:37 Acq:17-APR-2004 01:21:56 +1:55 Cal:H8072
AutoSpec EI+ Magnet BpM:351 BpI:148800 TIC:779172 Flags:ACC
File Text:Ratiba (SC-82) E/I 70 ev Temp.F. 230C



IV-1-4 : Le composé SC952 :

Interprétation :

- La fluorescence noire violette sous lumière de Wood est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.
- Le comportement chromatographique indiqué par les valeurs du R_f :
 - 0,65 dans le système Toluène / Méthyléthylcétone / Méthanol (4 :3 :3),
 - 0,05 dans le système Eau / Méthanol / Méthyléthylcétone / Acétylacétone (13 :3 :3 :1),
 - 0,018 dans le système Acide acétique 15%montre qu'il s'agit d'un aglycone.

L'étude de la série spectrale UV (spectre n° IV-11) montre :

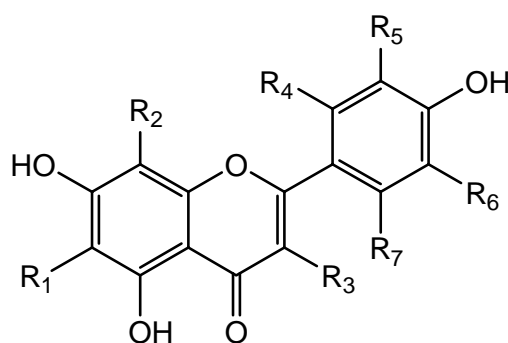
- Le maximum d'absorption de la bande I à 335 nm dans le spectre enregistré dans le méthanol indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 57$ nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse indique la présence d'un OH libre en position 4', l'apparition d'une nouvelle bande à 324 nm est révélateur de la présence d'un OH libre en position 7.
- L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = + 8$ nm) par rapport au spectre MeOH confirme la présence d'un OH libre en 7.
- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda = + 45$ nm) indique la présence d'un OH libre en 5.
- L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant les spectres $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ et AlCl_3 , laisse prévoir l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

L'ensemble des données de la série spectrale UV est reporté dans le tableau IV-8.

Tableau IV-8 : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaire
MeOH	335	/	268	flavone
+ NaOH	392	324	274	OH libre en 4' OH libre en 7
+AlCl ₃	382	348 300	274	OH libre en 5 Pas de ortho di-OH sur le cycle B
+AlCl ₃ /HCl	380	3344 300	274	
+NaOAc	380	306	276	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	338	/	269	/
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :



avec R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆ et R₇ différents de OH.

L'examen du spectre RMN ¹H (spectre n° IV-12) montre:

- Un singulet à $\delta = 6,57$ ppm attribuable à H-3, ce qui confirme la structure d'une flavone.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,51$ ppm, le second à $\delta = 6,23$ ppm ($J = 2,2$ Hz) attribuables à H-8 et H-6 respectivement.

- La constante de couplage $J = 8,7$ Hz du doublet qui apparaît à $\delta = 6,97$ ppm, permet l'attribution de ce signal d'intégration 2H à H-3' et H-5', de même la constante de couplage $J = 8,7$ Hz du doublet qui apparaît à $\delta = 7,71$ ppm, permet l'attribution de ce signal d'intégration 2H à H-2' et H-6'.

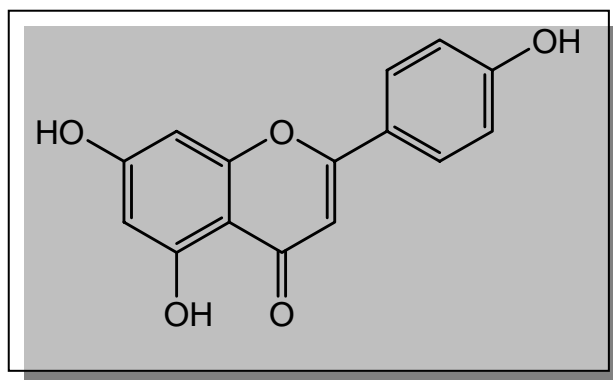
L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau IV-9.

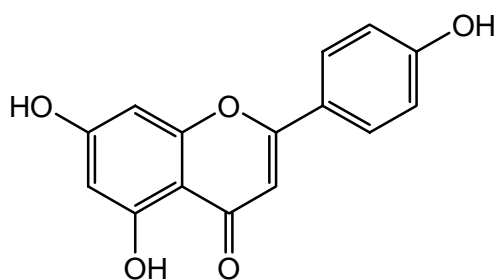
Tableau IV-9 : Données de la RMN ^1H :

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7.71	2H	d (8,7)	H-2' ; H-6'
6.97	2H	d (8,7)	H-3' ; H-5'
6.57	1H	s	H-3
6.51	1H	d (2,2)	H-8
6.23	1H	d (2,2)	H-6

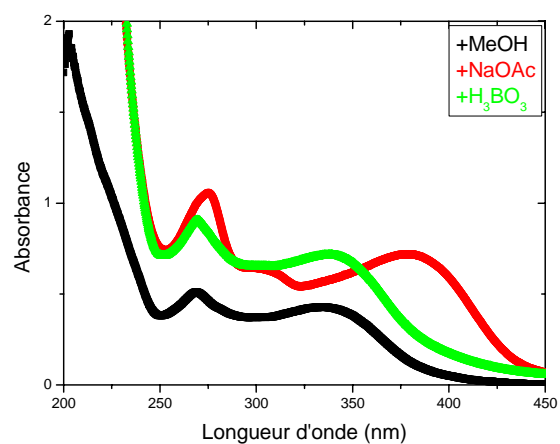
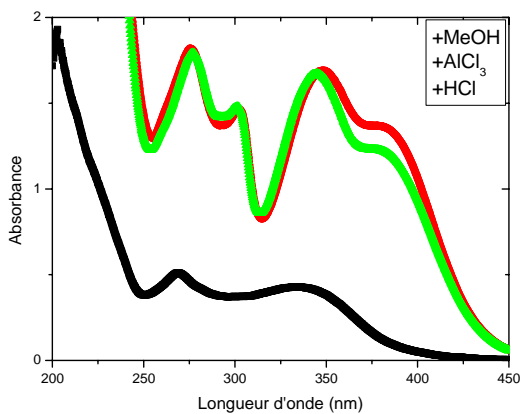
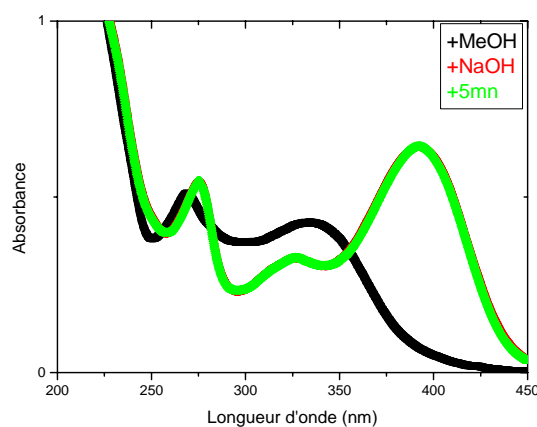
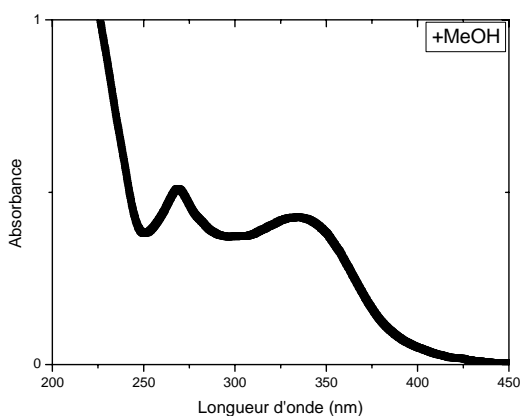
Ces données complètent la structure précédente et montrent que les substituants inconnus précédemment sont des protons menant ainsi à la :

4', 5, 7-trihydroxyflavone connue sous le nom d'**Apigénine**.



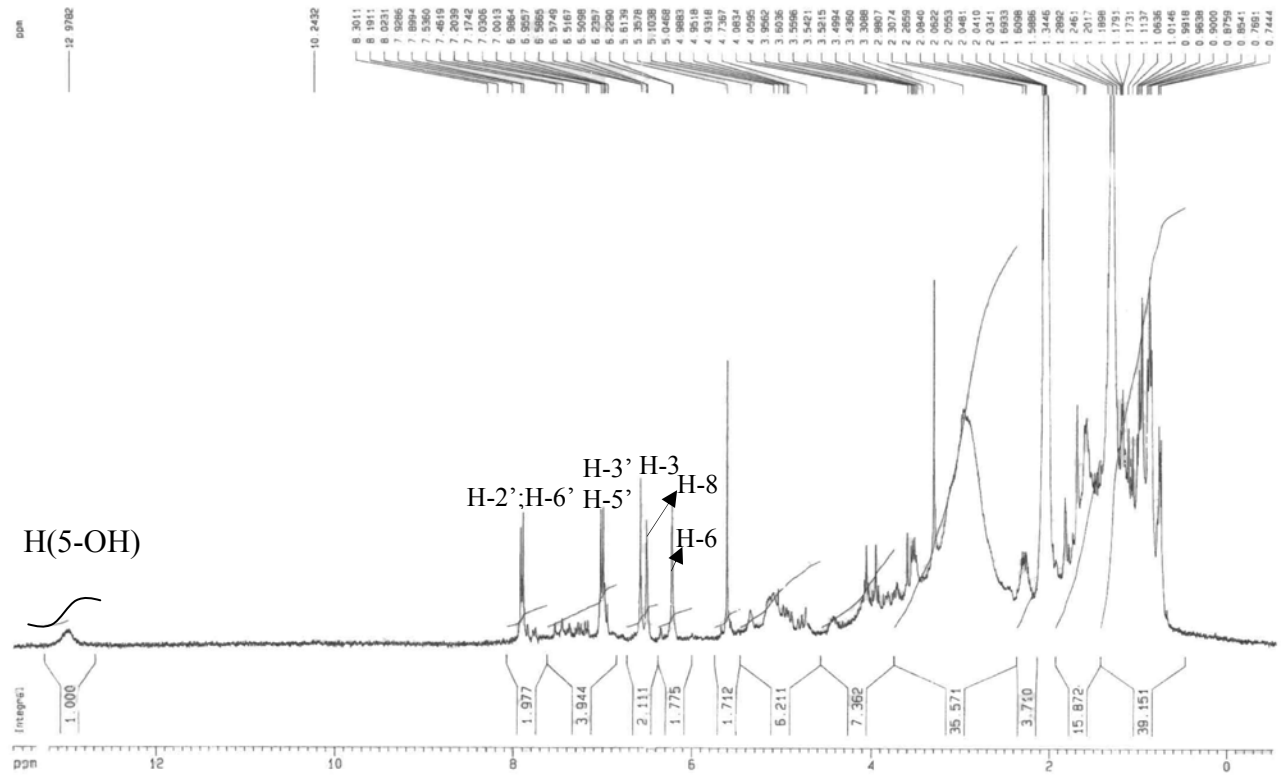


4', 5, 7-trihydroxyflavone
(Apigénine)



Spectre IV-11 : Série spectrale UV du composé SC952

**Spectre n° IV-12 : RMN ¹H (300 MHz, acétone-d₆)
du composé SC952**



IV-1-5 : Le composé SC96

Interprétation :

- La fluorescence jaune sous lumière de Wood laisse supposer la structure d'un flavonol.
- Les λ_{max} d'absorption de la bande I à 365 nm et la bande II à 260 nm confirment une structure de type flavonol.

L'examen de la série spectrale UV (spectre n°IV-13) montre :

- Un effet bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le milieu AlCl_3 ($\Delta\lambda = + 57$ nm) comparativement à celui enregistré dans le MeOH confirme le squelette d'un flavonol (OH libre en 3) et indiquant la présence d'un OH libre en 5.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 37$ nm) révèle la présence d'un OH libre en 4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 325 nm dans le même réactif montre la présence d'un OH libre en 7, ceci est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande II remarqué après addition de NaOAc ($\Delta\lambda = + 10$ nm) comparativement au spectre pris dans le MeOH.
- Pas de déplacement hypsochrome de la bande I en comparant le spectre $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ avec le spectre de AlCl_3 , ce qui prévoit l'absence de système orthodihydroxylé sur le noyau B.

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau IV-10.

Tableau IV-10 : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	365		260	flavonol
+ NaOH	404	325	271	OH libre en 4'
+ AlCl_3	422	290	270	OH libre en 5
+ AlCl_3/HCl	404	290 355	269	OH libre en 3
+ NaOAc	382		270	OH libre en 7
+ NaOAc/ H_3BO_3	382		269	
Spectre instable avec NaOH après 5 mn				

L'étude du spectre RMN ^1H donne les indications suivantes (spectre n° IV-14) :

- Deux doublets d'intégration de 2H chacun, l'un à $\delta = 7,41$, l'autre à $\delta = 6,80$ ppm ($J = 8,4$ Hz) attribuables à H-2', H-6', et H-3', H-5' respectivement.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,30$, le second à $\delta = 6,20$ ppm ($J = 2$ Hz) attribuables à H-8 et H-6 respectivement.

Le tableau IV-12 rassemble les résultats de la RMN ^1H .

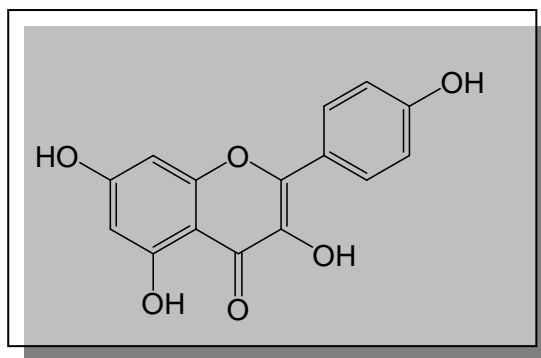
Tableau IV-11 : Données de la RMN ^1H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7.41	2H	d (8.4)	H-2' ; H-6'
6.80	2H	d (8.4)	H-3' ; H-5'
6.30	1H	d (2)	H-8
6.20	1H	d (2)	H-6

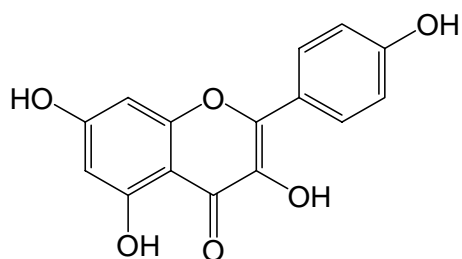
L'ensemble des données (UV et RMN ^1H) laisse proposer la structure :

4', 3, 5, 7-tetrahydroxyflavonol connue sous le nom de **Kaempférol**.

:

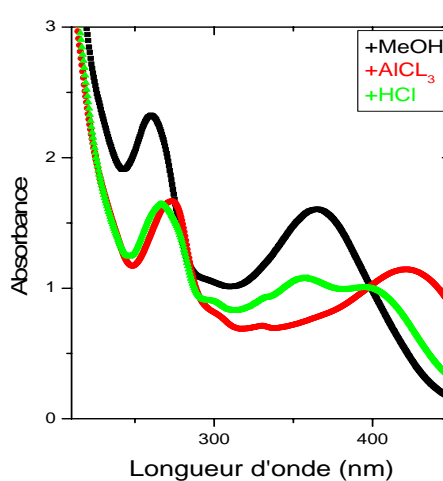
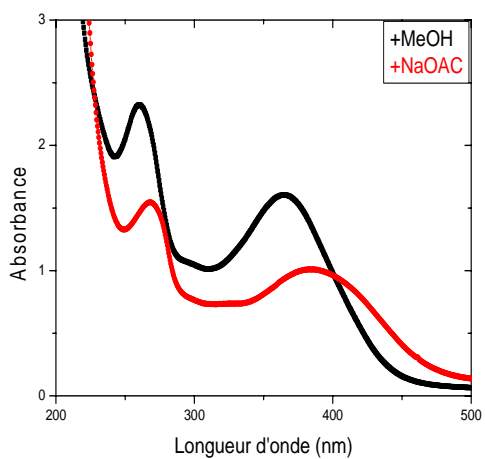
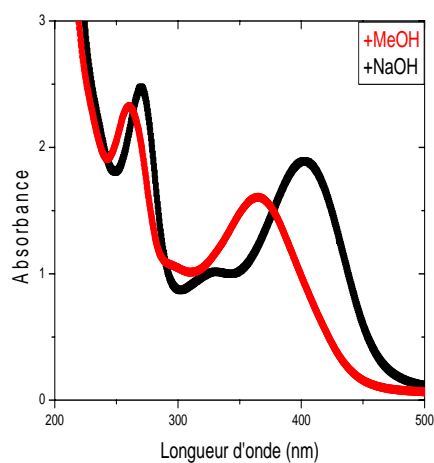
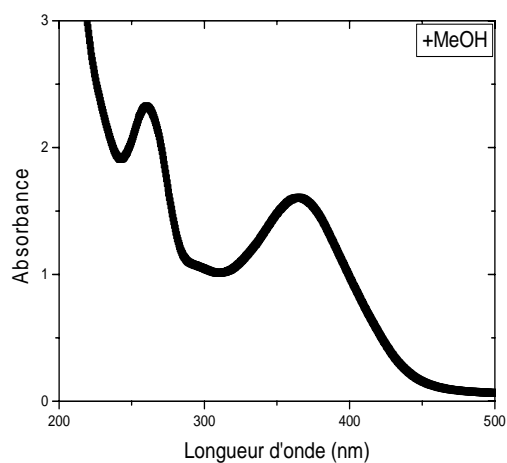


Cette structure est encore confirmée par le spectre SMIE (spectre n° IV-16) qui donne le pic moléculaire à $m/z = 286$ (intensité relative 100%) ainsi que des ions relatifs à la fragmentation du squelette flavonique notamment les ions $[A_1+1]^+$ à $m/z = 152,98$ témoignant d'un cycle A dihydroxylé ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$) et B_1^+ à $m/z = 134$ ($\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$) témoignant d'un cycle B monohydroxylé .



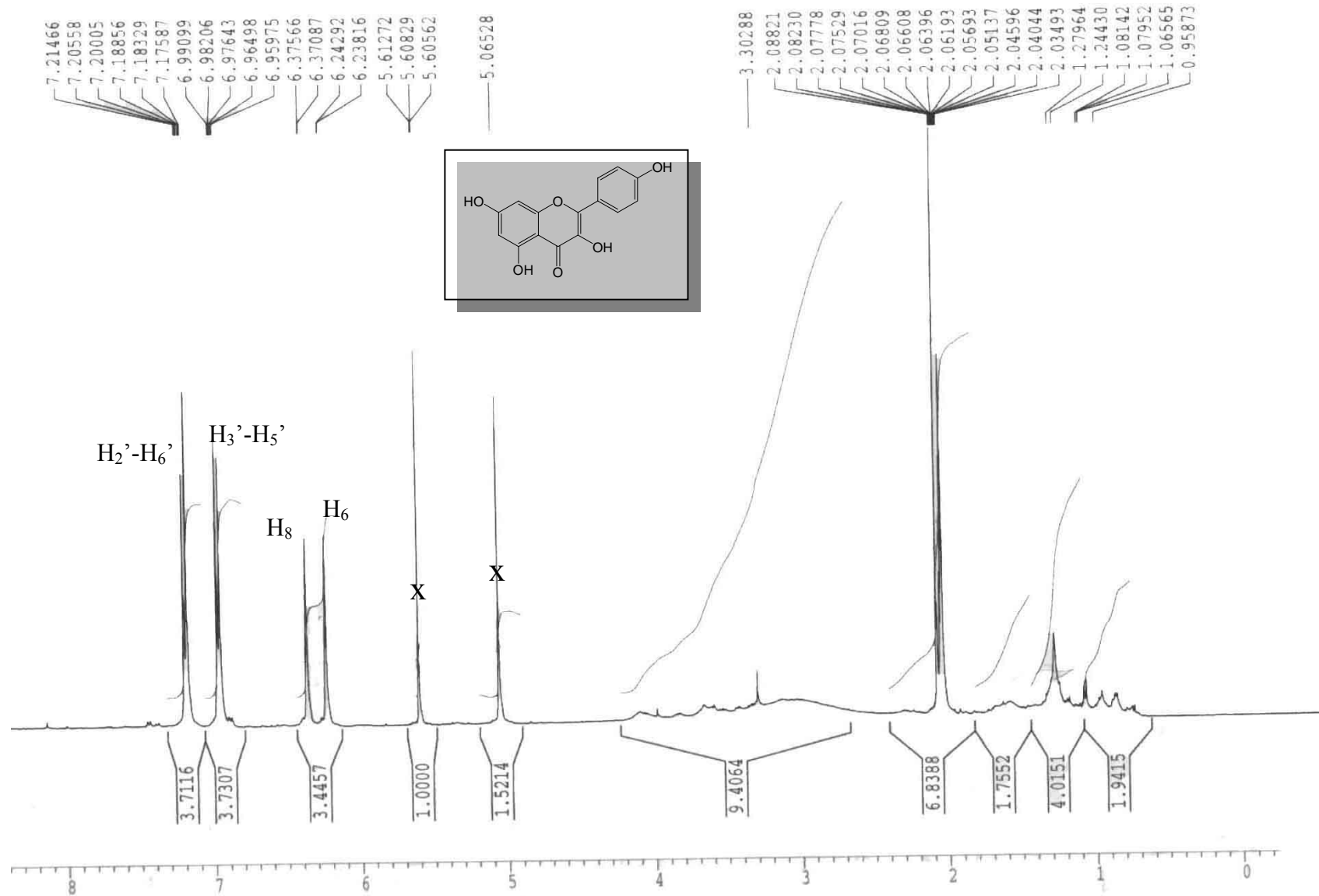
4', 3, 5, 7-tetrahydroxyflavonol

Kaempférol.

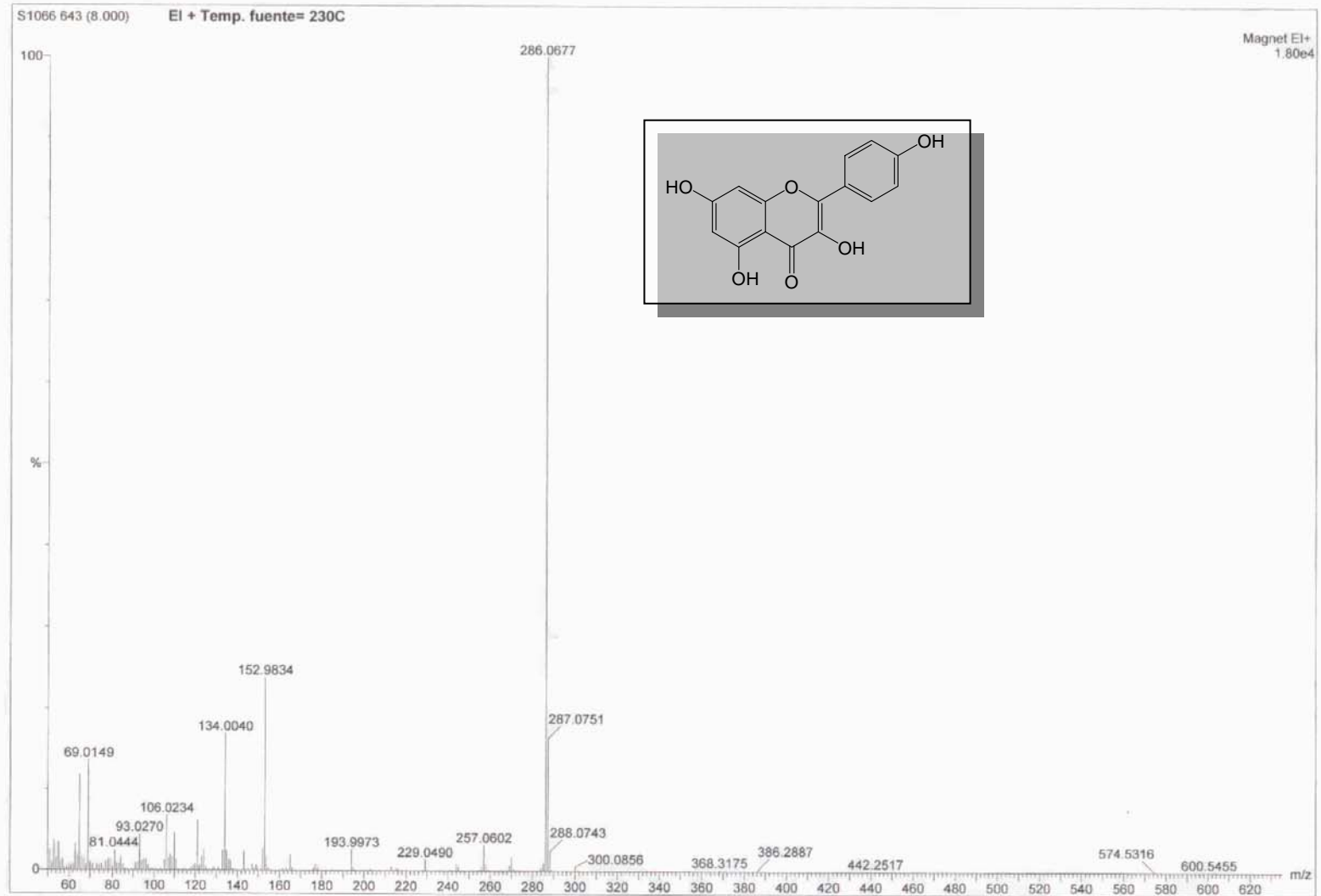


Spectre N° IV-13 : Spectre UV du composé SC96

**Spectre n° IV-14 : RMN ¹H (400 MHz, acétone-d₆)
du composé SC96**



**Spectre n° IV-15 : Spectre de masse (SMIE)
du composé SC96**



IV-I-6 : Le composé SA73 \equiv SB3 :

Interprétation :

L'étude du spectre RMN ^1H du composé SB3 permet de tirer les indications suivantes (spectre n° IV-16) :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta = 8,06$ ppm attribuable à H-2, caractérisant la structure d'une isoflavone.
- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 6,50$ ppm attribuable soit à H-6 soit à H-8 indiquant ainsi la substitution des positions 5, 6 et 7 ou bien les positions 5, 7 et 8.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun, à $\delta = 7,37$ et à $\delta = 6,84$ ppm ($J = 8,7$ Hz) attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement indiquant une substitution para du cycle B.
- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,93$ ppm montrant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

Les données de la RMN ^1H sont reportées sur le tableau IV-12

Tableau IV-12 : Données de la RMN ^1H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	multiplicité (J Hz)	Attribution
8,06	1H	s	H-2
7,37	2H	d (8,7)	H-2' ; H-6'
6,84	2H	d (8,7)	H-3' ; H-5'
6,50	1H	s	H-6/H-8
3,93	3H	s	OCH ₃

Par ailleurs, les données de la série spectrale UV (spectre n°IV-17) montrent :

- Une bande I sous forme d'un épaulement à environ 310 nm confirme le squelette d'une isoflavone.

- le déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc ($\Delta\lambda = + 11 \text{ nm}$) comparativement au spectre enregistré dans le méthanol indiquant la présence d'un OH libre en 7.
- Le faible déplacement bathochrome de la bande II enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans le MeOH oriente vers la présence d'un OH libre en position 5 et une oxygénation en position 6.
- Le fait que le spectre enregistré dans $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ soit identique à celui enregistré dans AlCl_3 impose l'absence de système ortho-dihydroxylé sur le cycle A.

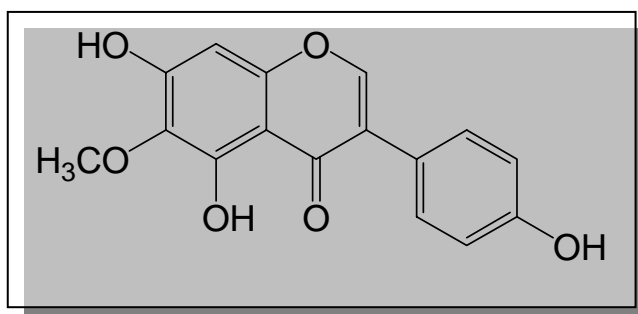
Les données relatives à la série spectrale UV sont reportées sur le tableau IV-13

Tableau IV-13 : Données de la série spectrale UV

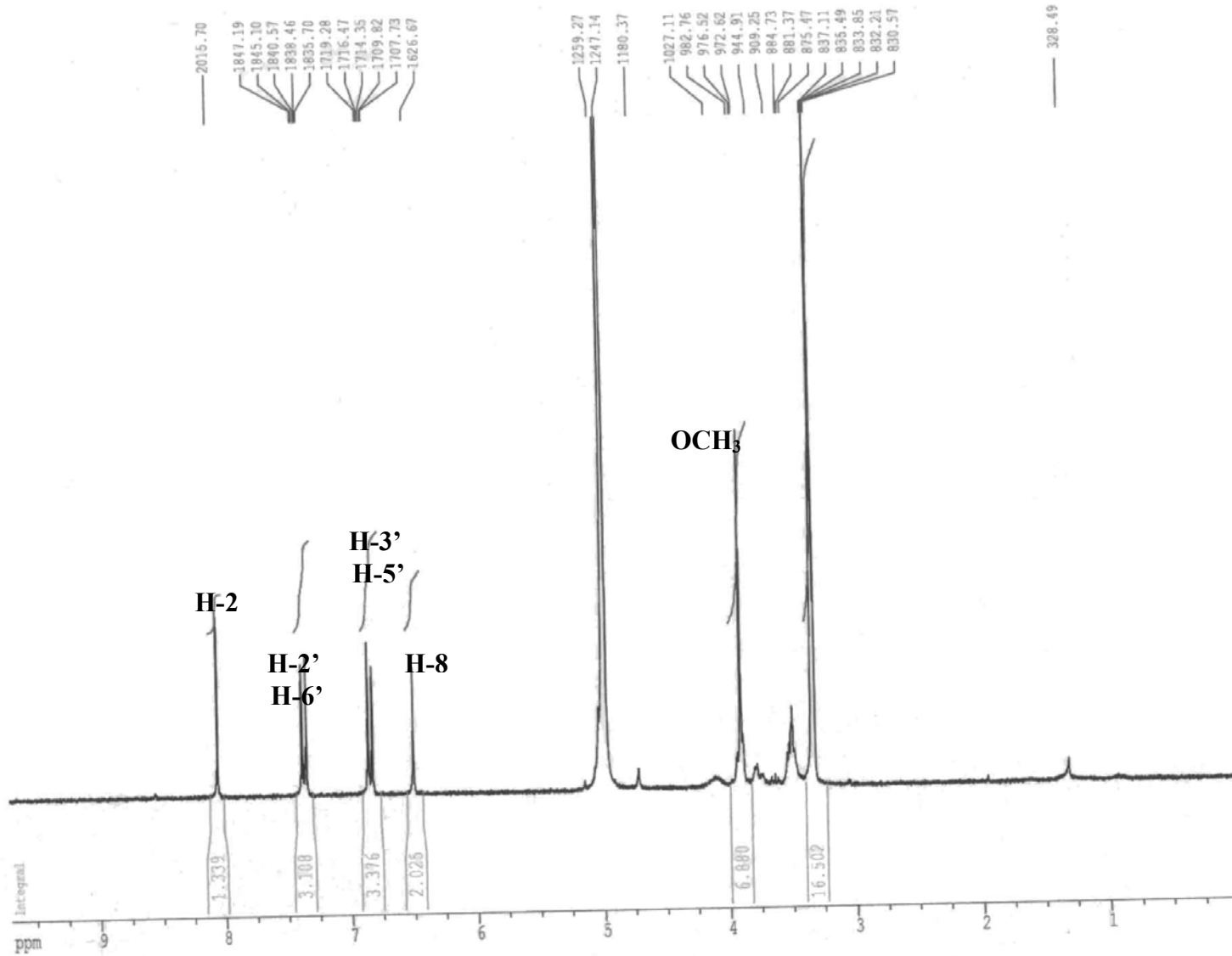
Réactifs	Bande I	Bande II	Commentaire
MeOH	310Ep.	258	Isoflavone
+ NaOH	Ep.	271	/
+AlCl ₃	317Ep.	257	OH libre en 5 avec une oxygénation en 6 Pas de ortho dihydroxyle sur le cycle A
+AlCl ₃ /HCl	317Ep.	257	
+NaOAc	321	269	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	312	258	/
Spectre stable avec NaOH après 5 mn			

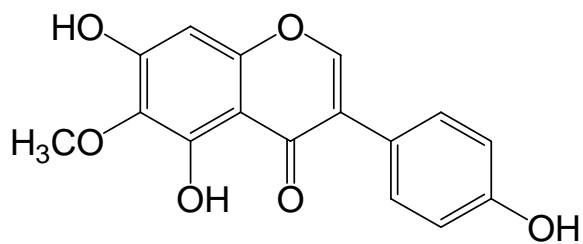
Ces données ainsi que la fluorescence Orange sous lumière de Wood permettent de confirmer la structure d'isoflavone d'une part et placer le méthoxyle en position 6 d'autre part. Ces constatations mènent au composé :

4', 5, 7-trihydroxy 6-méthoxy isoflavone.



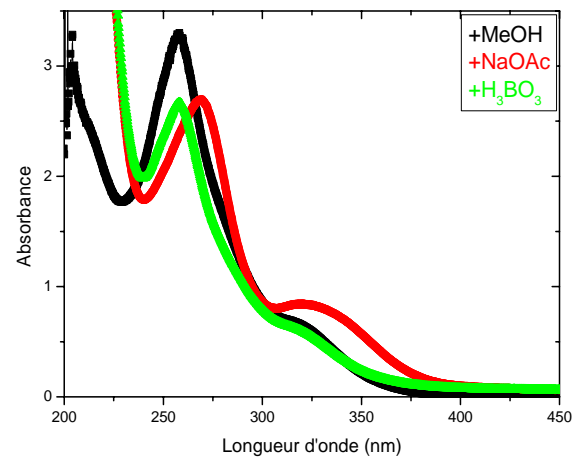
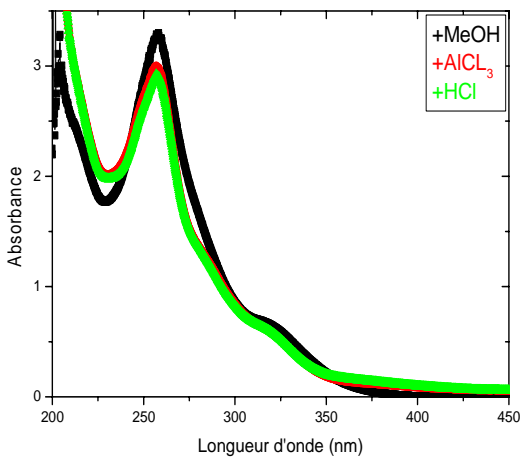
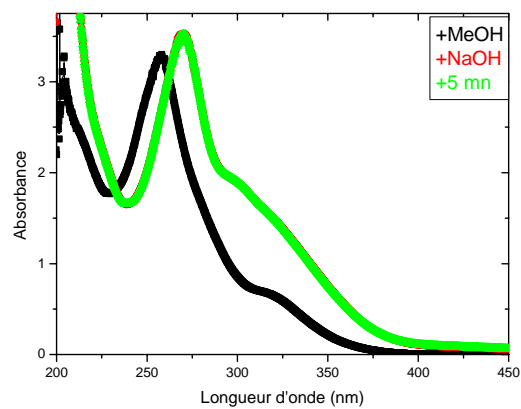
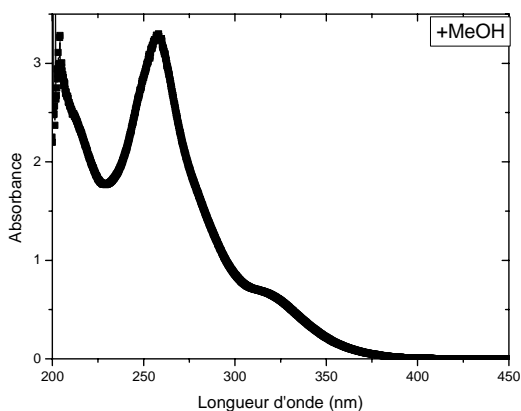
Spectre n°IV-16: RMN ¹H (250 MHz, CDO₃OD)
 Du composé SA73 ≡ SB3





4', 6, 7-trihydroxy

5-méthoxyisoflavone



Spectre n° IV-17 : Série spectrale UV du Composé SB3

IV-1-7 : Le composé SB1:

Interprétation :

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV-18 et IV-18bis) montre qu'il s'agit d'un flavonoïde de type isoflavone caractérisé par :

- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 7,60$ ppm caractéristique d'un H-2 d'une isoflavone.
- Un signal sous forme de multiplet dans l'intervalle compris entre 7,55 et 7,30 ppm, l'un d'intégration 2H centré à $\delta = 7,54$ ppm attribuables à H-2' et H-6', l'autre d'intégration 3H centré à $\delta = 7,41$ ppm attribuables à H-3', H-4' et H-5' traduisant ainsi la non substitution du noyau B.
- Un autre signal sous forme d'un singulet à $\delta = 5,79$ ppm d'intégration 1H attribuable d'après la valeur de son déplacement chimique à H-6 indiquant ainsi que le noyau A est substitué en 5, en 7 et en 8.
- Sur le même spectre on remarque la présence d'un signal sous forme d'un doublet à $\delta = 4,71$ ppm partiellement recouvert par le signal de l'eau de contamination du méthanol deutéré, caractérisant le proton anomérique d'un glucose ainsi que les autres signaux de ce glucose entre $\delta = 4,28$ et $\delta = 3,63$ ppm.

La nature du sucre (glucose) et de sa jonction à la génine ont été largement montré lors de la détermination structurales du composé SB4 [2] (voir annexe).

En effet, la portion du spectre RMN ^1H relative au sucre de SB1 est en parfait accord avec celle de SB4.

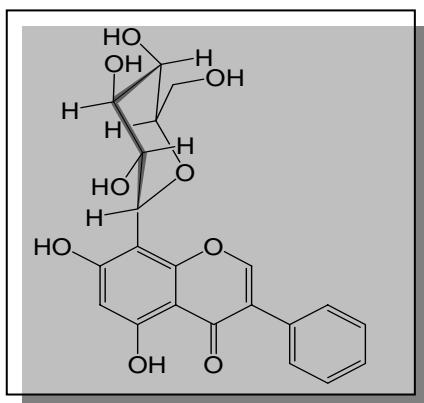
Le tableau IV-14 rassemble les résultats relatifs à la spectroscopie de la RMN ^1H .

Tableau IV-14 : Données de la spectroscopie RMN ^1H

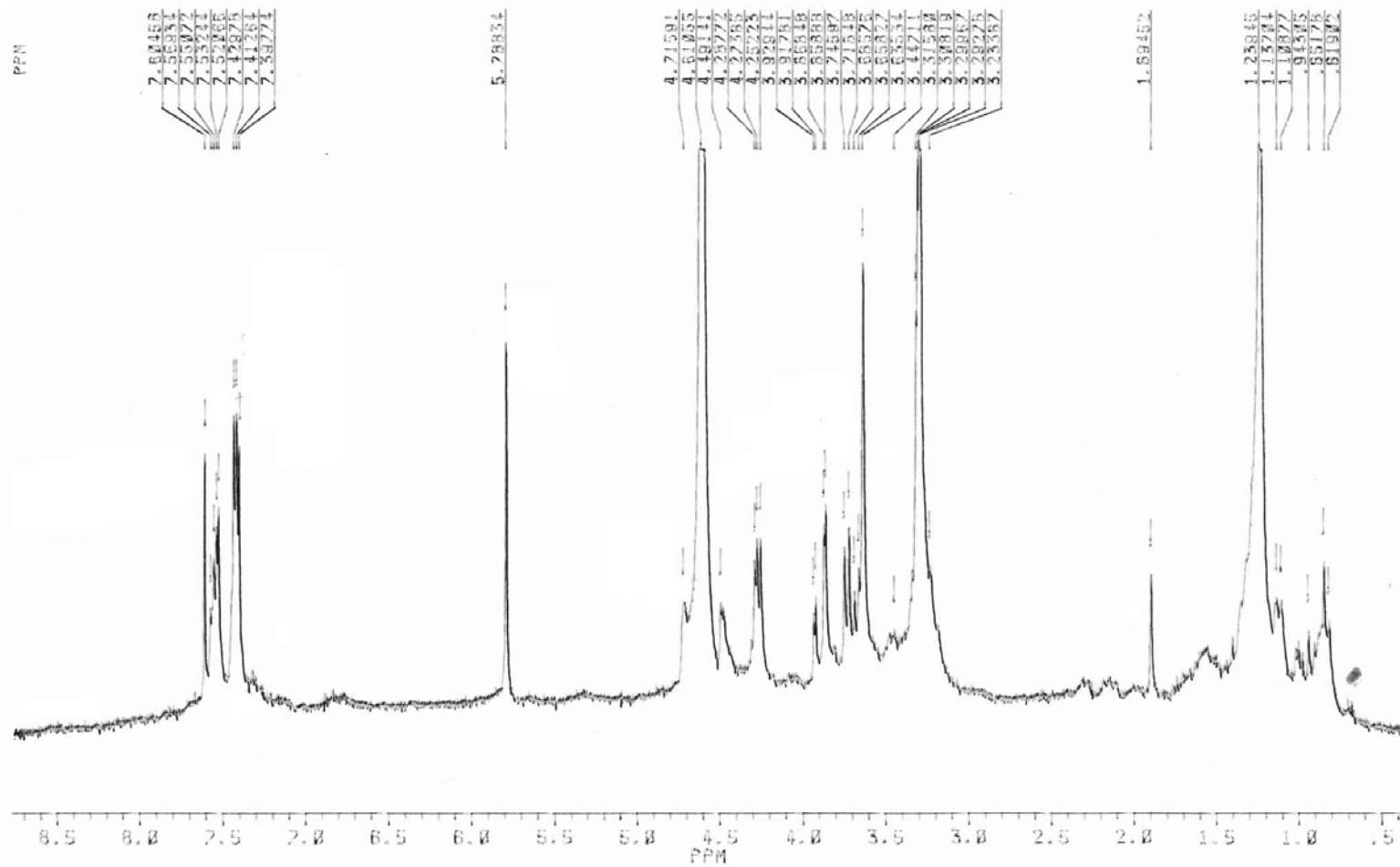
Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attributions
7,60	1H	s	H-2
7,39-7,55	5H	m	H-2' ; H-3' ; H-4' ; H-5' ; H-6'
5,79	1H	s	H-6
4,71	1H	d	H-1''

L'ensemble de ces données suggère la structure :

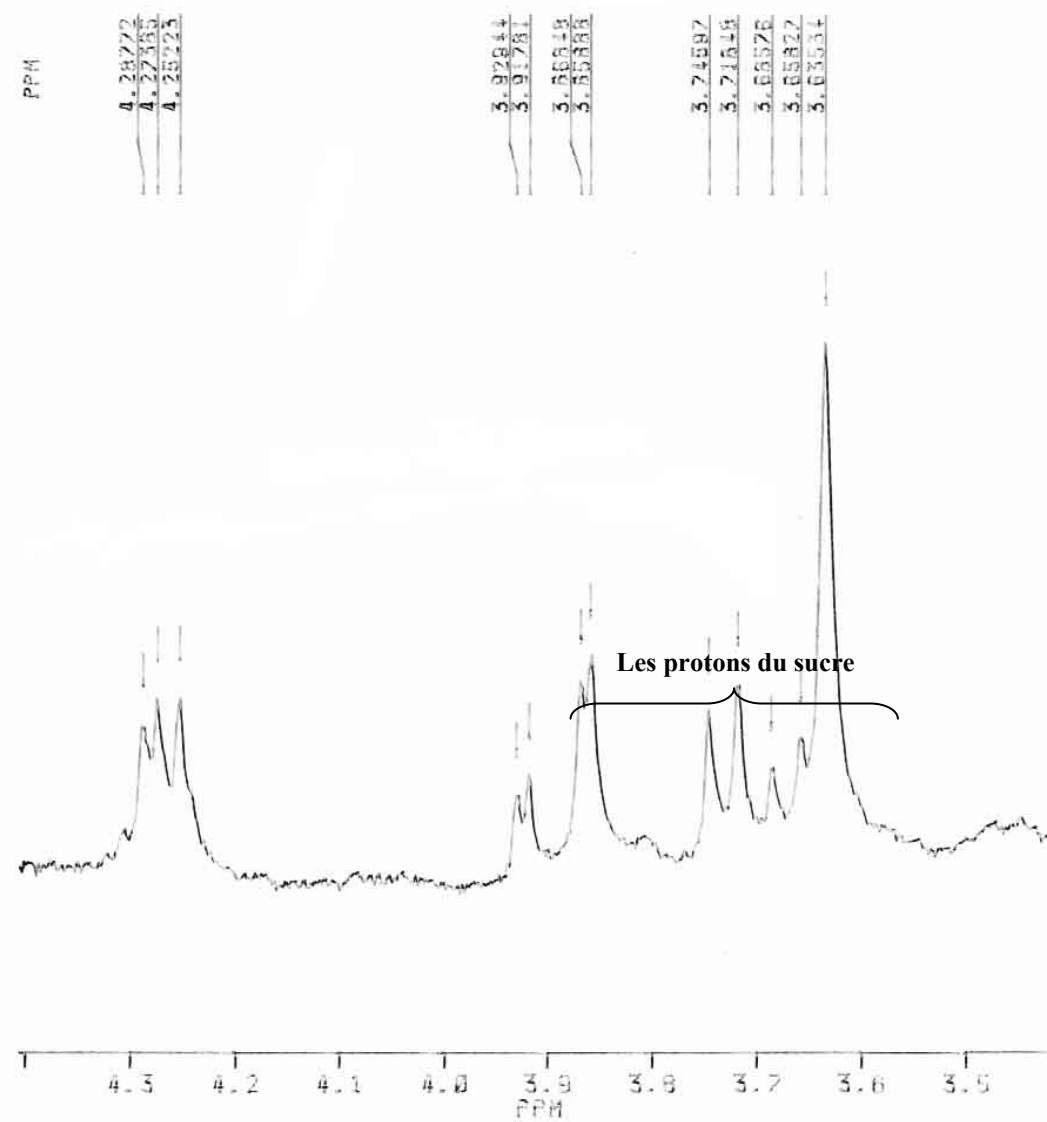
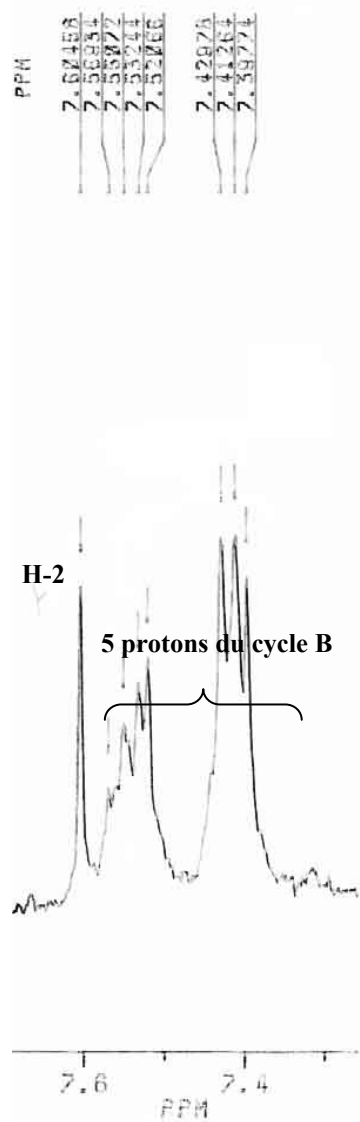
5, 7-dihydroxy 8-C-glucosylisoflavone.



Spectre n°IV-18 : RMN ¹H (200 MHz, CD₃OD)
du composé SBI



Spectre n° IV-18bis : RMN ¹H étalé (3.5-4.4 ppm et 7.3 – 7.7 ppm) du composé Sb1



IV-1-8- Le composé SB2 :

Interprétation :

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV-19), montre qu'il s'agit d'un flavonoïde de type isoflavone caractérisé par :

- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 8,06$ ppm caractéristique d'un H-2 d'une isoflavone.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun, à $\delta = 7,36$ ppm et à $\delta = 6,80$ ppm ($J = 8,6$ Hz) d'intégration 2H chacun attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement indiquant ainsi une substitution para sur le noyau B.
- Un autre signal sous forme d'un singulet à $\delta = 6,47$ ppm d'intégration 1H attribuable soit à H-6 soit à H-8. La valeur du déplacement chimique de ce proton (6,47 ppm) oriente vers la position 6 plutôt que la position 8 indiquant ainsi la substitution du noyau A en positions 5, 7 et 8.
- Sur le même spectre, on remarque la présence d'un signal sous forme d'un doublet à $\delta = 4,93$ ppm ($J = 9,7$ Hz) partiellement recouvert par une bande de rotation du signal de l'eau de contamination du méthanol deutéré, caractérisant le proton anomérique d'un glucose ainsi que les autres signaux de ce glucose entre $\delta = 3,52$ ppm et $\delta = 4,06$ ppm.

La nature du sucre (glucose) et de sa jonction à la génine ont été largement montrés lors de la détermination structurales du composé SB4 [2] (voir annexe). En effet, la portion du spectre RMN ^1H relative au sucre de SB2 est en parfait accord avec celle de SB4.

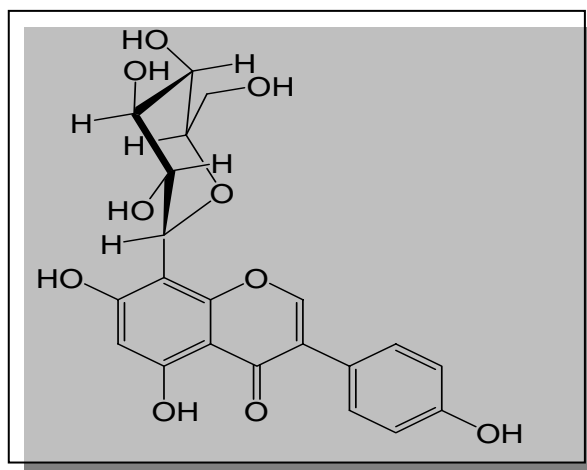
Les données relatives à la spectroscopie RMN ^1H sont rassemblées dans le tableau IV15.

Tableau IV-15 : Données de la spectroscopie RMN ¹H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
8,06	1H	s	H-2
7,36	2H	d (8,6)	H-2' ; H-6'
6,80	2H	d (8,6)	H-3' ; H-5'
6,47	1H	s	H-6
4,93	1H	d (9,8)	H-1''

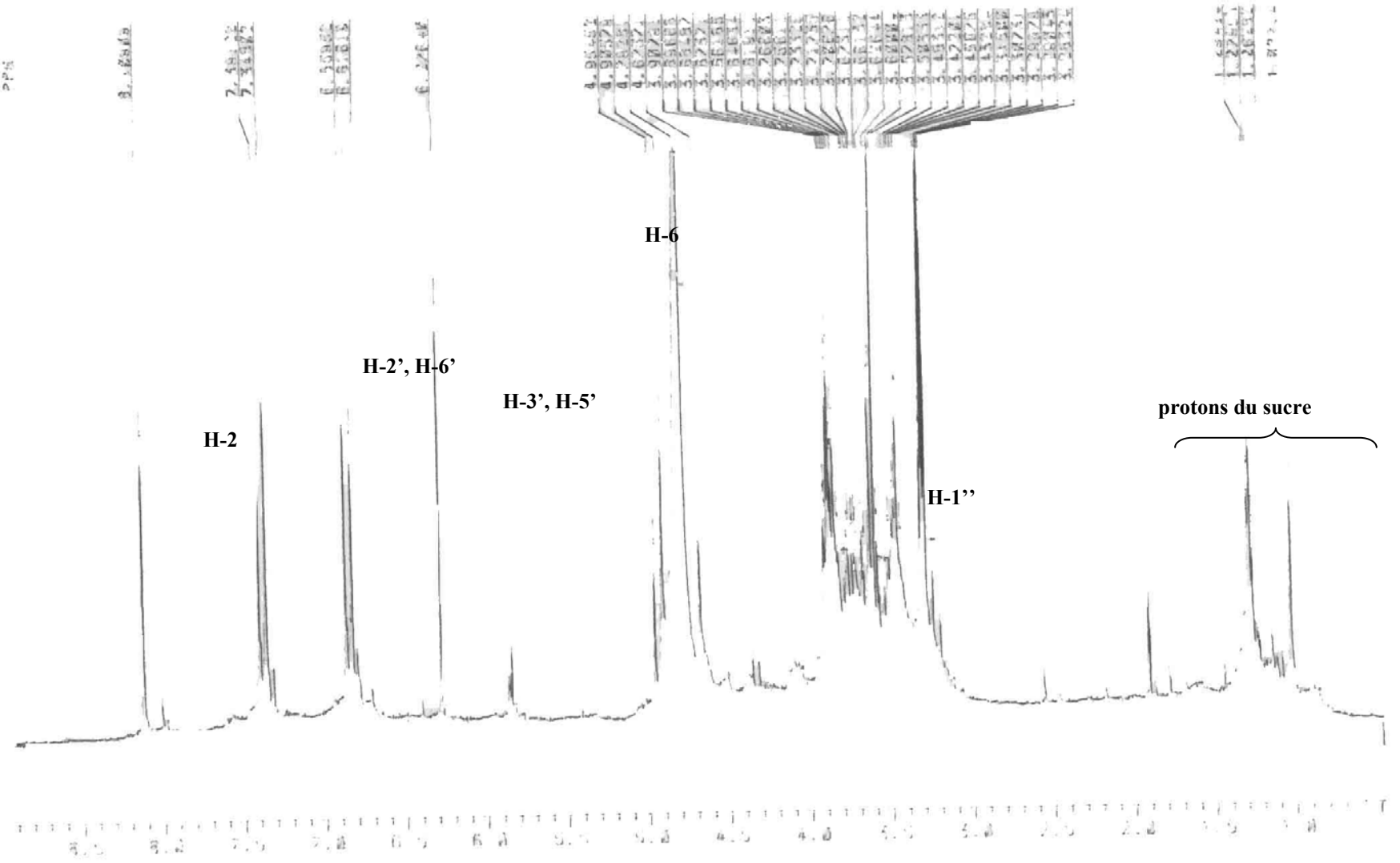
L'ensemble de ces données suggère la structure suivante :

4', 5, 7-trihydroxy 8-C-glucosylisoflavone (8-C-glucopyranosylgénistéine)



Cette molécule est largement distribuée dans les espèces du genre *Genista*.

Spectre°IV-19 : RMN ¹H (200 MHz, CD₃OD)
du composé SB2



IV-1-9 : Le composé SB4 :

Interprétation :

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV-20) montre la présence d'un ensemble de signaux caractérisant un squelette flavonique de type isoflavone reconnaissable par :

- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta = 7,98$ ppm caractéristique d'un H-2 d'une isoflavone.
- Un système AB caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B, ainsi les doublets à $\delta = 7,30$ ppm et à $\delta = 6,80$ ppm ($J = 8,6$ Hz) d'intégration 2H chacun sont attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement.
- Un autre signal sous forme d'un singulet à $\delta = 6,47$ ppm d'intégration 1H attribuable soit à H-6 soit à H-8 indiquant ainsi que le noyau A est substitué en 7, en 5 et soit en 6 soit en 8.
- Sur le même spectre, on remarque la présence d'un signal sous forme d'un doublet à $\delta = 4,98$ ppm ($J = 9,8$ Hz) caractérisant le proton anomérique d'un glucose ainsi que les autres signaux de ce glucose entre $\delta = 3,52$ ppm et $\delta = 4,06$ ppm.
- Un dernier signal sous forme d'un singulet à $\delta = 3,87$ ppm d'intégration 3H indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.

Par ailleurs, l'examen du spectre RMN 2D, COSY (spectre n° IV-21) montre :

- Une corrélation entre les noyaux des doublets à $\delta = 7,30$ ppm et $\delta = 6,80$ ppm confirmant les attributions de H-2', H-6' et H-3', H-5' donc une substitution du noyau B en 4'.
- Une tache de corrélation entre le H-6 ou H-8 et le groupement CH_3 du méthoxyle relative à un couplage lointain. Cela suppose que le groupement méthoxyle se trouve sur un carbone voisin de C-6 ou C-8 autrement dit le groupement méthoxyle est porté soit par le C-5 soit par le C-7 du noyau A.

Les données relatives à la RMN ^1H ainsi que la COSY sont rassemblées dans le tableau IV-16.

Tableau IV-16 : Données de la RMN ¹H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution	Couplage avec ¹ H
7,98	1H	s	H-2	/
7,30	2H	d (8,6)	H-2' ; H-6'	3', 5'
6,80	2H	d (8,6)	H-3' ; H-5'	2', 6'
6,47	1H	s	H-6 / H-8	OCH ₃
3,87	3H	s	OCH ₃	6 / 8
4,98	1H	d (9,8)	H-1''	2''
4,06	/	m	H-2''	1'', 3''
3,49-3,54	/	m	H-3''	2'', 4''
3,71-4,78	/	m	H-4''	3'', 5''
3,47-3,54	/	m	H-5''	4'', 6''
3,83-3,94	/	m	H-6''a	3'', 5''
3,83-3,84	/	m	H-6''b	4'', 6''

Les données de la série spectrale UV (spectre n° IV-22) donne d'autres indications complémentaires qui sont :

- Le spectre enregistré dans le MeOH donne deux bandes d'absorption, Une bande I à 314 nm sous forme d'un épaulement et une bande II à 257 nm confirmant ainsi la structure d'une isoflavone.
- L'ajout de NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = +12$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH indiquant ainsi la présence d'un OH libre en 7 et l'absence d'une oxygénation en C-6.
- L'addition de AlCl₃ ne montre aucun effet sur le spectre d'absorption comparativement à celui enregistré dans le MeOH ce qui prouve l'absence d'un OH libre en 5 et également l'absence d'un système orthodihydroxyle dans la structure.

Le tableau IV-17 rassemble les données de la série spectrale UV.

Tableau IV-17: Données de la série spectrale UV.

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaire
MeOH	314Ep.	278Ep.	257	isoflavone
+ NaOH	310Ep.	/	270	/
+AlCl ₃	314Ep.	278	257	Pas de OH libre en 5 Pas de ortho di-OH sur le cycle B
+AlCl ₃ /HCl	314Ep.	278	257	
+NaOAc	323Ep.	/	269	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	312Ep.	/	260	/
Spectre stable avec NaOH après 5 minutes.				

L'étude du spectre de corrélation XHCOR (spectre n° IV-23) permet d'effectuer les attributions suivantes :

- Une tache de corrélation entre H-2 et un atome de carbone qui ne peut être que C-2 à $\delta = 152,1$ ppm.
- Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et les atomes des carbone C-2' et C-6' permettant ainsi leur localisation à $\delta = 132,5$ ppm. De même, une tache de corrélation entre H-3', H-5' et les atomes de carbone C-3' et C-5' permettant leur localisation à $\delta = 116,1$ ppm.
- Une tache de corrélation avec H-6 ou H-8 permet l'attribution de C-6 ou C-8.
- Une tache de corrélation entre l'hydrogène anomérique et l'atome de carbone C-1'' du sucre, permettant ainsi sa localisation à $\delta = 75,7$ ppm. Cette valeur du déplacement chimique du C-1'' indique celle d'un groupement CH lié à un seul atome d'oxygène, ce qui suppose que la jonction génine-sucre est une liaison de type carbone-carbone. Comme indiqué plus haut, cette molécule est une isoflavone non substitué en C-2, et ayant un noyau B para substitué, ainsi le glucose, vu sa jonction C-C avec l'aglycone, ne peut être qu'en position 6 ou en position 8.

- Par ailleurs, ce même spectre permet l'attribution au carbone du méthoxyle le signal à $\delta = 56,4$ ppm.

L'ensemble des attributions et la finalisation de la structure seront complétées par l'étude du spectre de corrélation hétéronucléaire à longue distance (COLOC avec une constante de couplage optimisée à 6 Hz).

Sur ce spectre (spectre n° IV-24) nous avons :

- Une tache de corrélation entre H-2 et les atomes de carbone à $\delta = 180,4$ ppm, à $\delta = 152,1$ ppm et à $\delta = 126,6$ ppm attribuables à C-4, C-2 et C-3 respectivement. Ce même proton montre également une corrélation avec le carbone oxygéné à $\delta = 159,0$ ppm qui ne peut être que le C-9.
- Une tache de corrélation entre H-2', H-6' et le carbone oxygéné à $\delta = 158,5$ ppm qui ne peut être que C-4'.
- Le H-6 ou le H-8 donne deux taches de corrélation avec deux atomes de carbones oxygénés autres que le C-9, par conséquent ce sont les carbones C-5 et C-7, donc ce proton ne peut être qu'en C-6 ($\delta = 97,6$ ppm). L'emplacement du proton en C-6 et non en C-8 impose la substitution du C-8 par le glucose. En effet, le proton anomérique montre sur ce spectre une corrélation avec le carbone à $\delta = 105,6$ ppm qui ne peut être que le C-8 vu la valeur de son déplacement chimique, ceci permet par ailleurs d'attribuer le carbone non oxygéné restant à C-10 ($\delta = 108,6$ ppm). Ce proton anomérique (H-1'') montre également une corrélation avec un carbone oxygéné ($\delta = 163,3$ ppm) qui ne peut être que le C-7.
- Cette donnée oriente vers l'attribution du carbone oxygéné restant ($\delta = 162,4$ ppm) à C-5. Ce dernier atome de carbone (C-5), montre une corrélation avec les protons du groupement méthoxyle, ce qui place ce groupement en C-5. La position du méthoxyle en C-5, et celle du proton du cycle A en C-6 confirment bien la tache de corrélation observée sur le spectre COSY signalée précédemment.

Par ailleurs, l'analyse de l'ensemble des spectres a permis de faire toutes les attributions des noyaux de la partie osidique (spectre n° IV-25 RMN ^{13}C) Le tableau IV-18 rassemble toutes ces données.

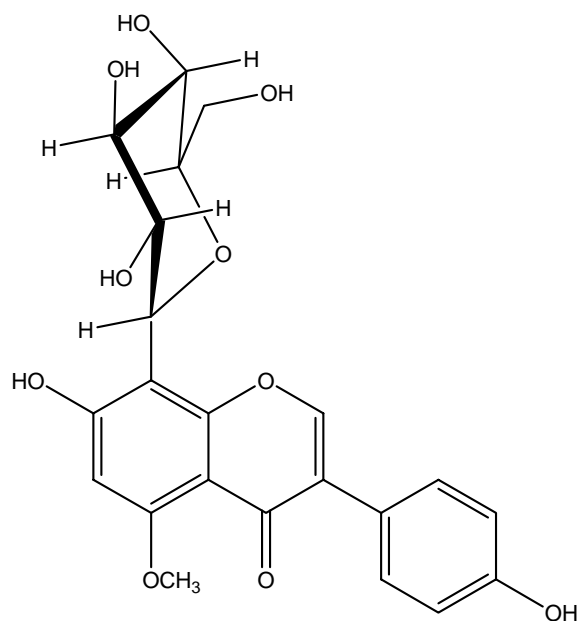
Tableau IV- 18 : Données de la RMN ¹³C :

Déplacement chimique δ (ppm)	Attribution	Corrélation avec H
152.1	C-2	2
126.6	C-3	2, 2', 6'
180.4	C-4	2
162.4	C-5	6, OCH ₃
97.6	C-6	/
163,3	C-7	1'', 6
105,6	C-8	1'', 6
159,0	C-9	2
108,6	C-10	6
124,3	C-1'	3', 5'
132,5	C-2'; C-6'	2', 6', 3', 5'
116,1	C-3'; C-5'	2', 6', 3', 5'
158,5	C-4'	2', 6'
75,7	C-1''	/
73,1	C-2''	/
78,9	C-3''	/
71,7	C-4''	/
82,6	C-5''	/
62,7	C-6''	/
56,4	OCH ₃	/

Le spectre de masse (mode FAB) dans le glycérol comme matrice (spectre IV-26), montre un pic quasi-moléculaire $[MH]^+$ à 447 indiquant une masse de 446, un autre pic à 399 relatif à $[MH - H_2O - CH_2O]^+$ confirmant la présence de OH et OCH₃ sur la molécule

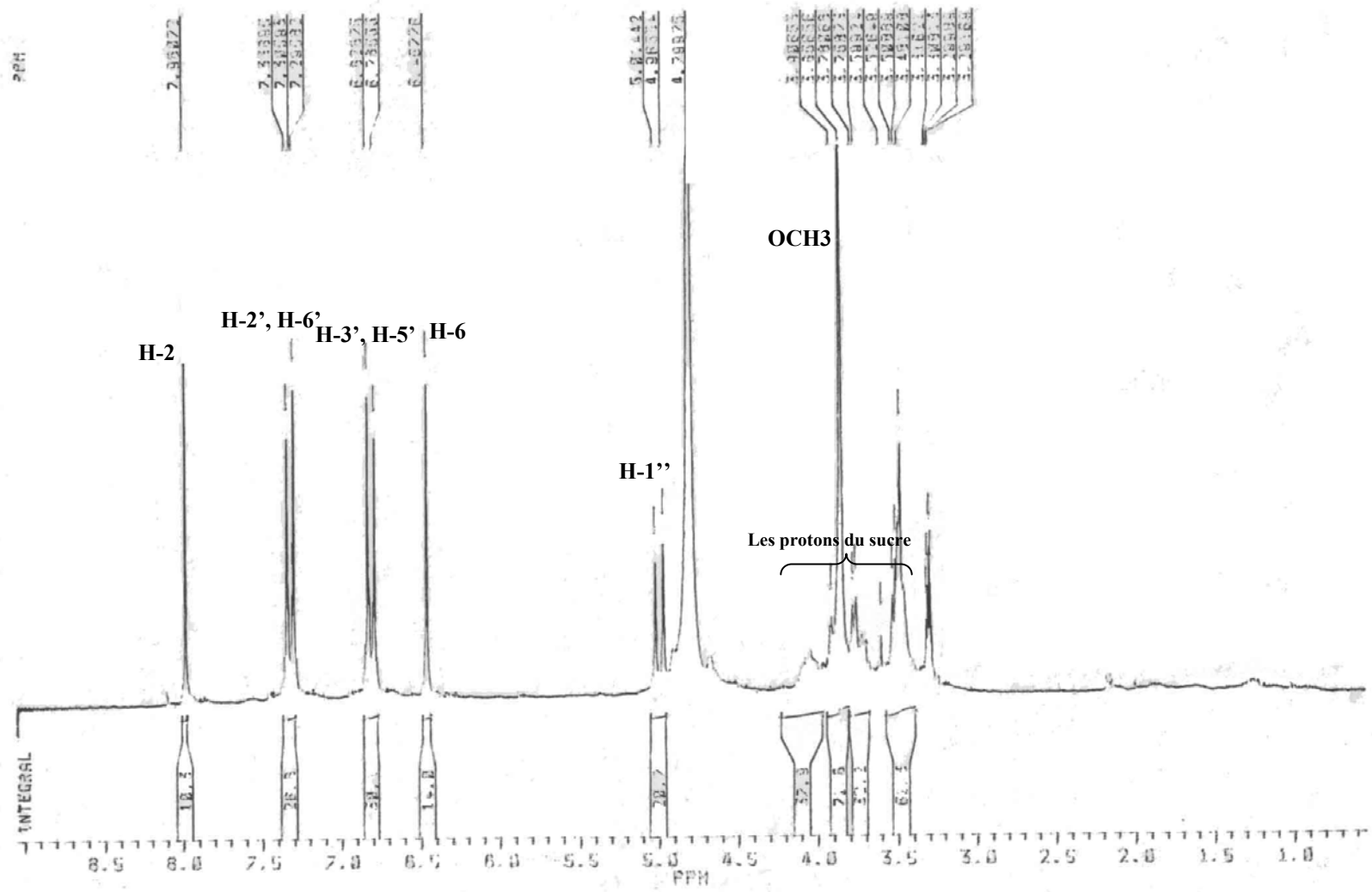
Toutes ces données rassemblées permettent d'écrire la structure finale de cette molécule :

4', 7-dihydroxy 8-C-glucosyl 5-methoxyisoflavone.

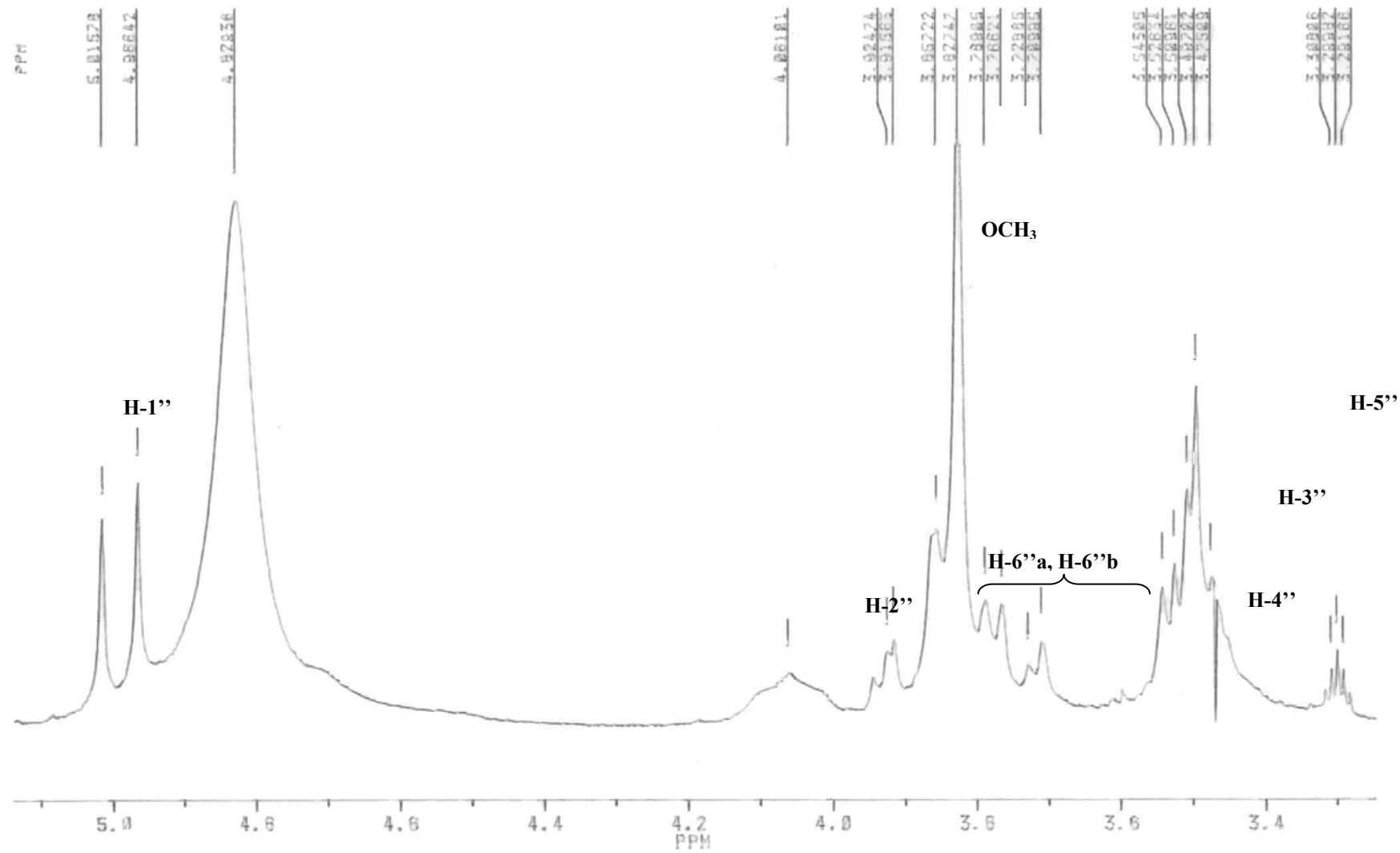


Une recherche bibliographique approfondie a montré que cette molécule est nouvelle. Ce résultat à fait l'objet d'une publication internationale [2] (voir annexe).

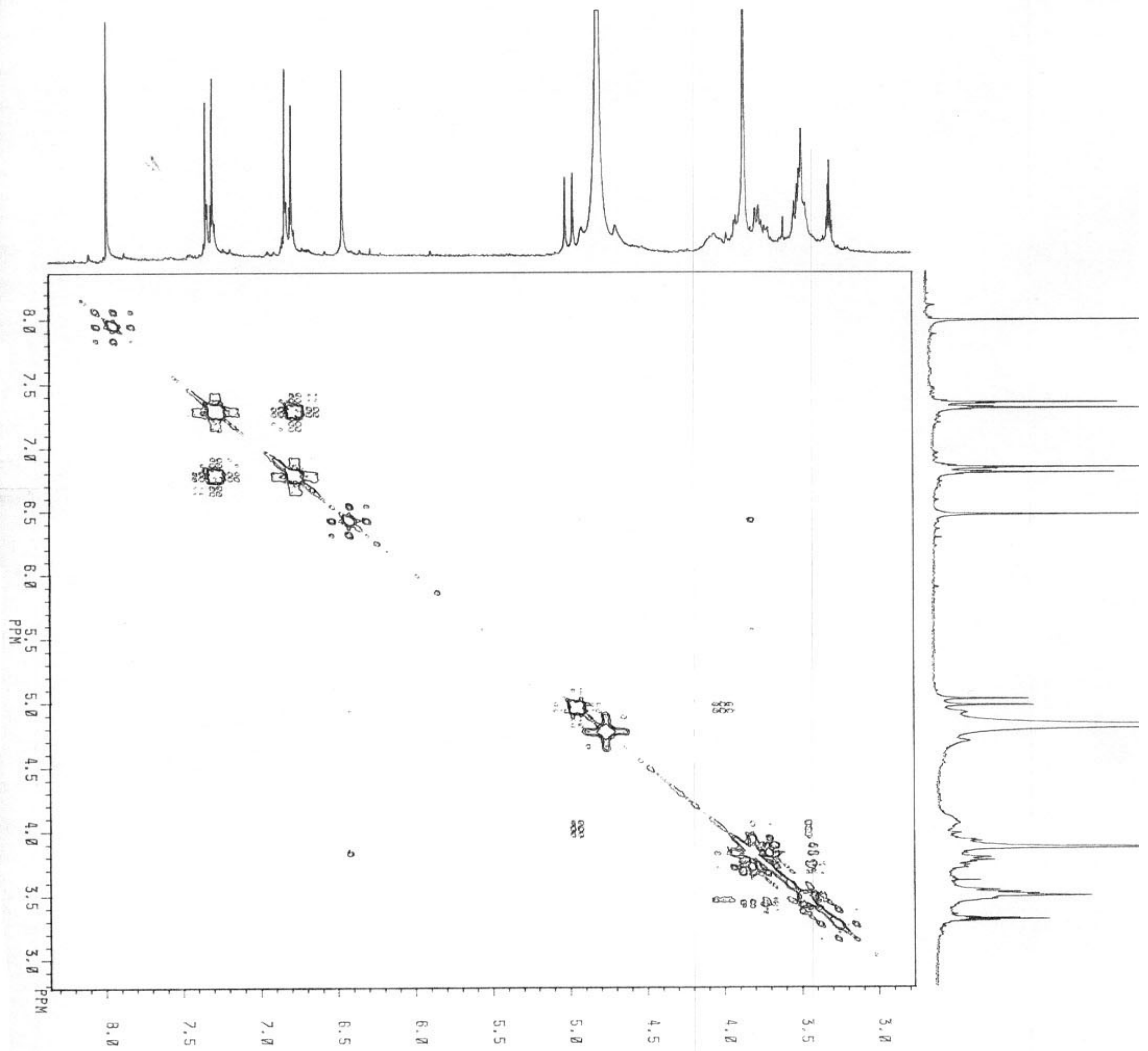
**Spectre n° IV-20: RMN ¹H (200 MHz, CD₃OD)
du composé SB4**

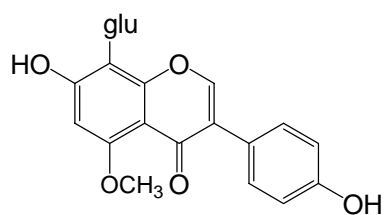


**Spectre n° IV-20bis: RMN ¹H étalé (3.2 à 5.2 ppm)
du composé SB4**

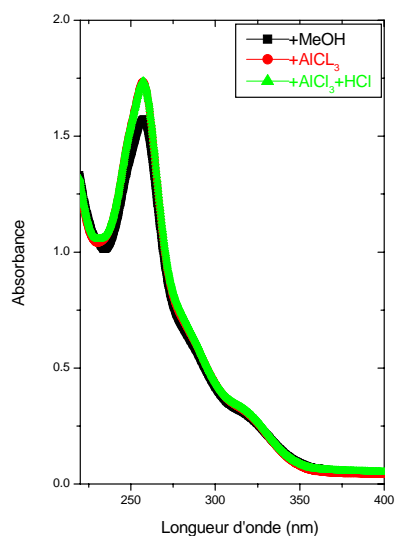
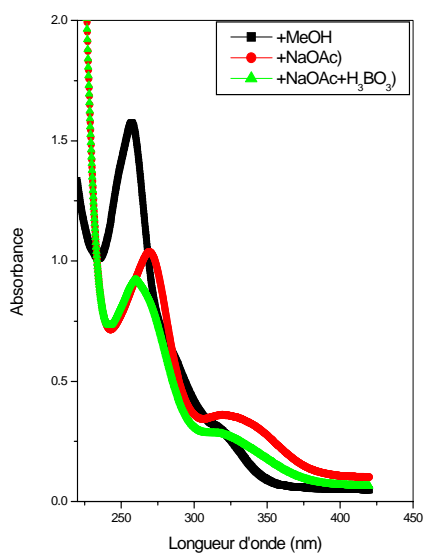
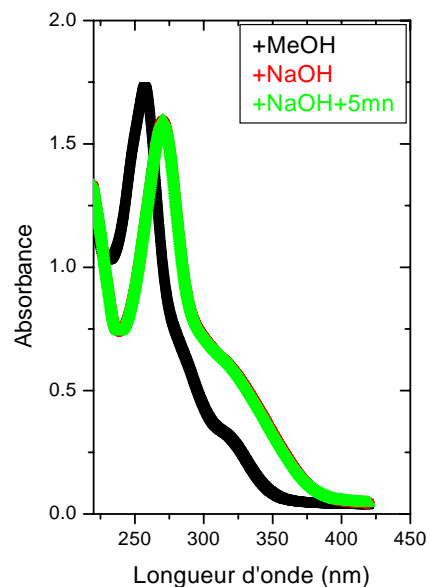
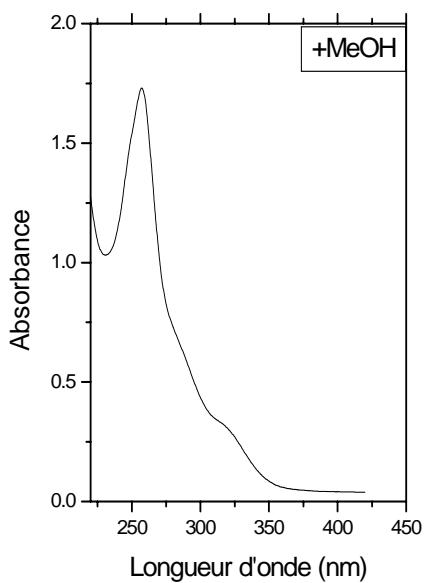


Spectre N° IV-21 : Spectre de corrélation COSY ($\delta^1\text{H}-\delta^1\text{H}$)



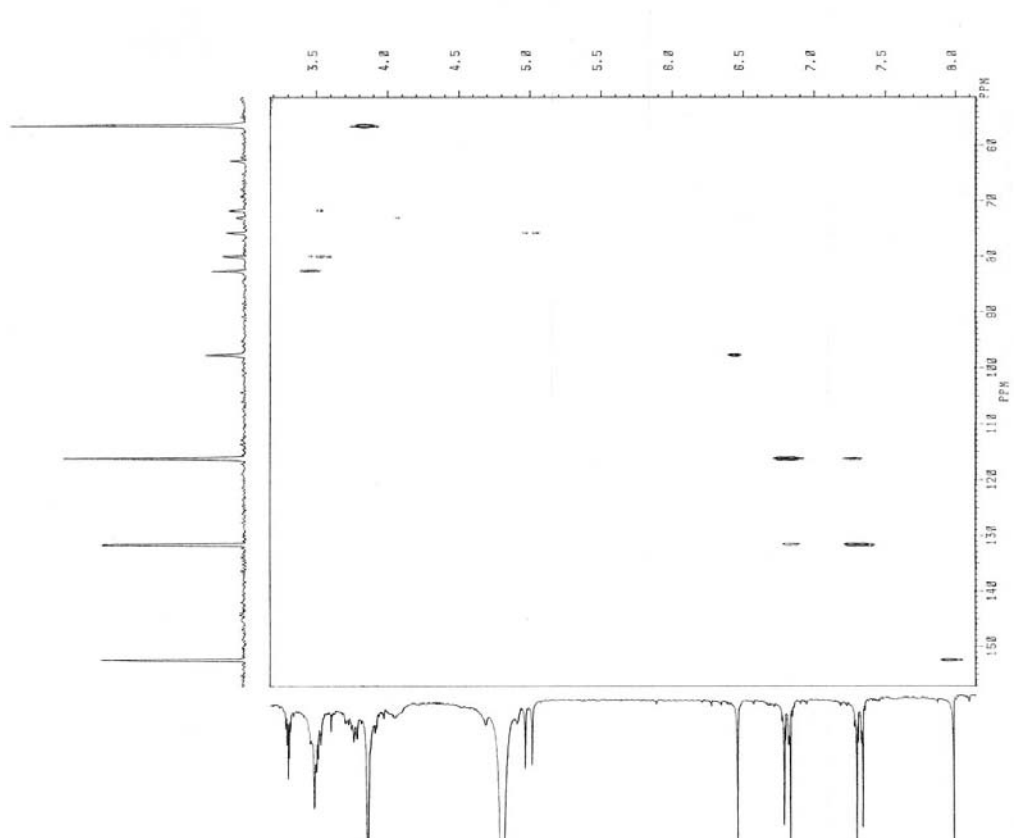


4', 7-dihydroxy 8-C-glucosyl 5-methoxyisoflavone.

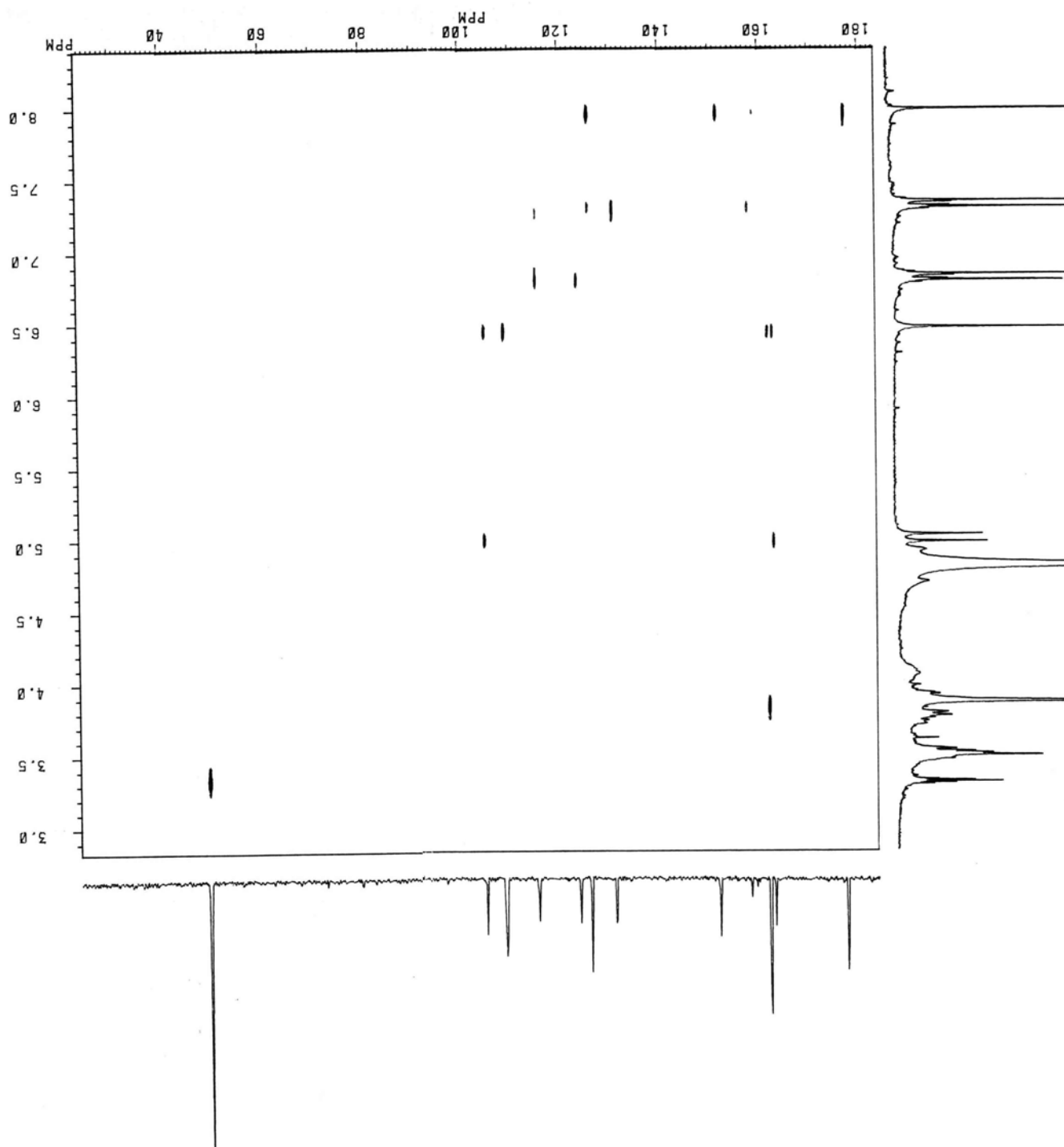


Spectre n° IV- 22: Série spectrale UV du composé SB4

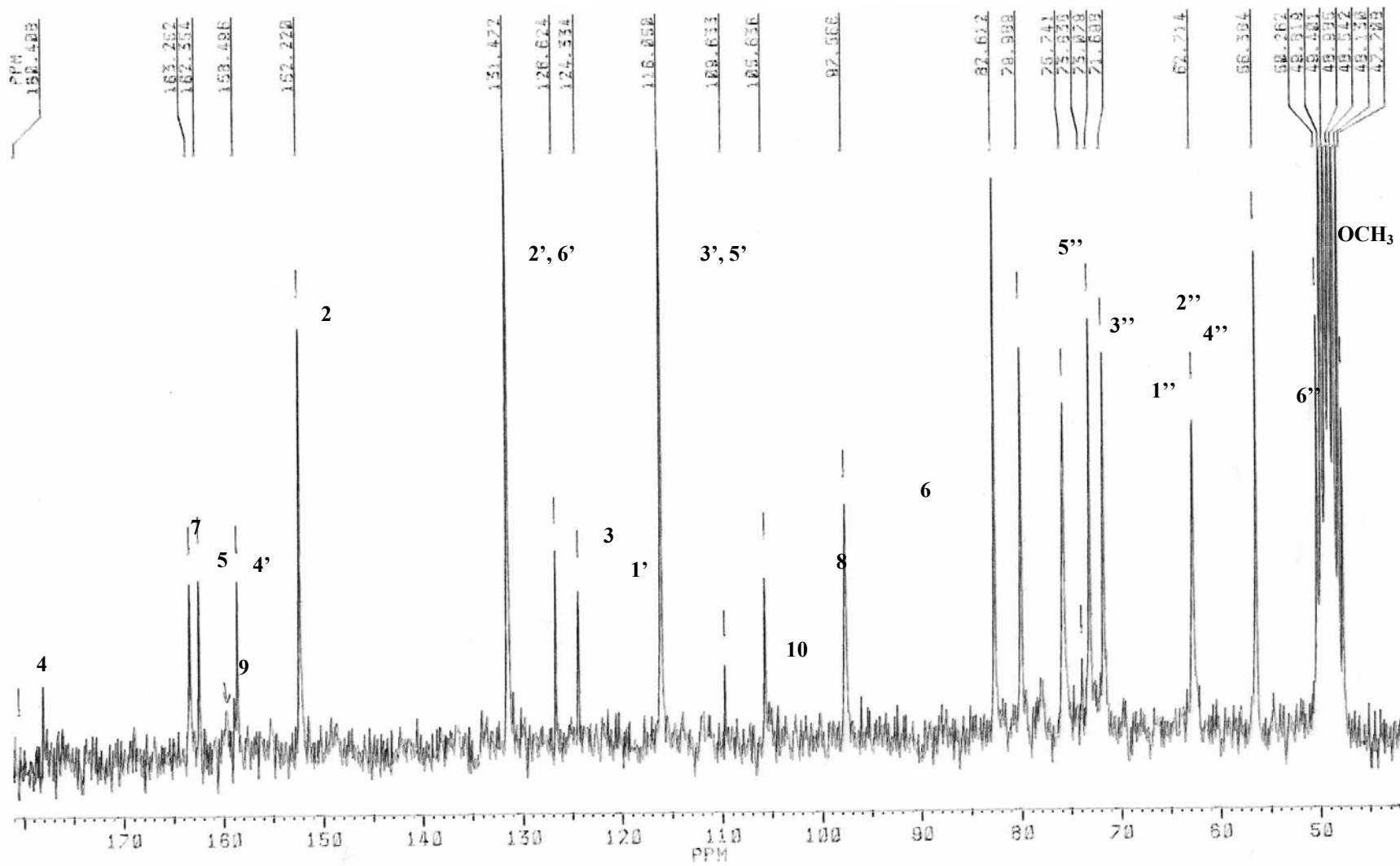
Spectre N° IV- 23 : Spectre expérience XH-CORR du composé SB4



Spectre N° IV-24: Spectre de corrélation COLOC (^1H - ^{13}C)



**Spectre n° IV-25 : RMN ¹³C (50 MHz, CD₃OD)
du composé SB4**



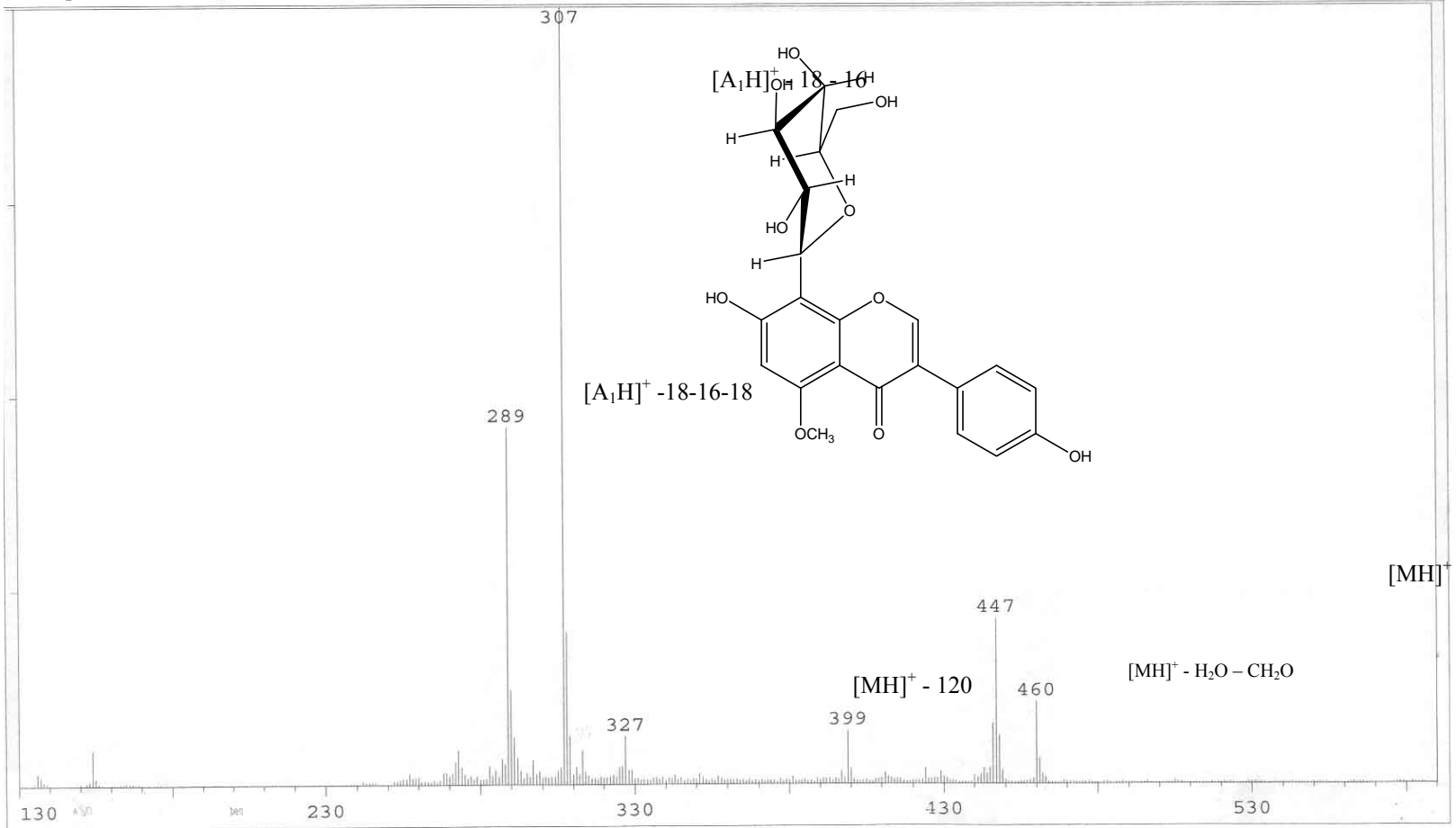
**Spectre n° IV-26: Spectre de masse (FAB)
du composé SB4**

Titre: DIJOUX masse= 446; réf: GSB4 ; fab matrice Glycérol

Fichier: f:\dijoux06 Date:26/01/20 Heure:15:33:39

DS=100 FS=1200 DA=130 FA=590 N=0 S=0.00000 Fact[->]*1

S=Moy[13->26] Bp=107 Ib=0.9003 Rét=00:00:39



Conclusion

Comme signalé au chapitre III et d'après nos résultats, il s'est avéré que *G. saharae* possède un métabolisme secondaire phénolique très diversifié du point de vue structurale. En effet, l'obtention à l'état pur de 24 produits a largement dépassé nos espérances, malheureusement, il aurait fallu partir d'une quantité plus importante de matériel végétal car pour les composés dont nous n'avons pas proposé de structures, les quantités obtenues ne nous ont permis que l'enregistrement de spectres RMN ^1H et de SMIE. Les données relatives à l'étude de ces spectres ne nous ont pas suffi pour proposer avec certitude des déterminations structurales vu la complexité des molécules entrevues.

IV-2- IDENTIFICATION DES PRODUITS ISOLÉS DE G. FERROX POIRRET

IV-2-1- Le composé FC112 :

Interprétation :

L'étude du spectre RMN ^{13}C de ce composé et les séquences DEPT 90 et 135 (spectre n° IV-27, tableau IV-19) montrent la présence de vingt atomes de carbone que nous pouvons répartir comme suit :

- Dix groupements CH_2 hybridés sp^3 dont un oxygéné ($\delta = 59,41$ ppm). En remarque, le CH_2 à $\delta = 29,67$ ppm ne peut être attribuable qu'aux graisses des solvants.
- Quatre groupements CH dont un éthylénique à $\delta = 123,05$ ppm.
- Cinq groupements CH_3 .
- Un carbone quaternaire éthylénique à $\delta = 140,31$ ppm.

A ce stade, on peut évaluer le nombre d'atomes d'hydrogènes à 39. Par ailleurs et vu les valeurs des déplacements chimiques des carbones et surtout des atomes d'hydrogènes (spectre n° IV-28, tableau IV-20) où l'on remarque :

- un multiplet à $\delta = 5,41$ ppm attribuable au CH éthylénique.
- Un doublet à $\delta = 4,15$ ppm ($J = 6,9$ Hz) attribuable au CH_2 oxygéné.
- Un doublet dédoublé à $\delta = 2,17$ ppm ($J = 7,4$ Hz) qui ne peut être attribué qu'à un CH_2 voisin d'un autre CH_2 et porté par le carbone quaternaire éthylénique.
- Tous les autres signaux apparaissent dans l'intervalle des déplacements chimiques inférieur à 1,7 ppm.

Tableau IV-19 : Données de la RMN ^{13}C et les séquences DEPT 90 et 135

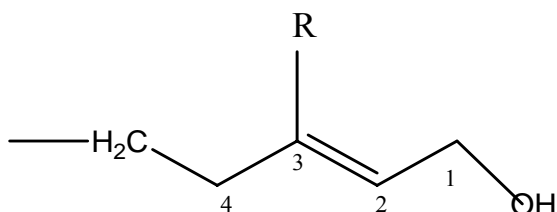
Déplacement chimique δ (ppm)	Attribution	DEPT	
		90	135
140,31	C-3	/	/
123,05	C-2	C-H	C-H
59,41	C-1	/	CH ₂
39,84	C-4	/	CH ₂
39,36	C-14	/	CH ₂
37,41	C-10	/	CH ₂
37,34	C-8	/	CH ₂
37,28	C-12	/	CH ₂
36,65	C-6	/	CH ₂
32,77	C-7	C-H	C-H
32,75	C-11	C-H	C-H
27,96	C-15	C-H	C-H
25,10	C-5	/	CH ₂
24,77	C-13	/	CH ₂
24,44	C-9	/	CH ₂
22,69	C-17	/	CH ₃
22,59	C-16	/	CH ₃
19,69	C-19	/	CH ₃
19,69	C-18	/	CH ₃
16,35	C-20	/	CH ₃

Tableau IV-20 : Données de la RMN ^1H

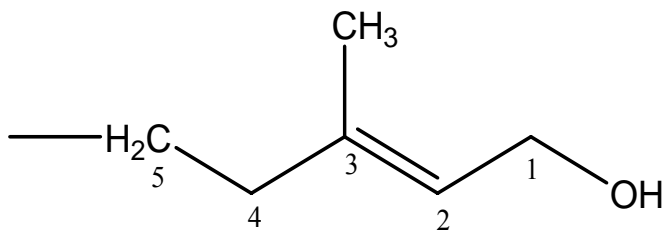
Déplacement chimique δ (ppm)	Multiplicité	J (Hz)	Attribution
5,41	m	/	C=CH-CH ₂
4,15	d (2H)	6,9	CH ₂ -OH
2,17	t (2H)	7,3 ; 7,6	-CH ₂ -C=C
1,67	s (3H)	/	CH ₃ -C=C
0,86	d (6H)	6,4	-CH (CH ₃) ₂
0,85	d (3H)	6,1	CH ₃ -CH
0,84	d (3H)	6,6	CH ₃ -CH

Ces observations permettent de suggérer que l'atome d'oxygène signalé plus haut sur un groupement CH_2 , ne peut être que sous la forme d'un groupement hydroxyle. Ce qui mène à la formule brute $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}$.

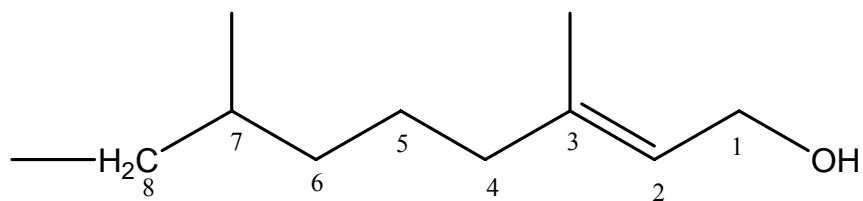
L'examen du spectre COSY (spectre n° IV-29) qui montre que le signal correspondant au CH_2OH corrèle avec le CH éthylénique suggère que ces deux atomes de carbone sont voisins ce qui permet d'écrire en tenant compte de ce qui a été dit précédemment une partie de la molécule sous forme :



Par ailleurs, ce même spectre montre une corrélation entre le CH éthylénique et le singulet d'intégration 3H à $\delta = 1,67$ ppm ce qui permet de placer un groupement méthyle sur la double liaison ceci est d'ailleurs correct vu la valeur du déplacement chimique de ce méthyle d'où la portion de structure :



Par ailleurs, le spectre COSY montre une corrélation entre le CH_2 en position 5 et un autre CH_2 , ce qui suppose que la position 6 est également sous forme d'un CH_2 . Ce dernier CH_2 montre une corrélation avec un CH, lequel corrèle avec un CH_3 et un autre CH_2 , d'où la portion de structure :



L'examen du spectre de l'expérience HMBC (spectre n°IV-30) confirme toutes ces données, notamment, la présence des corrélations entre les noyaux du groupe CH₂ oxygéné et les carbones éthyléniques et le carbone du méthyle en position 3 ainsi que des corrélations entre les protons de ce méthyle et les atomes de carbone éthylénique et le carbone du méthylène en position 4.

Outre le méthyle en position C-3, déjà signalé, les quatre autres apparaissent sous forme d'un doublet d'intégration 6H à $\delta = 0,86$ ppm ($J = 6,4$ Hz) signifiant la présence d'un groupement isopropyle dans la structure. Les deux autres apparaissent tous les deux sous forme de doublet à $\delta = 0,85$ ppm, ($J = 6,1$ Hz) et $\delta = 0,84$ ppm, ($J = 6,6$ Hz) signifiant la présence de deux méthyles sur un groupement CH.

Toutes ces données comparées avec celles se trouvant dans la littérature [3-5] mènent à la structure du phytol.

L'examen du spectre (SMIE) spectre n°IV-31, tableau IV-21) montre des fragments en tout point équivalentes à celle attendu pour le phytol, notamment la perte d'une molécule d'eau, d'une molécule d'hydrogène, d'une molécule de butène et d'une molécule d'hydrogène donnant ainsi le fragment à $m/z = 218$.

Par ailleurs, ce spectre montre des fragmentations correspondants à la chaîne hydrocarbonée, notamment les signaux à $m/z = 57$ et 55, ainsi que des fragments plus lourds de 14 unités de masse souvent réarrangés (perte de H₂).

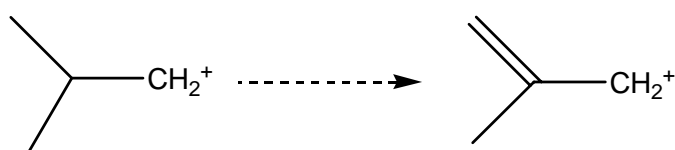
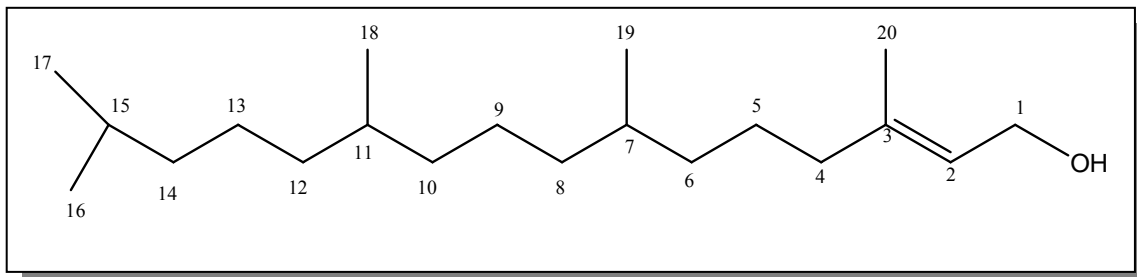


Tableau IV-21 : Données de la RMN ¹H

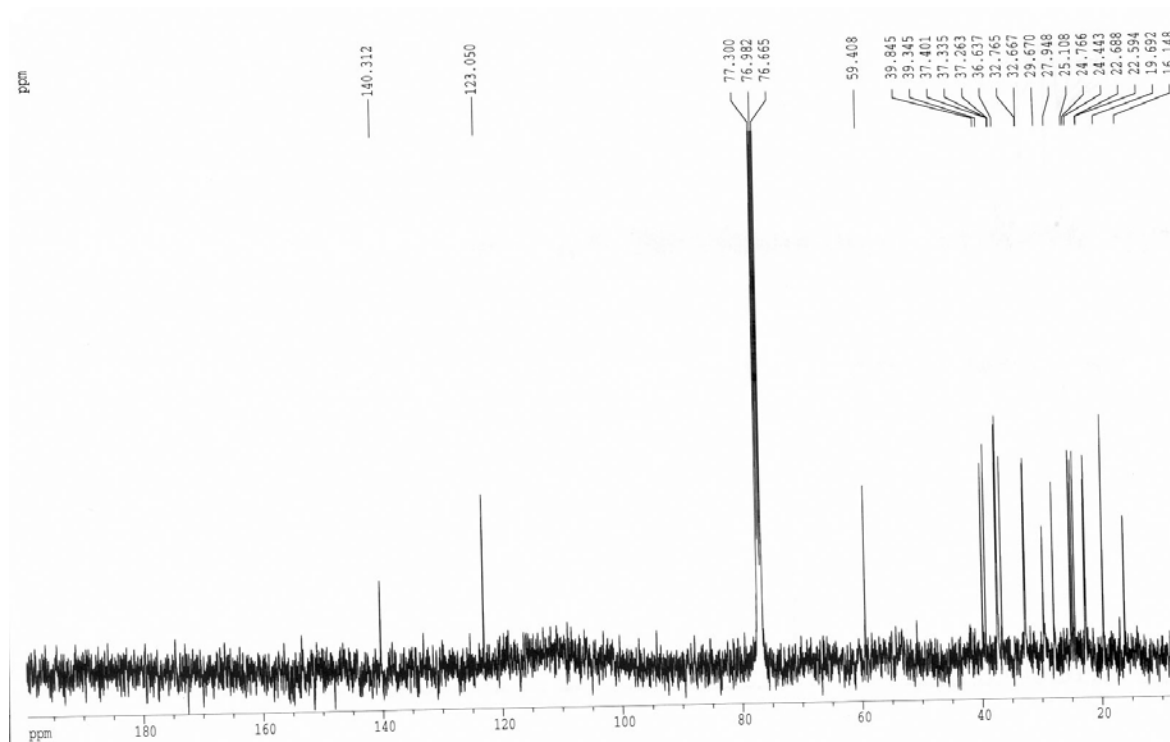
Formule brute	C ₂₀ H ₄₀ O	C ₂₀ H ₃₈	C ₁₆ H ₂₄
Fragment	[M] ⁺	[M- 18] ⁺	[M- 18-2-56-2] ⁺
<i>m/z</i>	296	278	218
Int. Rel.	4,69	8,72	47,65

L'ensemble de ces ions confirme la présence de la chaîne hydrocarbonée du phytol.

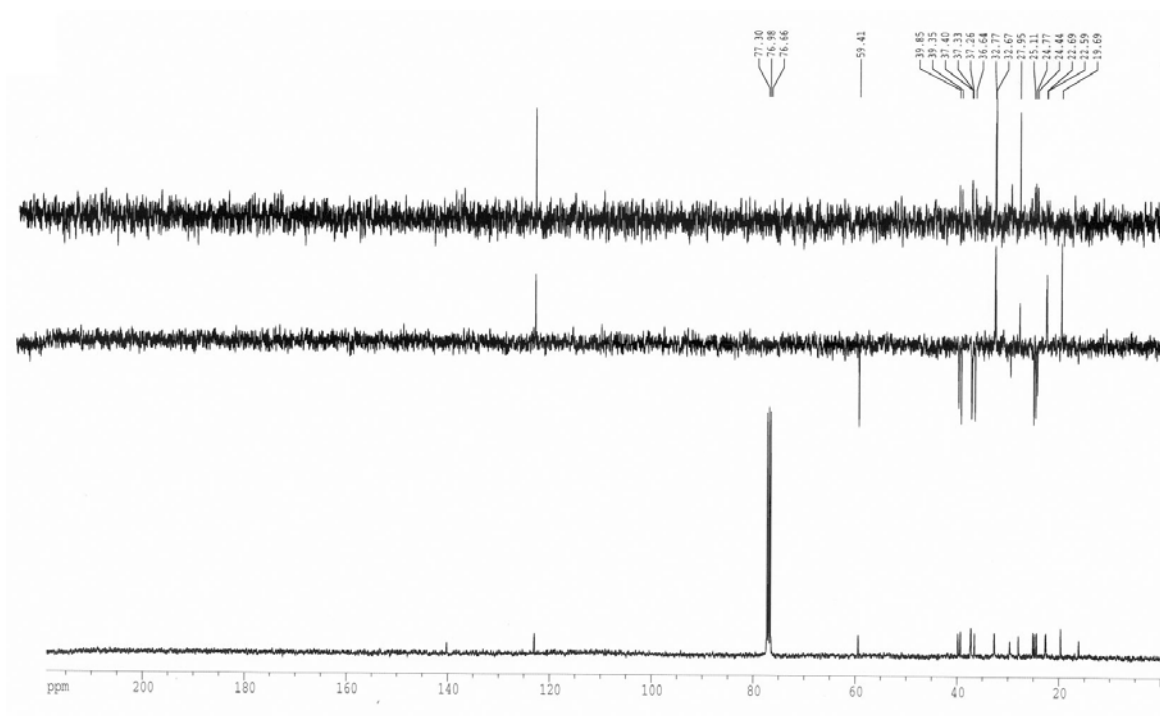


3, 7, 11, 15-tetraméthyl-2-hexadec-2-én--1ol connue sous le nom de **Phytol**

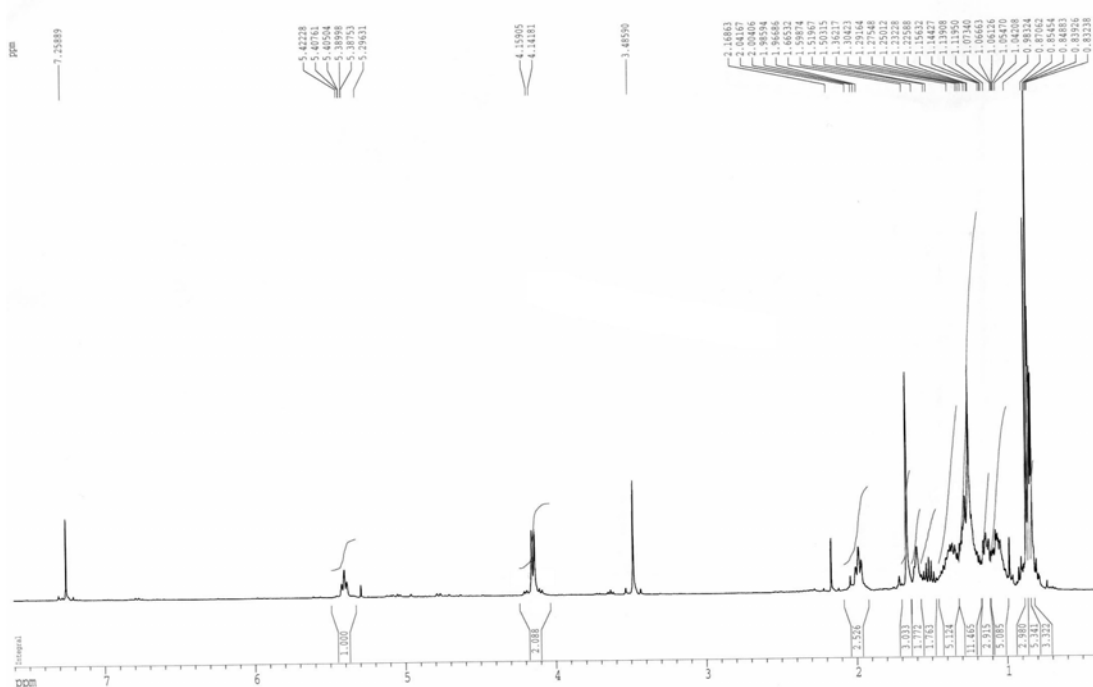
**Spectre n°IV-27 : RMN ^{13}C amplifié (100 MHz, CDCl_3)
du composé FC112**



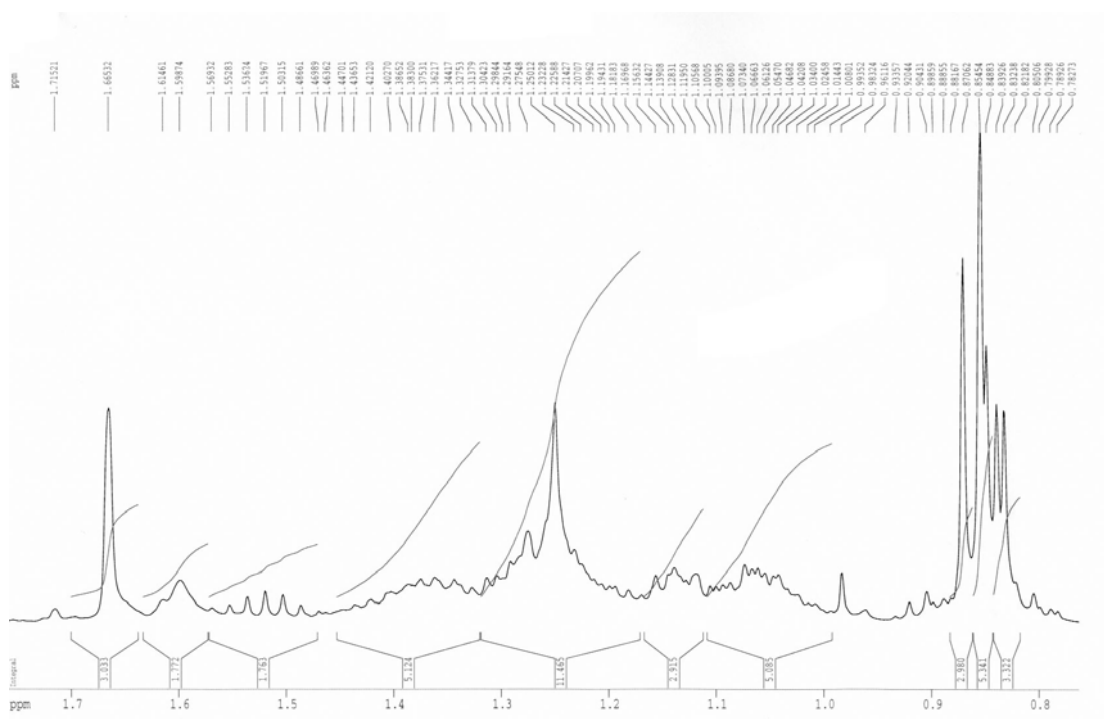
Spectre n°IV-27 bis: RMN ^{13}C et séquences DEPT 90 et 135 du composé FC112



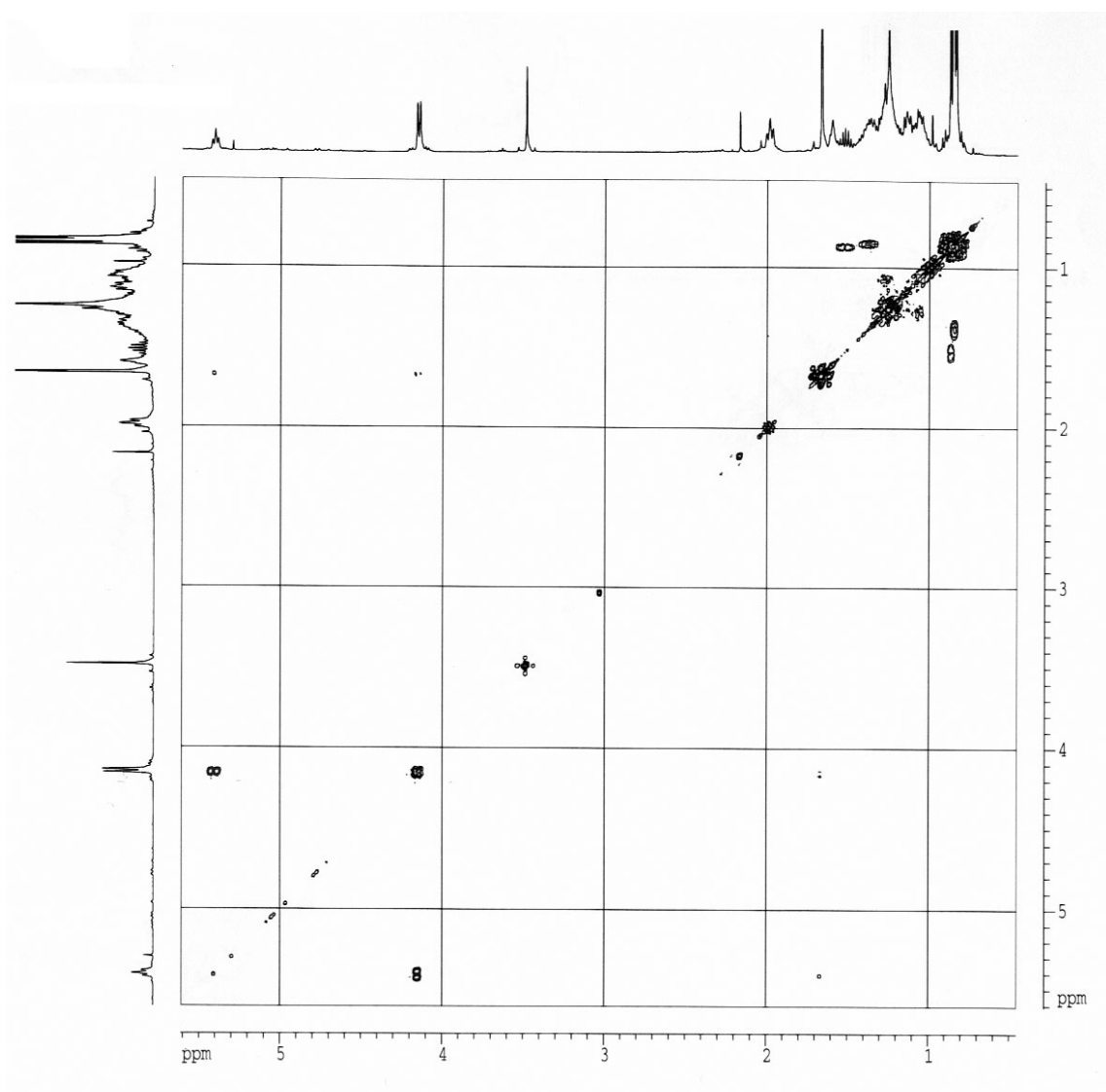
Spectre n°IV-28 : RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) du composé FC112



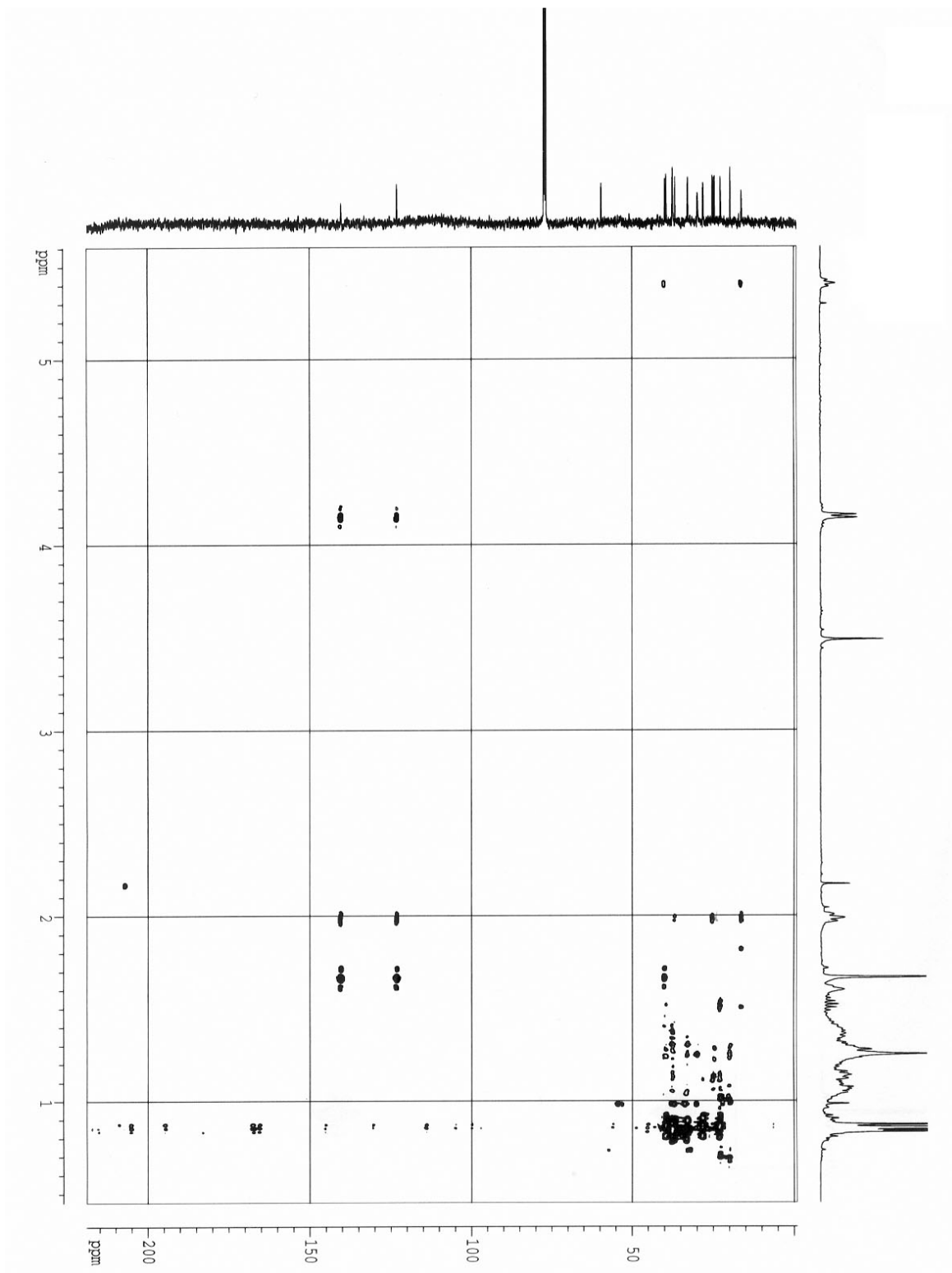
Spectre n°IV-28bis: RMN ¹H étalé (0.8-1.7 ppm) du composé FC112



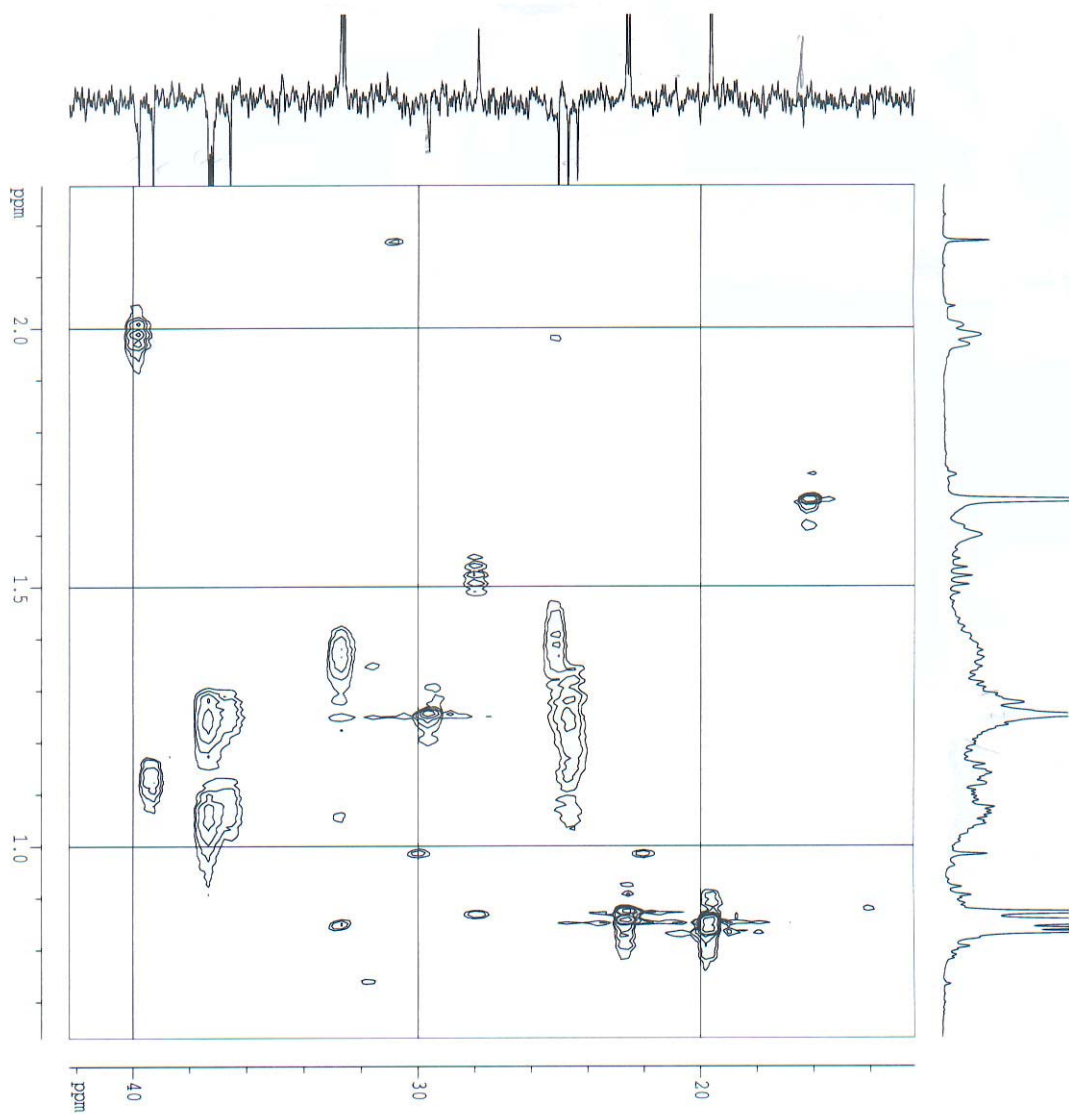
**Spectre n° IV-29 : RMN COSY δ ^1H - δ ^1H (400 MHz, CDCl_3)
du composé FC112**



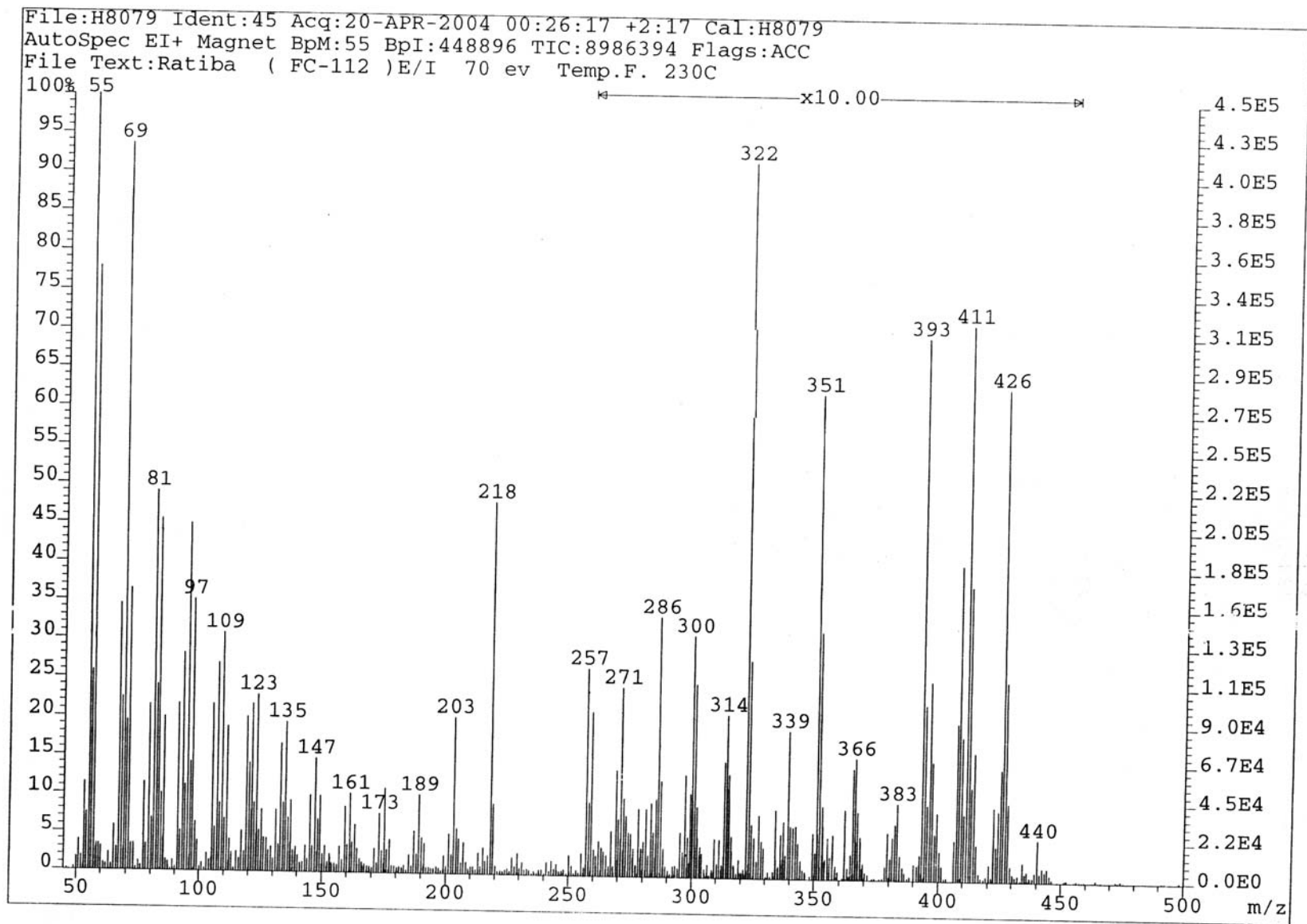
Spectre n°IV-30 : RMN HMBC (400 MHz, CDCl₃)
du composé FC112



**Spectre n°IV-30 bis: RMN HSQC (400 MHz, CDCl₃)
du composé FC112**



Spectre n°IV-31 : Spectre SMIE du composé FC131



IV-2-2- Le composé FC131 :

Interprétation :

Le spectre de masse à haute résolution (SMHR) (spectre n°IV-32) du composé FC131 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 & BUCHARD 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.

Ce spectre montre également la présence d'un ion à $m/z = 396,3221$ (63,89%) correspondant au départ par réarrangement d'une molécule d'eau confirmant la présence d'un groupement hydroxyle dans la molécule. Cet ion se fragmente à son tour pour donner un pic à $m/z = 381,3172$ (21,22%) correspondant au départ d'un radical méthyle, ce qui est largement attendu pour les stérols.

La structure stérol est appuyée par le signal à $m/z = 273,2379$ (17,96%) correspondant à la perte de la chaîne latérale ($C_{10}H_{21}$) par l'ion moléculaire ce qui est connue pour les stérols. Cette rupture 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 des stérols sont résumées dans le tableau IV-22 :

Tableau IV-22 : 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-33) dans CDCl_3 montre :

- un doublet large à $\delta = 5,35$ ppm d'intégration 1H correspondant au proton éthylénique connue 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 centré à $\delta = 0,86$ ppm correspondant aux deux méthyles isopropyliques qui sont diastéréotopiques et par conséquent magnétiquement non équivalents et au méthyle du groupement éthyle respectivement.

Le tableau IV-23 rassemble les données de la RMN ^1H du composé FC131.

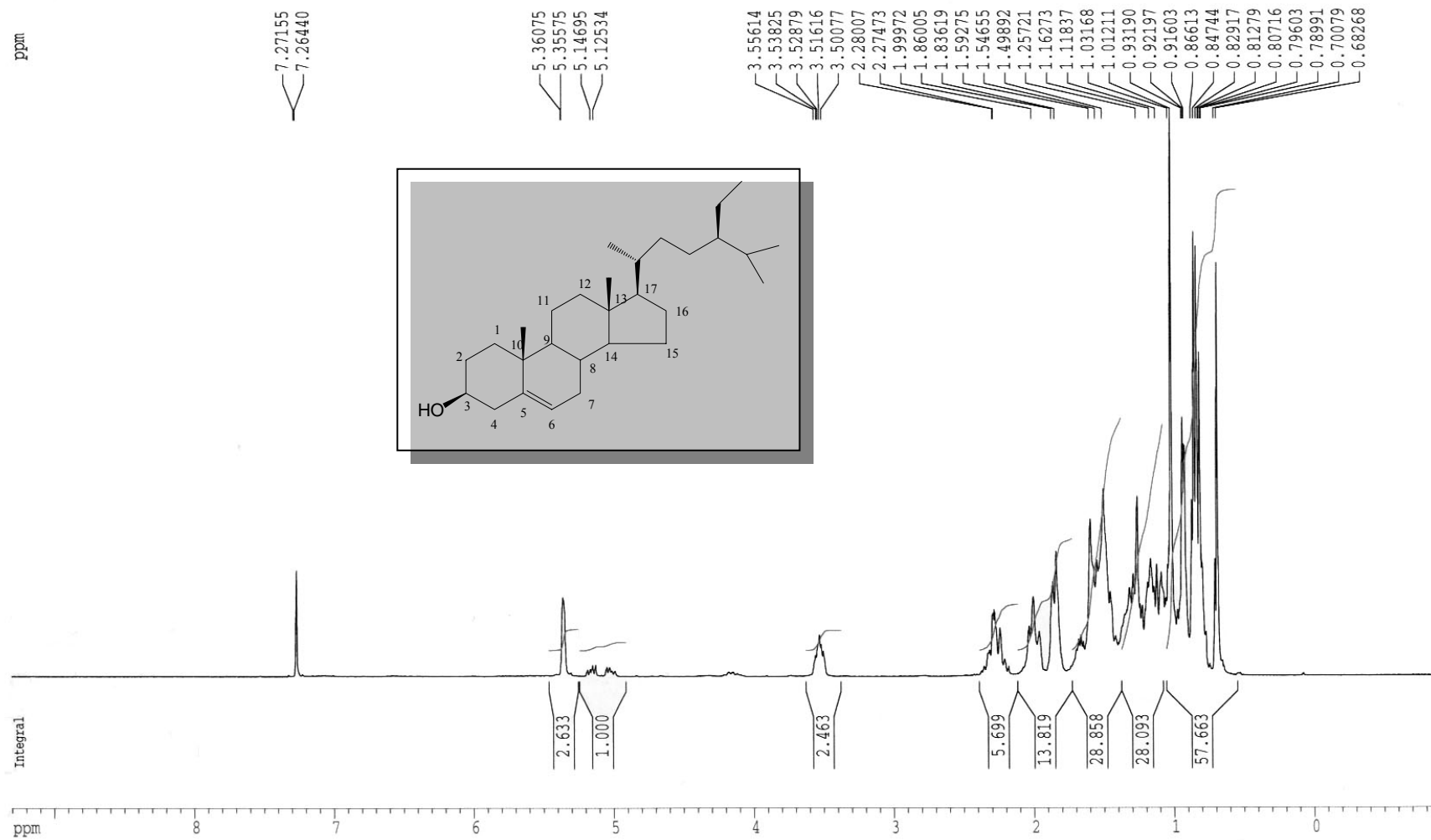
Tableau IV-23 : Données de la RMN ^1H

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

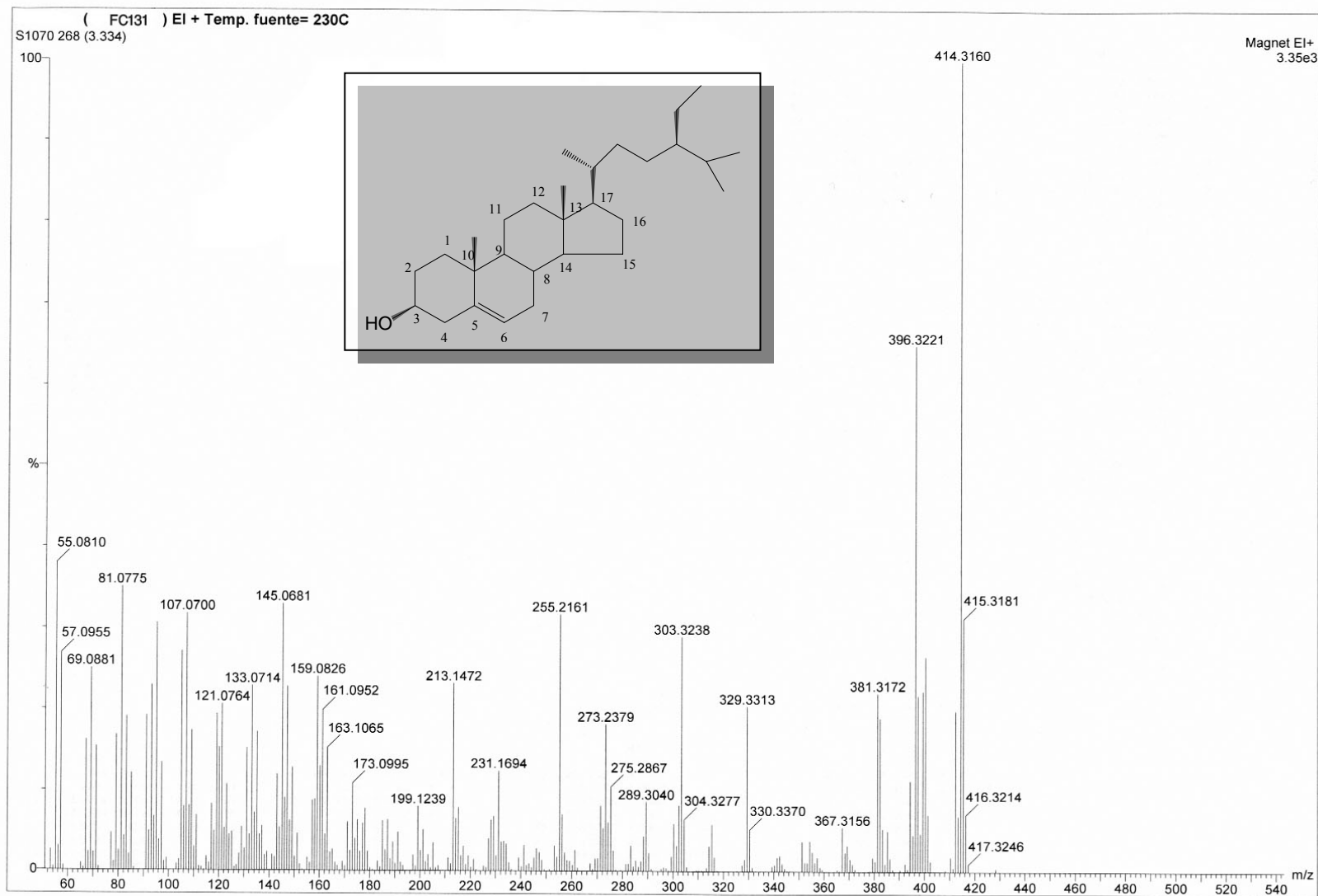
Le spectre RMN ^{13}C et les séquences DEPT 135 et 90 (spectre n°IV-34) confirment la présence de la double liaison trisubstituée par les signaux à $\delta = 140,8$ ppm, relatif à un carbone éthylénique quaternaire (C-5) et à $\delta = 121,6$ ppm relatif à un CH éthylénique (C-6), ainsi que la présence d'un CH oxygéné à $\delta = 71.7$ ppm relatif à (C-3) portant la fonction alcool.

L'ensemble de ces données comparées aux résultats de la littérature [6-8] ainsi que la co-chromatographie avec un échantillon authentique mène au β -sitostérol.

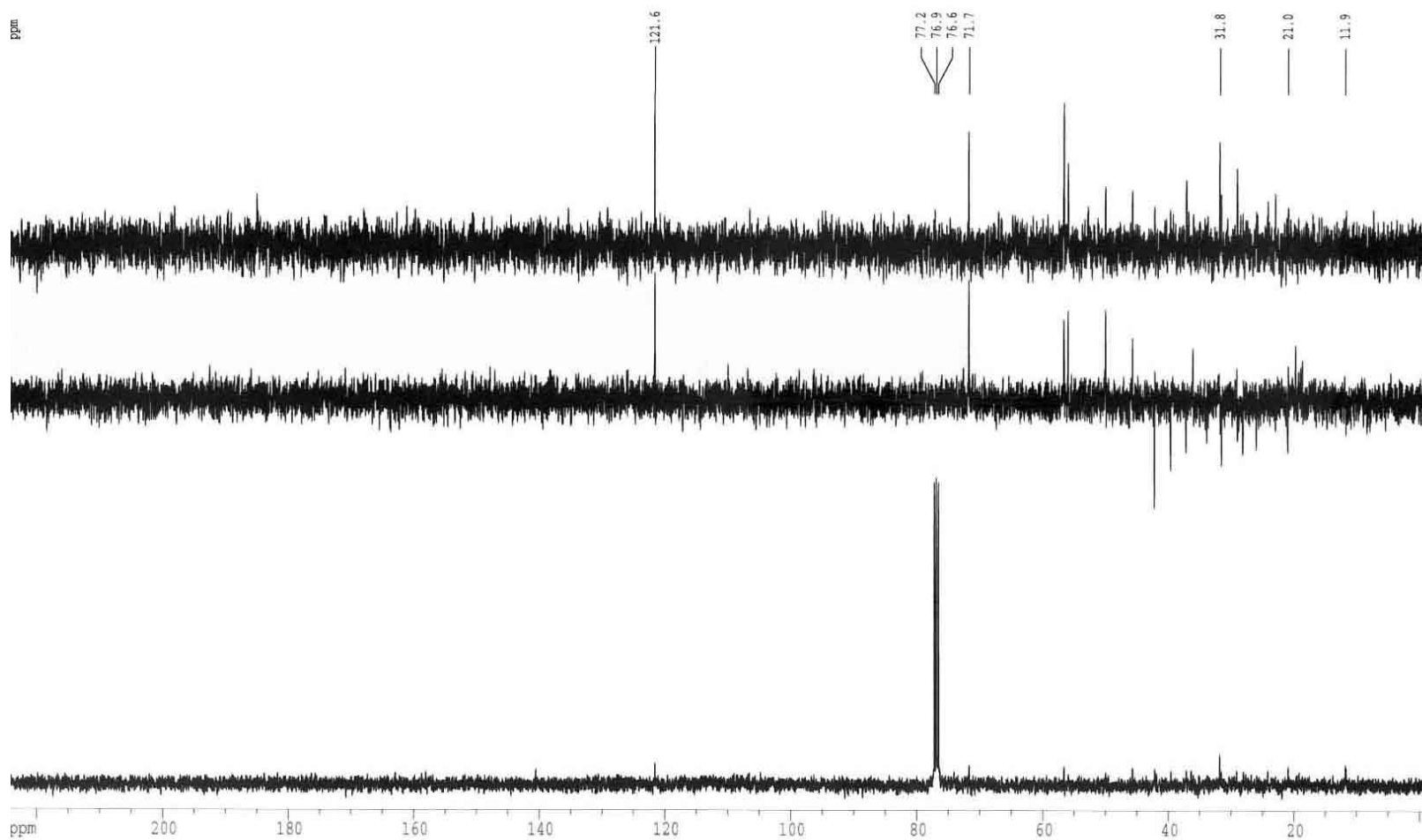
**Spectre n°IV-33 : RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)
du composé FC131**



Spectre n°IV-32 : Spectre SMIE du composé FC131



Spectre n°IV-34 : Spectre RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3)
du composé FC131



IV-2-3- Le composé FA83 :

Interprétation :

- La couleur orange fluorescente sous 365 nm oriente vers une structure d'isoflavone.

Les données de la série spectrale UV (spectre n° IV-35) montrent :

- La bande I sous forme d'un épaulement à environ 331 nm caractéristique d'un squelette de type isoflavone.
- le déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc ($\Delta\lambda = +8$ nm) indique la présence d'un OH libre en 7.
- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans le MeOH confirme la présence d'un OH libre en 5 ($\Delta\lambda = +43$ nm).

Les données relatives à la série spectrale UV sont rassemblées dans le tableau IV- 24

Tableau n° IV-24 : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	331Ep.	/	261	isoflavone
+ NaOH	Ep.	323	274	
+AlCl ₃	374	310	273	
+AlCl ₃ /HCl	374	310	273	OH libre en 5
+NaOAc	Ep.	/	269	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	Ep.	/	261	/
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV-36) montre :

- Un singlet d'intégration 1H à $\delta = 8,06$ ppm attribuable à H-2, confirmant la structure d'une isoflavone.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,35$ ppm ($J = 2.1$ Hz) attribuable à H-8, le second à $\delta = 6,22$ ppm ($J = 2.1$ Hz) attribuable à H-6 indiquant ainsi la substitution des positions 5 et 7.
- Deux autres doublets d'intégration 2H chacun, à $\delta = 7,37$ et à $\delta = 6,84$ ppm, ($J=8,5$ Hz) attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement confirmant la substitution du cycle B en 4'.

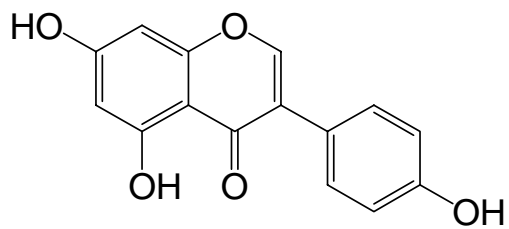
Les données relatives à la RMN ^1H sont rassemblées dans le tableau IV-25

Tableau n° IV-25: Données de RMN ^1H

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	multiplicité (J Hz)	Attribution
8,06	1H	s	H-2
7,37	2H	d (8,5)	H-2', H6'
6,84	2H	d (8,5)	H-3', H-5'
6,35	1H	d (2,1)	H-8
6,22	1H	d (2,1)	H-6

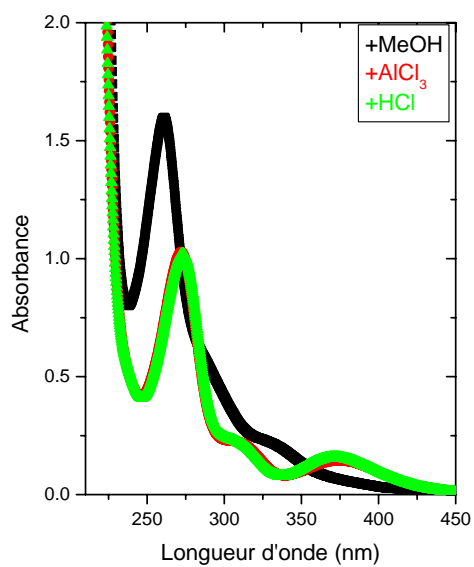
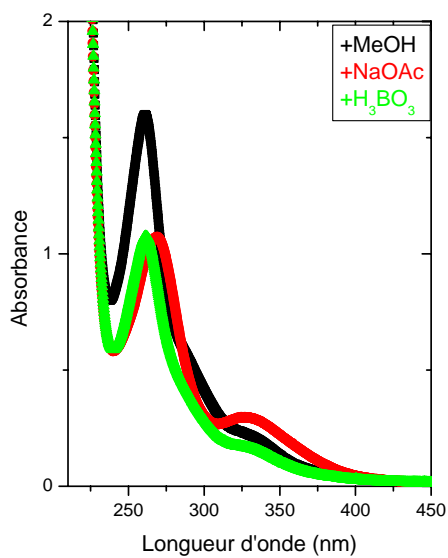
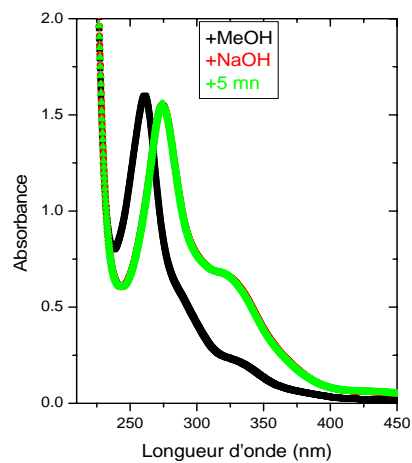
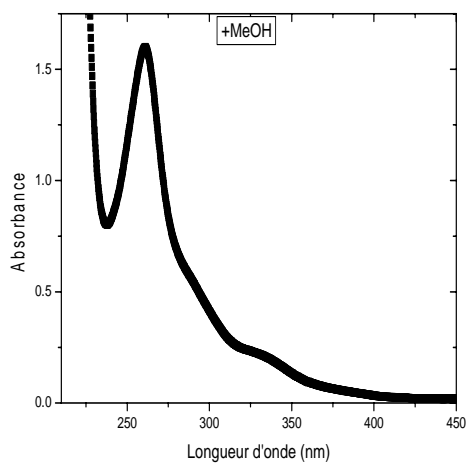
Toutes ces données complétées par la littérature mènent à la structure du composé :

4', 5, 7-trihydroxyisoflavone (Génistéine), déjà isolé de l'espèce *G. saharæ* Coss. et Dur. Cette molécule est majoritairement présente dans l'extrait acétate d'éthyle de cette espèce.



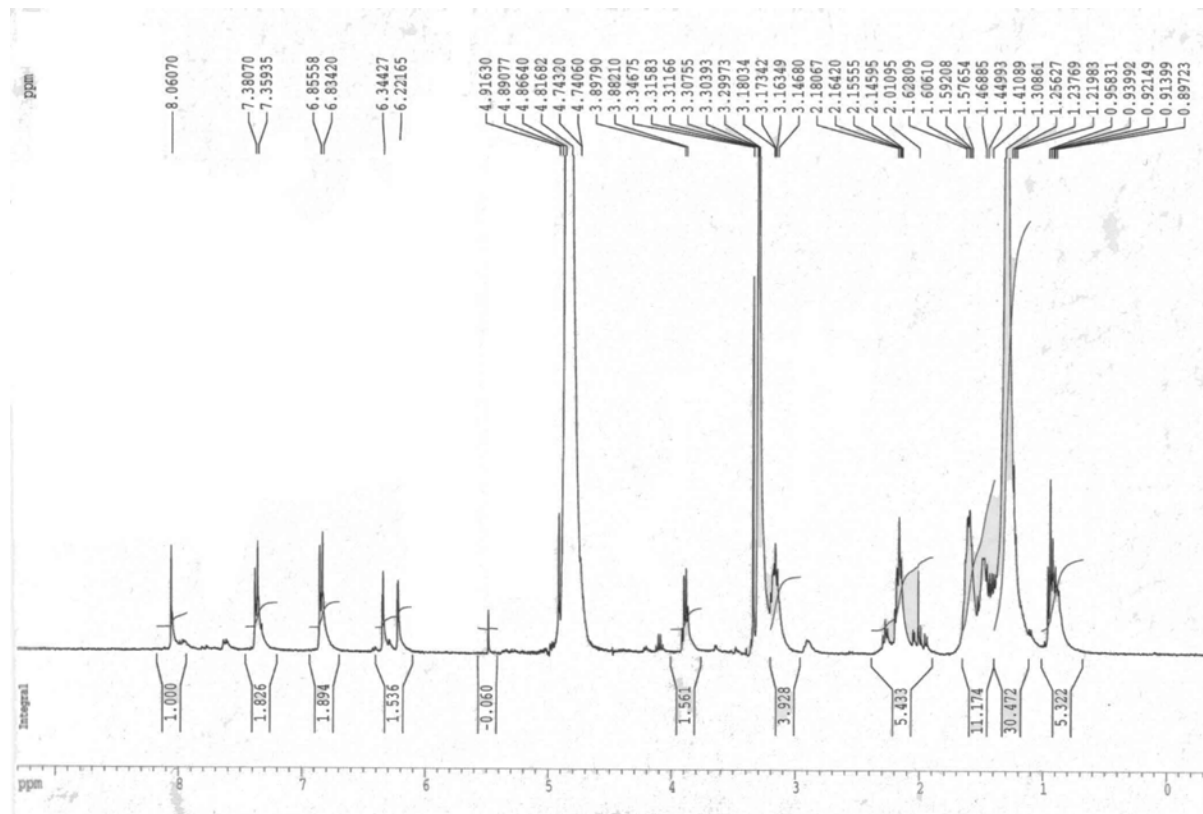
4', 5, 7-trihydroxyisoflavone

Génistéine

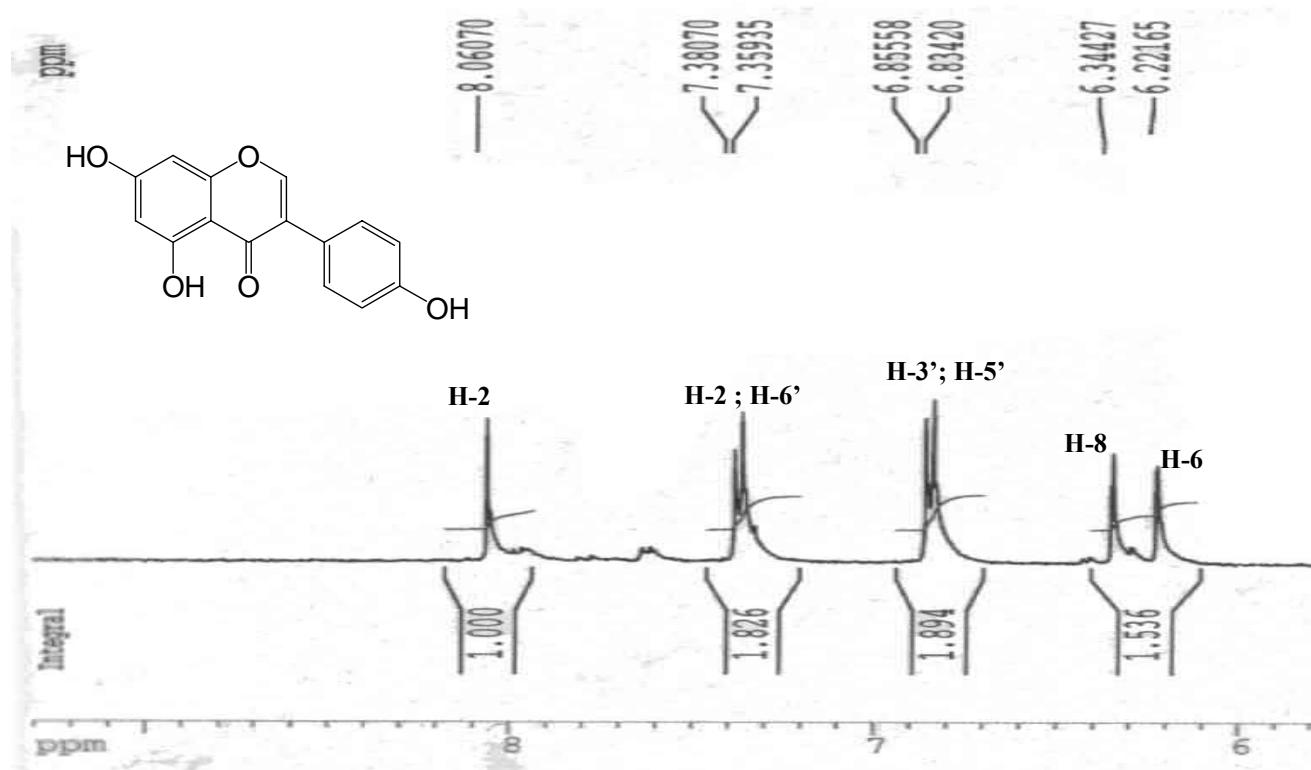


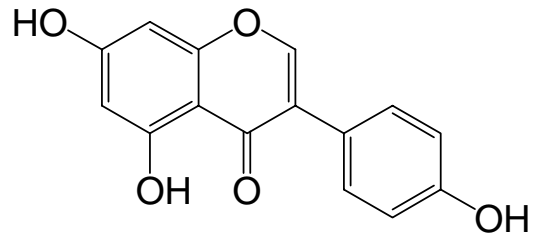
Spectre n°IV-35 : Spectre UV du composé FA83

**Spectre n°IV-36 : RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz)
du composé FA83**



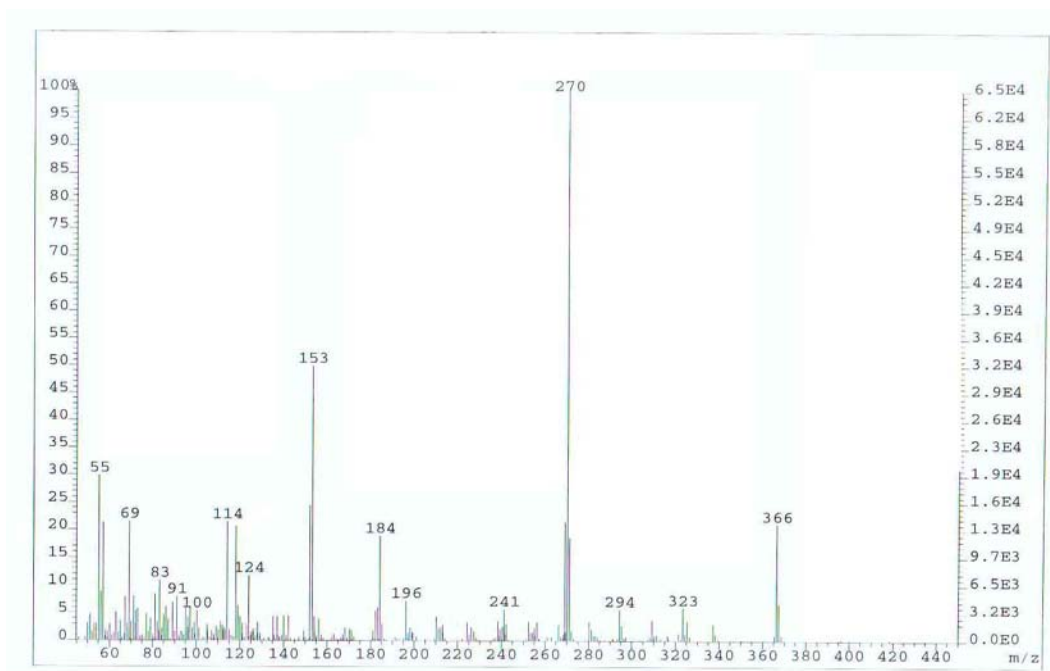
Spectre n°IV-36bis : RMN¹H étalé (6-9 ppm)
du composé FA83





4', 5, 7-trihydroxyisoflavone

(Génistéine)



Spectre N° IV-37 : Spectre SMIE du composé FA83

IV-2-4 : Le composé FA122

Interprétation :

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

Les données de la série spectrale UV (spectre n° IV-37, tableau n° IV-26) montrent :

- Le maximum d'absorption de la bande I à 335 nm indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 57$ nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse indique la présence d'un OH libre en 4', ainsi l'apparition d'une nouvelle bande à 325 nm indique la présence d'un OH libre en 7.
- L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = + 8$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le MeOH confirme la présence d'un OH libre en 7.
- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda = + 45$ nm) révèle la présence d'un OH libre en 5.
- L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant le spectre $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au spectre de AlCl_3 , laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Tableau IV-26: Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Autres bandes		Bande II	Commentaire
MeOH	335	/		268	flavone
+ NaOH	392	325		276	OH libre en 4' OH libre en 7
+AlCl ₃	382	350	303	274	Pas de ortho di-OH sur le cycle B OH libre en 5
+AlCl ₃ /HCl	380	318	303	278	
+NaOAc	380	308		276	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	343	/		269	/
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn					

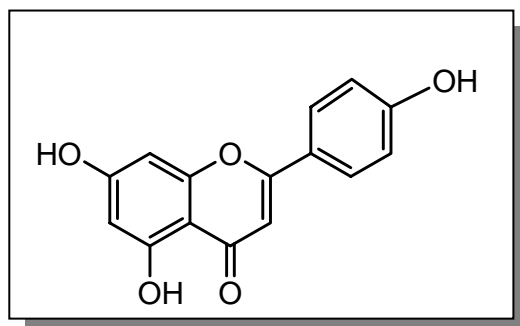
L'examen du spectre RMN proton (spectre n° IV-38, tableau IV-27) montre :

- Un singulet à $\delta = 6,46$ ppm attribuable à H-3, ce qui confirme la structure d'une flavone.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,32$ ppm, le second à $\delta = 6,15$ ppm ($J = 2.1$ Hz) attribuables à H-8 et H-6 respectivement, confirmant l'hydroxylation des positions 5 et 7.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun, à $\delta = 7,66$ et à $\delta = 6.82$ ppm, ($J=8,4$ Hz) attribuables à H-2', H-6' et à H-3', H-5' indiquant ainsi la substitution du noyau B en position 4'.

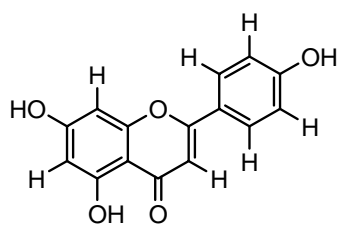
Tableau IV-27: Données de la série spectrale UV

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attributions
7.66	2H	d (8.4)	H-2', H-6'
6.82	2H	d (8.4)	H-3', H-5'
6.46	1H	s	H-3
6.32	1H	d (2.1)	H-8
6.15	1H	d (2.1)	H-6

L'ensemble des données de la série spectrale UV ainsi que la RMN 1H oriente vers le composé : **4', 5, 7-trihydroxyflavone** connue sous le nom d'**Apigénine**.

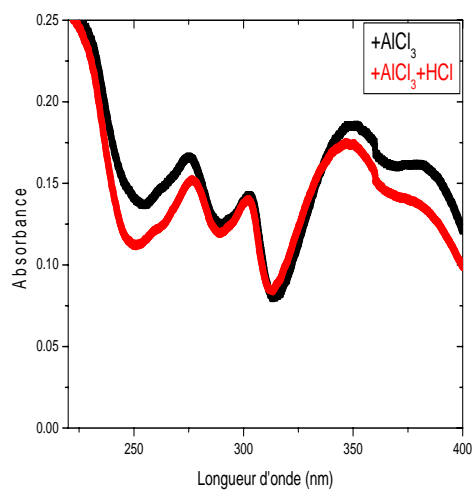
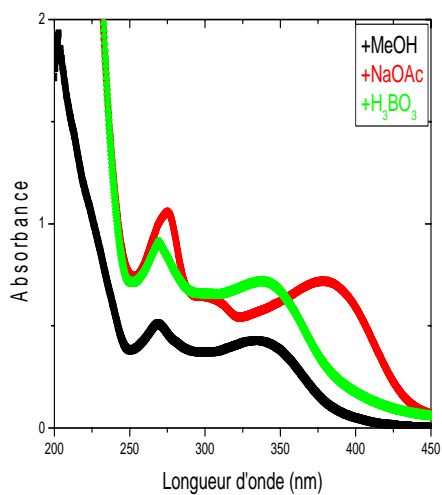
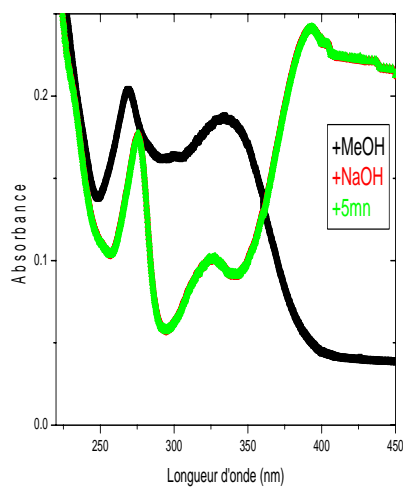
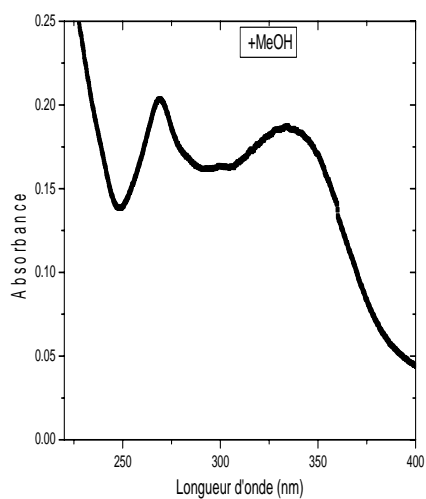


La structure de cette molécule est encore confirmée par le spectre SMIE (spectre n° IV-39) qui donne un pic moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 270$ (100%) correspondant à la formule brute $C_{15}H_{10}O_5$ indiquant ainsi un squelette trihydroxyflavone. La présence du pic à $m/z = 242$ correspond à $[M-CO]^+$, de même le pic à $m/z = 153$ correspond à $[A_1+H]^+$, le pic à $m/z = 118$ correspond à $[B_1]^+$.



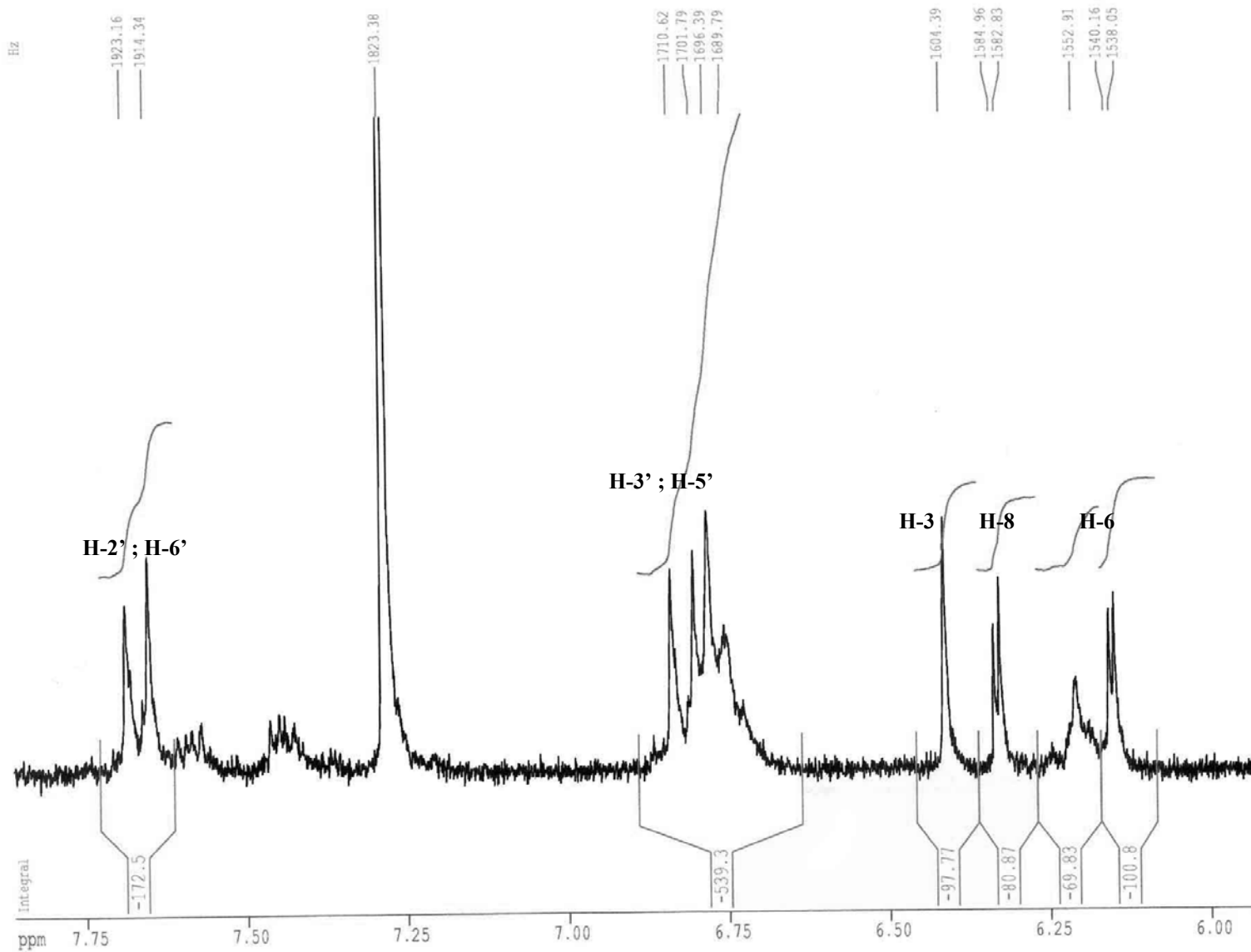
4', 5, 7-trihydroxyflavone

Apigénine

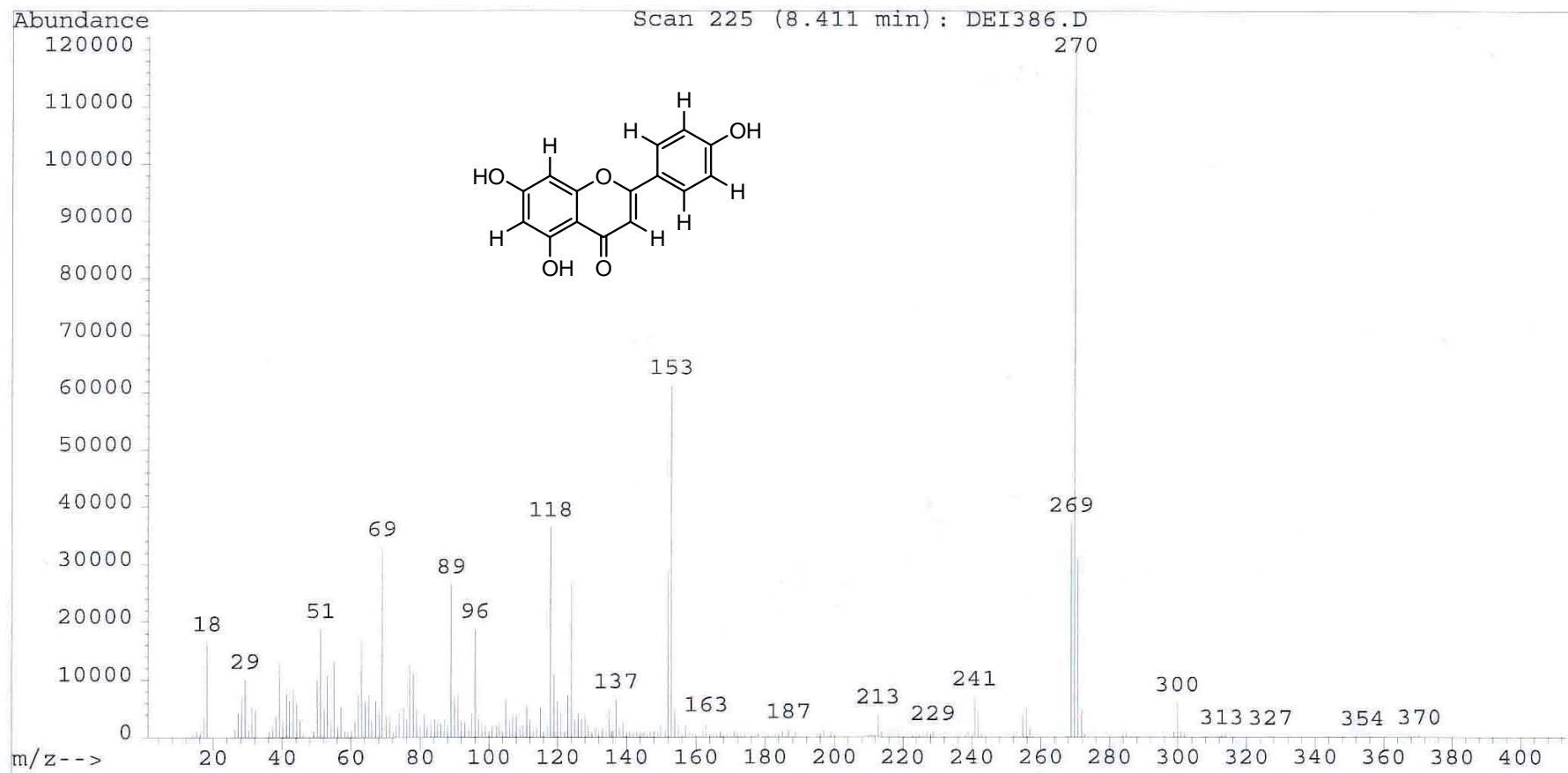


Spectre n° IV-37 : Série spectrale UV du composé FA122

**Spectre n° IV-38bis: Spectre RMN ¹H étalé (6 - 7,75 ppm)
du composé FA122**



Spectre n° IV-39 Spectre de masse (IE)
du composé FA122



IV-2-5: Le composé FA132

Interprétation :

- La fluorescence noire violette sous lumière de Wood est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.
- Le comportement chromatographique dans les différents systèmes indique que le composé est un hétéroside monoglycosylé.

Comportement chromatographique

Système	SI	SII	SIII
R _f	0,57	0.32	0.35

SI: Toluène/ Méthanol/ Methyléthylcétone (4:3:3)

SII: H₂O / MeOH / Methyléthylcétone / Acétylacétone (13:3:3:1)

SIII: Ac. Acétique (15%)

Les données de la série spectrale UV (spectre n° IV-44, tableau n° IV-30) montrent :

- Le maximum d'absorption de la bande I à 334 nm indique le squelette d'une flavone.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 58$ nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse indique la présence d'un OH libre en 4', l'absence d'une nouvelle bande dans l'intervalle [320-335] indique une substitution de la position 7.
- L'addition de NaOAc ne provoquant pas d'effet notable sur la bande II par rapport au spectre MeOH confirme la substitution en 7 (7- OR).
- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu (AlCl₃+ HCl) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda = + 45$ nm) confirme la présence d'un OH libre en 5.
- La faible déplacement de la bande I en comparant les spectres AlCl₃ + HCl et AlCl₃, laisse prévoir l'absence de système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Tableau IV-30: Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaires
MeOH	334	268	/	flavone
+ NaOH	392	275	/	OH libre en 4' Pas de OH libre en 7
+AlCl ₃	381	273	340 299	OH libre en 5 Pas de ortho di-OH sur le cycle B
+AlCl ₃ /HCl	379	272	341 299	
+NaOAc	373	269	/	OR en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	340	269	/	
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				

L'examen du spectre RMN proton (spectre n° IV-45) montre :

- Un singulet à $\delta = 6,74$ ppm attribuable à H-3, ce qui confirme la structure d'une flavone.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, à $\delta = 6,49$ et à $\delta = 6,23$ ppm ($J = 2.1$ Hz) attribuables à H-8 et H-6 respectivement.
- Deux autres signaux sous forme de doublets d'intégration 2H chacun et dont la constante de couplage $J = 8,9$ Hz, le premier à $\delta = 7,96$ ppm, attribuable H-2', H-6' et l'autre à $\delta = 6,95$ ppm, permet son attribution à H-3' et H-5'.
- Le doublet à 5,08 ppm indique la présence d'un sucre lié à l'aglycone par une liaison C-O, car toutes les positions susceptibles de faire des liaisons sont occupées par des protons dans cette molécule.

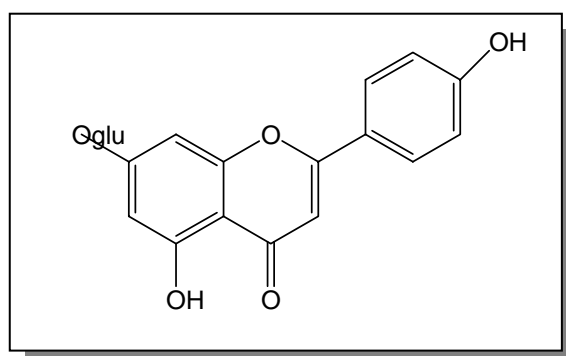
Les données de la RMN ¹H sont résumées dans le tableau IV-31

Tableau IV-31: Données de la RMN ^1H

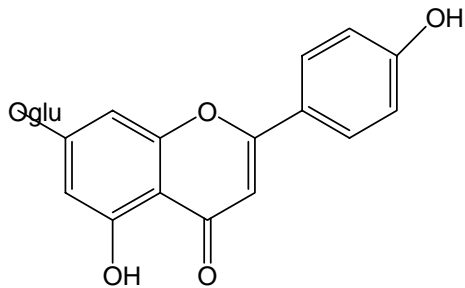
Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7.96	2H	d (8,9)	H-2', H-6'
6.95	2H	d (8,9)	H-3', H-5'
6.74	1H	s	H-3
6.49	1H	d (2,1)	H-8
6.23	1H	d (2,1)	H-6
5.08	1H	d	H1''(sucre)

L'examen du spectre RMN ^{13}C révèle la présence d'un groupement CH_2OH à $\delta = 61,0$ ppm, orientant ainsi vers un substituant de type glucosyle. La nature de ce substituant a été d'ailleurs vérifié par hydrolyse acide et co-chromatographie avec des échantillons de référence.

Toutes ces données complètent la structure précédente en attribuant les différents radicaux à des protons. Donc le composé est 4', 5-dihydroxy 7-O-glucosylflavone connue sous le nom de 7-O-glucosyl apigénine.

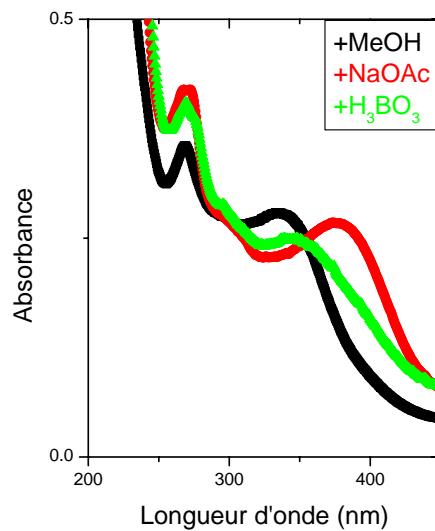
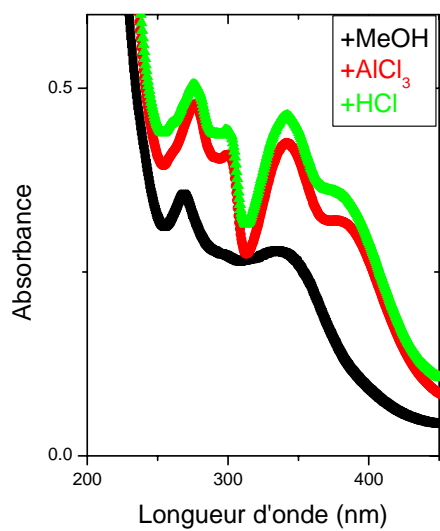
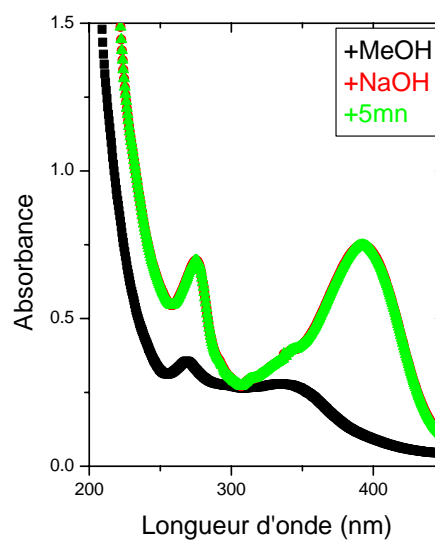
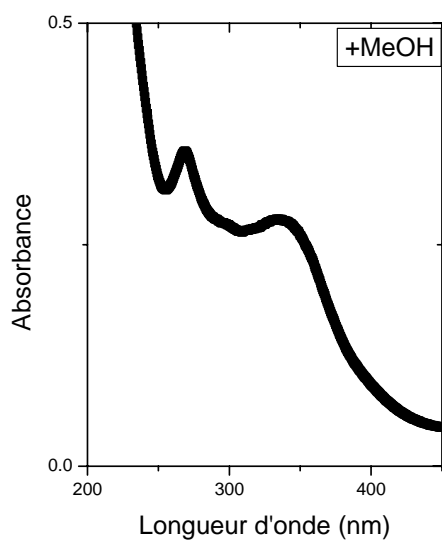


7-O-glucosyl apigénine



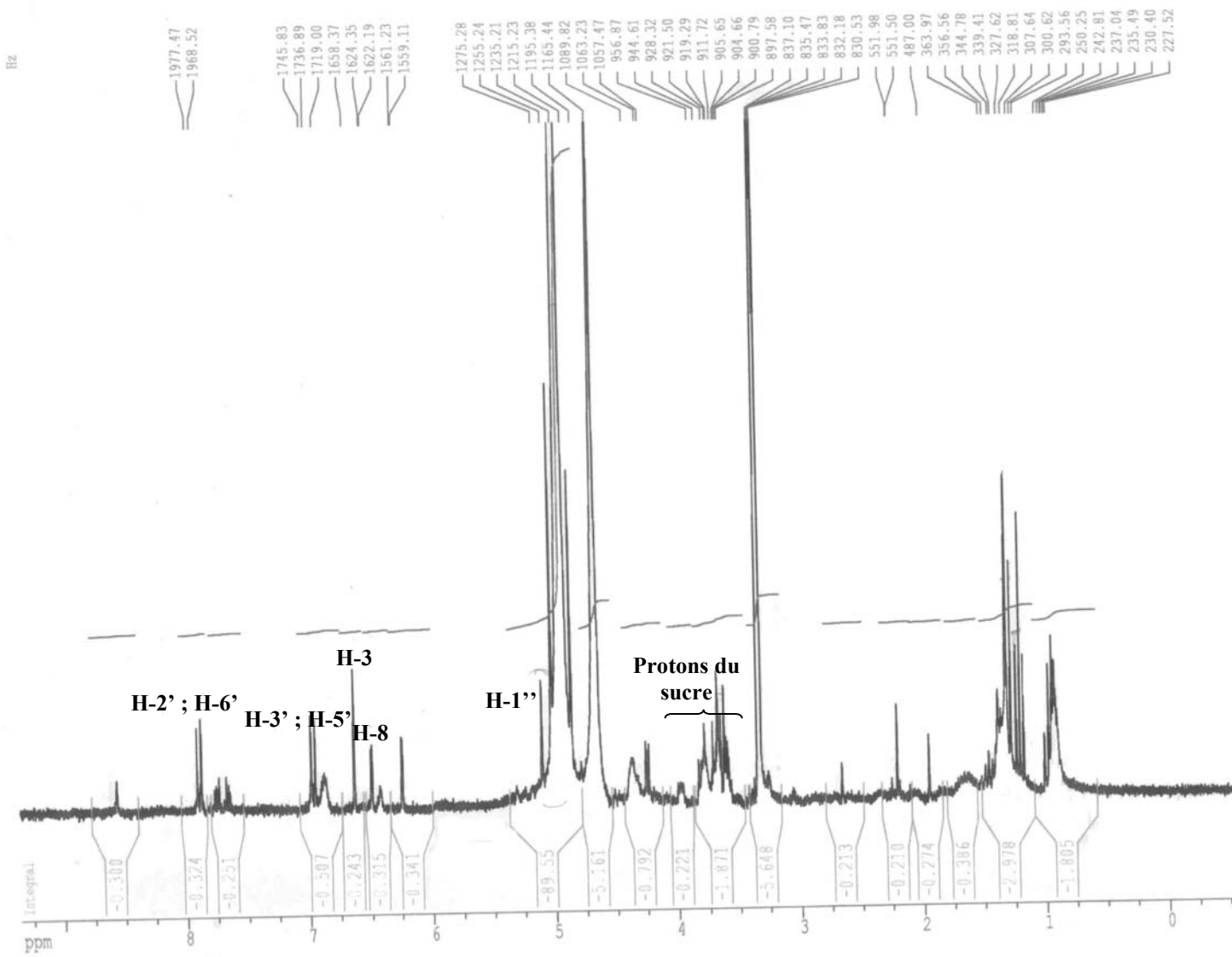
4', 5-dihydroxy 7-*O*-glucosylflavone

7-*O*-glucosyl apigénine

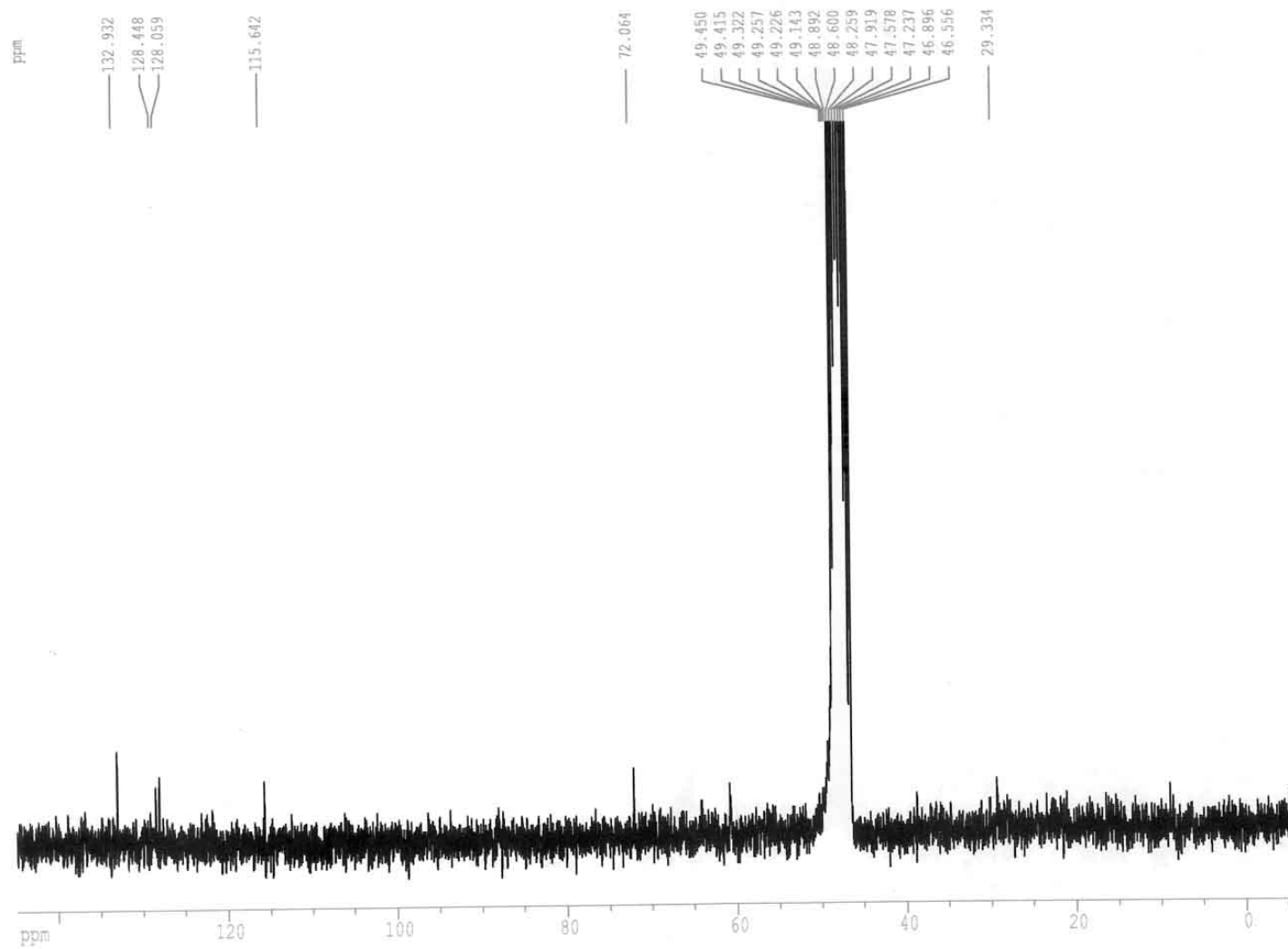


Spectre n°IV-44 : Série spectrale UV du composé FA132

**Spectre n° IV-45 : RMN ¹H (250 MHz, CDO₃OD)
du composé FA132**



Spectre n° IV-46: RMN ¹³C (63MHz, CD₃OD) du composé FA132



IV-2-6 : Le composé FA232

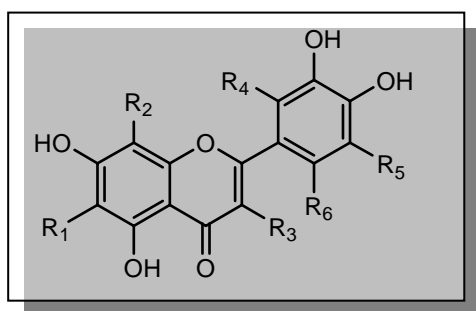
Interprétation :

- La fluorescence noire violette sous 365 nm de ce composé est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

Les données de la série spectrale UV (spectre n° IV-47, tableau IV-32) montrent :

- Le maximum d'absorption de la bande I à 350 nm et la fluorescence violette signalée plus haut sont en faveur d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 52$ nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse par rapport au spectre MeOH indique la présence d'un OH libre en 4', l'apparition d'une nouvelle bande à 329 nm indique l'existence d'un OH libre en 7.
- L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = + 5$ nm) par rapport au spectre MeOH confirme le OH libre en 7.
- La comparaison du spectre en présence de NaOAc et ce même spectre après addition de H_3BO_3 montre un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 49$ nm) dans ce dernier est révélateur de la présence d'un système ortho di-OH sur le cycle B. Cette hypothèse est confirmée par l'effet hypsochrome de la bande I ($\Delta\lambda = -37$ nm) du spectre enregistré dans le milieu ($AlCl_3 / HCl$) comparativement à celui enregistré dans $AlCl_3$.
- L'effet bathochrome de la bande I en comparant les spectres $AlCl_3 + HCl / MeOH$ ($\Delta\lambda = +35$ nm), indique la présence d'un OH libre en 5.

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :



Avec R_1, R_2, R_4, R_5, R_6 différents de OH et R_3 est un H ou un OR.

Tablrau IV-32 : Données de la série spectrale UV

Réactifs	Bande I	Bande II	Autres bandes	Commentaires
MeOH	350	264	255 291	flavone
+ NaOH	402	267	329	OH libre en 4' OH libre en 7
+AlCl ₃	422	273	303	/
+AlCl ₃ /HCl	385	274	358 297	OH libre en 5 Ortho di-OH sur le B
+NaOAc	352	269	254	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	401	269	/	Ortho di-OH sur B
Spectre stable en présence de NaOH après 5 mn				

L'examen du spectre RMN ¹H montre (spectre n° IV-48) :

- Un singulet à $\delta = 6,57$ ppm d'intégration 1H attribuable à H-3, ce qui permet d'opter pour une structure de type flavone.
- Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 2H à $\delta = 6,53$ ppm avec une constante de couplage $J = 2$ Hz attribuable à H-8, un autre signal sous forme de doublet et également d'intégration 2H à $\delta = 6,23$ ppm avec la même constante de couplage ($J = 2$ Hz) attribuable à H-6 confirmant ainsi l'hydroxylation des positions 5 et 7 du noyau A.
- Le signal à $\delta = 7,42$ ppm, d'intégration 2H attribuable à H-2' et H-6'. Ce signal correspond en fait à deux signaux superposés l'un deux sous forme d'un doublet dédoublé ($J = 8,4$ Hz et $J = 2$ Hz) caractérisant H-6' et l'autre sous forme d'un doublet ($J = 2$ Hz) caractérisant H-2'. Ce signal confirme l'hydroxylation des positions 3' et 4' du cycle B. Par ailleurs, le signal sous forme de doublet ($J = 8,4$ Hz) qui apparaît à $\delta = 6,95$ ppm, est attribuable à H-5'.

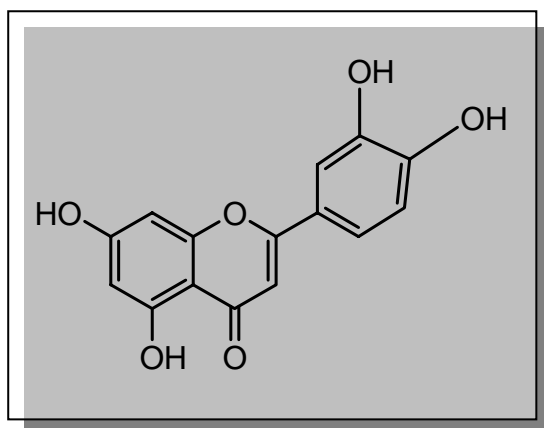
Les données relatives à la RMN ¹H sont reportées sur le tableau IV-33

Tablrau IV-33 : Données de la SRMN ¹H :

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
7,42	2H	dd (8,4 ; 2)	H-2' H-6'
6,95	1H	d (8,4)	H-5'
6,57	1H	s	H-3
6,53	1H	d (2)	H-8
6,23	1H	d (2)	H-6

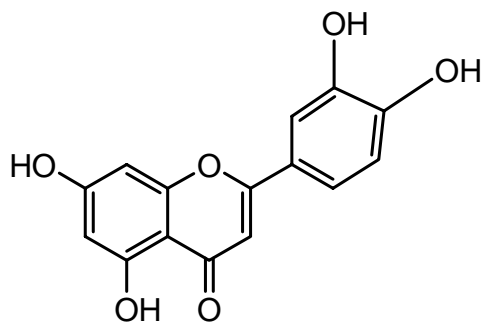
Toutes ces données permettent de dire que le composé FA232 correspond à :

3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone connue sous le nom de **lutéoline**.



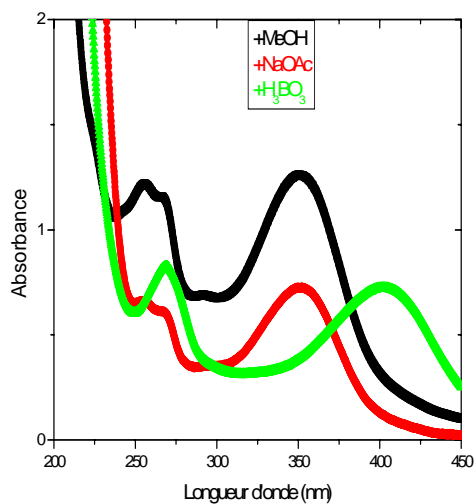
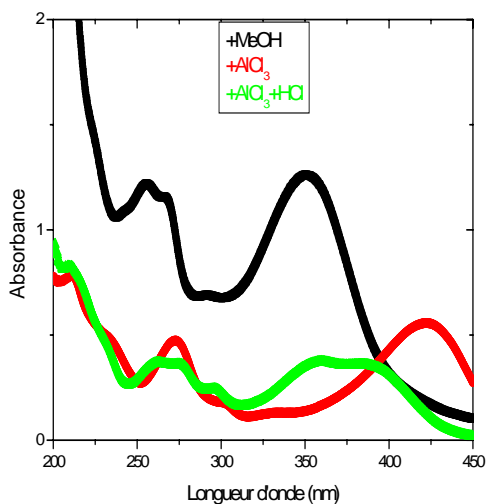
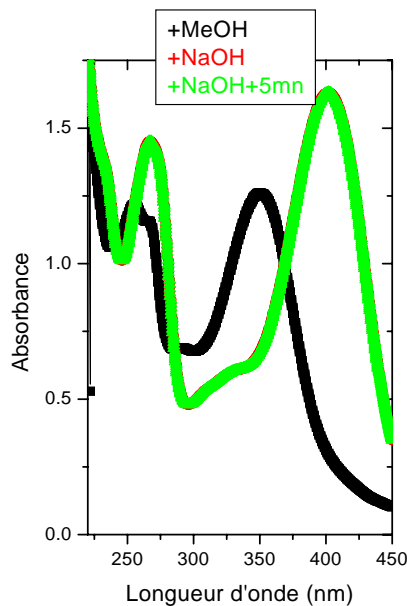
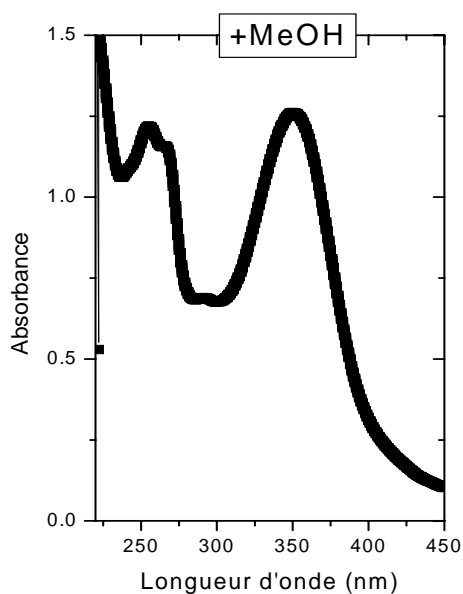
Le spectre SMIE (spectre n°IV-49) confirme bien cette structure, en y relève en effet la présence de l'ion moléculaire à $m/z = 286$ comme pic de base correspondant à la formule brute $C_{15}H_{10}O_6$ ainsi que les ions à $m/z = 258$ relatif à la perte d'un CO, à $m/z = 153$ correspondant à $[A_1+1]^+$ confirmant ainsi la dihydroxylation du noyau A et à $m/z = 134$ correspondant à $[B_1]^+$ confirmant bien une dihydroxylation du noyau B.

Donc le composé est effectivement : **3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone (lutéoline)**



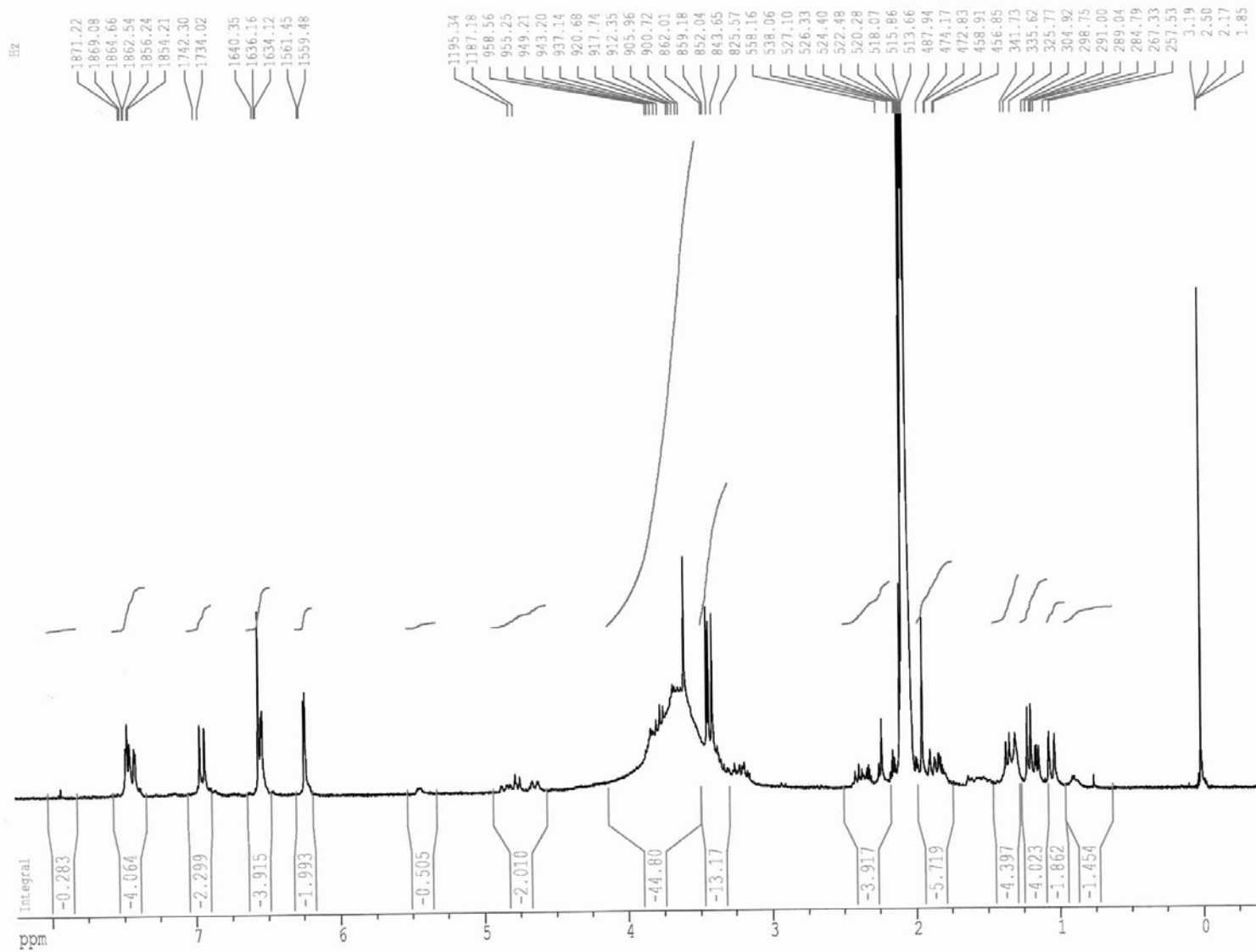
3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone

(lutéoline)

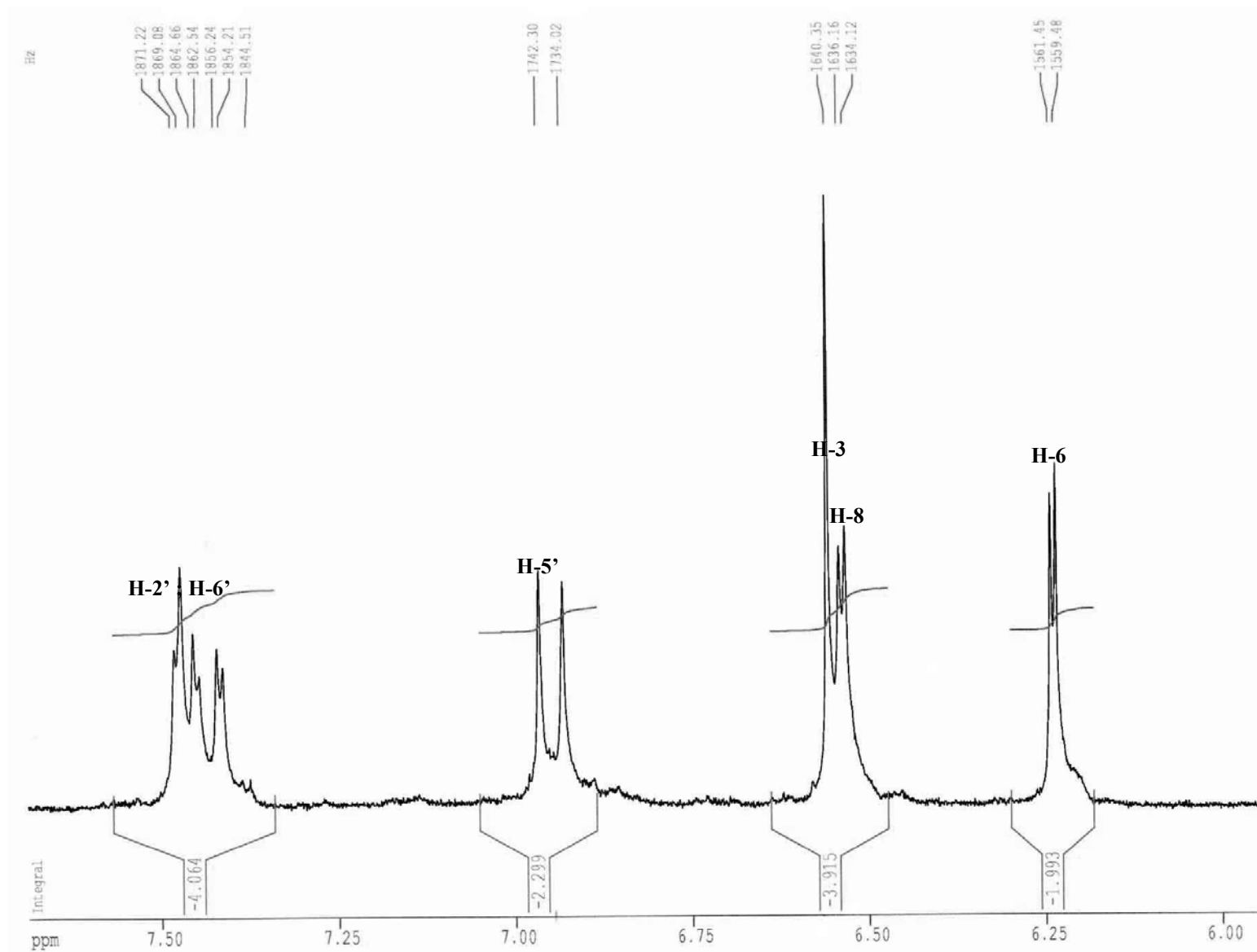


Spectre N° IV- 47 Série spectrale UV du composé FA232

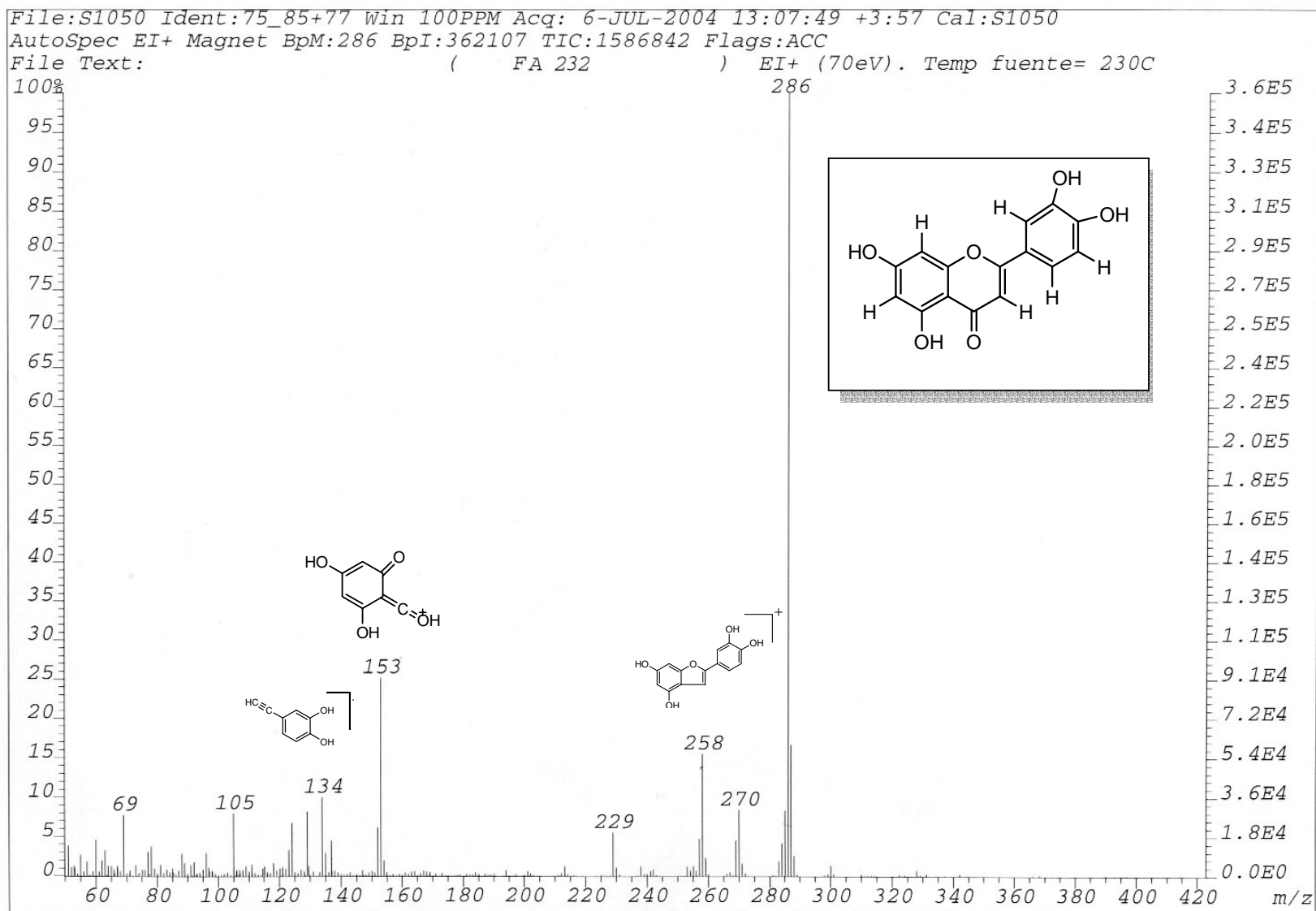
**Spectre n°IV-48 : RMN ¹H (250 MHz, acétone -d₆)
du composé FA232**



**Spectre n° IV-48bis :RMN ¹H étalé (6.00 – 7.50 ppm)
du composé FA232**



Spectre n° IV-49: Spectre de SMIE du composé FA232



Conclusion:

Les résultats de l'étude phytochimique concernant l'espèce *G. ferox* ont révélé la richesse de cette dernière en métabolites secondaires ainsi que leur diversité structurale. En effet, cette diversité est remarquée tant du point de vue squelette hydrocarboné que du point de vue substitution où l'on signale la présence du : phytol, du β -sitostérol ainsi que des flavonoïdes de type flavone et isoflavone.

Références bibliographiques

- [1] **Linuma , M. et all. (1993),**
Constituents of *Vancouveria hexandra* heterocycles (35) ,407.
- [2] **Mekkiou, R., Touahar H., Dijoux-Franca, M.G., Mariotte, A.M., Benayache, S. and Benayache, F., (2005),**
A new isoflavone from *Genista saharae* (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 635-638.
- [3] **Margarita Hernandez Silva, (1996),**
Thèse de doctorat en sciences de chimie, Université - La lagouna – Espagne.
- [4] **Eplotis, N.D., Bjorkquist, D., Bjorkquist, and Sarkanen, S. (1973),**
Journal of the American Chemical Society/ 91-23/ November 14.
- [5] **Ness, D.W., Norton, R.A., Benson, M., (1992),**
Phytochemistry, 31, pp. 805-811.
- [6] **Antonio, G. González, Eisa M. Rodriguez Pérez, Consuelo HernándezPadrón and Jaime bermejo Barrera (1997),**
Phytochemical Investigation of Canary Island lichens. Virtual avtivity, and Pharmacology pp. 49-60.
- [7] **Mitaine-Offer, A.-C., Tapondjou, L.A., Djoukeng, J.D., Bouda, H. and Lacaille-Dubois, M.-A., (2003),**
Biochemical Systematics and Ecology, 31, pp. 227-228.
- [8] **Wanchai De-Eknakul, Buppachart Potduang, (2002),**
Phytochemistry, 62, pp. 389-398.