

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

UNIVERSITÉ MENTOURI CONSTANTINE
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

N° D'ordre :

Série :

Mémoire
Présenté pour obtenir le diplôme de Magister
En Chimie Organique

Option
Chimie structurale : synthèse organique et substances naturelles

**RECHERCHE ET DETERMINATION
STRUCTURALE DE MÉTABOLITES
SECONDAIRES DE *Linaria atlantica* Boiss. & Reut.**

Présentée Par : CHERIET Tamer sous la direction de : Dr R. SEGHIRI

Devant le jury :

M ^{me}	F. BENAYACHE	Pr. Université Mentouri	Présidente
M ^r	R. SEGHIRI	M.C. Université Mentouri	Rapporteur
M ^r	S. BENAYACHE	Pr. Université Mentouri	Examineur
M ^{lle}	R. MEKKIOU	Pr. Université Mentouri	Examinatrice
M ^{me}	O. BOUMAAZA	M.C. Université Mentouri	Examinatrice

CONSTANTINE 2011

Dédicace

*A mon dieu, le clément et miséricordieux dont la grâce
me permet de présenter ce travail.*

*A ma chère mère quelle m'a offert ses chaleureuses affections,
vocations et sacrifices.*

*A mon tendre père qui m'a soutenue moralement dans ma vie et durant
mes études.*

*A mes amis : Abbas, Krime, abd el hamid, Fouzi, moh et chafeaai, chemsou,
mehdi, Billel, Dady, Fateh, Chouaibe ...*

*A tout ma promotion du magister : Halima, Hanane, Nassima, Sabrina,
Ferial, Wassila et Naïma.*

A tout ma famille de proche au loin.

Remerciements

Je tiens à exprimer tous mes sincères remerciements à **Mme Fadila Benayache**, pour avoir co-dirigé cette thèse et m'avoir accueilli au sien de son laboratoire de phytochimie. Ses compétences scientifiques, ses encouragements et la confiance qu'elle m'a accordée m'ont permis de mener à bien ce travail, qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer toute mes reconnaissances au docteur **Ramdane Seghiri** pour m'avoir permis de préparer mon magister dans les meilleures conditions. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour tous ses efforts et pour le soutien qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude placée sous sa direction.

Je remercie sincèrement Monsieur le professeur **Samir Benayache** ; professeur à l'université Mentouri Constantine, pour son aide morale et matérielle et aussi pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement Melle **R. Mekkiou** professeur, pour sa patience, et son aide, sa gentillesse, et sa disponibilité. Je remercie aussi docteur : **O. Boumaza**, pour le soutien, l'aide et l'encouragement pendant ma présence dans ce laboratoire et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie les docteurs; **Mme S. Ammedah** et **Me A. Menad**, du laboratoire de biologie et environnement, département de sciences de la nature et de la vie, université Mentouri-Constantine, pour m'avoir aidé dans le côté biologique.

Je suis aussi très reconnaissant à toute l'équipe du laboratoire de Phytochimie et d'analyses Physico-chimiques et Biologiques pour leur écoute et leur disponibilité, ceci avec une pensée toute particulière envers Monsieur **H. Hazmoune** pour sa gentillesse et son aide.

Je remercie sincèrement Monsieur **Kerkatou** et Melle **S. Baatouche** pour leurs aides, conseils et commentaires mais aussi leurs bienveillances et leurs humours qui ont été fort utiles.

Je remercie toute mes amis Abbes, Krimo, Chemsou, et Mehdi qui m'ont donné leur soutien et ont contribué avec leurs encouragements de près, ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je tiens enfin à exprimer toute ma gratitude à ma famille dont le soutien a été essentiel tout au long de mes études, et tout particulièrement au cours de ce travail. A mes parents, qui me sont chers, très chers pour moi. Merci beaucoup mama à votre vocation.

Merci beaucoup



SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
Références bibliographiques	3

PARTIE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Rappel Bibliographique

I. Description de la plante.....	5
I.1. Donnée botanique	5
I.1.1.Introduction	5
I.1.2. Description du genre <i>Linaria</i>	6
I.1.3. Caractéristique botanique de <i>Linaria atlantica</i>	6
I.2.Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre <i>Linaria</i>	6
I.2.1. Utilisation en médecine traditionnelle.....	6
I.2.2.Activités biologiques.....	7
I.3. études chimiques sur le genre <i>Linaria</i>	8
I.3.1.étude phytochimique sur <i>Linaria japonica</i>	8
I.3.2.étude phytochimique sur <i>Linaria vulgaris</i>	14
I.3.3.étude phytochimique sur <i>Linaria reflexa</i>	16
I.3.4.étude phytochimique sur <i>Linaria saxatilis</i>	16
I.3.5.étude phytochimique sur <i>Linaria Arcusangeli</i>	18
I.3.6.étude phytochimique sur <i>Linaria Canadensis</i>	18
I.3.7.étude phytochimique sur <i>Linaria aegyptiaca</i>	19
I.3.8.autres études phytochimique sur le genre <i>Linaria</i>	20
References bibliographiques.....	22

Chapitre II : Les métabolites secondaires chez *Linaria*

Introduction générale.....	27
Généralités sur les métabolites secondaires.....	27
II.1. LES TERPÈNES	28
II.1.1. Introduction	28
II.1.2. Classe des Terpénoides	29
II.1.2.1. Les Monoterpènes (C10)	30
II.1.2.2. Les Sesquiterpènes (C15)	31

II.1.2.3. Les Diterpènes (C20).....	32
II.1.2.4. Les Triterpènes (C30).....	33
II.1.2.5. Les tetraterpènes (C40).....	33
II.1.2.6. Les polyterpènes	34
II.1.2.7. Les Stéroïdes	35
II.1.2.7.1. Les hormones stéroïdes.....	36
II.1.2.7.2. Les corticostéroïdes.....	37
II.1.2.7.3. Les phytostérols	37
II.1.2.8. Les iridoïdes.....	38
II.1.2.8.1. Définition	38
II.1.2.8.2. Classification des iridoïdes	39
a) Les iridoïdes simples	39
b) Les iridoïdes glycosilés	40
c) Sécoiridoïdes	40
d) Bisiridoïdes	40
e) Iridoïdes lactones	41
II.1.2.8.3. Propriétés biologiques des iridoïdes	41
II.1.3. Le Rôle Bioactif des Terpénoïdes	42
II.2. Les polyphénols	42
Généralités	42
II.2.1. Les coumarines	42
II.2.2. LES FLAVONOÏDES	43
II.2.2.1. Introduction	43
II.2.2.2. Définition et Structure	44
II.2.2.3. Découverte des flavonoïdes	47
II.2.2.4. Origine Biosynthétique des flavanoïdes	47
II.2.2.5. Substitution du squelette flavonique	56
II.2.2.5.1. La O-substitution	56
II.2.2.5.1.1. L'hydroxylation.....	56
II.2.2.5.1.2. La méthylation	57
II.2.2.5.1.3. La O-glycosylation.....	58
II.2.2.5.2. La C-substitution.....	59
II.2.2.5.2.1. La C-méthylation.....	59
II.2.2.5.2.2. La C-glycosylation	59
II.2.2.6. propriétés et rôles des flavonoïdes.....	59
II.2.2.6.1. Pharmacodynamiques.....	59
II.2.2.6.2. Toxicité aiguë des flavonoïdes	60
II.2.2.6.3. L'immunologie des flavonoïdes	60
II.2.2.6.3.1. Les flavonoïdes comme antigènes	60
II.2.2.6.3.2. Flavonoïdes comme modulateurs immunisés.....	61
II.2.2.6.4. Les flavonoïdes comme antioxydants.....	61

II.2.2.6.5.L'action de l'hormone de flavonoïde.....	62
II.2.2.6.6.L'inflammation.....	63
II.2.2.6.7.L'effet des flavonoïdes sur la condition de malades diabète du mellite	63
II.2.2.6.8.Le traitement de cancer par les flavonoïdes.....	63
II.2.2.7.Activités biologiques des flavonoïdes.....	64
II.2.3.L'ETUDE CHIMIQUE DES FLAVONOÏDES	66
II.2.3.1.Introduction	66
II.2.3.2.Extraction	66
II.2.3.3.Séparation chromatographique	67
II.2.3.3.1.Généralités	67
II.2.3.3.1.1.Historique	67
II.2.3.3.1.2.Principe général de la chromatographie.....	68
II.2.3.3.2.Les différentes techniques chromatographiques.....	69
II.2.3.3.2.1.la chromatographie sur colonne	69
II.2.3.3.2.2.la chromatographie préparative sur papier (CP)	69
II.2.3.3.2.3.la chromatographie préparative sur couche mince (CCM)	69
II.2.3.4.Analyse structurale des flavonoïdes	70
II.2.3.4.1.Le facteur de retardation (R_f)	70
II.2.3.4.2.La Fluorescence sous lumière de Wood	71
II.2.3.4.3.La spectrophotométrie UV-Visible.....	72
II.2.3.4.3.1.Le spectre UV-Visible des flavonoïdes dans le MeOH.....	72
II.2.3.4.3.2.Addition des réactifs (la série spectrale UV).....	74
1. Spectre d'absorption en présence de NaOH ou NaOMe	74
2. Spectre en présence de NaOAc	75
3. Spectre d'absorption en présence de $H_3BO_3 + NaOAc$	75
4. Spectre en présence de $AlCl_3$ et $AlCl_3 + HCl$	75
II.2.3.4.4.La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	78
II.2.3.4.5.La Spectrométrie de masse MS	78
II.2.3.4.6.L'hydrolyse acide des hétérosides.....	79
Références bibliographiques	80

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III : Etude Phytochimique de l'espèce *Linarea atlantica*

III.1. Place dans la systématique (Botanique)	88
III.2. Description de l'espèce	88
III.3. Travaux antérieures.....	89
III.4. Récolte de matière végétale.....	89

III.5. Extraction de <i>Linaria atlantica</i>	89
III.6. Travaux personnels	91
III.6.1. Séparation et purification des composés de l'extrait	
Acétate d'éthyle de <i>Linaria atlantica</i>	91
III.6.1.1. Matériels et méthodes utilisés.....	91
III.6.1.2. Méthodologie générale	92
a) Fractionnement de l'extrait Acétate d'éthyle.....	92
b) Étude de la fraction F15	95
c) Étude de la fraction F16.....	96
d) Étude de la fraction F17	96
e) Étude de la fraction F20.....	96
f) Étude de la fraction F24	97
g) Étude de la fraction F25	97
III.7. Conclusion	98
III.8. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante	99
III.8.1. Principe du test au DPPH.....	99
III.8.2. Protocole expérimental.....	100
Références bibliographiques.....	101

Chapitre IV : Résultats et Discussions

IV. Identification des produits isolés de l'extrait Acétate	
de <i>Linaria atlantica</i>	103
IV.1.Elucidation structurale du composé TC1.....	103
IV.1.1.Spectroscopie de RMN ¹ H de TC1.....	103
IV.1.2. L'examen de la série spectrale UV de TC1.....	106
IV.1.3. Conclusion.....	107
IV.2. Elucidation structurale du composé TC2.....	109
IV.2.1. Spectroscopie de RMN ¹ H de TC2.....	109
IV.2.2. L'examen de la série spectrale UV de TC2.....	112
IV.2.3. Conclusion.....	114
IV.3. Elucidation structurale du composéTC3.....	114
IV.3.1. Spectroscopie de RMN ¹ H de TC3.....	114
IV.3.2. L'examen de la série spectrale UV de TC3.....	117
IV.3.3. Conclusion.....	120
IV.4. Elucidation structurale du composé TC4.....	120
IV.4.1. Spectroscopie de RMN ¹ H de TC4.....	120
IV.4.2. L'examen de la série spectrale UV de TC4.....	124
IV.4.3. Conclusion.....	126

IV.5. Résultat de l'activité antioxydante testée par la méthode du DPPH.....	126
Références bibliographiques.....	130
Conclusion générale.....	131

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres ont été enregistrés sur un appareil à transformée de Fourier :

- ✿ Brüker avance DP 250 (250 MHz pour le ^1H , 62.9 MHz pour le ^{13}C) du département de Chimie de l'université Mentouri-Constantine.

Les positions des pics (déplacement chimique) sont données en échelle δ et exprimées en partie par millions (**ppm**), le TMS est utilisé comme référence interne ($\delta=0$) dans la plupart des cas. Les spectres sont enregistrés dans le Méthanol deutéré MeOD, et l'acétone deutéré. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz).

Les notations suivantes sont utilisées : **s** : singulet, **d** : doublet, **dd** : doublet de doublet....

Spectrophotométrie de UV-Visible

Les spectres UV-visibles ont été enregistrés sur un appareil :

- ✿ Thermo Nicolet evolution I 300.

Chromatographie

Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur du gel de silice Merck 60 (70-230 Mesh).

Les chromatographies préparatives ont été effectuées sur plaques en verre avec du gel de silice 60 F₂₅₄ ou HF.

Les chromatographies analytiques (CCM) ont été effectuées sur plaques (épaisseur : 0.2 mm) en aluminium recouvertes de gel Merck 60 F₂₅₄ et révélées par une lampe UV réglée sur 254 nm et 365 nm.

Les abréviations et notation utilisées dans ce document sont explicitées ci-dessous:

AcOEt	Acétate d'éthyle
AlCl ₃	chlorure d'aluminium
BuOH	butanol
CC	Chromatographie sur colonne
CCM	Chromatographie sur couche mince
CHCl ₃	chloroforme
CO ₂	dioxyde de carbone
¹³ C	Carbone 13
CP	chromatographie sur papier
<i>d</i>	Doublet
<i>dd</i>	Doublet de doublet
DMAPP	Diméthylallyl Pyrophosphate
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyl
F	Fraction
FAB	ionisation par bombardement d'atomes accélérés (Fast Atom Bombardment)
FPP	Farnésyl pyrophosphate (diphosphate)
glu	Glucose
GC	chromatographie phase gazeuse
GPP	Géranyl pyrophosphate (ou di phosphate)
GGPP	Géranylgéranyl pyrophosphate (ou di phosphate)
¹ H	Proton
H ₃ BO ₃	acide borique
HCl	acide chlorhydrique
HPLC	Chromatographie liquide a haute performance /pression
HPTLC	chromatographie sur couche mince de haute performance
H ₂ O	eau
IC ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
IPP	Isopentényl pyrophosphate (diphosphate)
<i>J</i>	constante de couplage
LC	chromatographie en phase liquide
LPP	Linanyl pyrophosphate (di phosphate)
Me	methyl
MeOH	Methanol
M	Masse
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NaOAc	acétate de sodium
NaOH	hydroxyle de sodium
OH	hydroxyle
PAL	Phénylalanine Ammonia Lyase
PP	Pyrophosphate
R _f	facteur de Retardement
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Singulet
SM	Spectroscopie de masse
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultraviolet

Les unités couramment utilisées sont citées ci-dessous :

°C	température en degrés Celsius
cm	centimètre
g	gramme
h	Heure
Hz	Hertz
Kg	kilogramme
MHz	Méga Hertz
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
nm	nanomètre
ppm	partie par million
µg	microgramme

INTRODUCTION GENERALE

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité.

Dans le monde, **80%** des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. Aujourd'hui, le savoir des tradipraticiens est de moins en moins transmis et tend à disparaître. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages [1]. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs.

L'usage de la médecine traditionnelle est très répandu en Afrique. Son accessibilité, sa disponibilité et sa popularité ne font l'ombre d'aucun doute, dans la mesure où environ **80 %** d'Africains y ont recours pour leurs besoins de santé.

Par ailleurs, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**), près de **6377** espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de **4000** sont des plantes médicinales, ce qui constitue **90 %** de la médecine traditionnelle en Afrique (**OMS, 2003**).

En Algérie, pays avec plus de **3000** espèces dont **15%** endémiques [2], auxquelles la population a recours à la médecine traditionnelle, on commence à entreprendre des systématiques portant sur des plantes médicinales issues de sa flore.

Ces dernières années, plusieurs molécules isolées des plantes sont devenues des médicaments efficaces: citons par exemple le taxol issu de *Taxus baccata* L. (Taxaceae) pour ses propriétés anticancéreuses remarquables (cancer de l'ovaire et cancer du sein) et de l'artémisinine isolée d'*Artemisia annua* L. (Asteraceae) pour ses propriétés antipaludiques [3].

Dans cette thèse on a étudié une plante endémique pour l'Algérie et le Maroc : *Linaria atlantica*. Cette espèce est étudiée pour la première fois.

Le premier chapitre a été concerné à l'étude bibliographique, botanique et phytochimique du genre. En commençant par une description botanique du genre *Linaria* et de l'espèce *atlantica*, qui nous permet de positionner dans la systématique des Scrophulariaceae ainsi qu'une synthèse des principaux résultats phytochimiques antérieurs sur le genre. Le deuxième chapitre est consacrée à l'étude bibliographique impliquant la structure, la classification, et enfin l'activité biologique des métabolismes secondaires les plus courant chez ce genre (les terpènes, les iridoïdes et les flavonoïdes), qui constituent les composés chimiques dominants de la famille Scrophulariaceae en général et du genre *Linaria* en particulier.

Le chapitre trois représente nos travaux personnels d'extraction, séparation et purification des produits isolés. Dans le dernier chapitre on a consacré à l'élucidation structurale des composés isolés ainsi que l'activité biologique de l'extrait étudié.

Références bibliographiques

- [1]. Pelt, J.M. Les nouveaux actifs naturels. Marabout. **2001**. Paris.
- [2]. Gaussen, H., Leroy, H.F. Précis de botanique, végétaux supérieurs, **2ème** Ed. **1982**, **426**.
- [3]. Hostettmann K. Tout savoir sur les plantes médicinales des montagnes. Ed. Fabre S A, Lausanne, Suisse. **2001**, **121**.

CHAPITRE I

Rappel bibliographique

I Description de la plante étudiée

I .1.Données botaniques

I .1.1.Introduction

La famille scrophulariaceae comporte environ **220** genres et **4500** espèces [1]. Les plantes qui la composent se rencontrent abondamment dans les régions tempérées de l'hémisphère nord [2].

Le tableau (**tableau I.1**) présente quelques exemples sur les sous-familles, les tribus et des genres de cette grande famille (scrophulariaceae).

Tableau I.1 : Classification de la famille Scrophulariaceae d'après Valdés (1987) [3].

Sous-familles	tribus	genres
Verbascoideae Scrophularioideae	Verbasceae Scrophularieae Anthirrhineae	<i>Verbascum</i> <i>Scrophularia</i> <i>Anarrhium</i> <i>Antirrhinum</i> <i>Chaenorrhinum</i> <i>Cymbalaria</i> <i>Kickxia</i> <i>Linaria</i> <i>Misopates</i>
Rhinanthoideae	Gratiolleae Sibthorpieae Digitaleae Veroniceae Rhinantheae	<i>Gratiola</i> <i>Sibthorpia</i> <i>Digitalis</i> <i>Veronica</i> <i>Bartisia</i> <i>Ballardia</i> <i>Odentites</i> <i>Parentucellia</i> <i>Pedicularis</i>

I .1.2.Description du genre *Linaria*

Le genre *Linaria* (Scrophulariaceae) comprend approximativement **200** espèces de plante distribuées dans les zones climatiques modérées de l'Europe et l'Asie. Dans la médecine populaire, les espèces *Linaria* sont utilisées comme laxative, spasmolytique, cholagogue et anti-inflammatoire drogues, pour traitement d'hémorroïdes des catarrhes de la vessie, peau irrégulière [4], toniques, antiscorbutiques, antidiabétiques, diurétiques et les désordres vasculaires [5].

I .1.3.Caractéristiques botaniques de *Linaria atlantica*

Le genre *Linaria* est très largement représenté en Algérie, plus que **30** espèces sont trouvés et classés, où certaines espèces sont de détermination délicate, [6], on a *Linaria dissita* (Hauts plateaux oranais), *Linaria laxiflora* (Mzab), *Linaria peltieri*, *Linaria tingitana*, *Linaria virgata* [7], *Linaria munbyanna*, *Linaria simplex*, *Linaria tristis* [6] et *Linaria aegyptiaca* [6,8].

Les plantes de ce genre sont annuelles ou perpétuelles, parfois ligneuses. Elles ne diffèrent que par la corolle éperonnée à la base [6]. L'espèce *atlantica*, sujet de notre travail est une petite plante ramifiée dès sa base à épis florifères peu fournis [6].

I .2.Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre *Linaria*

I .2.1.Utilisation en médecine traditionnelle

Ce genre est le plus connu de la famille scrophulariaceae. Il inclut plusieurs espèces réputées pour leurs vertus thérapeutiques. *Linaria vulgaris* est répandue en Bulgarie dans la plaine région [9], utilisé dans la médecine populaire comme laxative, traitement d'inflammation de la vessie, éruptions cutanées ainsi que les hémorroïdes, etc. [10]. La même espèce, poussant dans le Nord-Est de la chine, est utilisée par la population locale dans le traitement de la toux, de l'asthme et comme expectorant [11].

Linaria Japonica (nom japonais: Unran) est une plante vivace, plante qui grandit dans les régions de rivage, est utilisé dans la médecine traditionnelle pour ces propriétés diurétique, purgative [12] et laxative [13].

Linaria cymbalaria [14] possède des propriétés diurétiques, toniques et de l'antiscorbutiques [15].

Les deux sous espèces *Linaria saxatilis* var. *saxatilis* et *Linaria saxatilis* var. *glutinosa* ont été étudié à cause de la variété des activités biologiques et usages thérapeutiques des espèces du même genre [16-18]. Différents classes de produits naturels sont présentes dans cette espèce, l'activité cytotoxique de ces molécules contre une série de cellules cancéreuses, a donnée des résultats intéressantes [19].

Linaria reflexa Desf., plante connue sous le nom de « Oum lajrah » en raison de son pouvoir cicatrisant, est également employée en usage externe dans le traitement de certaines dermatoses [20]. Cette espèce est un réservoir de flavanoïdes [21].

La recherche sur cette espèce a déterminé l'action de l'antiproliférative de plusieurs flavones isolés de *Linaria reflexa* Desf [22]. Le pectolarigenine et quelques flavonoïdes glycosides comme la pectolarine, ont une forte activité cytotoxique [21].

Il en ressort que la plupart des espèces du genre *Linaria* sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs diverses propriétés biologiques : toniques, antiscorbutiques, laxatives, antidiabétiques, et diurétiques, aussi bien que pour le traitement de blessures, hémorroïdes, et vasculaire désordres [5], spasmolytique et anti-inflammatoire, cholagogue, antirhume [23].

I.2.2. Activités biologiques

Les produits naturels sont une excellente source de structures chimiques possédant une large variété des activités biologiques et en particulier la propriété anticancéreuse [24]. Cela oriente vers de nouveaux champs d'enquête sur le potentiel des composés antitumorale, qui sont déjà largement utilisés dans la chimiothérapie du cancer. Les modèles de la sélection cytotoxique fournissent d'importants donnés préliminaires pour sélectionner des plantes possédant des composés ayant un potentiel anticancéreux [22]. Dans ce thème, **Rosa Tundis** et collaborateurs ont mis en évidence le potentiel antitumoral de dérivés flavoniques (pectolarine) isolés de *L. reflexa* [25]. Plusieurs flavonoïdes aglycones ont montré des propriétés cytotoxiques et/ou de l'antitumorales intéressantes, telle que des flavones [25-26], des flavonols [27] et des flavanones [28].

Pendant plusieurs années, **Marina Gordaliza** et collaborateurs ont étudié la composition chimique de certaines variétés de *Linaria saxatilis*. Il s'avère que *L. saxatilis* var. *saxatilis*, plante native du nord et du centre de la péninsule ibérique, a fait l'objet d'une investigation chimique qui a conduit à l'isolement de diterpénoïdes à squelette néo-clérodane. Ces derniers ont montré une activité cytotoxique contre une série de cellules cancéreuses cultivées in vitro [19]. Une autre étude effectuée sur l'espèce *Linaria saxatilis* var. *glutinosa*, par Terencio et collaborateurs, a révélé que quelques néo-clérodanes ont un effet inhibiteur sur les enzymes impliqués dans les processus inflammatoires [29].

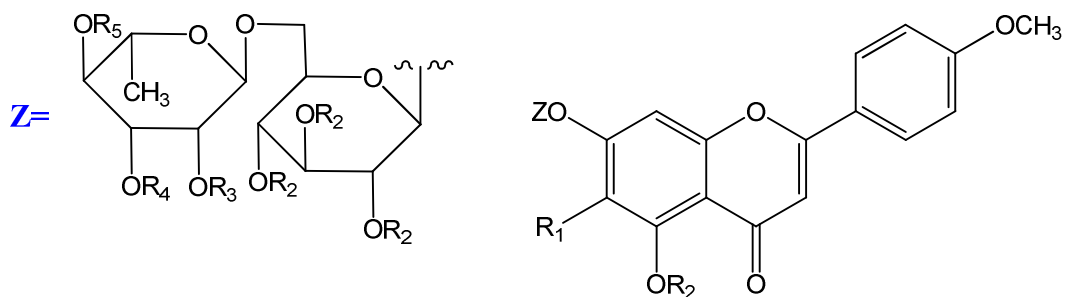
Hideaki Otsuka a étudié pendant des années l'espèce *Linaria japonica* [12]. Ces études sont bien connues comme références pour les autres recherches des espèces de ce genre, sans oublier aussi la richesse des résultats de **Isao Kitagawa** et collaborateurs sur l'espèce *Linaria japonica* [13].

I.3. études chimiques sur le genre *Linaria*

Les études soient biologiques ou bien chimiques réalisées sur les espèces du genre *Linaria*, ont mis en évidence l'isolement et l'identification structurale des divers métabolites secondaires, surtout : les alcaloïdes, les flavanoïdes, les diterpénoïdes et les iridoïdes [30-36]. Ces types de produits sont connus pour leurs activités biologiques notamment l'activité anti-inflammatoire [37].

I .3.1.étude phytochimique sur *Linaria japonica*

Des études phytochimiques réalisées sur *Linaria japonica*. En 1992, **Hideaki Otsuka** a fait une recherche chimique sur l'extrait méthanolique des parties aériennes de *L. japonica*. Cette étude a permis d'identifier cinq flavanoïdes glycosides: isolinarine **A** (1) et isolinarine **B** (2) nouveaux, linarine (3), pectolinarine (4) et linariine (5) connus [38]. Ces derniers produits sont présentés dans la figure suivante (**figure I.1**).

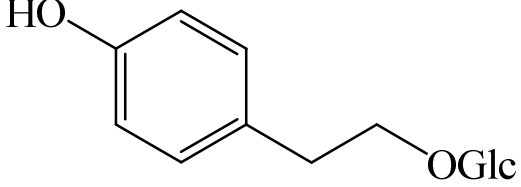
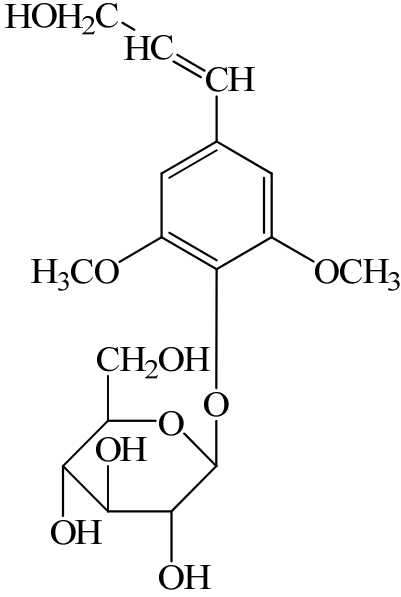
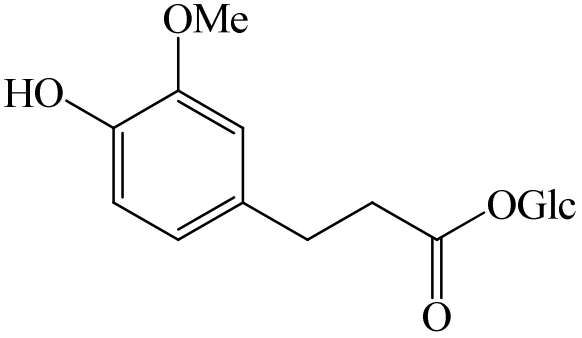
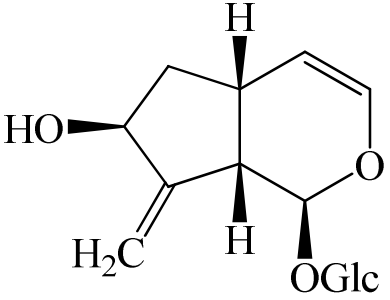


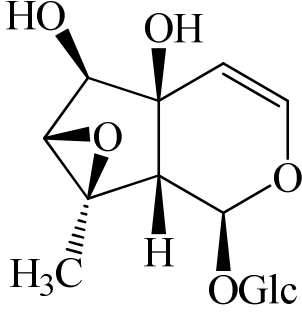
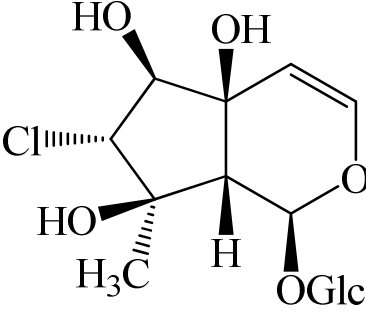
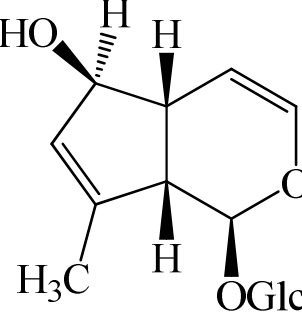
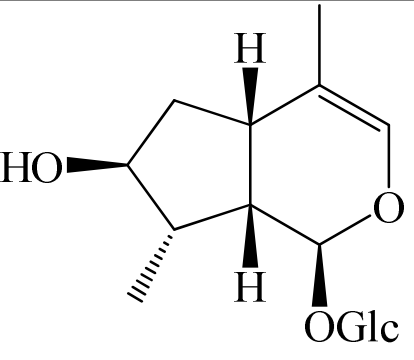
	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅
1	OMe	H	Ac	H	H
2	OMe	H	H	Ac	H
3	H	H	H	H	H
4	OMe	H	H	H	H
5	OMe	H	H	H	Ac

Figure I.1 : cinq flavanoïdes isolés de *linaria japonica*

En 1993, **Hideaki Otsuka** continu sa recherche sur le même extrait. Il a isolé deux phénols glycosides appelés solidoside (**6**), syringine (**7**) et β -D-glucopyranose-1-ferulate (**8**), ainsi que cinq iridoïdes glycosides connus. Il s'agit de: antirrhide (**9**), antirrhinoside (**10**), linarioside (**11**), linaride (**12**) et 7 β -hydroxy-8-épi-iridodial glucoside (**13**) [39]. Leurs structures sont représentées dans le **tableau I.2** ci-dessous.

Tableau I.2 : Structures chimiques des composés isolés de *Linaria japonica*

NOM	STRUCTURES
<p>Salidroside (6)</p>	
<p>Syringine (7)</p>	
<p>β-D-glucopyranose-1-ferulate (8)</p>	 

<p>Antirrhinoside (10)</p>	
<p>Linarioside (11)</p>	
<p>Linaride (12)</p>	
<p>7β-hydroxy-8-épi-iridodial glucoside (13)</p>	

Une autre étude supplémentaire réalisée par le même chercheur (**H. Otsuka**) sur la phase *n*-butanol qui s'avère richement fournie en métabolites secondaires de grande importance, il a séparé et identifié quatre iridolinarosides : **A(14)**, **B(15)**, **C(16)**, **D(17)** [40], présenté dans la figure suivante (**figure I.2**).

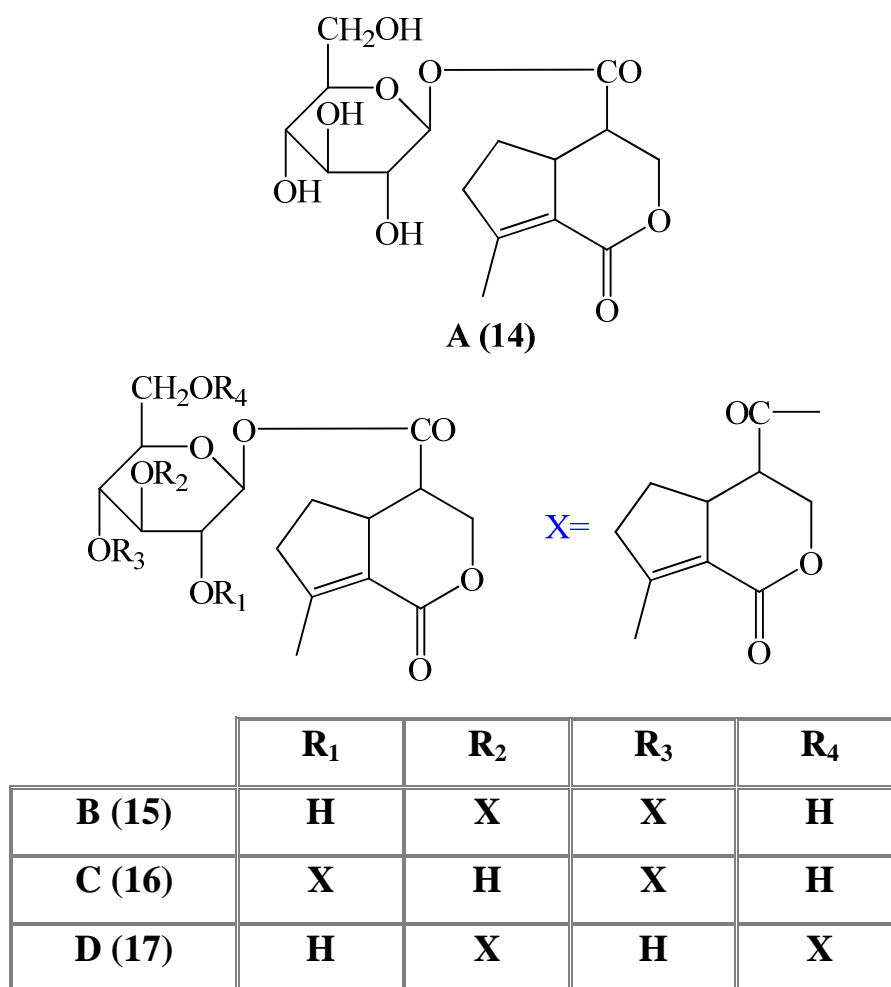
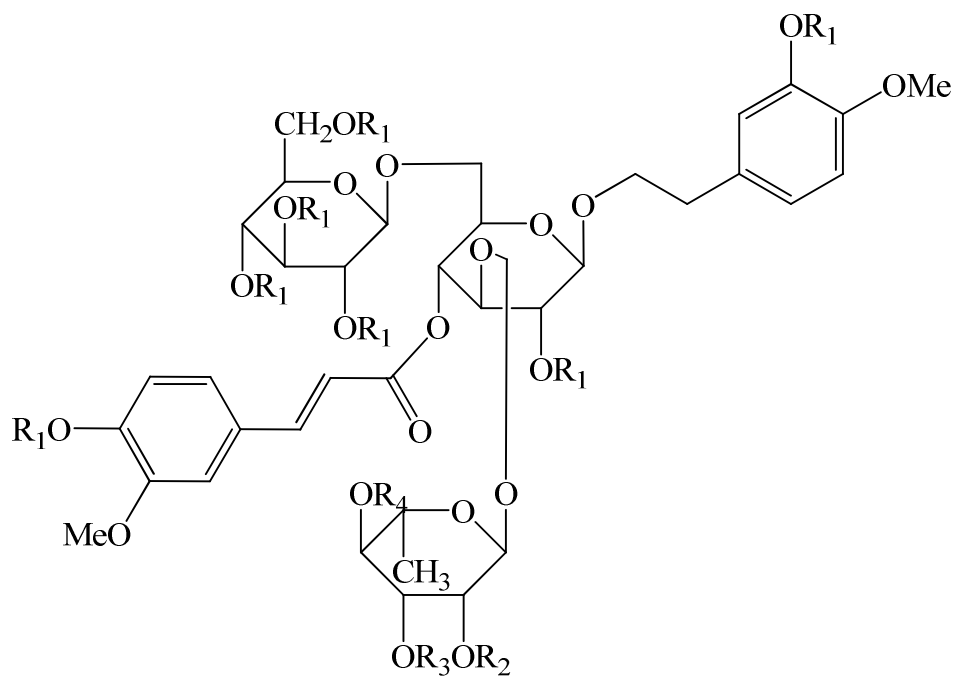
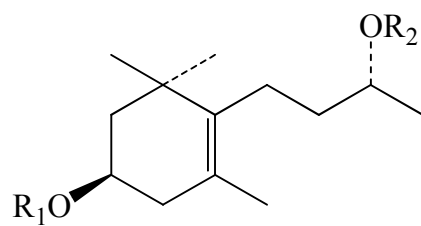


Figure I.2 : quatre iridolinarosides isolés de *Linaria japonica*

Cinq phényléthanoïdes (18), (19), (20), (21) et (22) [12], trois ionols glycosides (23), (24) et (25), de même que deux monoterpènes acycliques diglycosylés (26) et (27), ont été également isolés à partir de l'extrait méthanolique de *L. japonica* [41] (figure I.3).



	R1	R2	R3	R4
18	H	H	H	H
19	H	Ac	H	H
20	H	H	Ac	H
21	H	H	H	Ac
22	Ac	Ac	Ac	Ac



	R1	R2
Linarionoside A (23)	Glc	H
Linarionoside B (24)	H	Glc
Linarionoside C (25)	Glc	Glc

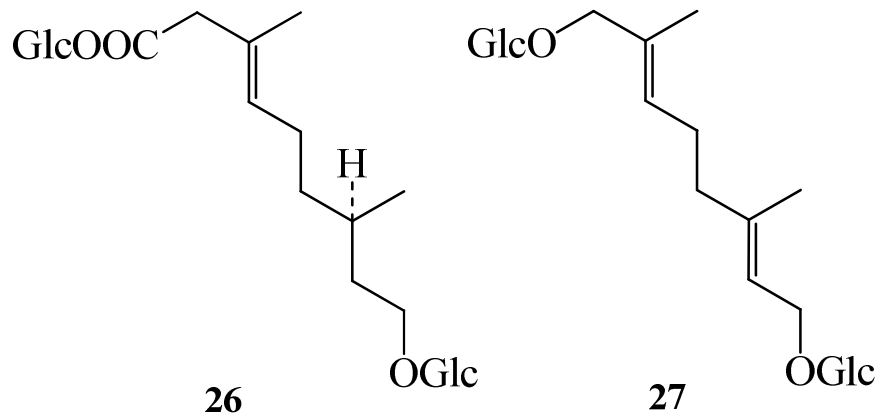


Figure I.3 : Cinq phényléthanoïdes, trois ionols glycosides et deux monoterpènes acycliques diglycosilés isolés de *L. japonica*

Deux diterpènes dialdéhydes, nommés linaridial (28) [42], linarienone (29) [43] de type *cis*-clérodane ont été isolés de l'extrait éther des racines de la plante étudié par Kitagawa, I. et collaborateur (figure I.4).

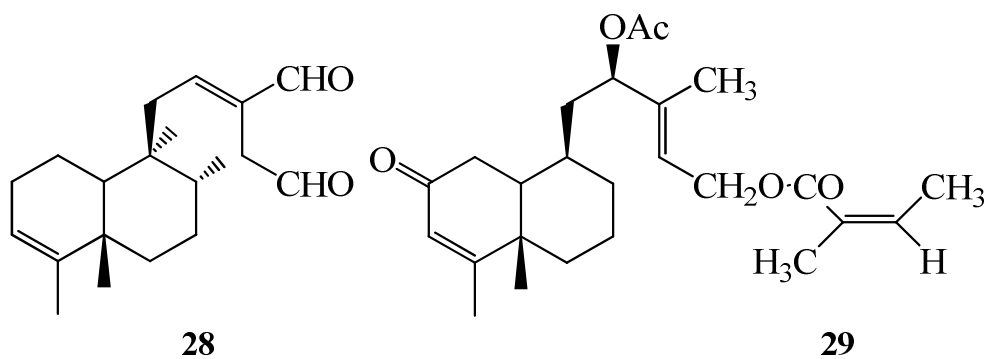
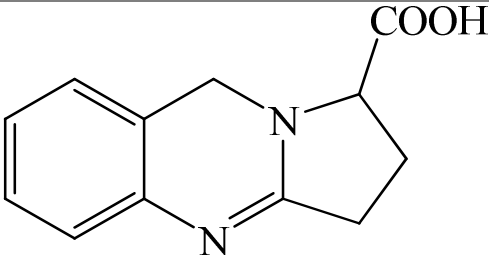
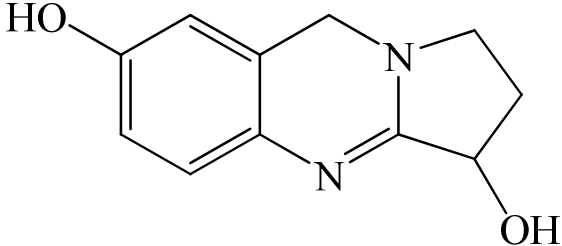
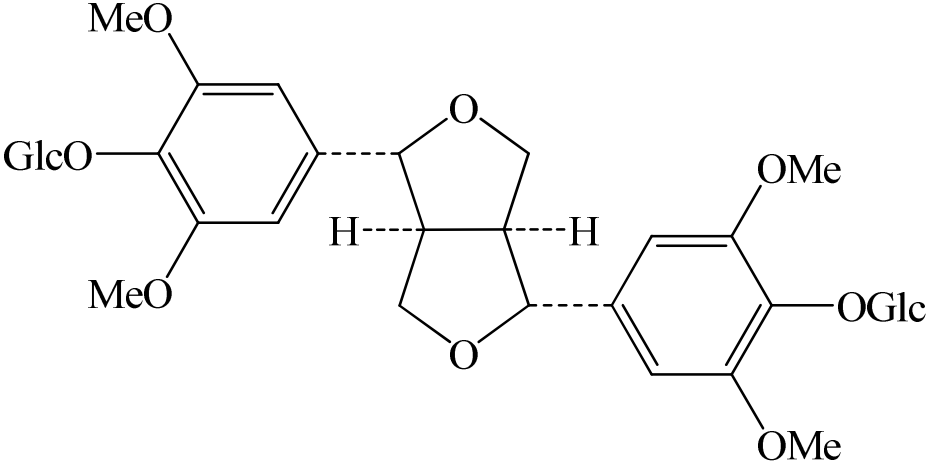


Figure I.4 : linaridial et linarienone

I .3.2. étude phytochimique sur *Linaria vulgaris*

Une étude phytochimique effectuée sur l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Linaria vulgaris*, a permis d'isoler et de caractériser deux alcaloïdes à squelette pyrroloquinazoline, l'acide linarinique (30) et le 7-hydroxy vasicine (31), en plus d'un lignane à squelette pinorésinole (32) et un alcool phénolique nommé syringine (7) [44]. Leurs structures sont répertoriées dans le **tableau I.3** ci-dessous.

Tableau I.3 : Structures des composés isolés de *Linaria vulgaris*

NOM	STRUCTURE
Acide linarinique (30)	
7-Hydroxyvasicine (31)	
Liriodendrine (32)	

D'autres études ont manifesté la présence d'iridoïdes au sein de cette espèce. L'antirrhinoside β -OH (**10**) isolé de l'extrait éthanolique [45] est connu comme un marqueur chimiotaxonomique de la famille Scrophulariaceae et trois autres iridoïdes de l'extrait méthanolique des parties aériennes sont : *6-O-trans-p-coumaroyl* antirrhinoside (**33**), *6-O-cis-p-coumaroyl* antirrhinoside (**34**) et procumbide α -OH (**35**) [46].

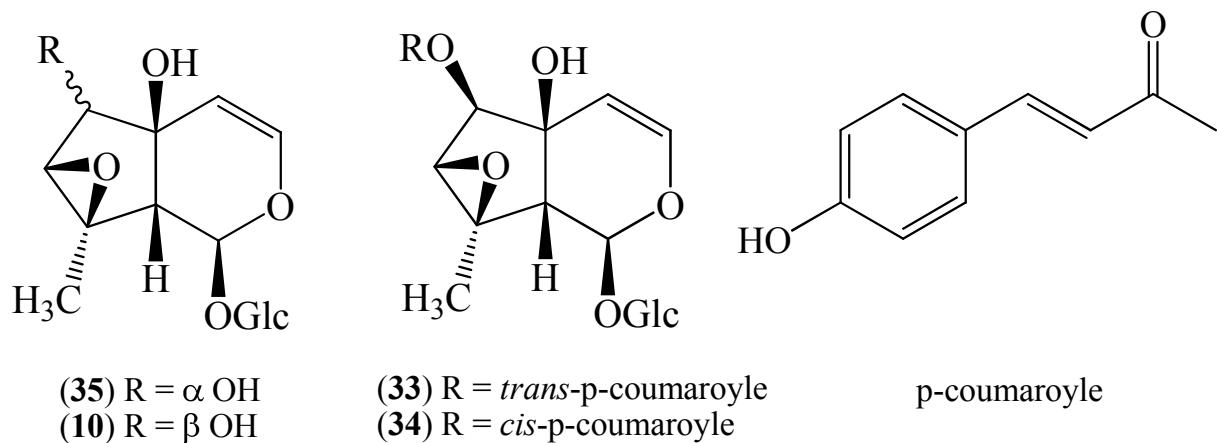


Figure I.5 : antirrhinoside et trois iridoïdes de *L. vulgaris*

I .3.3. étude phytochimique de *Linaria reflexa*

Rosa Tundis et collaborateurs ont fait une investigation chimique sur l'espèce *Linaria reflexa* Desf, qui a permis d'isoler quatre flavonoïdes : l'isolinarine **A** (1) et **B** (2), pectolinarine (4) et linariine (5) [22] (figure I.1).

I .3.4. étude phytochimique sur *Linaria saxatilis*

Marina Gordaliza et collaborateurs ont fait une étude phytochimique sur l'extrait hexanoïque des racines de *Linaria saxatilis* var. *saxatilis*, ce travail a révélé la présence de six néo-clérodane diterpénoïdes : *15,16*-diacétoxy-*15,16*-époxy-néo-cléroda-*3,12* Z-diène (36), *15,16*-diacétoxy-*12,13-15,16*-diépoxy-*14*-hydroxy-néo-clérod-*3*-ène (37), (38), (39), (40) et (41) [47] (figure I.6).

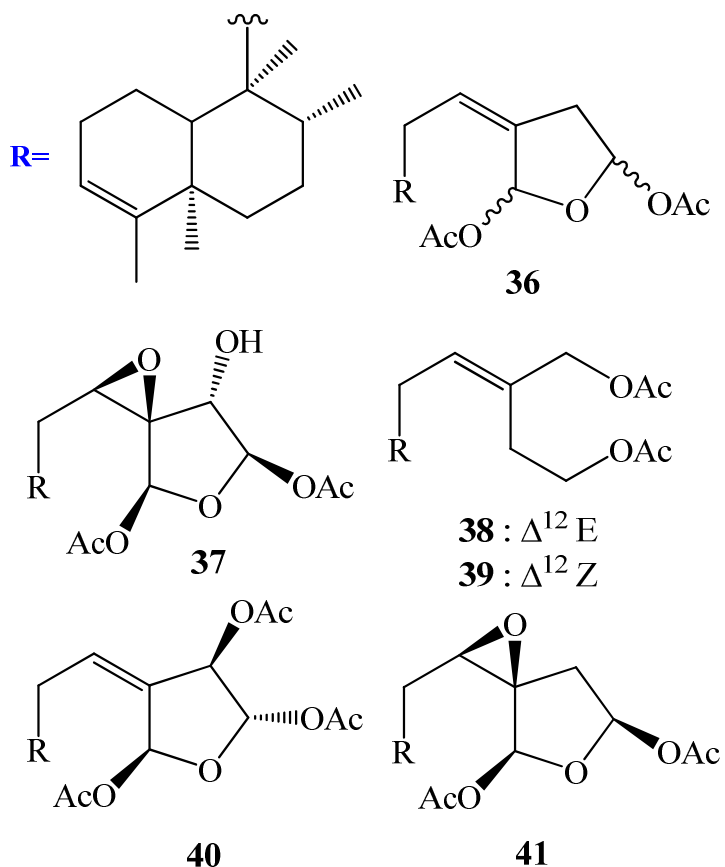


Figure I.6 : six néo-clérodane diterpénoïdes de *Linaria saxatilis*

Deux autres néo-clérodane diterpénoïdes (**42**) et (**43**), ont été isolés des parties aériennes et des racines de *L. saxatilis* var. *glutinosa*. Ces derniers sont responsables de l'activité cytotoxique décrite précédemment [19] (**figure I.7**).

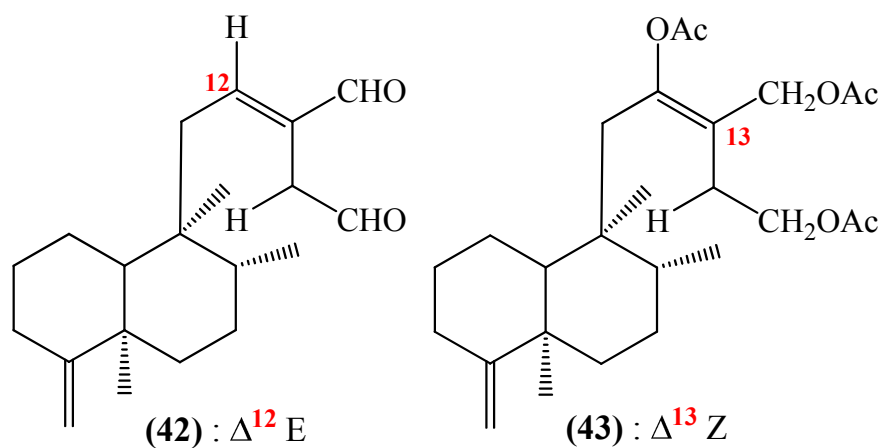


Figure I.7: deux néo-clérodane diterpénoïdes de *L. saxatilis*

I .3.5. étude phytochimique sur *Linaria arcusangeli*

Linaria arcusangeli s'avère particulièrement riche en iridoïdes. En effet, l'investigation chimique de cette dernière a permis d'isoler deux iridoïdes glycosilés nommés 8-épimuralioside (44), et macfadienoside (45) [48], un bisiridoïde nouveau appelé arcusangeloside (46) ainsi que d'autres iridoïdes connus : antirrhide (9), antirrhinoside (10), linarioside (11), , linaride (12) et 5-O-glucosylantirrhinoside (47) [49].

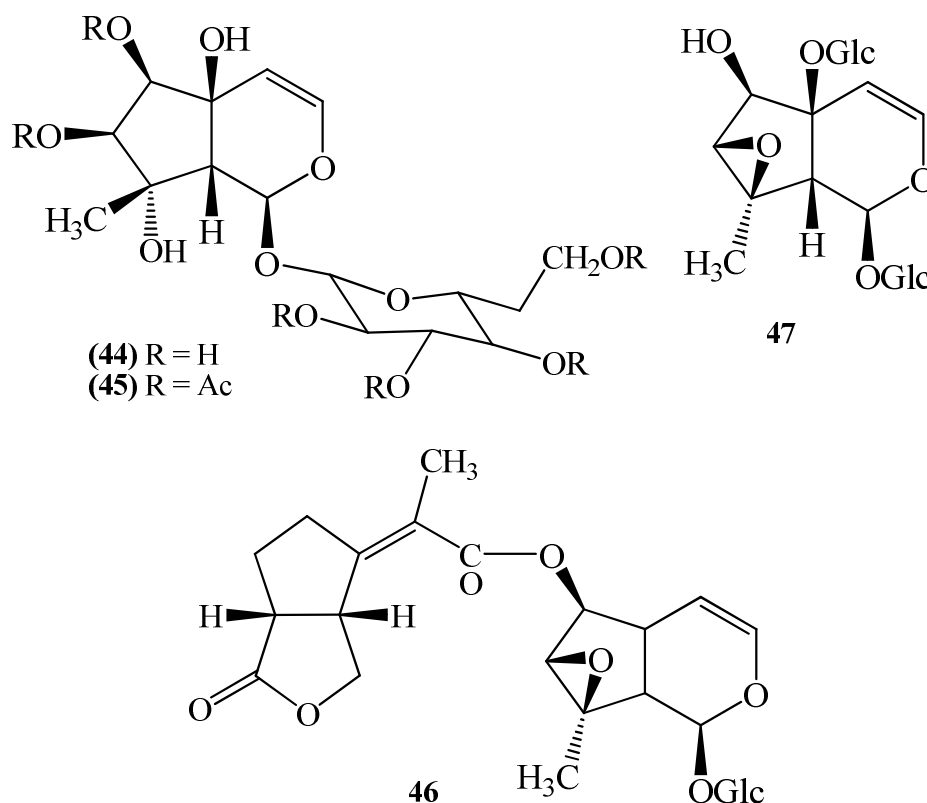


Figure I.8: quelques iridoïdes de *Linaria arcusangeli*

I .3.6. étude phytochimique sur *Linaria canadensis*

Les métabolites secondaires issus de l'investigation phytochimique de l'extrait méthanol des parties aériennes de *Linaria canadensis* (L.) sont divers. On y compte deux nouveaux dérivés iridoïdes : 7-deoxyiridolactonic diester acides (48), un glucopyranose analogue des iridolinarosides : le 3-acetyl-4,6-di-(7-deoxyiridolactonyl)-D-glucopyranose (49) et huit flavones connus [50] qui sont: l'apigénine (50)[51], la diosmétine (51)[52], la genkwanine (52) [51], la luteoline (53) [51], la luteoline 7-O-glucoside (54) [53], la luteolin 7-O-glucuronide (55) [54], la genkwanine 4'-O-rutinoside (56)[55], et la quercétine 7-O-rutinoside (57)[56] (figure I.9).

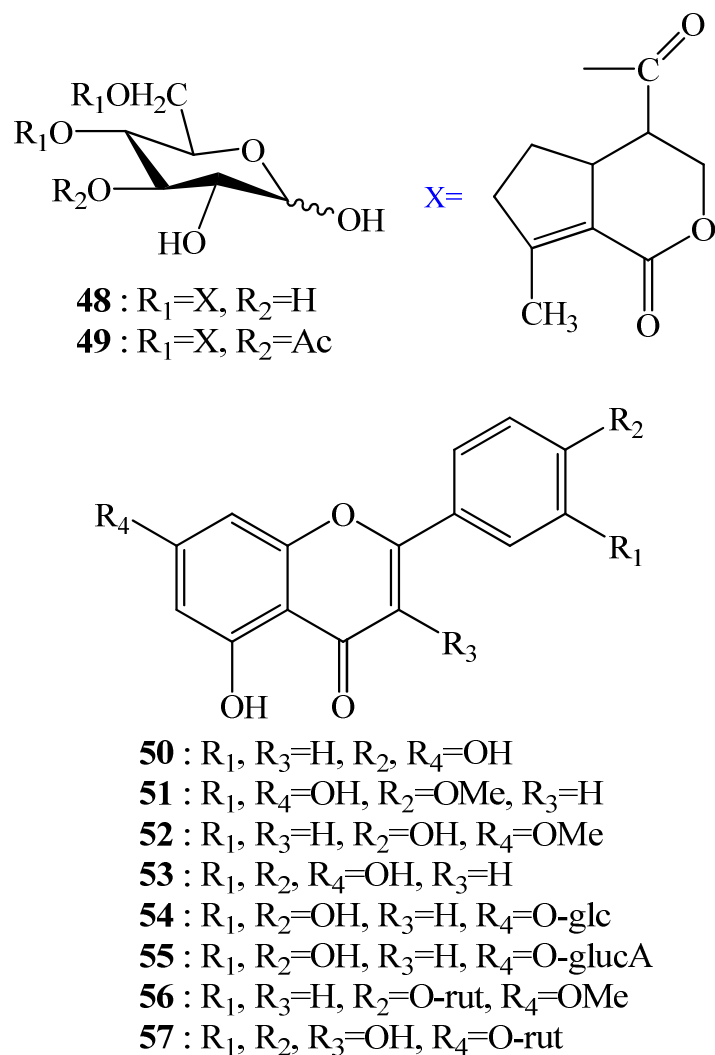


Figure I.9: deux iridoïdes et huit flavones de *Linaria canadensis*

I .3.7.étude phytochimique sur *Linaria aegyptiaca*

Une étude faite sur cette espèce ici en Algérie, à l'université de Batna. La recherche est faite à partir de l'extrait méthanolique, l'étude présente trois iridoïdes : l'antirrhinoside (**10**) [8,45], la linarioside (**11**) [8,57-58], l'acide mussaenosidique (**58**) [8,59], et un flavonoïde: la ladaneine (**59**) [8,60-61], ont été isolés de Les parties aériennes de *L. aegyptiaca* (L.) Dum. Subsp [8].

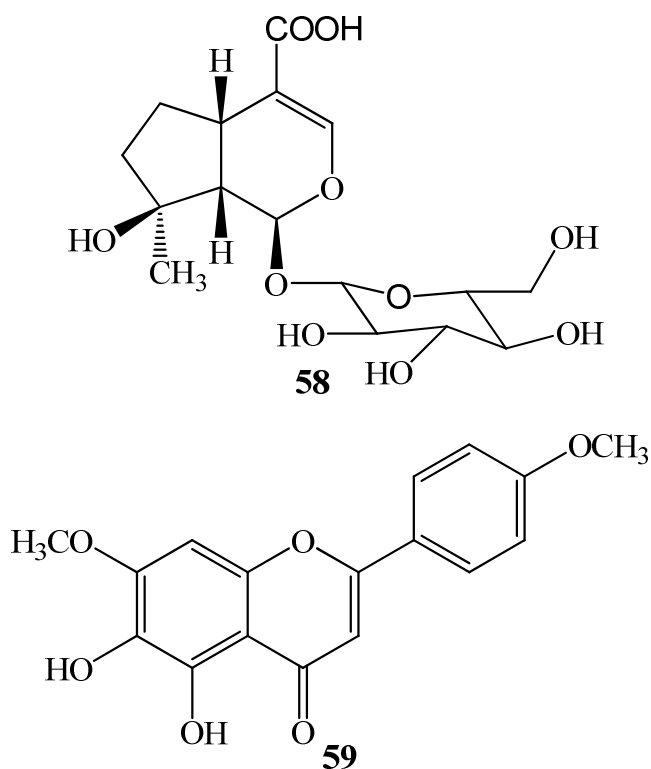


Figure I.10: l'acide mussaenosidique et un flavonoïde (ladaneine) à partir *Linaria aegyptiaca*

I .3.8. autres études phytochimique sur le genre *Linaria*

Un nouveau iridoïde glycosilé nommé genestifolioside (**60**), a été isolé de l'extrait éthanolique de *Linaria genestifolia* [62].

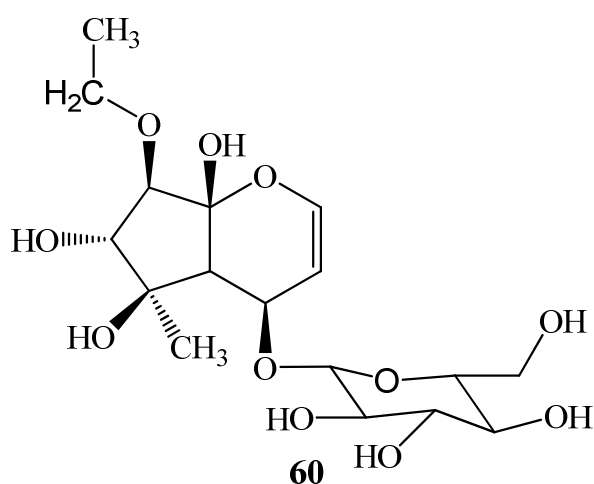
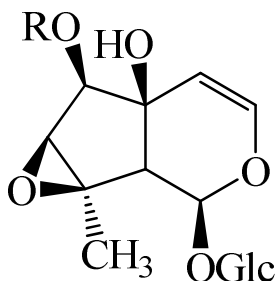


Figure I.11: la structure chimique de genestifolioside

Une investigation chimique de l'extrait acétone de *Linaria clementei*, a abouti à l'isolement de trois iridoïdes suivants : antirrhinoside (**10**), 6-seneciolyantirrhinoside (**61**) et 6-angeloylantirrhinoside (**62**) [63].



(**61**) R = COCH=CM₂

(**62**) R = COCMe=CHMe (Z)

Figure I.12: le 6-seneciolyantirrhinoside et 6-angeloylantirrhinoside

L'investigation chimique des parties aériennes de *Linaria multicaulis* (L.) Mill. a conduit à l'isolement des iridoïdes suivants : antirrhidine (**9**), antirrhinoside (**10**), 6-O-seneciolyantirrhinoside (**61**), et 6-O-angeloylantirrhinoside (**62**) [64]. Ces deux produits ont déjà été isolé à partir *Linaria clementei*.

De l'extrait éther du pétrole et l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Linaria aucheri*, 6 composés connus: β -amyrine (**63**), ergost-7-en-3 β -ol, stigmasta-5,22-*E*-dien-3 β -ol, stigmat-5-en, 24*S*-3 β -ol, antirrhinoside (**10**), et linariine (**5**) ont été isolés et identifiés [5].

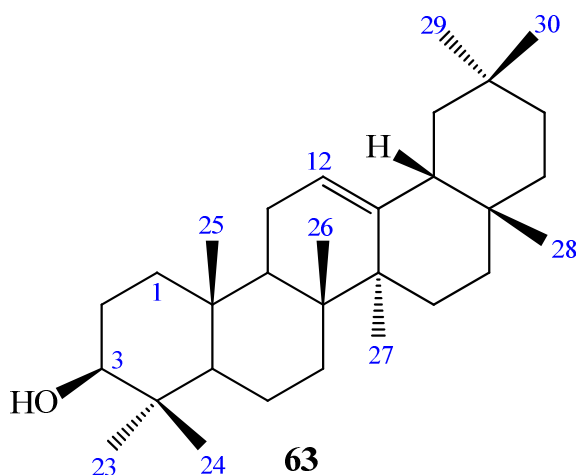


Figure I.13: la structure chimique de β -amyrine

References bibliographiques

- [1]. Deyuan H., Hanbi Y., Cun-li J., Manfred A. Fischer, Noel H. Holmgren & Robert R. Mill. *Flora of China*. **1998**. Vol **18**, **1**.
- [2]. Ismael E., S., Castro S., V., Appezato-da-Glória, B., *Brazilian archives of biology and technology*. **2001**. Vol **44** (3), **303-311**.
- [3]. Valdés, B., Talavera, S., Fernandez-Galiano E., Flora vascular de Andalucía Occidental (Scrophulariaceae). **1987** Barcelona: Ketres.. Vol **2**. **486-547**.
- [4]. HeJmut D., *Tetrahedron*. **1993**. Vol **49**. No **41**.
- [5]. Dilek E., M. Koray S., *Turk J Chem*. **2004**. Vol **28**, **133-139**.
- [6]. Quezel, P., Santa, S., Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. **1963**. Vol. **2**. CNRS, Paris.
- [7]. Viano, J., Anal. Inst. Bot. *Cavanilles*, **1978**. Vol **35**, **261-277**.
- [8]. Maria F., Hassina H., Catherine L., Hamada H., Christophe L., Mohammed B. *Bioch sys & eco*. **2010**. Vol **38**, **833-835**.
- [9]. Stojanov, Pd., Stefanov, B., and Kitanov, B. in *Flora Bulgaricu*, Part II, **1967**, **959**. Nauka i Iskustvo, Sofia.
- [10]. Stojanov, N., in *Our Medicinal Plants*, Part II, **1973**, **99**. Nauka i Iskustvo, Sofia.
- [11]. Jiangsu, College of New Medicine, "A Dictionary of the Traditional Chinese Medicines", **1977**. People's Hygiene Publisher, Beijing.
- [12]. Otsuka, H. *Phytochemistry*. **1993**. Vol **32** (04). **979-981**.
- [13]. Kitagawa, I., Tani, T., Akita, K., Yosioka. *Chem. Pharm. Bull.* **1978** I. Vol **21**.
- [14]. Arturo S. F., Marina G., JOSE M., Miguel D. C., and Maria L., De La Puente. *Phytochemistry*. **1993**. Vol **33** (3), **631-433**.
- [15]. Dobrescu, D., Cristea, A., Susanu, M. *Farmacia*. **1985**. Vol **33**, **215**.
- [16]. Pahlow, M., In "El gran libro de las plantas medicinales"; **4** Ed. **1979**, **273**; Everest S.A.: Madrid.
- [17]. Kitagawa, I., Tani, T., Akita, K., Yosioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1978**. Vol **21**. (**1973**).
- [18]. Dobrescu, D., Cristea, A., Susanu, M. *Farmacia*. **1985**. Vol **33**, **215**.
- [19]. Gordaliza M., Miguel Del Corral JM., de la Puente, LM; Garcia-Grávalos MD. San Feliciano, A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**. Vol **7** (13), **1649-1654**.
- [20]. Boukef, M.K., *Médecine traditionnelle et pharmacopée*. **1986**, ISBN.

- [21]. Marco, B., Rosa, T., Brigitte, D., Monica, R. L, Federica, M., François, T., Francesco, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**. Vol **18**, 5431–5434.
- [22]. Tundis, R., Deguin, B., Loizzo, M. R., Bonesi, M., Statti, G. A., Tillequin, F., Menichini, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**. Vol **15**, 4757-4760.
- [23]. Handjieva, N.V., Ilieva, E.I., Spassov. S.L., Popov, S.S. *Tetrahedron*. **1993**, Vol **49** (41), 9261-9266.
- [24]. Cragg, G. M., Newman, D. J., Expert Opin. *Investig. Drugs*. **2000**. Vol **9**, 2783.
- [25]. Beutler, J. A., Cardellina, J. H., II, Lin, C. M., Hamel, E., Cragg, G. M., Boyd, M. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**. Vol **03**, 581.
- [26]. Kupchan, S. M., Sigel, C. W., Hemingway, R. J., Knox, J. R., Udayamurthy, M. S. *Tetrahedron*. **1969**. Vol **25**, 1603.
- [27]. Woerdenbag HJ. Merfort I. Passreiter CM. Schmidt TJ. Willuhn G. van Uden, W. Pras, N. Kampinga, HH. Konings, A.W.T. *Planta Med.* **1994**. Vol **60**, 434.
- [28]. Pouget, C., Lauthier, F., Simon, A., Fagnere, C., Basly, J. P., Delage, C., Chulia, A. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**. Vol **11**. 3095.
- [29]. Benrezouk R., Terencio MC., Ferrándiz ML. S., Feliciano A., Gordaliza M., Miguel del C. JM. de la Puente ML. Alcaraz MJ. *Pharmacology Lett.* **1999**. Vol **64**. 205-211.
- [30]. Johne, S., Groeger D. *Pharmazie*. **1968**. Vol **23**, 35.
- [31]. Kuptsova LP., Bankovskii, AI. *Khim Prir Soedin*. **1970**. Vol **6**, 128.
- [32]. Feliciano, AS., Barrero, A.F., Miguel del Corral, J.M., Cordaliza, M., Medarde, M. *An Quim Ser, C*. **1985**. Vol **81**, 244.
- [33]. Leticia, J., El-Naggar, Beal JL. *J Nat Prod*. **1980**. Vol **43**, 649.
- [34]. Nicoletti, M., Serafini, M., Tomassini, L., Bianco, A., Passacantilli, P. *Planta Med.* **1987**. Vol **53**, 295.
- [35]. Ilieva, E., Khandzeva, N., Popov NS. *Phytochemistry*. **1992**. Vol **31**, 1040.
- [36]. Soren, D., Soren, R.J., Bentjuhl, J.N. *Phytochemistry*. **1981**. Vol **42**, 2717.
- [37]. Bahar, A., Al-Rehaily, A.J., Al-Howiriny, T.A., El-Sayed, K.A., Shamim, A.M., *Biol. Pharm. Bull.* **2003**. Vol **26** (4), 462-467.
- [38]. Otsuka, H., *J. Nat. Prod.* **1992**. Vol **55**, 1252-1255.
- [39]. Otsuka, H., *Phytochemistry*, **1993**. Vol **33** (3), 617-622.
- [40]. Otsuka, H., *Phytochemistry*. **1995**. Vol **39** (5), 1111-1114.
- [41]. Otsuka, H., *Phytochemistry*. **1994**. Vol **37** (2), 461-465.
- [42]. Kitagawa, I., Yoshihara, M., Tani T., Yosioka I. *Tetrahedron*. **1975**. Vol **1**, 23-26.
- [43]. Kitagawa, I., Yoshihara, M., Kamigauchi, T. *Tetrahedron*. **1977**. Vol **14**, 1221-1224.

- [44]. Hua, H., Cheng, M., Li, X., Pei Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**. Vol **50** (10), **1393-1394**.
- [45]. Sticher, O. *Phytochemistry*. **1971**. Vol **10**, **1974-1975**.
- [46]. Ilieva, EL., Handjieva, NV., Popov, SS. *Phytochemistry*. **1992**. Vol **31** (3), **1040-1041**.
- [47]. Gordaliza, M., Miguel Del Corral, JM., Mahique, MM., Castro, MA., San Feliciano, A. *Phytochemisrty*. **1995**. Vol **40** (4), **1307-1309**.
- [48]. Bianco, A., Guiso, M., Martino, M. *J. Nat. Prod.* **1997**. Vol **60**, **366-367**.
- [49]. Bianco, A., Guiso, M., Martino, M., Nicoletti, M., Serafini, M., Tomassini, L., Mossa, L., Poli, F. *Phytochemistry*. **1996**. Vol **42** (1), **89-91**.
- [50]. Kouichi, M., Takashi, T., Isao, K., Toshihiro, F., Yuki, Y., Kanji, I. *J Nat Med.* **2011**. Vol **65**, **172-175**.
- [51]. Aliouche, L., Zater, H., Zama, D., Bentamene, A., Seghiri, R., Mekkiou, R., Benayache, S., Benayache, F. *Chem Nat Compd.* **2007**. Vol **43**, **618-619**.
- [52]. Sahu, N.P., Achari, B., Banerjee, S. *Phytochemistry*. **1998**. Vol **49**, **1425-1426**.
- [53]. Chiruvella, K.K., Mohammed, A., Dampuri, G., Ghanta, R.G., Raghavan, S.C. *Int J Biomed Sci.* **2007**. Vol **3**, **269-278**.
- [54]. Lee, M.H., Son, Y.K., Han, Y.N. *Arch Pharm Res.* **2002**. Vol **25**, **842-850**.
- [55]. Dardass, AK. Ph.D. Thesis. *Karachi Univ* (Pakistan). **1999**.
- [56]. Sharaf, M., EL-Ansari, M.A., Saleh. *Bioch sys & eco.* **1997**. Vol **25**, **161-166**.
- [57]. Kitagawa, I., Tani, T., Akita, K., Yosioka, I. *Tetrahedron.* **1972**. Vol **5**, **419-422**.
- [58]. Kapoor, S.K., Reisch, J., Szendrei, K. *Phytochemistry*. **1974**. Vol **13**, **1018**.
- [59]. Damtoft, S., Hansen, S.B., Jacobsen, B., Jensen, S.R., Nielsen, B.J. *Phytochemistry*. **1984**. Vol **23**, **2387**.
- [60]. Yang, F., Li, X.-C., Wang, H.-Q., Yang, C.-R. *Phytochemistry*. **1996**. Vol **42**, **867**.
- [61]. Horie, T., Ohtsuru, Y., Shibata, K., Yamashita, K., Tsukayama, M., Kawamura, Y. *Phytochemistry*. **1998**. Vol **47**, **865**.
- [62]. Uddin Ahmed, V., Kousar, F., Zubair, M., Khan, A., Ali, M.S., Choudhary, I., Sener, B. *Fitoterapia.* **2006**. Vol **77**, **12-14**.
- [63]. Marco, J.L., *Phytochemistry*. **1985**. Vol **24** (7), **1609-1610**.
- [64]. Tundis, R., Deguin, B., Dodaro, D., Statti, G.A., Tillequi, F., Menichini, F. *Bioch sys & eco.* **2008**. Vol **36**, **142-145**.

CHAPITRE II

Les métabolites secondaires chez Linaria

Introduction générale

Les plantes produisent un grand nombre de composés, dont, jusqu'à il n'y a pas très longtemps, on ne connaissait pas le rôle pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires. Des découvertes récentes ont montré que bon nombre d'entre eux ont un rôle défensif pour les plantes. Ils ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Ils se sont surtout illustrés en thérapeutique et dépassent actuellement **100 000** substances identifiées. Parmi eux : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes. Ces composés se trouvent dans toutes les parties des plantes mais ils sont distribués selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une espèce à l'autre [1].

Le genre *Linaria* est connu pour la présence de variété des composés. Les enquêtes antérieures ont mené à l'isolement des alcaloïdes [2], iridoïdes [3-6], flavonoïdes [6-8] et diterpénoïdes[9].

Dans ce chapitre on va présenter une étude sur les terpénoïdes et les flavonoïdes.

Généralités sur les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires des végétaux sont des molécules qui constituent très souvent la clé de voûte du système d'interactions entre les plantes et leur environnement. D'une part, les pigments et les arômes (flavonoïdes, caroténoïdes, terpènes...) sont très souvent impliqués dans des relations à bénéfices réciproques établies au cours de l'évolution entre plantes et animaux (pollinisation, dissémination des semences...). D'autre part, la plupart des métabolites secondaires des végétaux sont des phytoalexines, c'est à dire des molécules biologiquement actives, impliquées dans la défense des végétaux. Les propriétés de ces molécules sont très souvent mises à profit dans le cadre des médecines traditionnelles, à travers l'emploi des plantes médicinales, mais également dans la médecine allopathique moderne à travers l'usage de molécules purifiées ou issues d'hémisynthèses chimiques. Dans certains cas, la synthèse chimique est plus coûteuse que la production des molécules directement par les plantes. La culture au champ de plantes médicinales est cependant parfois délicate et les efforts se sont multipliés depuis maintenant près de **20** ans pour produire des molécules à partir de cultures in vitro de tissus végétaux [10-11].

II .1.LESTERPÈNES

II .1.1.Introduction

Les terpènes constituent un ensemble connu et très vaste des métabolites secondaires des végétaux. Ce sont des molécules polyéniques qu'on trouve également dans le règne animal.

En **1887**, **O. Wallach** croyait que le terpène devait être construit à partir d'unité isoprénique [12]. Cette hypothèse a été renouvelée en **1953** par **Ruzicka**[13]. Une règle général qui postule que chaque groupe de terpènes est issu de la condensation « tête à queue » d'un nombre variable d'unités isopréniques.

Le chimiste Ruzicka proposa une nomenclature pour les terpènes en fonction du nombre d'atomes de carbones qui les constituent: les hémiterpènes en **C5**, les monoterpènes en **C10**, les sesquiterpènes en **C15**, les diterpènes en **C20**, les sesterpènes en **C25**, les triterpènes en **C30**, les tétraterpènes en **C40** et les polyterpènes [14].

Le terme terpène est inventé par **Kekulé**, vient à l'origine de l'huile de «térébenthine» qui a été utilisé pour tous les composés huileux volatils insolubles dans l'eau [15].

Ils sont d'origine végétale et constituent, entre autre, principe odoriférant des plantes. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant **10, 15, 20** atomes de carbones. Extraites, ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Nombre d'entre eux possédant de propriétés antiseptiques [16], d'où divers emplois dont l'embaumement qui est resté dans le terme balsamique donné aux plantes et aux huiles essentielles qui en sont tirées. Ces terpènes sont biosynthétisés à la suite du couplage de **2** entités à **5** carbones (au minimum) et dont la structure est celle de l'isoprène (**2-méthylbuta-1,3-diène**). Plus de **20.000** structures terpénoïdes ont été identifiées à ce jour.

II .1.2. Classe des Terpénoïdes

Les terpènes sont tous dérivés de la même entité C5 isoprène (**figure II.1**) et ils se différencient entre eux par leurs structures.

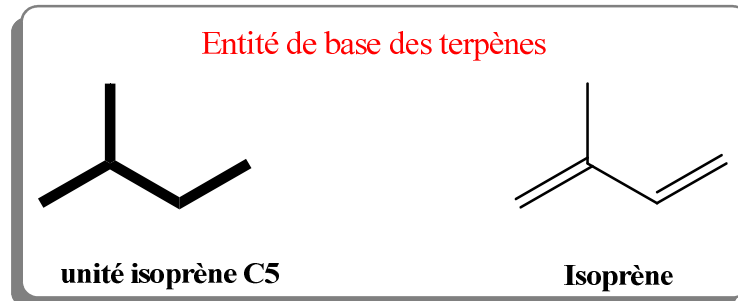


Figure II.1: L'isoprène

L'isoprène, qui est un produit naturel, n'est pas invoqué dans le processus biochimique de la formation des terpènes. Deux entités isoprènes biochimiquement actives ont été identifiées : le **DMAPP** (Diméthylallyl Pyrophosphate ou diméthylallyl diphosphate) et l'**IPP** (Isopentényl Pyrophosphate ou diphosphate) (**Figure II.2**).

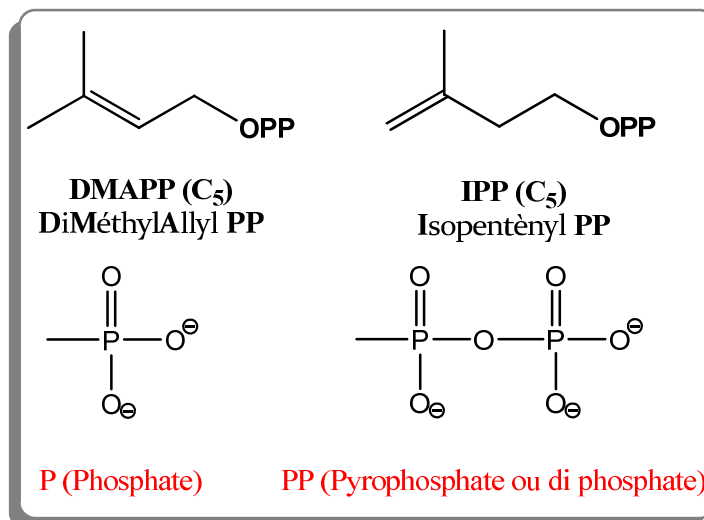


Figure II.2: DMAPP et IPP

Selon le nombre d'entités C5 isoprènes (C_5H_8)_n, incorporé dans leurs structures, les terpènes sont classés en diverses catégories (**Figure II.3**).

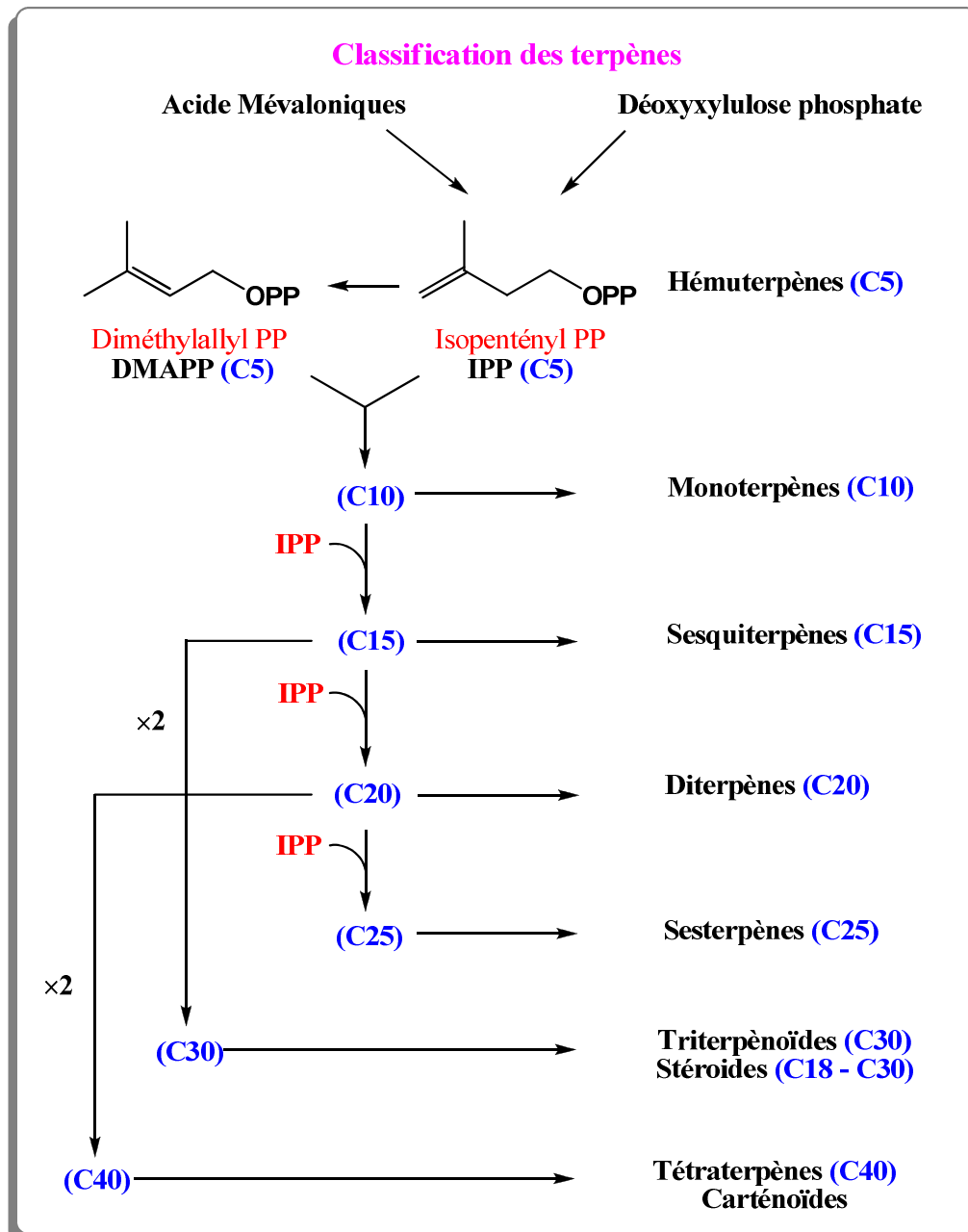


Figure II.3: la classification des terpènes

II .1.2.1. Les Monoterpènes (C10)

Le processus biochimique invoqué lors de la formation du géranyl diphosphate (**GPP**) est une condensation du **DMAPP** et de l'**IPP** la prényl transférase. Ils constituent la majeure partie des huiles essentielles qui sont présentes en quantité chez environ **2000** espèces de **60** familles végétales [17]. Cette classe des composées a connu une large extension conduisant ainsi à des systèmes mono/bicyclique. Quelques exemples parmi les plus significatifs de ces systèmes acycliques et cycliques (**Figure II.4**) sont illustrés dans ce qui suit :

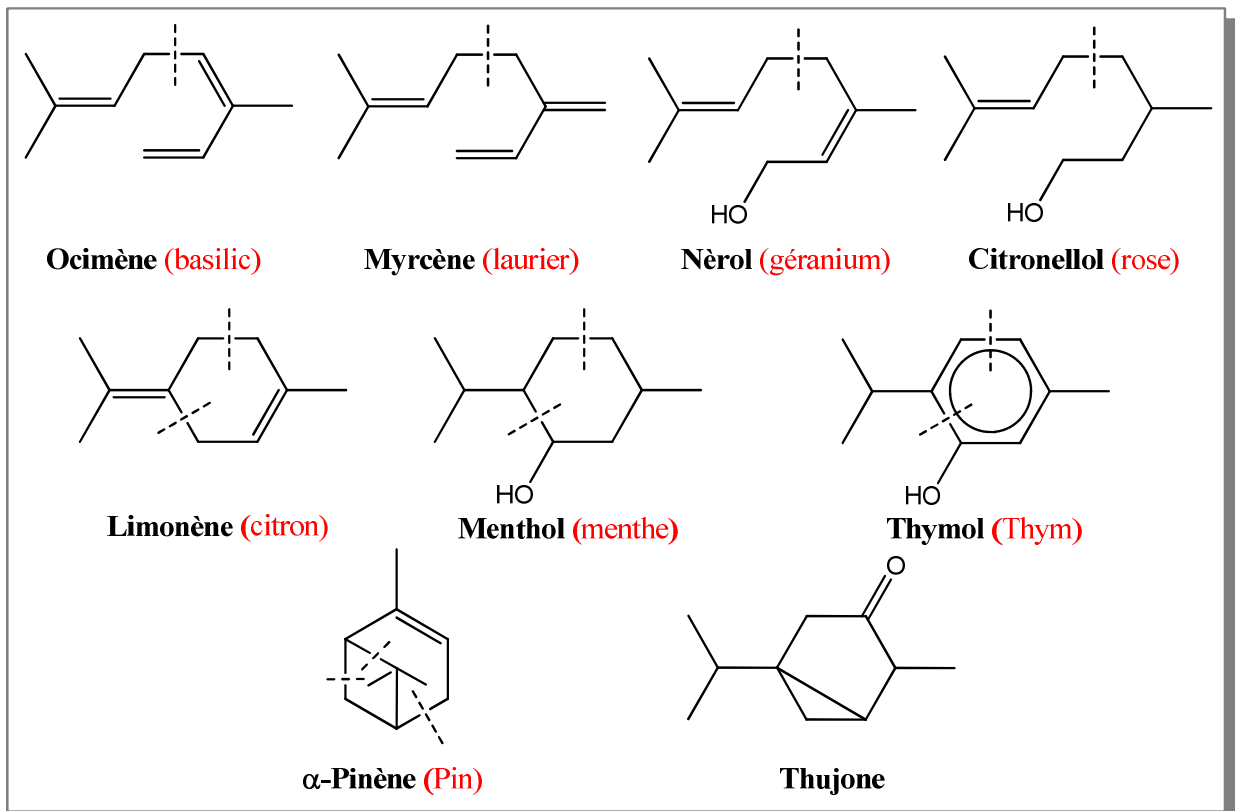


Figure II.4 : quelques exemples des monoterpènes

II 1.2.2. Les Sesquiterpènes (C15)

L'addition d'une unité **IPP** au géranyl diphosphate conduit via la prényl transférase, au farnésyl diphosphate (**FPP**), précurseur fondamental des sesquiterpènes. Par rapport à la sous famille des monoterpènes, les sesquiterpènes offrent un plus grand nombre de possibilités de cyclisation, ce qui augmente la diversité structurale de façon considérable.

Ces composés n'ont pas seulement un intérêt de produit chimique et position-points de chemotaxonomique, mais aussi parce que beaucoup d'entre eux possèdent une activité thérapeutique anti-inflammatoire, antitumoral, antimicrobienne, anthelminthique et anti-nourrir [18]. Les sesquiterpènes lactones représentent plus de **5000** structures différentes [19]. On les retrouve dans les champignons et autre familles d'angiospermes (ex. Apiaceae) et dans les plantes (ex. Asteraceae, fleurs et feuilles). Dans le règne végétal, les sesquiterpènes lactones appartiennent essentiellement à quatre familles : les Astéracées (ou composées), les Lauracées, les Frullania et les Magnoliacées, et par conséquent dans tout les produits qui en sont dérivés.

Tous les sesquiterpènes lactones présentent en général, une structure commune, un groupement α -méthylène- γ -lactone (**Figure II.5**), qui semble être responsable de leurs activités biologiques.

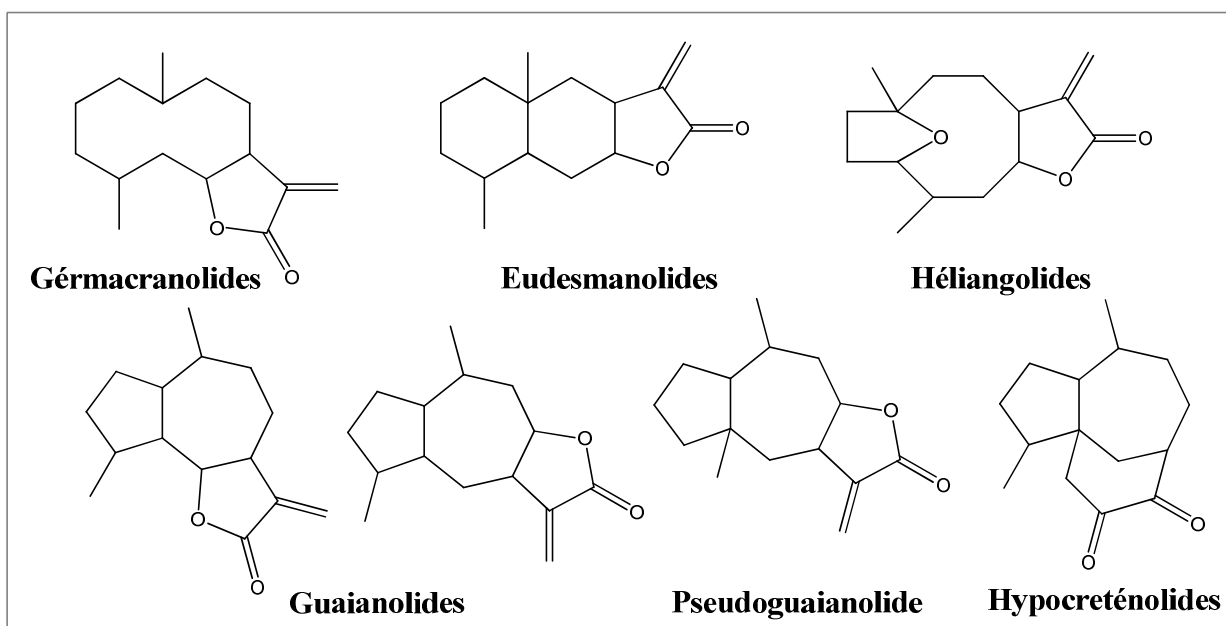


Figure II.5: Structures de quelques lactones sesquiterpènes

II .1.2.3. Les Diterpènes (C₂₀)

Les diterpènes sont surtout répandus chez les végétaux, mais sont aussi présents chez certains insectes et chez divers organismes marins. Ils sont formés par l'union des quatre unités d'isoprènes et sont classés selon leur biogenèse pour former le géranyl diphosphate (GGPP)[20]. La figure suivante présente quelques structures des diterpénoïdes (**figure II.6**).

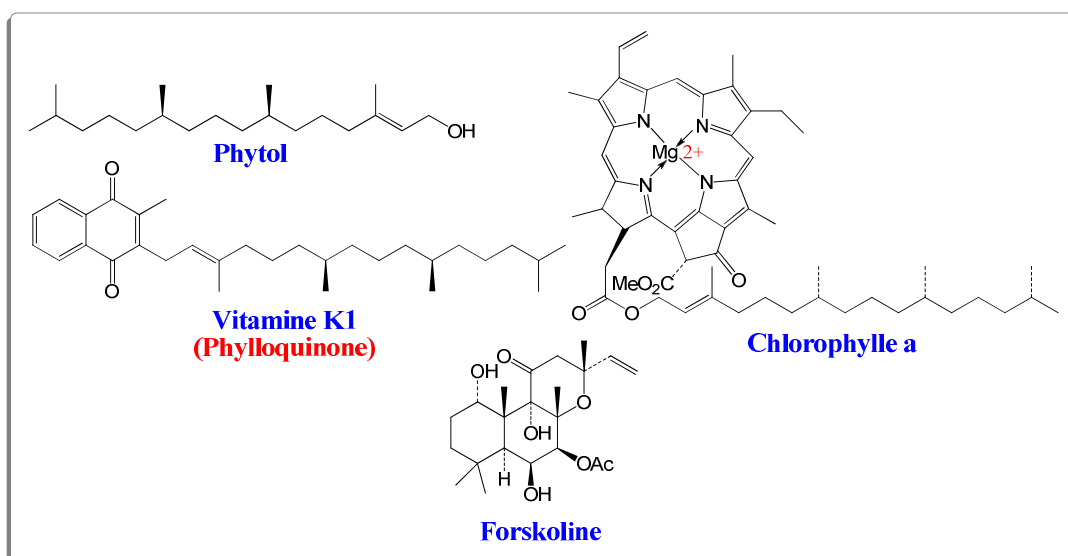


Figure II.6: quelques exemples des Diterpènes

II .1.2.4. Les Triterpènes (C30)

Les triterpènes sont distribués dans le règne végétal et animal, leur formation en C30 provient du simple triterpène le squalène (**figure II.7**) issu du couplage réductif de deux unités de (FPP) [15,20].

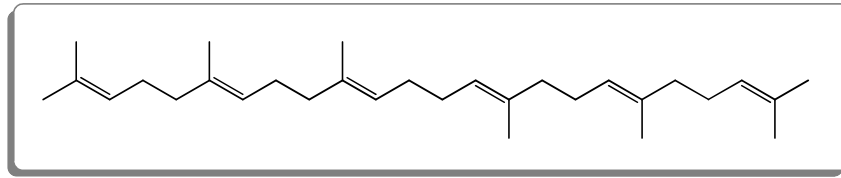


Figure II.7: le squalène

* Les triterpénoïdes saponines :

Les triterpénoïdes saponines sont fréquemment rencontrés dans le règne végétal sous forme de glycosides mais en faible concentration. L'hydrolyse acide libère les sucres habituellement liés en position 3 (de un à six unités tel le glucose, le galactose, le maltose, le rhamnose et / ou l'arabinose) et l'aglycone (sapogénine) qui peut être un triterpénoïde ou un stérol. Les structures de triterpénoïdes les plus rencontrées sont des structures pentacycliques.

II .1.2.5. Les tetraterpènes (C40)

Ils sont représentés par un seul groupe de composés, les caroténoïdes, dont plusieurs centaines de variantes structurales sont connues. Ces composés jouent un rôle dans la photosynthèse mais en les retrouve également dans des tissus non photosynthétiques de plantes, de champignons et dans les bactéries. La formation du squelette tetraterpène invoque un couplage queue-queue de deux molécules de GGPP dans la séquence essentielle qui est similaire à celle invoquée dans la formation des triterpènes et du squalène. La couleur orange des carottes (*Daucus carota*; Umbelliferae/Apiaceae) est causée essentiellement par le β -Carotène.

Le β -carotène (**figure II.8**) possède 11 doubles liaisons conjuguées, d'où sa couleur qu'il donne aux carottes. Il joue un rôle essentiel dans la croissance et dans la chimie de la vision. Le Lycopène (**figure II.8**), qui est un exemple caractéristique de caroténoïdes, est le pigment rouge de la tomate mûre (*Lycopersicon esculente*, 0.02 g/Kg), il est entièrement acyclique.

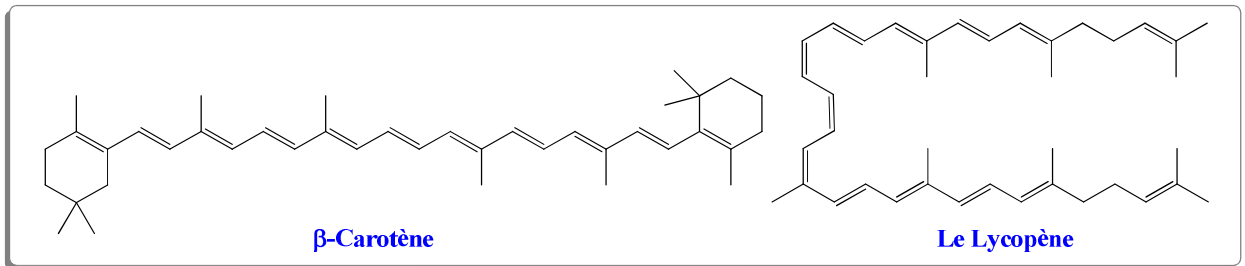


Figure II.8: quelque triterpènes

II .1.2.6.Les polyterpènes

Le caoutchouc naturel (ou gomme) (**figure II.9**) extrait de l'hévéa brasiliensis (Euphorbiaceae) est un polymère de l'isoprène. Il est produit par la coagulation, par la chaleur, de la sève de l'hévéa. Toutes ses doubles liaisons sont Z (chaîne principale) et chaque molécule comporte de **103 à 105** résidus isoprènes. L'isomère, où toutes les liaisons sont E est la gutta-percha (**figure II.9**) extrait de Palaquium gutta (Sapotceae), c'est une matière dure et cassante ($n \approx 1000-10.000$).

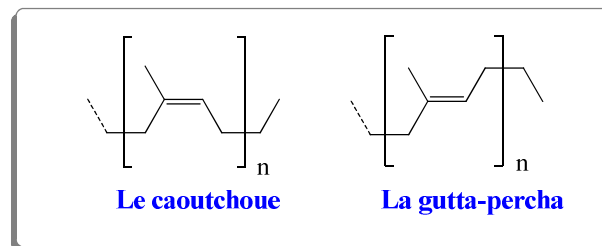


Figure II.9

Certains dérivés de quinones présentent des chaînes latérales de longueur variable constituées d'unités isoprènes : de **1 à 12** unités dans les ubiquinones (coenzymes Q) et de **3 à 10** résidus pour les plastoquinones (**figure I.10**).

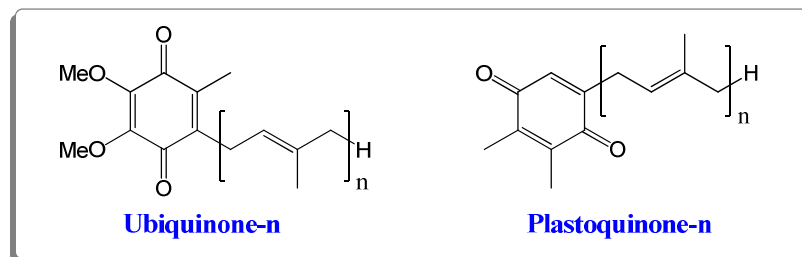


Figure II.10

II .1.2.7.Les Stéroïdes

Les stéroïdes sont des triterpènes modifiés contenant le système tétracyclique du lanostérol avec introduction de divers groupements dans le noyau (méthyle, hydroxyle...) et une chaîne latérale contenant plusieurs modifications. Ils sont très répandus dans la nature où on les rencontre à tous les échelons du règne végétal et du règne animal. Ce sont

des composés biologiques de première importance. Les hormones, les corticostéroïdes, les acides biliaires, les vitamines D, les phytostérols sont des stéroïdes. Les stéroïdes partagent tous le même squelette de base : le noyau stérol. Ce noyau est constitué de quatre cycles accolés : le cyclopentanoperhydrophénanthrène.

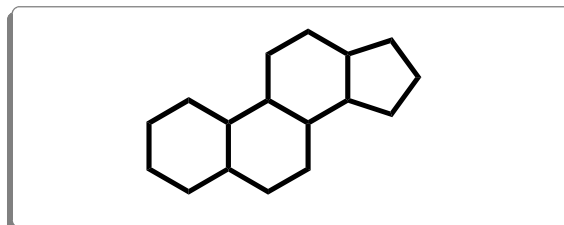


Figure II.11: Noyau stérol

Les stéroïdes comportent différents groupement chimiques sur le noyau stérol. Ils possèdent généralement des méthyles en **C-10 (Me-19)** et **C-13 (Me-18)** et souvent une chaîne alkylée (chaîne latérale) en **C-17**. En fait, il semble que les voies métaboliques de synthèse des stérols ne soient présentes que chez les eucaryotes (animaux, plantes, champignons).

Un exemple bien connu de stérol est le cholestérol, mais il en existe plus d'une centaine différente. Ils sont localisés quasi-exclusivement chez les animaux, les plantes, les champignons.

* Le cholestérol

C'est le plus abondant et le plus connu des stéroïdes (**figure II.12**), c'est aussi le plus ancien identifié. Isolé dans les calculs biliaires dès le XVIII^{ème} siècle, sa formule globale fut établie en **1888** et sa structure complète en **1955**. Il comporte **8** carbones asymétriques, un seul isomère, sur les **256** possibles, existe naturellement.

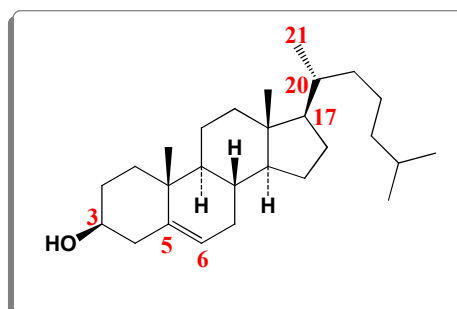


Figure II.12: le cholestérol

II .1.2.7.1. Les hormones stéroïdes

Les hormones sont des molécules émises par une glande. Elles ont des structures différentes : acides aminés, polypeptides ou stéroïdes. Ces dernières sont des régulateurs de

l'activité biologique (caractères sexuels secondaires et physiologie de la reproduction).

Trois grandes classes : les androgènes, les œstrogènes et les progestatifs.

- ✗ Les androgènes : ce sont des hormones mâles (testostérone et androstérone) produites par les testicules. Elles sont responsables des caractères masculins (pilosité, gabarit, voix grave...)
- ✗ Les œstrogènes: ce sont des hormones femelles (œstrone (folliculine), œstradiol). Elles contrôlent le cycle menstruel et sont responsables du développement des caractères sexuels secondaires féminins (voix, pilosité...).
- ✗ Les progestatifs : sont plus communément connus sous le nom d'hormones de « grossesse » (progestérone). Associées aux œstrogènes, elles sont responsables de la nidation de l'ovule fécondée et régulent l'évolution de la grossesse.

La figure suivante présent quelques exemples des hormones stéroïdiennes.

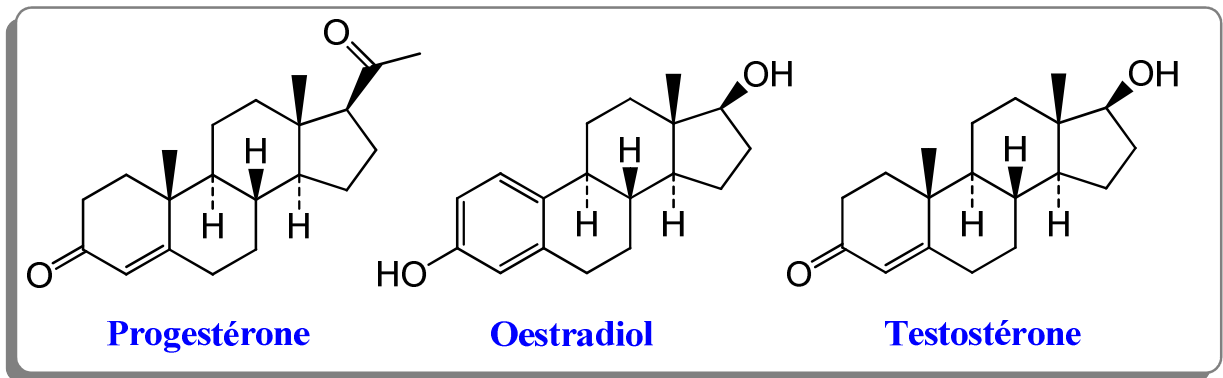


Figure II.13: Hormones stéroïdiennes

II .1.2.7.2.Les corticostéroïdes

Elles sont produites au niveau des glandes surrénales (corticosurrénales). La fonction oxygénée en **C-11** est caractéristique de ce groupe. Ce sont des anti-inflammatoires très puissants (traitement des allergies, de l'asthme, des rhumatismes, de l'arthrite...) et elles participent au contrôle du métabolisme des protéines et des glucides.

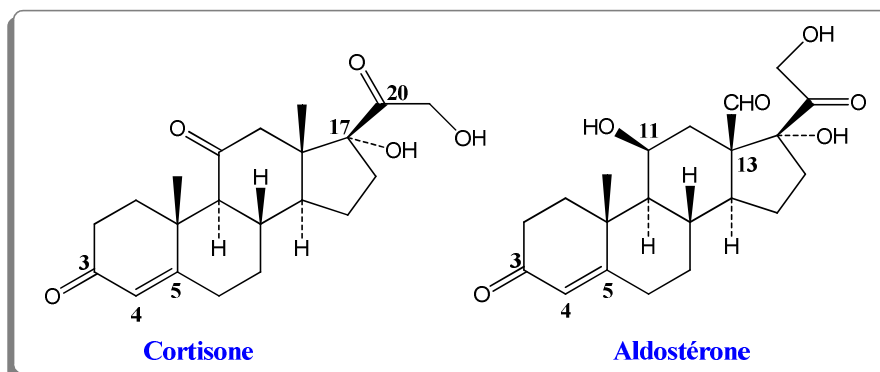


Figure II.14

II .1.2.7.3.Les phytostérols

Le stéroïde majeur chez les mammifères est sans aucun doute le cholestérol (**C-27**), précurseur de nombreuses autres structures telles les hormones sexuelles et les corticostéroïdes. Les principaux stérols (**figure II.15**) dans les plantes, les champignons et les algues sont caractérisés par la présence, sur la chaîne latérale, d'un méthyle (ou éthyle) attaché au carbone **C-24**. Ces différents types de stérols, appelés phytostérols, sont des constituants de membranes cellulaires qui jouent un rôle très important dans la perméabilité de celles-ci et aussi dans la prolifération cellulaire.

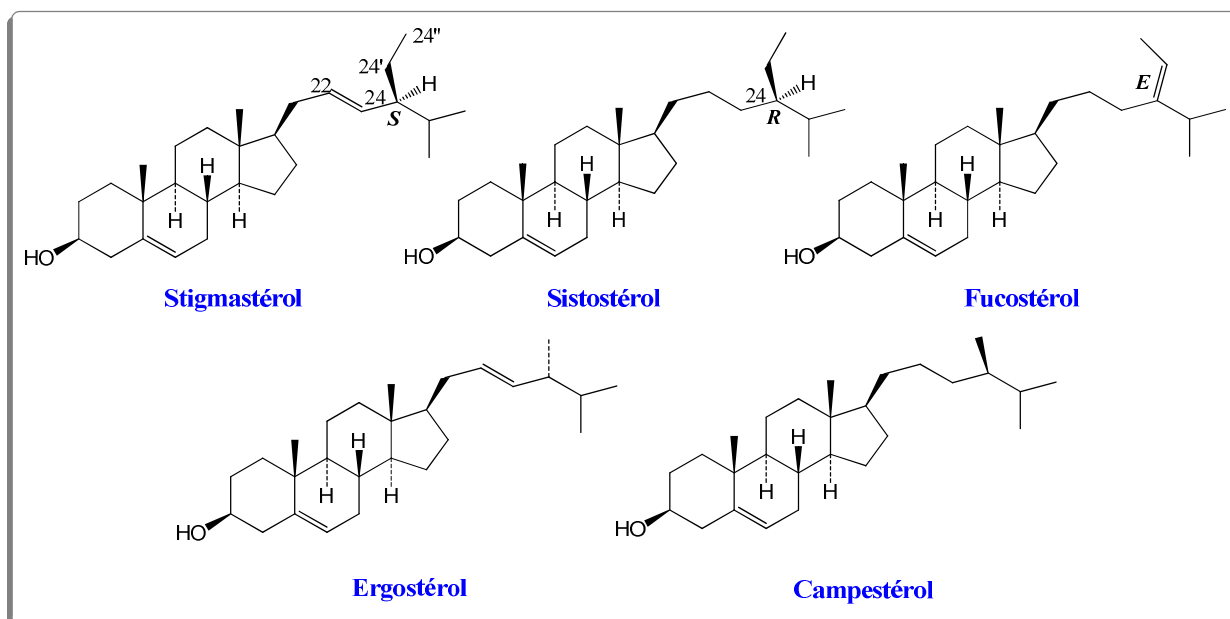


Figure II.15

II .1.2.8.Les iridoïdes

II .1.2.8.1.Définition

Les iridoïdes sont un groupe de composés naturels appartenant à la grande classe des terpénoïdes[21]. Ce sont des monoterpènes caractérisés par un squelette cyclopentane(C) pyranique à jonction cis, partiellement hydrogéné [22]. Ils sont définis par une structure commune, en l'occurrence le noyau iridane de nature cyclopentapyranique (*cis*-2-oxabicyclo [4,3, O]-nonane) [23].

Les iridoïdes tirent leur nom de celui de fourmis du genre *Iridomirmex*, à partir desquelles furent isolés des composés impliqués dans les mécanismes de défense qui leur sont propres. On citera notamment l'iridodial et l'iridomyrmécine [23].

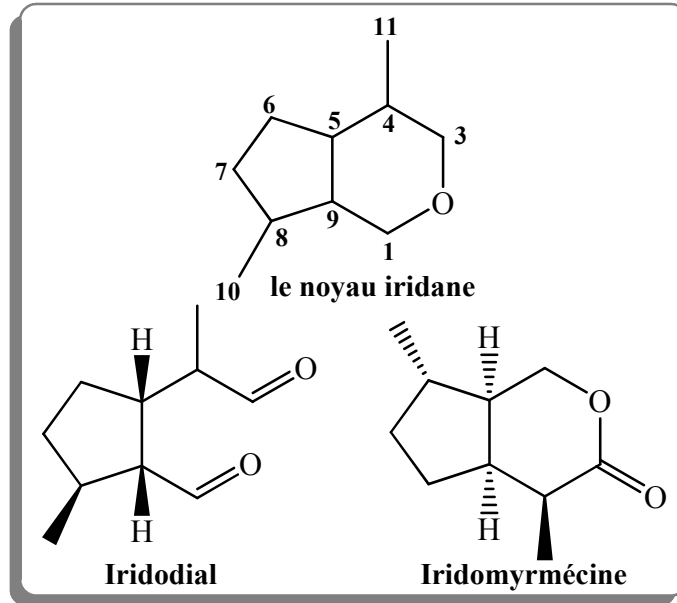


Figure II.16

II .1.2.8.2. Classification des iridoïdes

Les iridoïdes qui constituent la famille la plus nombreuse des dérivés monoterpéniques à squelette cyclopentanoïde, peuvent être divisés en cinq groupes [24] : Iridoïdes simples ou non glycosilés, iridoïdes glycosilés, sécoiridoïdes, bisiridoïdes et les Iridoïdes lactones.

a) Les iridoïdes simples

Les iridoïdes simples ou non hétérosidiques peuvent être alcaloïdiques (skytanthine), polycycliques comme pluméricine (**figure II.17**), esters ou éthers internes [23].

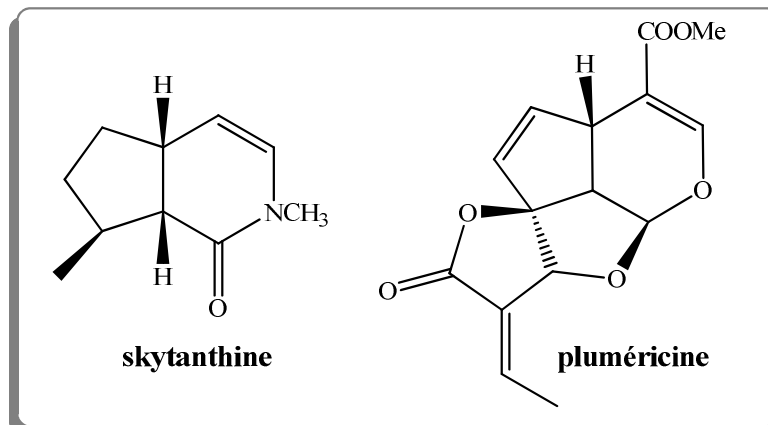


Figure II.17: Iridoïdes simples

b) Les iridoïdes glycosilés

La majorité des iridoïdes sont des glucosides. La liaison hétérosidique s'établit entre l'hydroxyle porté par le carbone anomérique du D-glucose et l'hydroxyle en *C-1* de la génine [23]. Ces iridoïdes sont les métabolites secondaires communs des Scrophulariaceae, particulièrement les iridoïdes à neuf atomes de carbone. On citera entre autres: l'aucubine et dérivés, le catalpol et dérivés (**figure II.18**) [25].

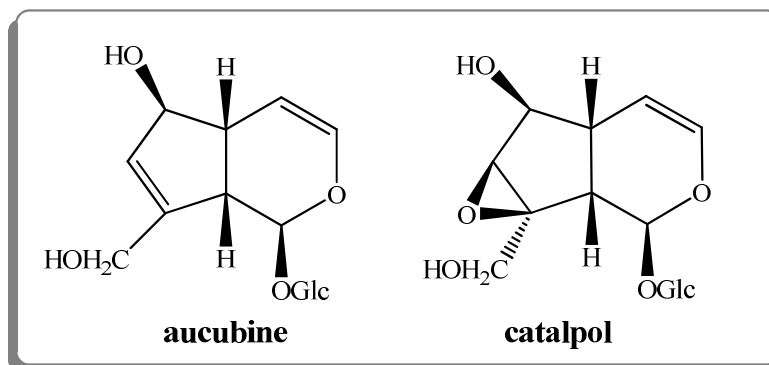


Figure II.18: Iridoïdes glycosilés

c) Sécoiridoïdes

Ils sont issus de rupture de la liaison *C7-C8* du noyau cyclopentanique. Les sécoiridoïdes non hétérosidiques sont rares. La sécologanine est un exemple de ce type des iridoïdes [26].

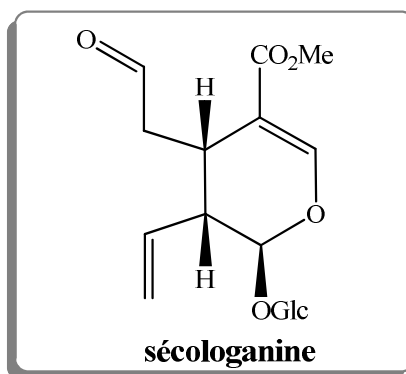


Figure II.19

d) Bisiridoïdes

Ces composés sont issus de la dimérisation de deux iridoïdes et sécoiridoïdes. Ainsi le picconioside est un bisiridoïde constitué de la loganine estérifiée par la déoxyloganine [27].

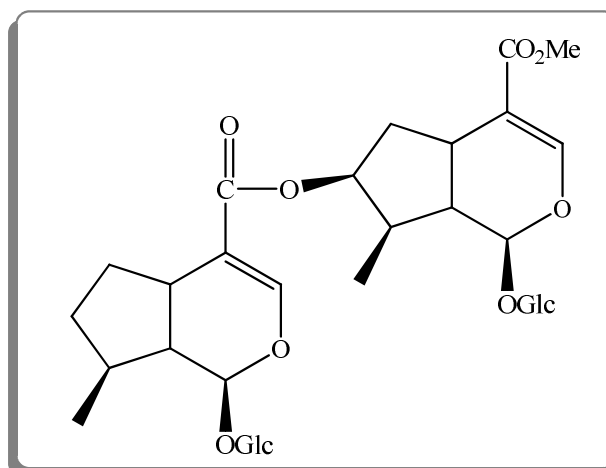


Figure II.20: picconioside

e) Iridoïdes lactones

Pour cette classe de substances, on distingue les iridoïdes lactones de types I et II[28], selon l'orientation régiochimique de la lactone par rapport au noyau cyclopentanique.

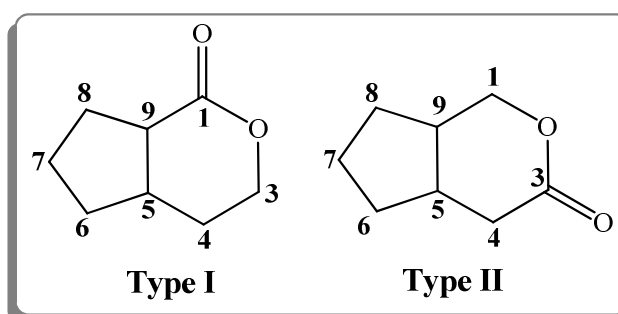


Figure II.21: Iridoïdes lactones

II .1.2.8.3. Propriétés biologiques des iridoïdes

Les iridoïdes, composés largement répandus dans la nature, sont principalement connus pour être des principes actifs de plantes jouissant d'un usage non négligeable en phytothérapie. On citera pour cela la valériane et l'harpagophyton utilisés pour traiter les désordres digestifs, la fièvre et soulager les douleurs des parturientes [29]. Ils présentent un large éventail d'activités biologiques du fait de leurs particularités structurales. Ils possèdent des propriétés antimicrobiennes [30], antitumorales [31], antioxydantes [32], anti-inflammatoires [33], antinociceptives [34], anti allergiques [35], immunostimulantes [36]...etc.

II .1.3.Le Rôle Bioactif des Terpénoïdes

Des investigations concernant les activités biologiques des mono- et des sesquiterpènes ont prouvé l'existence des effets suivants [37-38]: anesthésique, antihistaminique (allergies), anti-rhumatismal, diurétique (β -eudesmol), insecticide, analgésique, toxique (sesquiterpènes) quelquefois, antibiotique, anti-inflammatoire, anti-cancéreux, irritant et calmant (mono- et sesquiterpènes).

II .2.Les polyphénols

Généralité

Les polyphénols constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de **8000** structures phénoliques connues. Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux et présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent biogénétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate [39].

Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques avec ou non d'autres fonctions (OH alcoolique, carboxyle...). Dans cette catégorie, on trouve de nombreuses substances : les noyaux simples en **C6-C1** et **C6-C3**, les noyaux dérivants de l'extension du phényle propane, en **C6-C3-C6**[40].

Les composés phénoliques forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes [41].

II .2.1.Les coumarines

La coumarine tire son nom de **kumarú**, le nom dans une langue amérindienne tupi de Guyane de l'arbre poussant en Amérique du sud, le gaiac de Cayenne (*Dipteryx odorata*) de la famille des Fabacées, donnant la fève tonka d'où cette molécule fut isolée en **1820** par Vogel. Le nom de tonka vient aussi du tupi et d'une langue caraïbe de Guyane, le kali'na (ou galibi) [42].

La coumarine est une substance naturelle organique aromatique connue dans la nomenclature internationale comme **1-benzopyrane-2-one** (**figure II.22**) qui peut être considérée en première approximation, comme une lactone de l'acide **2-hydroxy-Z-cinnamique**. Son odeur de foin fraîchement coupé a attiré l'attention des parfumeurs sur elle dès le **XIXe** siècle. Le même terme de coumarine désigne aussi la classe des composés phénoliques dérivés de cette dernière molécule, la **2H-1-benzopyrane-2-one**. Ces composés possèdent des hydroxyles phénoliques qui peuvent être méthylés ou être engagés dans des

liaisons hétérosides. Plus d'un millier de coumarines naturelles ont été décrites. Elles sont très largement distribuées dans le règne végétal [43].

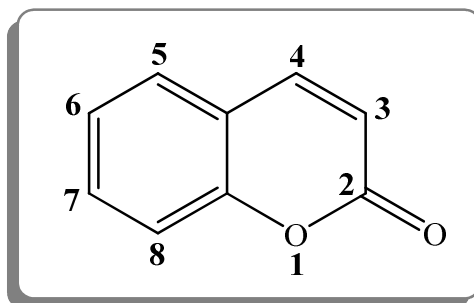


Figure II.22: la coumarine

II .2.2.LESFLAVONOÏDES

II .2.2.1.Introduction

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuellement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont : les flavones, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavone, les isoflavonones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins [44]. Parmi toutes les molécules flavoniques, les flavonols sont considérés comme l'étendue la plus ancienne [45] (Stafford 1991).

Le terme « flavone » a été utilisé pour la première fois en 1895 par « VonKostanecki » et « Tamber » qui étaient des pionniers dans le travail structural de cette classe particulière des flavonoïdes [46].

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, pollen, fruits, graines, bois, ...etc.

Leur fonction principale semble être la coloration des plantes. Tous les flavonoïdes n'absorbent pas dans le domaine du visible, mais présentent tous une bande d'absorption dans l'ultraviolet proche du visible. Ils jouent un rôle important dans la protection des plantes [47]. Ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV [48]. Un des rôles de la couleur chez les plantes est d'attirer les insectes et cela afin de déclencher la fécondation, les charger de pollen ou de grains de façon à en assurer la dissémination nécessaire à la reproduction de l'espèce [49]. De nos jours; plus de 8000 flavanoïdes ont été identifiés [50].

II .2.2.2. Définition et Structure

Le squelette de base des flavonoïdes est constitué de **15** atomes de carbone, répartis sur deux noyaux benzéniques qui sont reliés par une chaîne linéaire de **3** atomes de carbone [51], comme le montre la **figure II.23**

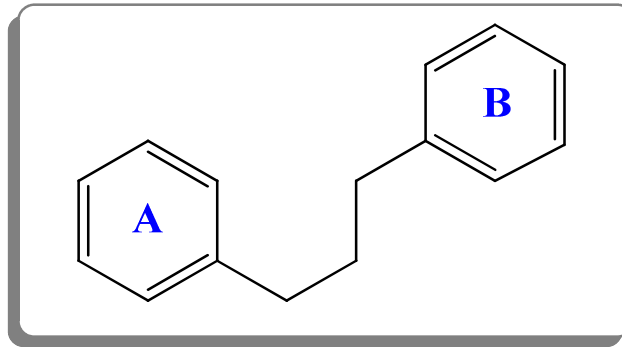


Figure II.23: Squelette de base des flavanoïdes

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides, une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone ou génine [52].

Certains flavonoïdes sont spécifiés à partir des tissus végétaux, les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles. Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, ce sont des pigments naturels au même titre que la chlorophylle (couleur verte) et les caroténoïdes (nuance jaune et orangée) [52].

La variation du degré d'oxydation de la chaîne carbonée **C 3** (formant, en général un hétérocycle **C**, par condensation avec un **OH** phénolique du noyau **A**) détermine les propriétés et la classification utile en sous-groupes ou famille dont les membres peuvent porter des substituants différents au niveau du noyau **B** [53].

Le noyau **B** est relié à l'hétérocycle **C** dans les positions **2**, **3** ou **4** comme le montre la **figure II.24**.

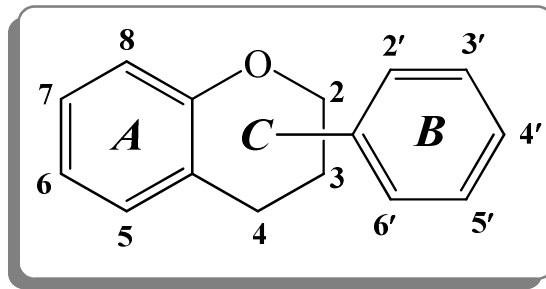


Figure II.24

La figure II.25 montre les différents sous-groupes dérivés des flavonoïdes.

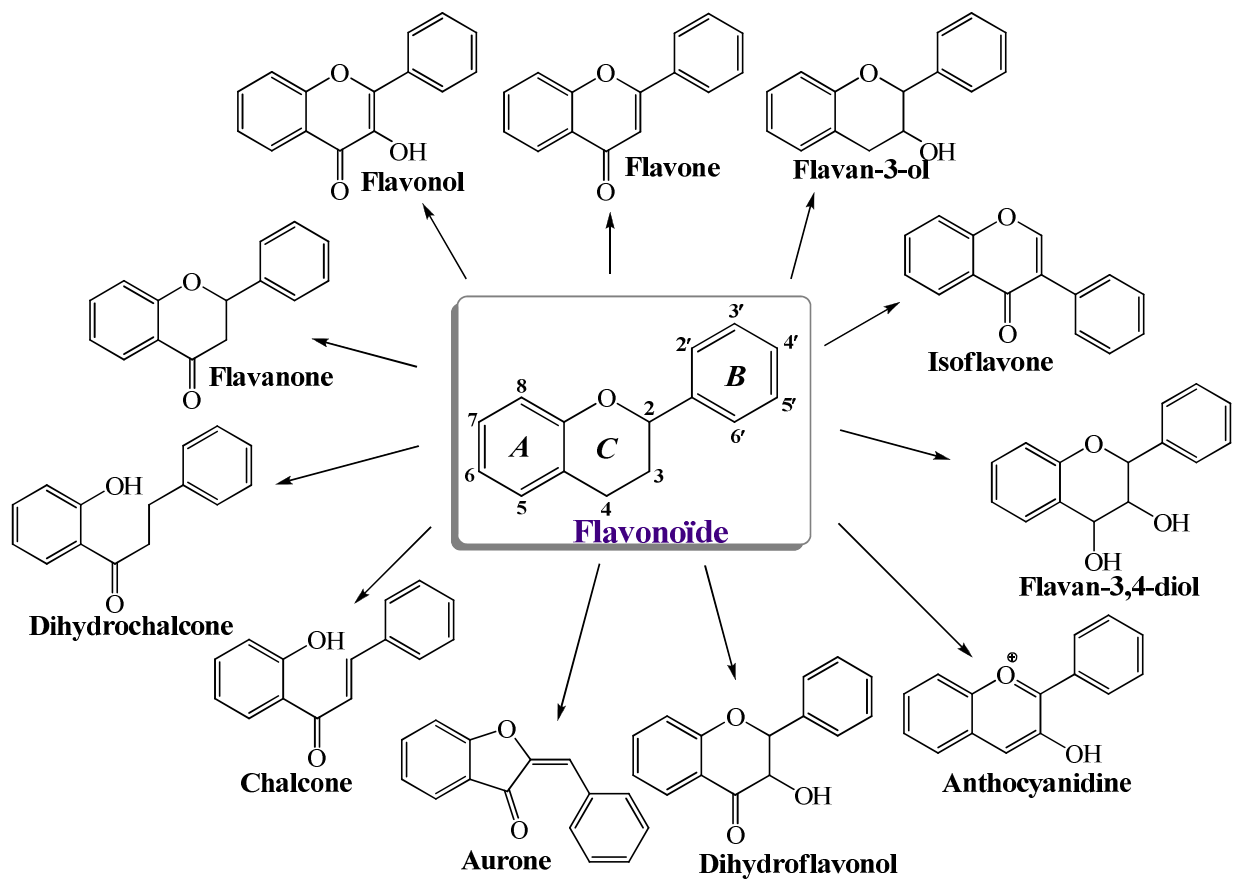


Figure II.25 : représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C.

Parmi les différentes structures des flavonoïdes on observe une sous classe appelée les isoflavonoïdes. Ils forment une sous classe très large et très distinguée des flavonoïdes, ces composés très actifs se trouvent essentiellement chez la famille des fabales (les légumineuses) [54]. Ils jouent un rôle important sur la santé humaine, certains isoflavonoïdes fonctionnent comme des phytoalexines, synthétisées comme défense contre le stress (microorganisme infectieux, froid, UV), c'est aussi le seul groupe de flavonoïdes connus pour être hautement toxiques envers de nombreux insectes [55].

Structurellement les isoflavonoïdes se différencient des flavonoïdes par le positionnement du cycle **B** du squelette flavonique sur le carbone **3**, la **figure II.26** montre les principaux types d'isoflavonoïdes :

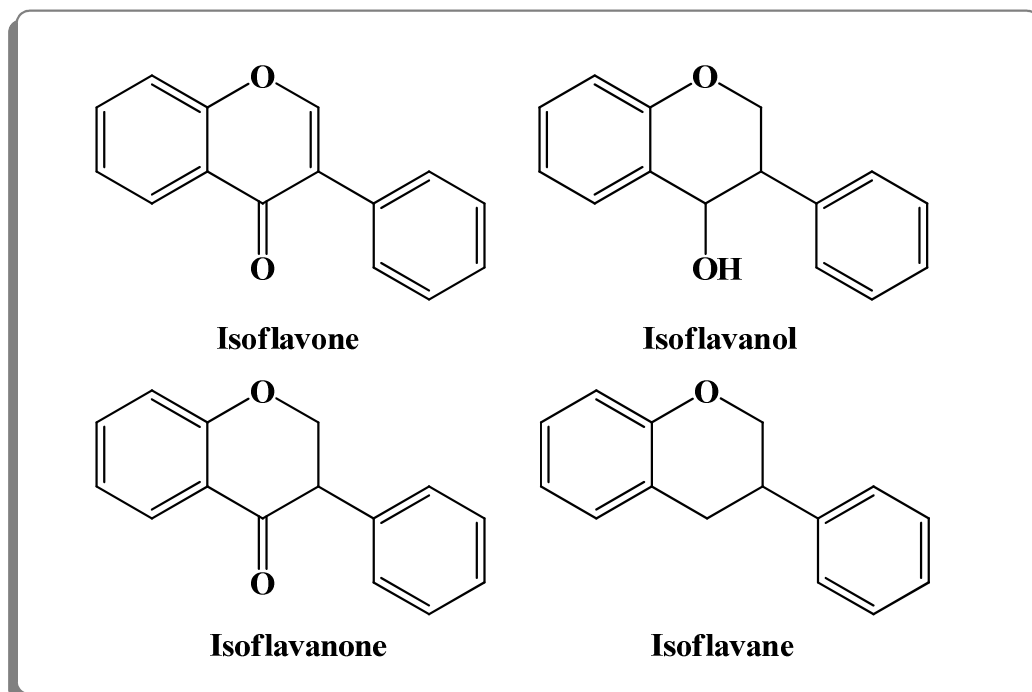


Figure II.26 : les types des isoflavones

II .2.2.3.Découverte des flavonoïdes

L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine **C**, à la suite des travaux de *Szent Gyorgyi* en **1938**. Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de Paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque. Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique **P** (**P** étant la première lettre du mot perméabilité). Cette notion de vitamine **P** n'existe plus à l'heure actuelle puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines ; par contre, les flavonoïdes sont considérés comme de importants micronutriments puisqu'ils peuvent jouer des rôles d'antioxydants ou posséder des propriétés biologiques diverses que nous présenterons dans ce mémoire [56].

II .2.2.4.Origine Biosynthétiques de flavanoïdes

Les connaissances actuelles sur la biosynthèse et l'enzymologie de la production des proanthocyanidines dans les plantes proviennent d'une étude détaillée réalisée par Stafford [57]. Il a également décrit les relations entre lignine et proanthocyanidines, mais n'a pas pu montrer de rôle structural pour les proanthocyanidines contrairement à la lignine. Stafford suggère que lignine et proanthocyanidines ont des rôles similaires de défense.

Le schéma de la biosynthèse [58] des proanthocyanidines est résumé dans la **figure II.32** et la liste des enzymes qu'elle implique est présentée dans le **tableau I.1** Les étapes réactionnelles conduisant aux précurseurs de flavonoïdes et à leurs différentes classes impliquent des intermédiaires **4'**-hydroxylés (sur le cycle **B**), les flavanoïdes obtenus sont ensuite hydroxylés (ou fonctionnalisés) sur les noyaux **A** et **B** pour conduire aux autres classes de flavonoïdes.

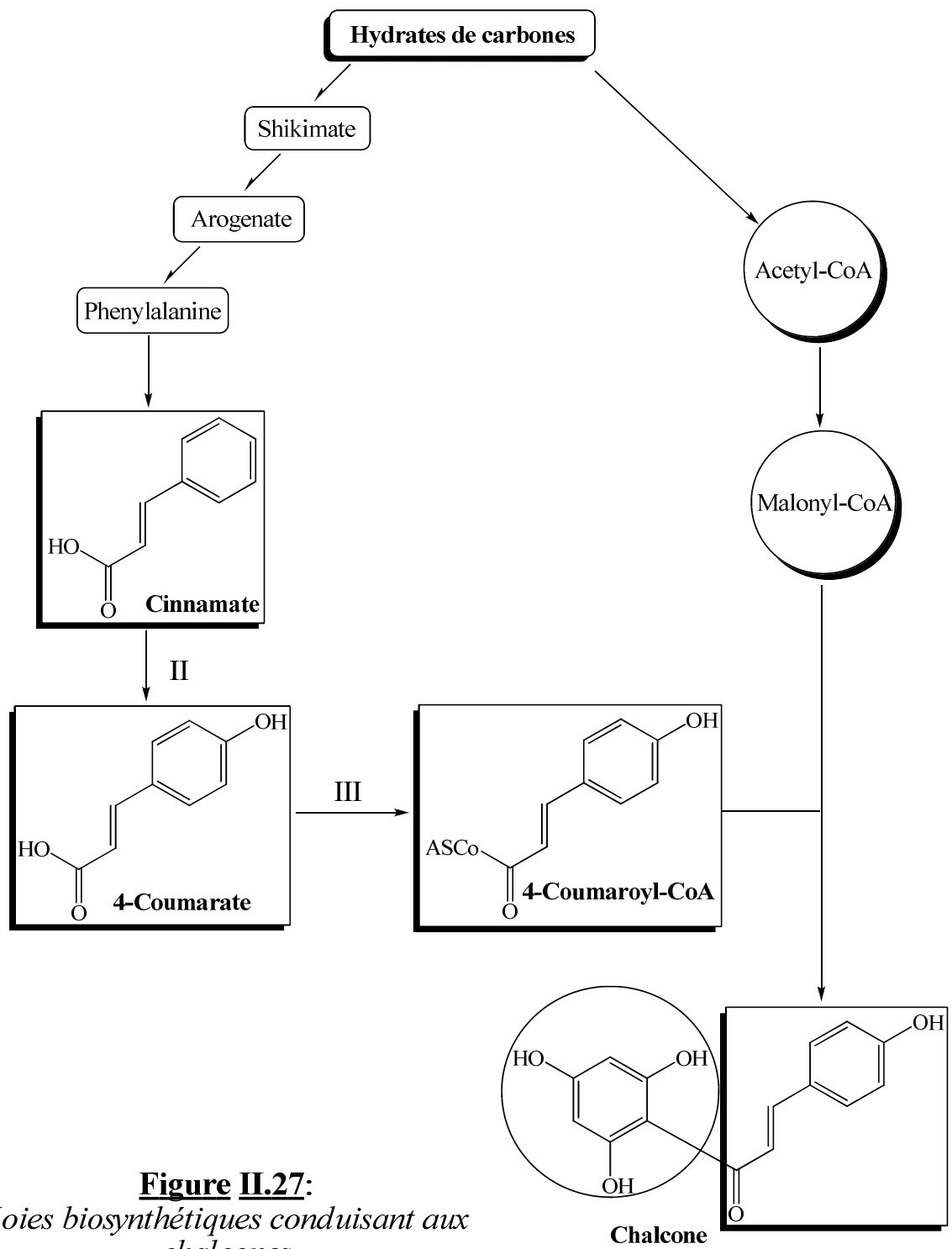


Figure II.27:
Voies biosynthétiques conduisant aux chalcones

Le cycle **B** est une partie de l'hétérocycle **C** du squelette en **C15** des flavonoïdes proviennent de l'ester hydroxycinnamique-CoA, habituellement le **4-coumaroyl-CoA**, alors que le cycle **A** est originaire de trois unités acétate provenant du malonyl-CoA.

Les deux précurseurs (**figure II.27**) proviennent d'hydrates de carbone. Le malonyl-CoA est formé à partir d'acétyl-CoA et de **CO₂** par catalyse à l'acétyl-CoA carboxylase. Le **4-coumaroyl-CoA** et les esters d'acides hydroxycinnamiques correspondants sont fournis à partir de la voie phénylpropanoïde. Cette voie de biosynthèse de la phénylalanine est issue de celle du shikimate/arogénate. La réaction clé est la désamination de la phénylalanine catalysée par la phénylalanine ammonialyase (PAL). Cette enzyme joint la voie métabolique primaire à la voie phénylpropanoïde. Le produit de la réaction, le *trans*-cinnamate, est hydroxylé en **4-coumarate** par la cinnamate-**4**-hydroxylase associée à la fonction monooxygénase du cytochrome P-**450**. L'activation du **4-coumarate** par la formation d'ester CoA est catalysée par la **4-coumarate-CoA** ligase. Le **4-coumaroyl-CoA** peut être hydroxylée en position **3**, en caffeoyl-CoA qui sert de substrat pour la formation de chalcones ainsi que pour la synthèse de la **4-coumaroyl-CoA** dans certaines plantes.

L'enzyme-clé pour la formation du squelette flavonoïde est la chalcone synthèse (**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**, **2',4',6',4'**-tétrahydrochalcone (**figure II.28**)[59].

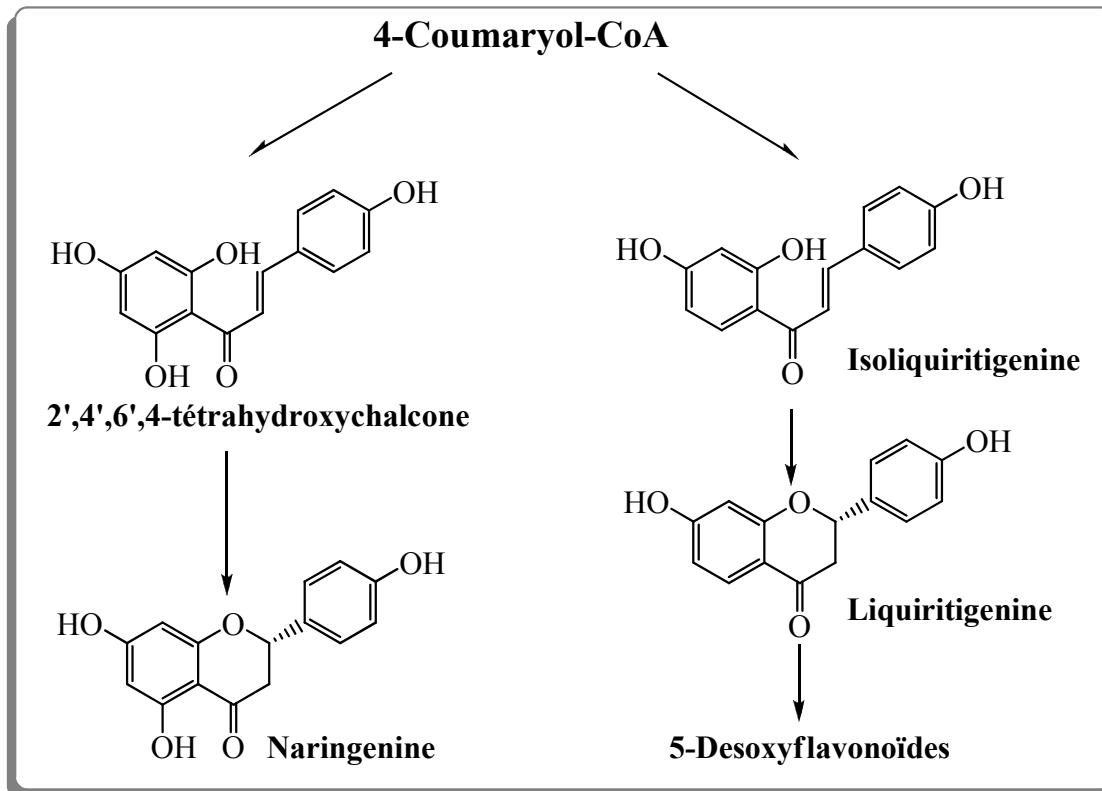


Figure II.28: Voie de biosynthétique de construction du squelette benzopyrane.

La 6'-désoxychalcone et l'isoquiritigenine sont respectivement obtenues à partir de la malonyl-CoA et du 4-coumaroyl-CoA par la chalcone synthase mais avec participation d'une réductase *NADPH*-dépendante. Ces deux types de chalcones sont les précurseurs directs des aurones et des autres diphenylpropanoïdes. Les enzymes impliquées dans ces réactions sont encore inconnues. Mais, en particulier, les 6'-hydroxy- et 6'-désoxychalcones sont les intermédiaires précurseurs de tous les flavonoïdes. La cyclisation stéréospécifique des chalcones, catalysée par la chalcone isomérase, conduit aux 2*S*-flavanones (par exemple la naringenine et la liquiritigenine) avec le squelette spécifique des flavonoïdes (**figure II.28**). Deux types de chalcone isomérases sont connus, l'une catalyse la cyclisation de la 6'-hydroxychalcone en 5-hydroxyflavanone et l'autre isomérise les 6-hydroxy et 6'-désoxychalcone en 5-hydroxy- et 5-désoxyflavanone, respectivement.

Les flavanones sont les précurseurs directs de la majeure partie des flavones, des isoflavones et de la formation de deux intermédiaires de flavanoïdes: les flavan-4-ols et les dihydroflavanols. Les flavones (comme l'apigénine) sont synthétisées à partir des flavanones par introduction d'une double liaison entre les carbones *C-2* et *C-3* (**figure II.29**).

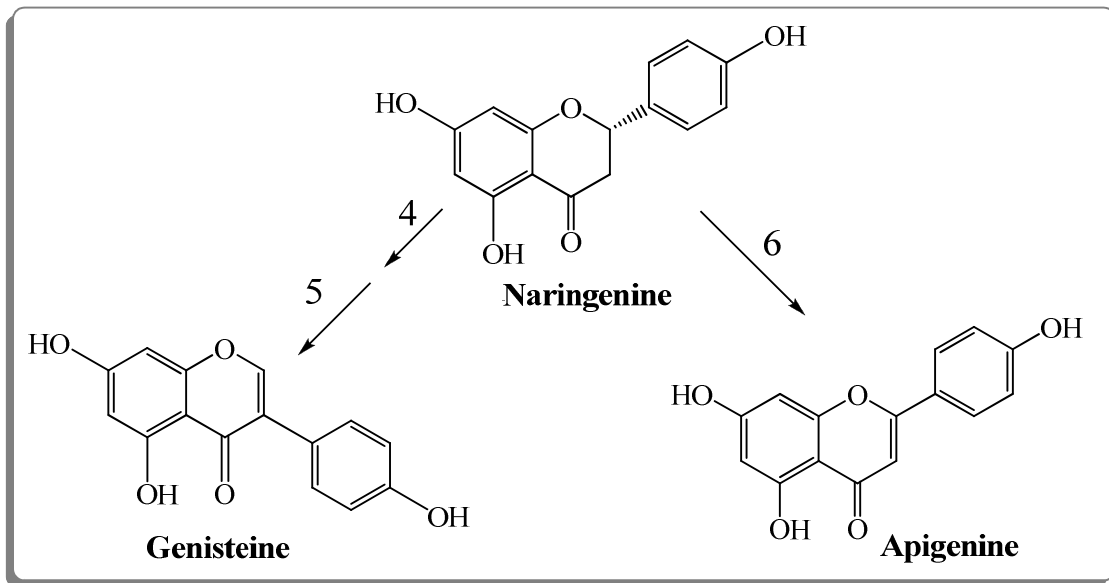


Figure II.29: Formation de la génistéine et de l'apigénine.

Deux types d'enzymecatalysent cette réaction, la flavone synthèse **I**: une 2-dioxygénase oxoglutarate-dépendante et la flavone synthèse **II**: une fonction associée monooxygénase du cytochrome **P-450** couplée à une protéine déhydratase. L'enzyme accepte comme substrat aussi bien les 5-hydroxy que les 5-désoxyflavanones. Pour les isoflavones, la réaction implique un réarrangement oxydant de flavanone et un déplacement du groupe aryle de la position **2** à la position **3**.

La réaction du groupe carbonyle des flavanones permet d'obtenir les flavan-4-ols (comme l'apiférol). La réaction est catalysée par la flavanone-4-réductase et donne le précurseur immédiat pour la formation des 3-désoxyanthocyanines (**figure II.30**).

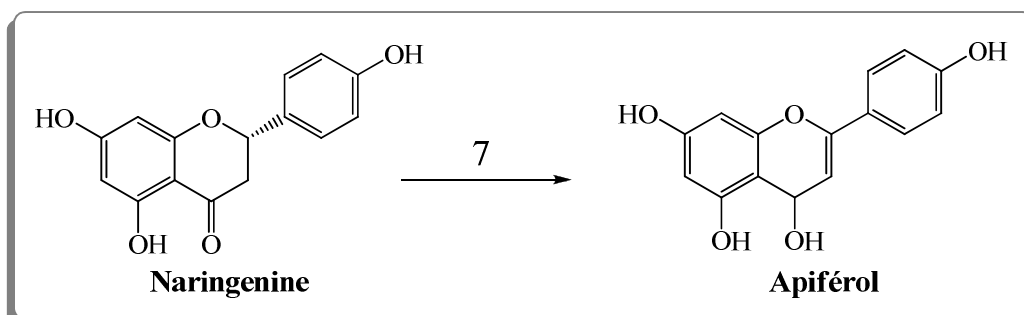


Figure II.30: Réduction de la cétone en position 4.

Finalement, les flavanones peuvent être hydroxylées dans la position **3** pour conduire aux dihydroflavanonols (comme le dihydrokaempférol), qui sont les intermédiaires biosynthétiques dans la formation des anthocyanidines. Cette réaction est catalysée par la flavanone 3-hydroxylase, 2-oxoglutarate-dépendante une dioxygénase.

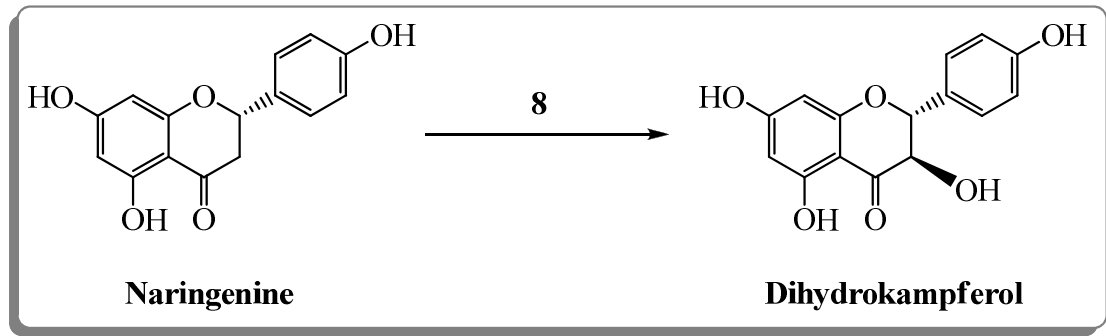


Figure II.31: *Hydroxylation de la position 3.*

Les dihydroflavanonols sont les précurseurs directs pour une grande partie des flavonols et pour la formation des flavan-**3,4**-diols (les leucoanthocyanidines). Les flavonols (comme le kaempferol) sont formés à partir des dihydroflavanonols (**figure II.31**) par introduction d'une double liaison entre les carbones **C2** et **C3**. La réaction est catalysée par la flavonol synthase, une autre 2-dioxygénase oxoglutarate-dépendante.

La réduction des dihydroflavanonols en position **4** catalysée par les dihydroflavanonol-**4**-réductases, conduit aux flavan-**2,3-trans-3,4-cis**-diols (comme la leucopelargonidine), qui sont des intermédiaires dans la formation des catéchines, des proanthocyanidines et des anthocyanidines. Les catéchines (comme l'afzelechine) sont synthétisées à partir des leucoanthocyanidines via une réduction de la position **4**. Cette réaction est catalysée par la flavan-**3,4-cis**-diol réductase. Les proanthocyanidines (comme la propélargonidine) proviennent vraisemblablement de la condensation de leucoanthocyanidines et de catéchines. Les enzymes catalysant cette réaction sont encore inconnues.

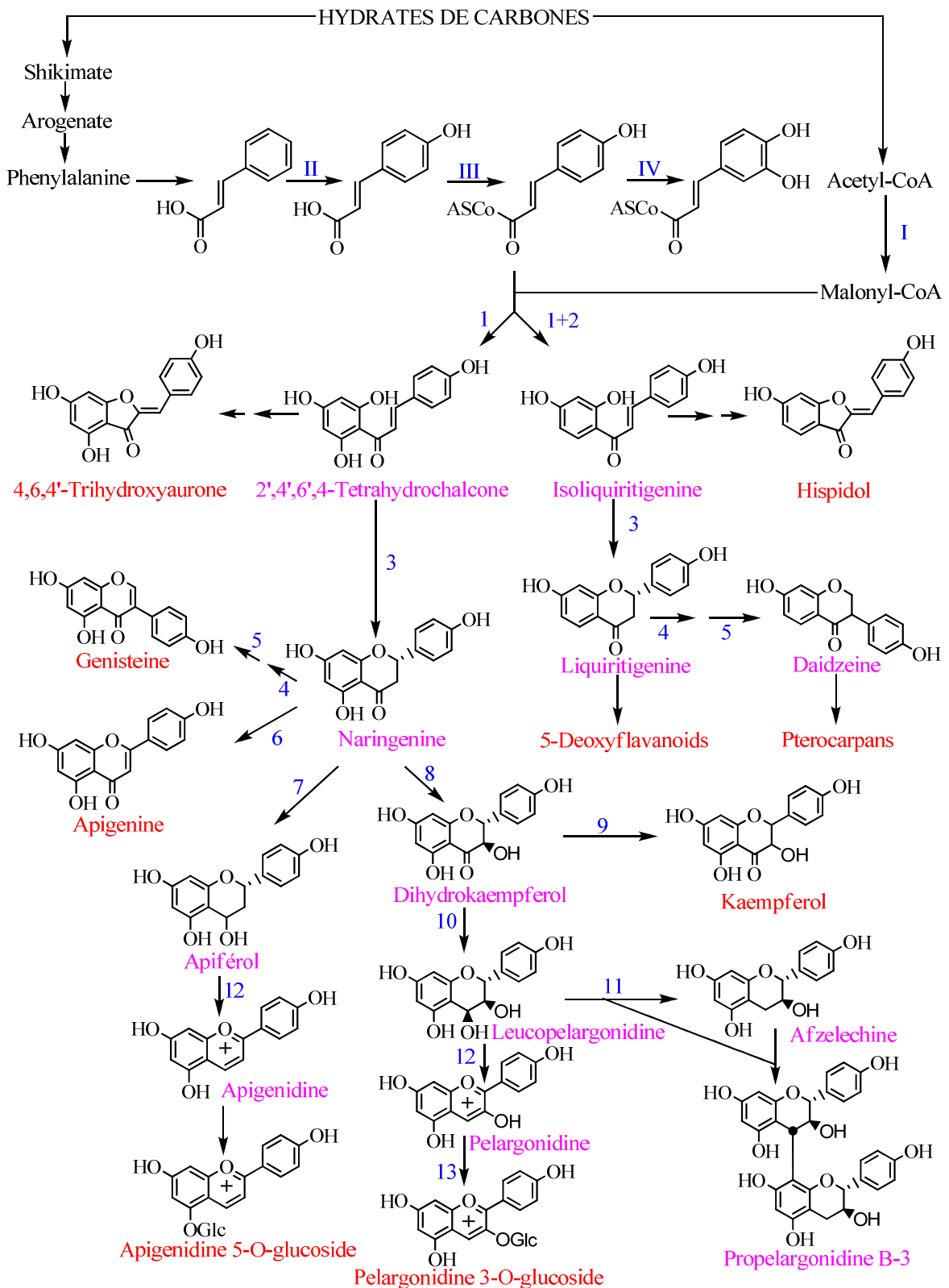


Figure II.32: Voie biosynthétique conduisant à la majorité des flavonoïdes.
 Les enzymes représentées par des numéros sont rassemblées dans le tableau I.1.

L'enzyme catalysant cette réaction avec les anthocyanidines comme substrat est l'UDP-glucose-flavonoïde-3-O-glucosyl-transférase. Le produit est une anthocyanine stable (comme la pélargonidine-3-O-glucoside) (**figure II.32**).

Tableau II.1: Liste des enzymes (indiquées figure II.27 à II.32) conduisant aux différentes classes de flavonoïdes [60-61].

<i>Numéro</i>	<i>Enzyme</i>	<i>Acronyme</i>
<i>PRECURSEURS NON-FLAVONOIDES</i>		
I	Acetyl-CoA carboxylase	ACC
II	Phenylalanine ammonialyase	PAL
III	Cinnamate 4-hydroxylase	C4H
IV	4-Coumarate: CoA ligase	4CL
V	4-Coumaroyl-CoA 3-hydroxylase	CC3H
<i>CLASSES FLAVONOIDES</i>		
1	Chalcone synthèse	CHS
2	Polyketide réductase	PKR
3	Chalcone isomérase	CHI
4	2-Hydroxyisoflavone synthèse	IFS
5	2-Hydroxyisoflavone déhydratase	IFD
6	Flavone synthèse I et II	FNS I et II
7	Flavone 4-réductase	FNR
8	Flavone 3-hydroxylase	FHT
9	Flavonol synthèse	FLS
10	Dihydroflavonol 4-réductase	DFR
11	Leucoanthocyanidin 4-réductase	LAR
12	Anthocyanidine synthèse	ANS
13	Flavonoïde 3-O-glucosyl transférase	FGT

II .2.2.5.Substitution du squelette flavonique

Les flavonoïdes se divisent en sous classes, les composés variés de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements **hydroxyles, méthoxyls** et autres) sur les deux noyaux aromatiques **A** et **B** et l'hétérocycle **C**.

II .2.2.5.1.La O-substitution

II .2.2.5.1.1.L'hydroxylation

Dans plus de **90 %** des cas, le cycle **A** des flavones et flavonols est substitué par deux hydroxyles en **C-5** et **C-7** et hydroxylé en position **C-4'** sur le cycle **B**, qui sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone [62].

D'autre part, dans plus de **80 %** des cas, le cycle **B** est substitué en **C-4'** avant la formation du squelette chalcone ou disubstitué en **C-3'** et **C-4'**, ou moins fréquemment **3'**, **4'**, **5'**-trisubstitué[63-64]. Les positions **2'** et **6'** du cycle **B** sont rarement hydroxylés [65].

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 pterocarpane [66].

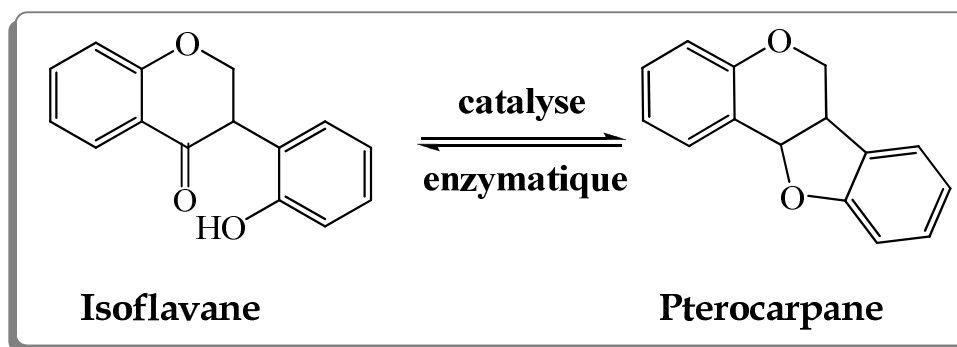


Figure II.33:Transformation de l'isoflavane en pterocarpane

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

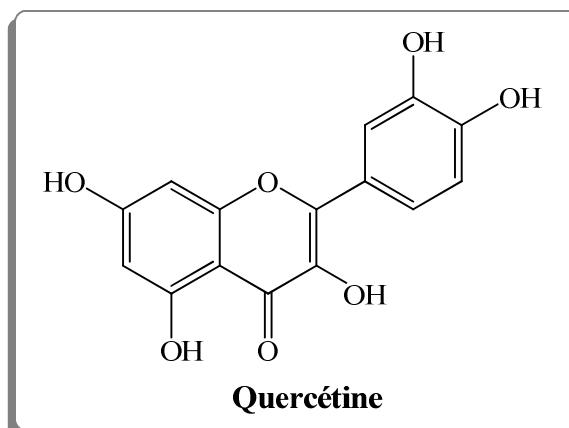


Figure II.34 : la structure du Quercétine

II .2.2.5.1.2.La méthylation

La méthylation fait partie de la biosynthèse de plusieurs flavonoïdes, elle joue un rôle important dans la couleur de ces derniers, par exemple le groupe méthyle de l'anthocyanine donne la couleur des fleurs [67].

La fixation du groupement méthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (O-méthyltransférase) 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 [68-69].

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 [68].

On note aussi les recherches faites par « *Deluca* » en 1984 qui a abouti à faire un schéma montrant les différentes étapes de la substitution du groupe méthyle sur le squelette flavonique. On présente un seul exemple dans la **figure II.35**.

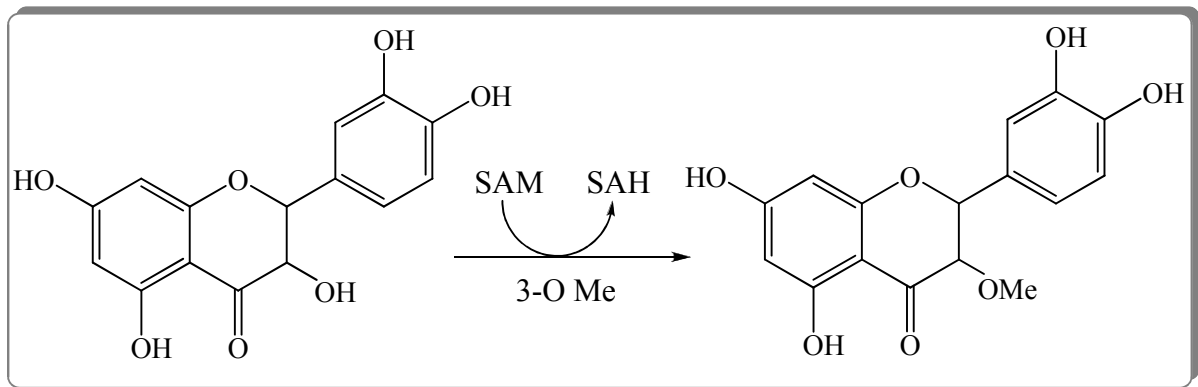


Figure II.35 : La O-methoxylation chez *Chrysosplenium americanum* Selon « Deluca 1984 ».

II .2.2.5.1.3. La O-glycosylation

Elle lie un hydroxyle du squelette flavonique avec un autre hydroxyle alcoolique du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose) en présence de l'enzyme Glycosyltransférase et l'UDP-glu (Uridinediphosphateglucose) comme donneur du sucre [70].

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 [71].

Dans la nature on trouve souvent les flavonoïdes sous forme glycosylés avec des différents types de sucre comme : D-glucose, L-rhamnose, glucorhamnose, lignine et arabinose [72]. On peut aussi trouver des flavonoides biglycosylés, la figure II.36 montre des exemples de ces structures [73].

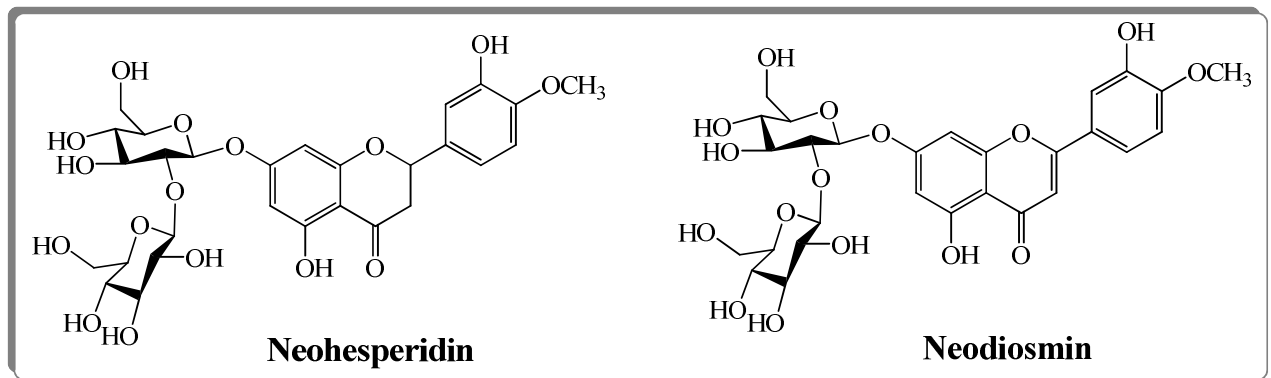


Figure II.36:structures biglycosylées

II .2.2.5.2.La C-substitution

II .2.2.5.2.1.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 **6** ou en position **8**, ou encore en position **6** et **8**. L'enzyme catalysant la C-méthylation en position **6** et / ou en position **8** est toujours inconnue [74].

II .2.2.5.2.2.La C-glycosylation

Les flavonoïdes C-glycosylés ne sont pas rares, on y trouve plus de **350**hétérosides [75]. Dans ce type de composés, le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide [76].

II .2.2.6.propriétés et rôles des flavonoïdes

II .2.2.6.1.Pharmacodynamiques

Les flavonoïdes alimentaires sont absorbés de la gastro-intestinale étendue [77,78], alors que les flavonoïdes médicaux sont administrés directement au tissu de malade, si c'est accessible, ex., dans la peau ou la gorge, ou le long d'un itinéraire qui mène immédiatement à la cible, ex., la nasale ou les systèmes vasculaires [79-84]. Après la libération des glycosides de l'aglycone par enzymes bactériennes dans l'intestin, approximativement **15%** des aglycones du flavonoïde sont absorbés avec micelles de la bile dans les cellules épithéliales et est passé à la lymphe [85-86]. Un facteur important qui détermine l'efficacité de l'absorption de glycosides du flavonoïde par l'intestin est la moitié

du sucre. [87] ont montré cela, les glycosides de la quercétine d'oignons ont été absorbés mieux (52%) que l'aglycone pur (24%).

II .2.2.6.2.Toxicité aiguë des flavonoïdes

Par injection de grands montants d'aglycones du flavonoïde d'une solution dans le sang de rats, il a été possible à déterminer les LD_{50} évalués pour cet animal. C'est **2g /kg** de poids du corps [88]. Dû à la solubilité basse d'aglycones du flavonoïde dans l'eau, au temps de résidence court de flavonoïdes dans l'intestin et au coefficient bas d'absorption, ce n'est pas possible pour les êtres humains à souffrir des effets toxiques aigus de la consommation de flavonoïdes, avec l'exception d'un événement rare d'allergie [89-94].

En plus, les effets de plusieurs flavonoïdes ne peuvent pas être additifs. De plus, les flavonoïdes très toxiques ont été trouvés dans les régions tropicales, ex., Afrique. Ils ont coloré la propolis locale variantes fortement noir. D'où, types de propolis très sombres devraient être évités, à moins qu'ils aient été testés. Tels les échantillons sont très rarement trouvés en dehors de place de leur origine [95].

II .2.2.6.3.L'immunologie des flavonoïdes

Les petits composés organiques tels que les flavonoïdes aglycones et seulement antigénique s'ils sont liés aux macromolécules dans le sang, aux protéines du plasma. Bien que les réactions immunisées soient rarement des problèmes par la consommation ou application thérapeutique de flavonoïdes, ils se produisent parfois. Au moins quelques flavonoïdes, par conséquent, sont capables d'agglutination à une ou plus des protéines du plasma, probablement à l'origine à albumine du sérum et lipoprotéines, depuis les flavonoïdes sont hydrophobes et sont transportés dans le complexe de l'acide de bile, aussi bien que dans le chylomicrons [95].

II .2.2.6.3.1.Les flavonoïdes comme antigènes

Les flavonoïdes ne sont pas faiblement antigéniques, mais des anticorps contre les flavonoïdes ont été trouvés dans le sang humain. Les réactions allergiques se produisent dans approximativement **3-5%** de la population après la prise de considérable montant de produits riches en flavonoïde [92-94][96-101]. Cependant, presque toute substance à laquelle nous sommes exposés peut donner la montée à allergie dans les personnes sensibles.

II .2.2.6.3.2.Flavonoïdes comme modulateurs immunisés

Bien que les flavonoïdes soient sus pour moduler l'activité de phosphatases de la protéine qui est impliqué dans les deux gènes, expression et le règlement de traduction de la protéine, leur effet principal semble être pour alerter des macrophages [102-104]. Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la réaction de l'anaphylactique lente par un cependant mécanisme inconnu [105].

II .2.2.6.4.Les flavonoïdes comme antioxydants

Une des propriétés plus proéminentes des flavonoïdes est leur excellente capacité d'ébouage radicalaire. C'est aussi un précieux aspect pour les applications thérapeutiques et prophylactiques des flavonoïdes [106]. En 1960 le célèbre chercheur français Henry Laborit attirait déjà l'attention sur la toxicité de l'oxygène pressurisé et préconisait l'usage d'antioxydants comme agents protecteurs [107]. Ce rapport a été enquêté et a discuté par rapport aux flavonoïdes par Halpern (1961) [108] et Marcus (1963) [109].

La génération des espèces réactives de l'oxygène dénommées ROS (Reactive Oxygen Species) se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire [110]. Les ROS désignent une appellation collective et comprennent les radicaux libres et certaines molécules qui sont des agents d'oxydation et ou facilement convertis en radicaux. Les ROS dont les plus courants : le radical hydroxyle (OH), l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le dioxygène singulet (1O_2) endommagent la vie cellulaire en causant l'oxydation des lipides, des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'évolution de cette oxydation semble être la cause de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer, les infections inflammatoires, les maladies cardiaques ou neurodégénératives et accélèrent le processus de vieillissement [111]. Elle serait même impliquée dans la pathologie du paludisme et des ulcères gastriques [112].

Un antioxydant est une substance qui en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable retarde ou empêche, de manière significative, l'oxydation de ce substrat. Il peut agir en supprimant les ROS ou en empêchant leur formation ou encore en réparant les dommages causés par ceux-ci [113]. Mais l'activité antioxydante des extraits de plantes est essentiellement attribuée aux composés phénoliques en particulier aux flavonoïdes.

Ainsi dans la détermination de l'activité antioxydante des extraits de plantes, la teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux est aussi déterminée dans

le but d'établir une corrélation essentielle entre teneur en composés phénoliques et activité antioxydante et ou entre teneur en flavonoïdes et activité antioxydante.

Les antioxydants de synthèse tels que le butyle hydroxy anisole (**BHA**) et le butyle hydroxy toluène (**BHT**) sont certes très efficaces mais susceptibles de manifester des effets secondaires et voir même toxiques [114]. Plusieurs molécules à propriétés antioxydantes sont isolées des plantes [115].

II 2.2.6.5.L'action de l'hormone de flavonoïde

Les flavonoïdes peuvent agir comme hormones dans les plantes et les animaux [116-117]. La découverte que les flavonoïdes ont aussi des effets hormonaux dans les systèmes animaux était une surprise [118]. L'origine était l'observation du mouton qui avait mangé le trèfle fermenté a été éveillé sexuellement. L'analyse a montré que la substance active était silybine. La structure de ce flavonoïde complexe a été élucidée par *Sonnenbichler et Pohl (1980)*. Ils ont trouvé que le groupe hydroxyle de l'aglycone a été placé dans l'espace juste au-dessus de ceux-là d'un oestrogène (**figue.II.37**). Depuis oestrogènes aussi ayez des effets de l'anabolique [119-120], on peut soupçonner ces flavonoïdes peuvent être capable d'agir aussi comme des hormones chez les animaux. Cependant, si loin seulement peu d'indications d'une telle fonction ont été trouvez.

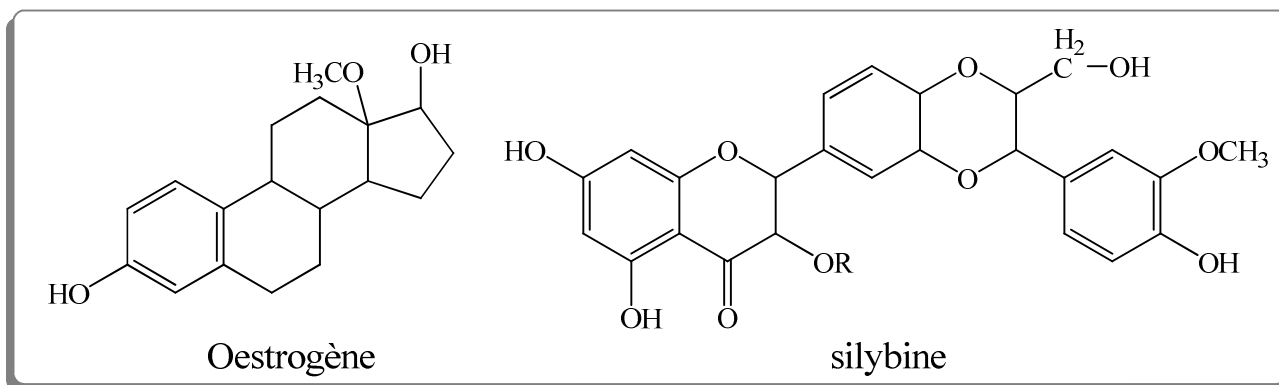


Figure.II.37 : Comparaison des structures d'oestradiol et silybine.

II .2.2.6.6.L'inflammation

Un autre exemple principal de l'application thérapeutique des flavonoïdes, c'est l'inflammation [121-122]. Ce processus est la réponse intégrée de beaucoup de systèmes de la défense du corps à l'invasion d'un corps étranger de tout genre, ex., un en bois éclatez, cellules bactériennes, ou virus [123]. L'inflammation implique, parmi d'autres, l'action du système du complément, coagulation du sang, humoral et immunité cellulaire, cytokines, hormones du tissu, angiogénèses et le processus de la réparation. Les flavonoïdes tuent un grand nombre de souches bactériennes, mais pas toutes, Certains de ces sujets sont encore l'objet de recherches intensives. [79,112, 124-125].

II .2.2.6.7.L'effet des flavonoïdes sur la condition de malades diabète du mellite

Les flavonoïdes ne peuvent pas guérir le diabète du mellite parce que les types de cette maladie sont fondamentalement d'origine génétique et aucune drogue (seule)ne peut corriger une erreur innée. Cependant, les flavonoïdes peuvent améliorer quelques-unes des conséquences de diabète du mellite [126].

II .2.2.6.8.Le traitement de cancer par les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des anticancéreux et les plus prometteurs produits naturels testés. Des composés synthétiques relatifs à titre d'exemples des flavones ont été déjà soumis en premier dans les tests des procès clinique et ils pourraient bientôt devenir adoptés dans le répertoire général de traitement cytostatique [127].

Les flavonoïdes exercent une activité cytotoxique spécifique vers différent cellules cancéreuses qui ont donnés un grand intérêt dans développement des cytostatiques basés sur les flavonoïdes pour la thérapie anticancéreuse [128,129].

II .2.2.7. Activités biologiques des flavonoïdes

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités : antivirales, antitumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, anticancéreuses, antiulcéreux, anticarcinogènes, antibactériennes et antimicrobiennes,... [130-132].

Le tableau suivant (**TableauII.2**) résume les effets potentiels de quelques flavonoïdes sur les animaux et les humains [133].

TableauII.2 : Effets potentiels de quelques flavonoïdes

<p><i>Analgésique :</i> Hespéridine Khelline Quercétine</p> <p><i>Antianginous :</i> Isoflavone</p> <p><i>Antithérogénique :</i> Quercétine</p> <p><i>Anticancéreuse :</i> Bacaleine Catéchine Epigallocatechine Kaempferol-3-O-β-D-glucopiranoside Nobiletine Quercétine Rutine Tangerétine Tricine Woogonine</p> <p><i>Antidiabétique :</i> Quercétine</p> <p><i>Vasculaire protection :</i> Anthocyanidine Citrine Rutoside</p>	<p><i>Anti-inflammatoire :</i> Apigénine Chrysin Gossypine Hibrifoline Hypolaétin-8-β-D- glucoside Luteoline Myricétine Neptine Quercétine Quercitrine Sidertoflavanone</p> <p><i>Anti ostéoporotique :</i> Ipriflavone</p> <p><i>Antispasmodique :</i> Apigénine Catéchine Chrysin Flavone Kaempferol Quercétine</p> <p><i>Antiulcéreux :</i> Flavanone Flavone Kaempferol Quercétine Rutine</p>
---	--

II .2.3.L'ETUDE CHIMIQUE DES FLAVONOÏDES

II .2.3.1.Introduction

Pour faire une investigation phytochimique qui consiste principalement en l'isolement et l'identification structurale de produits naturels à partir de végétaux, il est nécessaire, voir même indispensable de bien choisir la partie du matériel végétal et en fonction de la nature des produits recherchés, adapter et optimiser les techniques ou les méthodes physico-chimiques nécessaires [134].

II .2.3.2.Extraction

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes [135-136]. L'une de ces méthodes est adoptée par notre laboratoire, les étapes essentielles sont :

- ① **Macération** : répétée du matériel végétal dans une solution hydroalcoolique (méthanol ou éthanol avec l'eau distillé).
- ② **Extractions** : L'extraction liquide-liquide ou *LLE* (Liquid-Liquid Extraction) est une opération fondamentale de transfert de matière de polarités différentes entre deux phases liquides non miscibles. Elle consiste à extraire une ou plusieurs molécules (les solutés) d'un milieu liquide (la solution) au contact d'un solvant dans lequel les solutés sont solubles. Le solvant qui contient alors les solutés est désigné sous le terme d'extrait, et la solution qui a perdu la majorité de ces mêmes constituants est appelée raffinat. Cette opération est fréquemment utilisée pour séparer d'un mélange liquide des constituants dont les polarités sont variables [137-138].

Pour que l'opération soit réalisable il est nécessaire :

- ✓ que les deux phases ne soient pas complètement miscibles
- ✓ que leurs masses volumiques soient différentes
- ✓ qu'il n'existe pas de réactions chimiques entre les divers constituants du mélange

Cette technique est très utilisée dans les industries alimentaires, pharmaceutiques ainsi que dans les milieux de l'hydrométallurgie et de la pétrochimie. Elle a été utilisée au cours de notre travail pour tenter d'extraire des différentes phases.

Les solvants utilisés 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 [139].

- ③ Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec et pesés pour un éventuel traitement.

II .2.3.3.Séparation chromatographique

II .2.3.3.1.Généralités

II .2.3.3.1.1.Historique

C'est en **1906** que le terme de chromatographie (du grec *krôma*, couleur et graphein, écrire) est apparu suite à l'expérience du botaniste russe **Mikhaïl Semenovitch Tswett** qui sépara les pigments végétaux colorés d'épinard sur une colonne remplie de carbonate de calcium et d'alumine à l'aide d'éther de pétrole [140]. Il a alors observé la formation des bandes de couleurs différentes (vert, orange, jaune...) sur la colonne. Il a également défini les termes : chromatogramme, élution et rétention.

En **1931**, **Khun** et **Lederer** utilisent la méthode de **Tswett**, pratiquement oubliée, pour réaliser une séparation préparative des carotènes et des xanthophylles qui marque la redécouverte de la chromatographie, qui se développe ensuite rapidement grâce aux travaux de **Brockmann**, **Karrer**, **Winterstein** et **Zechmeister** [141-142].

En **1941**, **Martin** et **Synge** développent la pratique et la théorie de la chromatographie [143], ils sont récompensés en **1952** par le Prix Nobel de Chimie pour leurs travaux sur la chromatographie de partage sur gel de silice.

Les techniques chromatographiques telles qu'on les connaît aujourd'hui ont été développées en **1952** pour la chromatographie en phase gazeuse par **Martin** et **James** [144], et en **1967** pour la chromatographie liquide haute pression, qui s'appellera ensuite chromatographie liquide à haute performance (**HPLC**), avec les travaux de **Huber** et **Huzsman** [145].

Depuis la mise en place de ces techniques séparatives, les colonnes utilisées n'ont cessé d'évoluer : la première séparation chirale sur une colonne **HPLC** a été rapportée en

1979; la taille des particules des colonnes *HPLC* ne cesse de diminuer pour en accroître les performances.

II .2.3.3.1.2.Principe général de la chromatographie

La chromatographie est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse. Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire (emprisonnée dans la colonne) et la phase mobile qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité...). A leur arrivée en bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange [146]. La chromatographie peut être analytique ou préparative. Dans le cas de la chromatographie analytique, l'objectif est d'identifier des solutés qualitativement et/ou quantitativement. Pour cela, on associe la chromatographie à d'autres techniques analytiques chimiques ou physico-chimiques (la spectrométrie de masse dans notre cas) : c'est le couplage. La chromatographie préparative est utilisée lorsque l'on désire purifier un produit, soit à l'issue d'une synthèse, soit dans le but d'utiliser d'autres techniques analytiques, comme la **RMN** par exemple.

Il existe deux grands types de chromatographie, en fonction de la phase mobile utilisée : la chromatographie en phase gazeuse (**GC**) et la chromatographie en phase liquide (**LC**), qui regroupe la chromatographie sur colonne à pression atmosphérique, ou sous pression (communément nommée **HPLC** pour High Performance Liquid Chromatography), la chromatographie d'échange d'ions, d'exclusion stérique ou encore la chromatographie sur couche mince.

II .2.3.3.2.Les différentes techniques chromatographiques

II .2.3.3.2.1.la chromatographie sur colonne

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

Elle présente cependant plusieurs inconvénients :

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

Elle est adaptée à la purification de quantités importantes de produits, lorsque les conditions opératoires sont au point. Cependant, la méthode étant très empirique, sa mise au point nécessite souvent de nombreux essais [147].

II .2.3.3.2.2.la chromatographie préparative sur papier (CP)

Cette méthode est très ancienne mais intéressante car elle permet la séparation d'une grande quantité de produit et détache le maximum d'acides phénoliques[148]. Le support utilisé ici est le papier *Whatman* et les systèmes de solvants contiennent souvent de l'acide acétique pour améliorer la séparation et éviter les traînées dues à l'ionisation des molécules [149].

II .2.3.3.2.3.la chromatographie préparative sur couche mince (CCM)

Le principe de la chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC dans la terminologie anglo-saxonne) et de la HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography = chromatographie sur couche mince de haute performance) est comme pour toutes les méthodes de chromatographie, un procédé de partage multi-étapes. Ce procédé nécessite un adsorbant (la phase stationnaire), un solvant ou un mélange de solvants (la phase mobile, généralement appelée éluant en chromatographie sur couche mince) et le mélange à séparer. L'adsorbant est déposé en une mince couche sur un support approprié (plaque de verre, feuille de polyester ou d'aluminium). L'élution par la phase mobile permet de séparer les constituants du mélange. Bien que le principe de la chromatographie sur couche mince soit connu depuis plus d'un siècle [150] son essor en tant que méthode analytique a été pris il y a seulement 35 ans, grâce notamment aux travaux d'Egon Stahl [151].

II .2.3.4.Analyse structural des flavonoïdes

L'analyse structurale des composés flavoniques est très délicate, ceci est dû à la grande variété et réactivité de ces composés [152]. Les méthodes modernes d'analyse sont:

La chromatographie liquide à haute performance (**HPLC**) avec la spectrométrie de masse (**MS**), la résonance magnétique nucléaire (**RMN**), la spectrophotométrie (**UV-Visible**) en plus le calcul du **R_f**[153] et la fluorescence sous la lumière **UV-Visible**, qui révèle des renseignements utiles sur la structure moléculaire probable.

II .2.3.4.1.Le factor de retardation (R_f)

Ce facteur est défini par l'équation suivante [154] :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance parcourue par le front desolvant}}$$

Il existe une relation entre la structure flavonique et le **R_f**. Cette valeur ne peut pas être considérée comme une constante physique du corps, car elle est influencée par de nombreux facteurs tel que la qualité de la matière, la nature du solvant, la technique employée, la température [155-156], ainsi que les substituants et leur position sur le squelette flavonique, **tableau II.3**.

Tableau II.3 : Relation R_f-Structure flavonique.

<i>Structure flavonique</i>	<i>R_f</i>
Augmentation des groupes Hydroxyls	<ul style="list-style-type: none"> • R_f diminue dans les systèmes de solvants organiques et augmente dans les systèmes de solvant aqueux.
Méthylation des hydroxyles	<ul style="list-style-type: none"> • R_f augmente dans les systèmes de solvants organiques et diminue dans les systèmes de solvant aqueux.
Glycosylation	<ul style="list-style-type: none"> • R_f augmente dans les systèmes de solvants aqueux et diminue dans les systèmes de solvants organiques.

II .2.3.4.2.LaFluorescence 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 [157].

Tableau II.4 : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.

LA FLUORESCENCE	LES STRUCTURES POSSIBLE
Violette noire	Flavones avec 5, 6,7 ou 5,7, 8 trihydroxy flavone Flavonol avec 3-OR. Chalcones.
Blue	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	Aurone
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

II .2.3.4.3.La spectrophotométrie UV-Visible

C'est une méthode utilisée pour l'identification des structures flavoniques. Elle est basée sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanolique) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales [158]. Cette technique permet la localisation des hydroxyles libres et de les positionner sur le squelette flavonique, par la formation de complexes avec les différents réactifs, qui se traduit sur le spectre UV-Visible par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorptions par rapport au spectre de référence pris dans le méthanol [159].

II .2.3.4.3.1.Le spectre UV-Visible des flavonoïdes dans le MeOH

Le spectre d'absorption UV-Visible des flavonoïdes en milieu méthanolique présente deux bandes d'absorptions principales: la **bande I** et la **Bande II** comme le montre la **figure II.38**.

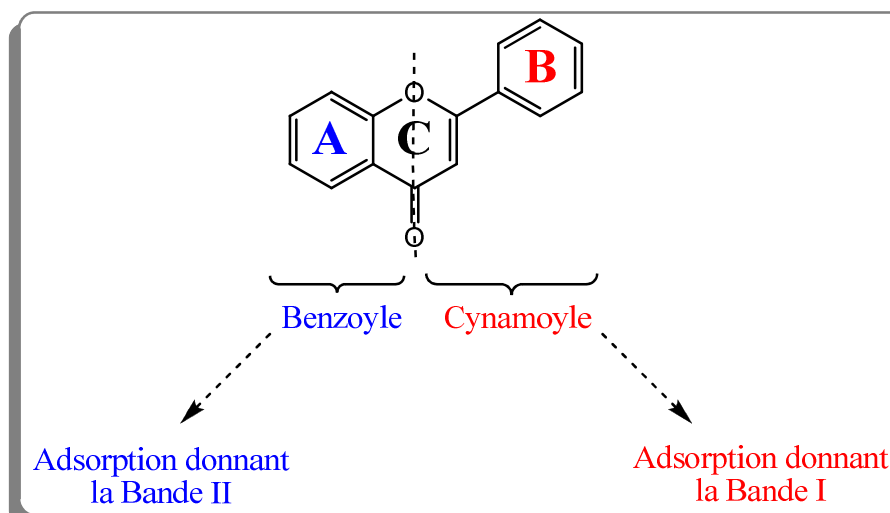


Figure II.38

LA BANDE I

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

LA 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**[160].

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 [161].

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**[157].

Le tableau suivant (**tableau II.5**) donne la relation entre le maximum d'absorption en UV et le type des flavonoïdes.

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

TYPE DE COMPOSE FLAVONIQUE	BANDE I	BANDE II
Flavones	320-350	250-270
flavonol	352-385	250-280
flavanone	300-330	245-275
isoflavone	300-330	245-275
Chalcone	340-390	230-270
Aurone	380-430	230-270
Anthocyanidine	465-560	270-280

II .2.3.4.3.2. Addition des réactifs (la 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.

1. Spectre d'absorption en présence de NaOH ou NaOMe

NaOH ou (**NaOMe**), une base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. L'addition du **NaOH** indique le nombre et la position des hydroxyles libres sur le squelette flavonique essentiellement les **OH** des positions **7**, **4'**, **3** par effet bathochromique de la **bande I**.

2. Spectre en présence de NaOAc

NaOAc, base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soient les groupes **7-OH**, **4'-OH** et **3-OH** et elle ionise spécialement le groupement hydroxyle en position 7. Ceci se traduit par le déplacement sur la **bande II** [49].

3. Spectre d'absorption en présence de H₃BO₃+ NaOAc

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** [157].

4. 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** [164], par contre, ceux formés entre **AlCl₃** et les hydroxyles **5-OH** ou **3-OH** et la fonction carbonyle sont stables [162-163]. 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**.

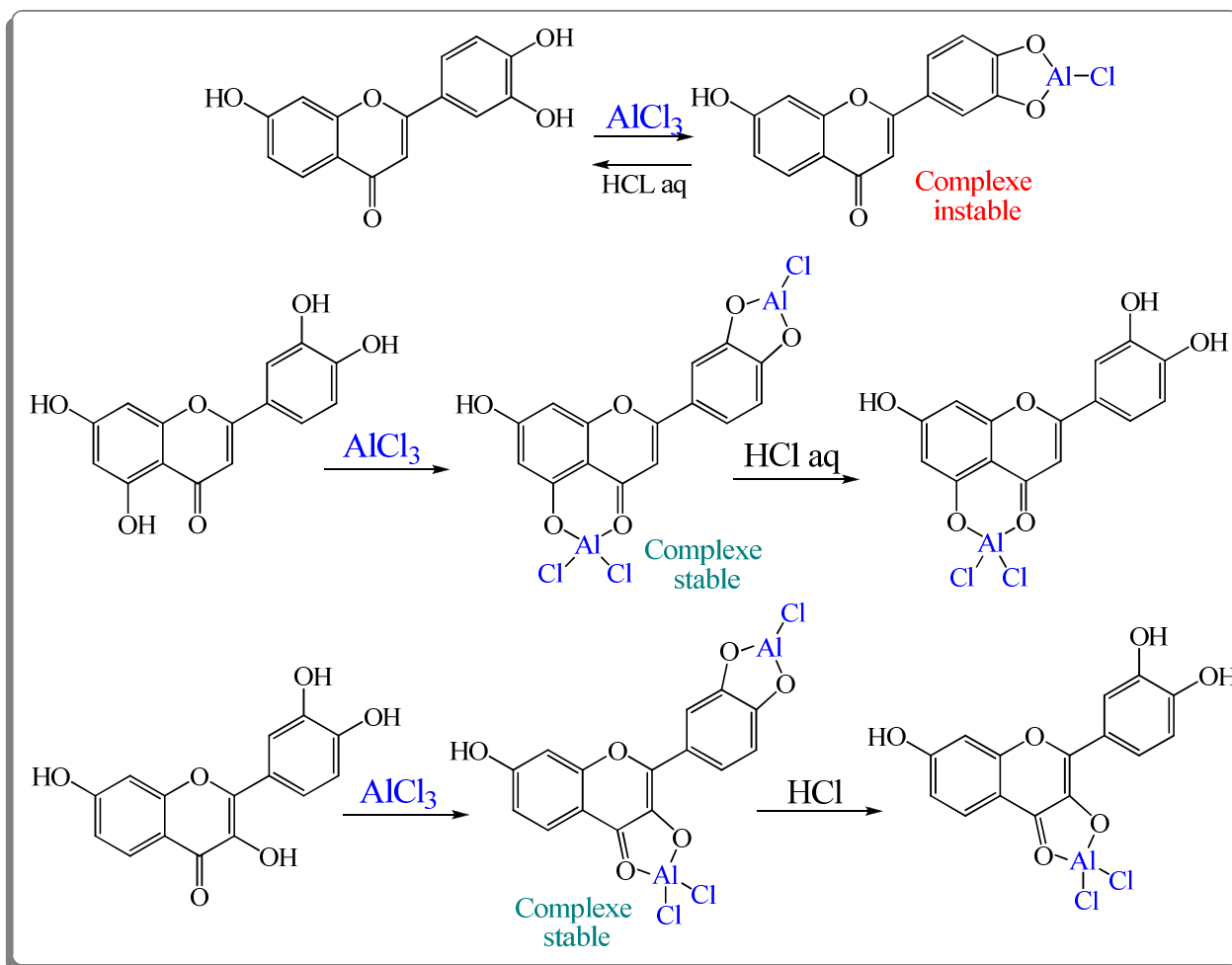


Figure II.39 : Formation des différents types de complexes après addition de AlCl_3 et en présence de HCl

Tableau II.6 : les principaux déplacements des bandes I et II dans le cas de flavone.

Les réactifs	Les déplacements (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	304-350 328-357	250-280 250-280	Flavones Flavonols 3-OR
NaOMe (NaOH)	- Stable +45 à +65 1- L'intensité ne diminue pas/ MeOH.		4'-OH
	2- L'intensité diminue/ MeOH. - L'intensité diminue avec le temps, décomposition.		4'-OR ; 3-OH 3, 4'-OH ; Ortho di-OH sur A (6,7) ou (7,8).
	Nouvelle bande par rapport au spectre MeOH entre [320-335]		7-OH
NaOAc/MeOH		+5 à +20 déplacement diminue en présence d'un substituant en 6 ou 8.	7-OH
		Pas de déplacement ou très faible.	7-OR
		Spectre qui se décompose avec le temps.	5, 6, 7-tri-OH ou 5, 7, 8tri-OH
NaOAc+H ₃ BO ₃ /MeOH	+12 à +36		Ortho di-OH sur B
	+05 à +10		Ortho di-OH sur A (6,7) ou (7,8).
AlCl ₃	Une seule bande entre 420-430.		Ortho di-OH sur B avec 5-OH
(AlCl ₃ + HCl) /MeOH	+17 à +20		5-OH avec une oxygénation en 6.
	+35 à +55		5-OH et 3-OCH ₃
(AlCl ₃ +HCl) / AlCl ₃	-20 à -40 avec un sommet ou épaulement entre [350-360].		Ortho di-OH sur B.
	-20 à -25		Ortho di-OH sur A et B ou tri-OH sur B.

/ = par rapport à.

(-) = hypsochrome.

(+) = bathochrome.

II .2.3.4.4.La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.)

La spectroscopie **RNM** est indiscutablement l'une des méthodes d'analyses la plus importante utilisée aujourd'hui [164]. La **RMN** trouve un grand emploi pour la détermination des structures flavoniques [165]. De nombreux noyaux atomiques peuvent être détectés par la technique de **RMN**, les noyaux les plus utilisés sont le proton (^1H), le carbone (^{13}C) en plus le phosphore (^{31}P), l'azote (^{16}N), le sodium (^{23}Na), le potassium (^{39}K) et le fluor (^{19}F) (Fan 1996) [54].

La RMN du proton (RMN ^1H): elle informe sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm elle permet de connaître [165-169]:

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

La RMN du carbone 13 (RMN ^{13}C): donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telles que [160,169] :

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

II .2.3.4.5.La Spectrométrie de masse MS

Cette technique permet la détermination du pic moléculaire des aglycones qui donne globalement le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles [170-171].

Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements utiles, notamment sur les structures de substitution des noyaux **A** et **B** [122]. Cette technique connaît un véritable succès dans ce domaine avec le développement de divers mode d'ionisation permettant l'analyse des structures glycosylés à l'état natif tels que la **FAB**, et l'électro-spray.

II .2.3.4.6.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 [70].

Références bibliographiques

- [1]. Seghiri Ramdane. Thèse de doctorat. Université Mentouri – Constantine. **2007**.
- [2]. Hua, H., Cheng, M., Li, X., Pei, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**. Vol **50**, **1393**.
- [3]. Ahmad, V.U., Kousar, F., Zubair, M., Khan, A., Ali, M.S., Choudhary, M.I., Sener, B. *Fitoterapia*. **2006**. Vol **77**, **12**.
- [4]. Otsuka, H. *Phytochemistry*. **1995**. Vol **39(5)**, **1111**.
- [5]. Tundis, R., Deguin, B., Dodaro, D., Statti, G.A., Tillequin, F., Menichini, F. *Bioch sys & eco*. **2008**. Vol **36**, **142**.
- [6]. Maria, F., Hassina, H., Catherine, L., Hamada, H., Christophe, L., Mohammed, B. *Bioch sys & eco*. **2010**. Vol **38**, **833–835**.
- [7]. Otsuka, H. *J. Nat. Prod.* **1992**. Vol **55**, **1252**.
- [8]. Tundis, R., Deguin, B., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Statti, G.A., Tillequin, F., Menichini, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**. Vol **15**, **4757-4760**.
- [9]. Gordaliza, M., Miguel Del Corral, J.M., Mahiques, M.M., Castro, M.A., San Feliciano, A. *Phytochemistry*. **1995**. Vol **40**, **1307**.
- [10]. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., et Gontier, E. *Plant Science*. **2001**. Vol **161**, **839-851**.
- [11]. Rao, S.R., et Ravinshankar, G.A. *Biotechnology Advances*. **2002**. Vol **20**, **101-153**.
- [12]. Jens, A. Pedersen. *Bioch sys & eco*. **2000**. Vol **28**, **229-253**.
- [13]. Itokawa, H., Suto, K., and Takeyo, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**. Vol **29(1)**, **254-256**.
- [14]. Soldermann, N. « Etude et développement du processus Tandem réaction de Diels Alder/réarrangement de Ireland-Claisen: Application à la synthèse de la Juvabione », Thèse de Doctorat. Université de Neuchâtel, juin **2002**.
- [15]. Teisseire, P.J., « Chimie des substances odorantes », Tec et Doc, Lavoisier, Paris, **1991**, **9,25-30**, et **66-69**.
- [16]. Bruneton, J., Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales, **3ème Ed.** **1999**.
- [17]. Louis, S., « Diversité Structurale et d'Activité Biologique des Albumines Entomotoxiques de type 1b des Graines de Légumineuses », Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Février **2004**.
- [18]. Picman, A.K. *Biochem. Syst. Ecol.* **1986**. Vol **14**, **255**.
- [19]. Fraga, B. *Natural Product Reports*. **1998**. Vol **15**, **73-92**.
- [20]. Bruneton, J., « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ». 2nd Edition université de Paris- sud, France. **1993**, **389-617**.
- [21]. Jensen, S.R., Schripsema, J., Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae, L & Albert V. Eds. Cambridge University Press. **2002**, **573-584**.
- [22]. Evan, W.C. Trease and Evan. Pharmacognosy. **15ème Ed.** W.B. Sanders Company Limited, **2002**.
- [23]. Bruneton, J. Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales, **3ème Ed.** Tec & Doc, Paris. **1999**.
- [24]. Bianco, A. "The Chemistry of Iridoids" in "Studies in Natural Products Chemistry", Attaur-Rahman Ed. Elsevier Science Publishers. **1990**. Vol **7**. **329**. Amsterdam.
- [25]. Cogne, A.L., these de doctorat "Phytochemical investigation of plants used in African traditional medicine: *Dioscorea sylvatica* (Dioscoreaceae), *Urginea altissima* (Liliaceae), *Jamesbrittenia fodina* and *Jamesbrittenia elegantissima* (Scrophulariaceae)", Université de Lausanne. **2002**.
- [26]. Brown, R.T., Chapple, C.L., *Tetrahedron*. **1976**. Vol **17**, **787-790**.
- [27]. Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S.R. *Phytochemistry*. **1997**. Vol **45** (4), **743-750**.

- [28]. Nangia, A., Prasuna, G., *Tetrahedron*. **1996**. Vol**52**, **3435**.
- [29]. Gruenwald, J., Brendler, T., et Jaenicke, C., PDR for Herbal Medicine, Medical Economics Company, Montlave, **2000**.
- [30]. Graikou, K., Aligiannis, N., Chinou, I.B., et Harvala, C.Z. *Naturforsch.***2002**. Vol**57c**, **95-99**
- [31]. Hamdi, H.K., Et Castellon, R. *Biochemical and Biophysical Research communications.***2005**. Vol **334**, **769-778**,
- [32]. Raju, B.L., Lin, S.J., Hou, W.C., Lai, Z.Y., Liu, P.C. et Hsu, F.L. *Natural Product Research.***2004**. Vol **18(4)**, **357-364**,
- [33]. Bas, E., Recio, C., Abdalh, M., Manez, S., Giner, R. M., Cerda-Nicolas, M. et Rios, G. L. *Journal of ethnopharmacology.***2007**. Vol **110**, **419-427**,
- [34]. Kupeli, E., Harput, U.S., Varel, M., Yesilada, E. et Saracoglu, I. *Journal of Ethnopharmacology.***2005**. Vol **102**, **170-176**,
- [35]. Baruah, C.C., Gupta, P.P., Nath, A., Patnaik, L.G.K., et Dhawan, B.N. *Pharmacological Research.***1998**. Vol **38 (6)**.
- [36]. Mathad, V.T., Raj, K., Bhaduri, A.P., Sahai, R., Puri, A., Tripathi, L.M. et Srivastava, V.M.L. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.***1998**. Vol **6**, **605-611**.
- [37]. Veličković, A.S., Ristić, M.S., Veličković, D.T., Ilić, S.N., and Mitić, N.D.J. *Serb. Chem. Soc.* **2003**. Vol **68 (6)**, **435-445**.
- [38]. Hsiou-Y. Ding, Yang-ch. Wu, and Hang-Ch. Lin, *Journal of the Chinese Chemical Society.* **2000**. Vol **47**, **561-566**.
- [39]. Lugaci A. Hovari J. Sagi K et Biro L. *Acta biologica Szegediensis.* **2003**. Vol **47(1-4)**, **119-125**.
- [40]. Dubois G.E., Grosby, G.A. et Saffron, p. *Science.* **1977**. Vol **195**, **397-399**.
- [41]. Beta, T., Nam, S., Dexter J.E. et Sapirstein, H.D. *Cereal chem.***2005**. Vol **82(4)**. **390-393**.
- [42]. George, S., Clark. *Perfumer & Flavorist.* **1995**. Vol **20**, **23-34**.
- [43]. Casley-Smith, J.R., R.G., et Piller, N.B. *New Engl. J. Med.* **1993**. Vol **329**, **1158-1163**.
- [44]. Hodek, P. *Chemico-Biological Interactions.* **2002**. Vol **139**, **1-21**.
- [45]. Effend, .L. *Metabolic Engineering.* **2005**, p**1426**.
- [46]. Stefane, M., Axel, M. *Phytochemistry.***2005**. Vol **66**, **2399-2407**.
- [47]. Bruneton, J.: *Phytochimie et pharmacognosie des plantes médicinales, Techniques et Documentation.* Lavoisier(**1933**).
- [48]. Milane, Hadi. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur, Strasbourg I. **2004**.
- [49]. Beltran, F., Viguera, J.M., Casabuena, A. *Farmacognosia.* **1985**. Vol **10**, **197-215**.
- [50]. Pietta, P.G. *J. Nat. Prod.* **2000**. Vol **63**, **1035-1042**.
- [51]. Guignard, J.L., Cosson, L., et Henry, M. *Abrégé de phytochimie.* **1985**. Vol **143**.
- [52]. Bentamene, Ali. Thèse doctorat. Université Mentouri-Constantine-Algérie.
- [53]. Guignard J-l: *Abrégé de biochimie à l'usage des étudiants en pharmacie.* **1974**. **165**
- [54]. Negrette, R.E., Backhouse, N., Bravo, B., Eraso.S., Garcia, R., Avendano, S. *Plantes Med et phytotherapia.* **1987**. **XXI n°2**, **168-172**.
- [55]. Nancy, G., Vincent, G., Jacque, D., Patricia, B., Monique, T., Luc, A. *Journal of Ethnopharmacology.* **1999**. Vol **68**, **235-241**.
- [56]. Havsteen, B.H. *Pharmacology & Therapeutics.* **2002**. Vol **96**, **67-202**.
- [57]. Stafford, H.A., *CRC Press. Boca Raton.* **1990**.
- [58]. Heller, W., Forkmann, G. *Chapmann et Hall.* **1993**.
- [59]. Richter, G. *physiologie et biochimie.* **1933**, p **333**.
- [60]. Heller, W., Forkmann, G., Britsh, L., and Grisebach, H. *Planta Med.* **1985 a**, **163-191**.
- [61]. Forkmann, G. *Lisbon.* **1992**. Vol **16**, **19-27**.

- [62]. Gonzales, AG., Barera, JB., Garcia, TZ., & Rosas, F.E. *Phytochemistry*. 1984, 2071-2072.
- [63]. Gadeschi, E., Jorge, Z.D., Massanet, G.M., and Luis, F.R. *Phytochemistry*. 1989. Vol 28(8), 2071-2072.
- [64]. Oksuz, S., Halfon, B, and Term, B. *Planta Med*. 1988. Vol 54(1), 89.
- [65]. Iinuma, M., and Mizuno, M. *Phytochemistry*. 1989. Vol 28, 681.
- [66]. Kochs, G., and Grisebach, H. *Eur. J. Biochem*. 1986. Vol 155, 311.
- [67]. Harborne, J.B., and Williams, C.A. *Phytochemistry*. 2000. Vol 55, 481-564.
- [68]. Heller, W., and Forkmann, G. *Chapman and Hall*. 1988, p 399-425.
- [69]. Ebel, J., and Hahlbrock, K. *Chapman and Hall*. 1982, p 641-659.
- [70]. Bensouici, Chawki. Thèse de Magister. Université Mentouri-Constantine.
- [71]. Harbone, J.B., and Williams, C.A. *Chapman and Hall*. 1988, 303.
- [72]. Ali, YE., Omar, AA., Sarg, T.M, and Slatkin, D. *JPlanta Med*. 1987. Vol 53(5), 503-504.
- [73]. Barrero, F.A., Sanchez, J.F., and Rodriguez, I. *Phytochemistry*. 1989. Vol 28, 1975.
- [74]. Heller, W. and Forkmann, G., *Chapman and Hall*. 1993, p 499-535.
- [75]. Bruneton, J., Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3ème Ed. 3, lavoisier, Paris. 1999.
- [76]. Chopin, J., Actualité de phytochimie fondamentale, IIème série, édition Masson, Paris. 1966, 119.
- [77]. Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C., & Remesy, C. *Am J Physiol*. 1999. Vol 277, G120– G126.
- [78]. Pforte, H., Hempel, J., & Jacobasch, G. *Nahrung*. 1999. Vol 43, 205–208.
- [79]. Metzner, J., Bekemeier, H., Paintz, M., & Schneidewind, E. *Pharmazie*. 1979. Vol 34, 97–102.
- [80]. Heilmann, J., & Merfort, I. *Pharm Unserer Zeit*. 1998. Vol 27, 173–183.
- [81]. Masquelier, J., Michaud, J., Laparra, J., & Dumon, M.C. *Int J Vitam Nutr Res*. 1979. Vol 49, 307–311.
- [82]. Spilkova, J., & Hubik, J. *Cesk Farm*. 1986. Vol 35, p278–286.
- [83]. Spilkova, J., & Hubik, J. *Pharm Unserer Zeit*. 1988. Vol 17, 1–9.
- [84]. Spilkova, J., & Dusek, J. *Ceska Slov Farm*. 1996. Vol 45, 296–301.
- [85]. Day, A.J., Du Pont M.S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.I.C., Morgan, M.R.A., & Williamson, G., *FEBS Lett*. 1998. Vol 436, 71–75.
- [86]. Spencer, J.P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E.S., Srai, S.K., & Rice-Evans, C. *FEBS Lett*. 1999. Vol 458, 224–230.
- [87]. Hollman, P.C., Bijlsman, M.N., van Gameren, Y., Cnossen, E.P., de Vries, J.H., & Katan, M.B. *Free Radic Res*. 1999. Vol 31, 569–573.
- [88]. Casley-Smith, J.R., & Casley-Smith, J.R. *Lippincott*. 1986.
- [89]. Petersen, H.O. *Danish. Ugeskr Laeger*. 1977. Vol 139, 2331–2333.
- [90]. Petersen, H.O., & Afzelius, H. *Danish. Ugeskr Laeger*. 1977. Vol 139, 2329–2331.
- [91]. Wozniak, K.D., & Braun, W. *Medicamentum*. 1972. Vol 13, 114–116.
- [92]. Hausen, B.M., & Wollenweber, E. *Contact Dermatitis*. 1988. Vol 19, 296–303.
- [93]. Hausen, B.M., Wollenweber, E., Seuff, H., & Post, B. *Contact Dermatitis*. 1987a. Vol 17, 163–170.
- [94]. Hausen, B.M., Wollenweber, E., Seuff, H., & Post, B. *Contact Dermatitis*. 1987b. Vol 17, 171–177.
- [95]. Bent, H., Havsteen. *Pharmacology & Therapeutics*. 2002. Vol 96, 67–202.
- [96]. Hausen, B.M., Evers, P., Steuve, H.T., Konig, W.A., & Wollenweber, E. *Contact Dermatitis*. 1992. Vol 26, 34-44.
- [97]. Hegui, E., Suchy, Y., & Nagy, M. *Hausarzt*. 1990. Vol 41, 675– 679.

- [98]. Schuler, T.M., & Frosch, P.J., *Hautarzt*. 1988. Vol 39, 139–142.
- [99]. Ginanneschi, M., Acciai, M.C., Sertoli, A., & Bracci, S., *Contact Dermatitis*. 1989. Vol 21, 267–279.
- [100]. Janes, K., & Bumba, V. *Pharmazie*. 1974. Vol 29, 544–545.
- [101]. Hashimoto, T., Tori, M., Asakawa, Y., & Wollenweber, E. *Z Naturforsch*. 1988. Vol 43, 470–472.
- [102]. Berton, G., Schneider, C., & Romeo, D. *Biochim Biophys Acta*. 1980. Vol 595, 47–55.
- [103]. Amoras, M., Sauvager, F., Girre, L., & Cormier, M. *Apiologie*. 1992a. Vol 23, 231–240.
- [104]. Amoras, M., Simoes, C.M., Girre, L., Sauvager, F., & Cormier, M. *J Nat Prod*. 1992b. 55, 1732-1740.
- [105]. Hope, W.C., Fenton, A.F., Nagy, C.F., Batula-Bernardo, C., & Coffey, J.W. *Biochem Pharmacol*. 1983. Vol 32, 367–371.
- [106]. Fritz-Niggli, H., & Frohlich, E. *ROFO Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed*. 1980. Vol 133, 316–321.
- [107]. Laborit, H., Drouet, J., Gerard, J., Jouany, JM., Narvaes, C., Niaussat, P., Weber, B. *Presse Médicale*. 1960. Vol 68, 305-8.
- [108]. Halpern, J. *Q Rev Chem*. 1961. Vol 15, 207–236.
- [109]. Marcus, R.A. *Rev Phys Chem*. 1963. Vol 67, 2853–2889.
- [110]. Tarnawski, M., Depta, K., Grejcium, D., Szelepin, B. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006. Vol 41, 182-188.
- [111]. Luximon-Ramma, A., Baborun, T., Soobrattee, M.A., and Aruoma, O.I. *Food Chem*. 2002. Vol 50, 5042-5047.
- [112]. Gülçin, I., Mashvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R. *Phytomedicine*. 2006. Vol 13, 343-351.
- [113]. Halliwell, B. *Am J Med*. 1991. 91(3C): 14S-22S.
- [114]. Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P., Manian, S. *Food Chem*. 2008. Vol 107, 1000-1007.
- [115]. Lee, KY Weintraub, ST Yu, BP. *Free Radical Biology & Med*. 2000. Vol 28, 261-265.
- [116]. Sonnenbichler, J., & Pohl, A. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*. 1980. Vol 361, 1757–1761.
- [117]. Baker, M.E., Medlock, K.L., & Sheehan, D.M. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998. Vol 217, 317–321.
- [118]. Mitcher, L.A., Tekkepalli, H., Waner, P.B.B., Kuo, S., Shanhel, D.M., & Stewart, G. *Mutat Res*. 1982. Vol 267, 229–241.
- [119]. Sokolova, V.E., Vasil'chenko, E.A., & Izma'lova, I.K. *Farmakol Toksikol*. 1978. Vol 41, 323–327.
- [120]. Sharma, R., Gupta, S.K., & Arora, R.B. *J Sci Indian Res*. 1971. Vol 30, 190–192.
- [121]. Van Cauwenberge, H., & Franchimont, P. *Zentralbl Phleb*. 1968. Vol 7, 110–121.
- [122]. Brandao, M.G., Krettli, A.U., Soares, L.S., Nery, C.G., Marinuzzi, H.C. *J Ethnopharmacol*. 1997. Vol 57, 131–138.
- [123]. Hufford, C.D., & Lasswell, W.I. *Lloydia*. 1978. Vol 41, 156–160.
- [124]. Mabry T.J. & Ulubelen A. *J Agric Food Chem*. 1980. Vol 28, 188–195.
- [125]. Cizmarik, J., & Trupl, J. *Pharmazie*. 1976. Vol 31, 63–65.
- [126]. Lean, M.E., Noroozi, M., Kelly, I., Burns, J., Talwar, D., Sattar, N., & Crozier, A. *Diabetes*. 1999. Vol 48, 176–181.
- [127]. Fang N. & Casida J.E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998. Vol 95, 3380–3384.
- [128]. Galati, G., O'Brien, P. J. *Free Radic. Biol. Med*. 2004. Vol 37, 287.

- [129]. Chen, D., Daniel, K.G., Chen, M.S., Kuhn, D.J., Landis-Piwowar, K.R., Dou, Q.P. *Biochem.Pharmacol.* **2005**. Vol **69**, **1421**.
- [130]. Abdelghafour, Marfak. Thèse de Doctorat. Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des Alcools : Formation de Depsides. Univ.Limoges. Ecole Doctorale Sciences Biologie Santé, Faculté de pharmacie. **2003**.
- [131]. Bahorun,T.,Substances naturelles actives: La flore *mauricienne*, une source d'approvisionnement potentielle. Univ. Maurice. **1997**.
- [132]. Nathalie Rivard-Gervais. *Le Médecin du Québec*. **2001**. Vol **36** (4).
- [133]. Asen, S., Putun, E., Doga.Kim. Ser. **1987**. Vol **11**(2), **66-71**.
- [134]. J. Loisseur, Techniques de laboratoire, Chimie physique, Chimie Biologique, Tome **1**, Editeurs Masson et CIE. **1973**.
- [135]. Bruneton, J. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, **3èmeEd.** 3, lavoisier, Paris. **1999**.
- [136]. Ribereau-Gayou, J.B. The phenolic compounds of vegetals, Edition Dundo, Paris. **1968**.
- [137]. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J. Chimie Analytique. Traduction de la 7ème édition américaine par Buess-Hermann C., Dauchot-Weymeers J., Dumont F., De Boeck Université. **1997**, **996**.
- [138]. Rhode R. Extraction Liquide/Liquide. Cours du Lycée Pradeau la Sède, Tarbes, **1998**.
- [139]. Mekkiou Ratiba. Thèse de Doctorat. Université Mentouri-Constantine.
- [140]. Tswett, M.,*Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. **1908**.Vol **41** (1)**1352-1354**.
- [141]. Kuhn, R., Lederer, E. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. **1931**. Vol **64** (6),**1349-1357**.
- [142]. Kuhn, R., Winterstein, A., Lederer, E. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie*. **1931**. Vol **197**, **141-160**.
- [143]. Martin A.J.P., Syngé R.L.M. *Biochemistry Journal*. **1941**. Vol **35**, **1358-1368**.
- [144]. Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A., Wittier, P., Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse. Ed. Masson, Paris. **1995**.
- [145]. Rosset, R., Caude, M., Jardy, A. Chromatographies en Phase Liquide et Supercritique. Ed. Masson, Paris. **1991**.
- [146]. Richardin P. La chromatographie.
<http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/chromato.htm>.
- [147]. Belkacem Souada. Thèse Doctorat. Université Mentouri-Constantine. **2009**.
- [148].Harborne, J.B. Phytochemical Methods.*Chapman and Hall*. **1973**.
- [149]. Loiseleur, J. Techniques de laboratoire, Chimie physique, Chimie Biologique, Tome 1, Editeurs MASSON et CIE. **1973**.
- [150]. Beyerinck,M.W. Z. *Phys. Chem.* **1889**. Vol **3**, **110**.
- [151]. Stahl,E. *Springer-Verlag*. **1967**.
- [152]. Bronze, M.R., and Boas, L.F.V.*Analisis*. **1998**. Vol **26**(1), **40-47**.
- [153]. Bate-Smith, E.C., and Westall, R.G.*Bioch.Bioph.Acta*. **1950**. Vol **4**, **427-440**.
- [154]. Harborne, J.B.*Chapman and Hall*.**1975**.V.**1Ed**,
- [155]. Ribereau-Gayon, P.: Les Composé Phénoliques des Végétaux. **1968**.
- [156].Ramderath, K.: Chromatographie Couche Mince. **1971**.
- [157]. Mabry, T.J., Markham, K.R., and Thomas,M.B. *Springer-Verlag, Heidelberg*. **1970**, **254**.
- [158]. Jurd, L., and Horwitz, R.*Pergamon Press New-York*. **1962**. **107-155**.
- [159]. Harborne, J.B., Mabry, T.J., and Mabry, H.*Academic Press*. **1975**.
- [160]. Markham, K.R.*Academic press*. **1982**.

- [161]. Markham, K.R. and Mabry, T.J. *Phytochemistry*. **1968**. Vol **7**, **1197**.
- [162]. Horhammer, L., and Hänsel, R. *Arch. Pharm.* **1952**. Vol **285**, **438**.
- [163]. Jurd, L., and Geissman, T.A. *J. Org. Chem.* **1956**. Vol**21**, **1395**.
- [164]. Terence, N., Mitchell, · Burkhard Costisella. NMR – From Spectra to Structures An Experimental Approach. **2Ed.** *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. **2007**.
- [165]. Markham, K.R., and Geiger, H. *Chapman & Hall*. **1993**.
- [166]. Wilson, R.G., Bowie, J.H., and Williams, D.H. *Tetrahedron*. **1986**. Vol **24**, **1407**.
- [167]. Rodriguez, E., Carman, N.J., and Mabry, T.J. *Phytochemistry*. **1972**. Vol **11**, **409**.
- [168]. Markham, K.R. *Academic Press*. **1989**, **197-262**.
- [169]. Markham, K.R. *Tetrahedron*. **1976**. Vol **32**, **2607-2612**.
- [170]. Audier, H. Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse. **1966**.
- [171]. Nielsen, J.G., and Moller, J. *Acta Chem. Scand.* **1970**. Vol **24**, **2665**.

CHAPITRE III

L'étude phytochimique de Linaria atlantica

III. 1. Place dans la systématique (Botanique)

Ce classement se réfère à la classification botanique [1] présenté dans le tableau suivant :

Tableau III. 1 : classification botanique de l'espèce étudiée

Embranchement	Viridaeplantae
Royaume	plante
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Scrophulariales
Famille	Scrophulariaceae
Sous-famille	Scrophularioidea
Tribu	Antirrhineae
Genre	<i>Linaria</i>
Espèce	<i>Linaria atlantica</i>

La famille scrophulariaceae comporte environ **220** genres et **4500** espèces [1]. Son centre principal de distribution est localisé dans la cuvette méditerranéenne [2]. C'est une grande famille des plantes médicinales qui ont acquis une très grande importance. Le genre *Linaria* appartient à la famille Scrophulariaceae, ses espèces ont été utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement de désordres vasculaires (*L. vulgaris*) [3], et pour leur effets : tonique et antiscorbutique (*L. cymbalaria*) [4], laxative (*L. japonica*) [5] et diurétique (*L. cymbalaria* et *L. japonica*) [4-6].

III. 2. Description de l'espèce

Tiges grêles de **3-10** cm, calice glabrescent. Petite plante ramifiée dès sa base à épis florifères peu fournis et une inflorescence en général ramifiée ± paniculée champs pelouses [7].

III. 3. Travaux antérieures

L'espèce *Linaria atlantica* Boiss. & Reut. est endémique pour l'Algérie et le Maroc. Notant qu'aucune investigation phytochimique n'a été faite sur cette dernière, ce qui donne une originalité à notre travail.

III. 4. Récolte de la matière végétale

L'espèce *Linaria atlantica* a été récoltée durant le mois de juin **2010**, dans le parc de la région d'El-Kala de Taref.

La détermination botanique de cette espèce a été réalisée par le Mr. Sarri Djemal.

III. 5. Extraction de *Linaria atlantica*

La matière végétale (feuilles, fleurs et tiges; **1285.15 g**) est mise en macération à température ambiante, dans un mélange hydroalcoolique (**MeOH/Eau ; 80%/20%**) [8]. Cette macération est répétée **4** fois, à chaque fois on renouvelé le solvant dans une période de **72** heures. On a évaporé le solvant avec l'évaporateur rotatif à **35 °C**, et sous pression réduite jusqu'à la concentration de notre extrait. Ce dernier a été dilué avec l'eau distillée à raison de **400 ml** pour **1 Kg** de matière sèche, après on a fait une extraction successive de type liquide-liquide avec l'ampoule à décanter, en utilisant des solvants de polarité croissante, en commençant par le chloroforme, l'acétate d'éthyle et finalement le *n*-butanol. **La figure III.1** présente les différentes étapes de l'extraction jusqu'à l'obtention des extraits bruts.

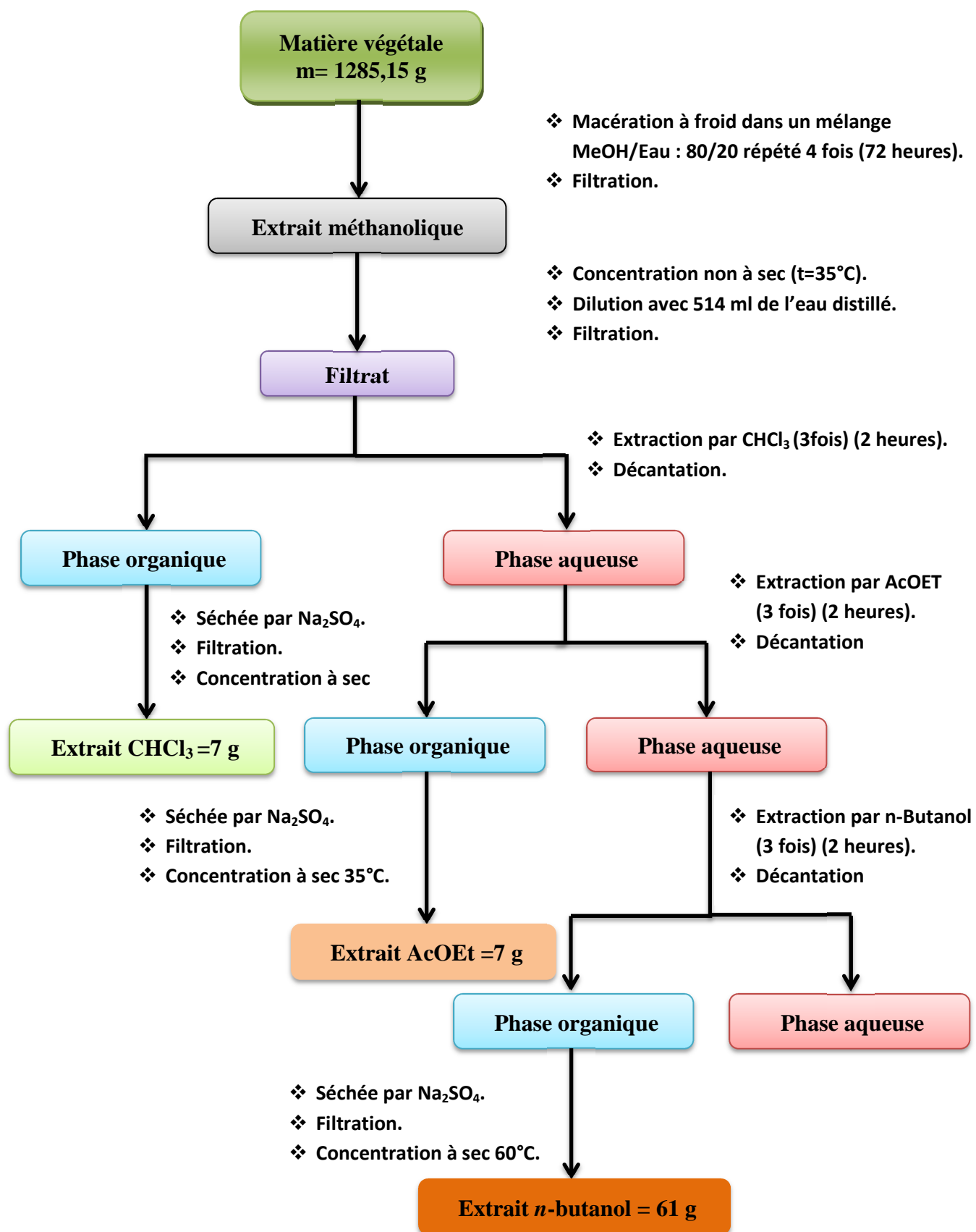


Figure III.1: Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de *Linarea atlantica*

Les trois phases (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par le sulfate de sodium (Na_2SO_4) pour éliminé l'eau, puis filtrées et concentrées à sec sous pression réduite, les poids et les rendements sont données dans le tableau suivant :

Tableau III.2: Rendement des extraits

Matière végétale	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
1285.15 g	<i>Chloroforme</i>	7	0,54
	<i>Acétate d'éthyle</i>	7	0,54
	<i>n-butanol</i>	61	4,74

III. 6. Travaux personnels

Ce travail se résume principalement dans l'investigation phytochimique de l'espèce *Linaria atlantica*. On commence par une extraction suivi par fractionnement et purification de différents composés en utilisant diverses techniques chromatographiques. La dernière étape c'est l'élucidation structurale des métabolites secondaires isolés en utilisant la combinaison des techniques d'analysés soit spectrophotométrie : UV-visible, ou bien la spectroscopie : RMN de proton.

III. 6.1. Séparation et purification des composés de l'extrait Acétate d'éthyle de *Linaria atlantica*

III. 6.1.1. Matériels et méthodes utilisés

- **L'extrait Acétate de la plante *L. atlantica* : 7 g.**
- **Solvants utilisées :** Ether de pétrole, Acétate d'éthyle, Chloroforme, et le Méthanol.
- **Révéléateur à base d'acide :** AcOH 80%
 H_2SO_4 04%
 H_2O 16%
- **Chromatographie analytique sur couche mince (CCM)**

L'analyse de l'extrait, les fractions et les produits séparés, a été faite sur des plaques CCM avec une silice utilisée comme phase stationnaire est : la silice **60 G F₂₅₄ Merck**, **0,1 mm** sur support d'aluminium (**20×20 cm**).

➤ Chromatographie d'adsorption sur colonne ouverte (CC)

Une colonne ouverte (1200×40 mm), le gel de silice est de granulométrie moyenne : 0,063-0,200 mm (70-230 mesh), Merck H60, réf. 7741.

➤ Chromatographie préparative sur couche mince (CCM prép.)

Les chromatographies préparatives sur couche mince sont effectuées sur des plaques en verre (20×20 cm) pré-étalées de gel de silice Merck 60 F₂₅₄ de 0,3 mm d'épaisseur.

III. 6.1.2. Méthodologie générale

L'extrait acétate d'éthyle est soumis à des séparations successives par les différentes méthodes chromatographiques conduisant à l'isolement des molécules pures. La séparation chromatographique, on commence par une recherche sur plaques analytiques, avec des différents systèmes d'élution pour trouver le système d'élution donnant la meilleure séparation. Les tests nous montrent que la bonne séparation est obtenue avec le système **Chloroforme/Méthanol** dans les proportions **9,5/0,5**. La plaque CCM est révélée et représentée dans la figure suivante :



Figure III.2 :

Plaque CCM éluee avec le système (CHCl₃/MeOH : 9,5/0,5) puis révélée.

a). Fractionnement de l'extrait Acétate d'éthyle

Cette étude commence par des tests des extraits de cette plante avec la chromatographie analytique (plaque CCM), en utilisant différents systèmes d'élution, on a trouvé que cette plante est riche en métabolites secondaires, c'est pour ça on a travaillé sur

7 g de l'extrait Acétate d'éthyle. Le choix de cet extrait est du à sa richesse en métabolites secondaires et leurs bonne séparation.

Un premier fractionnement de l'extrait a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur colonne.

L'extrait Acétate d'éthyle dissout dans l'acétone est mélangée avec une petite quantité de gel de silice (pour colonne), l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur la colonne de gel de silice, préparée dans le chloroforme. La masse de gel de silice est de **180 g**. L'élution a été réalisée par le chloroforme enrichi progressivement avec le méthanol. Les fractions obtenu sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couche mince, qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes approprié, ont été visualisées sous lampe UV à **254** et **365 nm**, puis révélée et chauffée pendant **1 min** à **100°C**, les résultats obtenus sont présenté dans le **tableau III.3**

Tableau III.3 : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Acétate d'éthyle de *Linaria atlantica*

Lots	Fractions	SYSTEME D'ELLUTION		Poids de la fraction (mg)	Volume des fractions (ml)
		CHCl ₃ %	MeOH%		
1-5	F0	100	0	3,3	125
6-7	F1	100	0	3,9	50
8	F2	100	0	29,8	25
9-12	F3	100	0	9,6	100
13-14	F4	100	0	4,3	50
15-19	F5	100	0	18,1	125
20-21	F6	100	0	7	50
22-26	F7	100	0	10,8	125
27-33	F8	100	0	21,5	175
34-42	F9	100	0	6,4	225
43-44	F10	100	0	7,2	50
45-56	F11	100	0	26,7	300

57-63	F12	100	0	15,1	175
64-70	F13	100	0	10,8	175
71-75	F14	99	1	19,1	125
76-90	F15	99	1	68,3	375
91-99	F16	99	1	71,5	225
100-104	F17	99	1	14,8	125
105-109	F18	99	1	25,8	125
110-115	F19	99	1	30,4	150
116-121	F20	99	1	38,2	150
122-126	F21	99	1	26,7	125
127-131	F22	99	1	9,8	125
132-151	F23	99	1	54,7	500
152-197	F24	98	2	281,3	1150
198-222	F25	96	4	439,5	625
223-260	F26	94	6	1057,7	950
261-302	F27	92	8	366,2	1025
303-316	F28	90	10	146,6	350
317-323	F29	85	15	56	175
324-340	F30	85	15	147,4	425
341-402	F31	80	20	564,1	1550
403-404	F32	70	30	229,6	50
405-430	F33	70	30	269,7	650
431-449	F34	50	50	67,8	475
450-465	F35	40	60	50,9	400
466-487	F36	20	80	34,26	550
488-500	F37	0	100	24,1	325

Les fractions obtenues sont analysées par des plaques **CCM** dans le but de :

- ✓ rassembler les fractions qui présentent les mêmes taches.
- ✓ chercher un nouveau support chromatographique ainsi qu'un nouveau système de solvant susceptible de mieux séparer les composés.

La richesse de l'extrait et la difficulté de certaines séparations, nous obligent à diversifier les systèmes chromatographiques.

Pour les fractions étudiées suivantes, on a utilisé les plaques préparatives (plaque en verre étalait avec du Gel de Silice **GF 254** pour TLC).

b) Étude de la fraction F15

Cette fraction (m=**68,3** mg), est issue de la colonne dans pourcentage **99% CHCl₃/1% MeOH** avec différents taches, et renfermant un produit majoritaire donnant une tache noir-violette sous **UV (365 nm)**, cette dernière donne une coloration jaune après exposition à la vapeur de l'ammoniaque ce qui orient vers un composé de type flavonique. Pour séparer les autres taches, on a utilisé la chromatographie sur plaque préparative avec comme système d'éluion le **CHCl₃/MeOH: 9,3/0,7**. Les taches séparés sont 3 : **F 15-1**, **F 15-2**, et **F 15-3**, ces derniers sont testé dans un autre système et on a trouve des autres taches, on utilisant un système de séparation **CHCl₃/Acétone : 6/4** sur plaques préparatives pour la sous-fraction **F 15-1** et on a isolée le **F 15-1-1**. La plaque **F 15-1** est représentée dans la figure suivante :

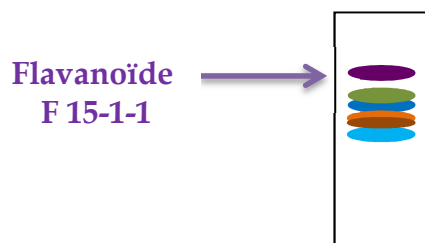


Figure III.3: F15-1 avec le système CHCl₃/Acétone: 6/4

On a gratté le produit noir-violet, lavé et filtré avec le méthanol plusieurs fois, puis séchée sous pression réduite. On a obtenu **F 15-1-1** comme produit pure (**5 mg**) soluble dans le **MeOH**.

Pour les sous-fractions **F 15-2** et **F 15-3**, on a utilisé le **Sephadex LH20** pour la séparation de deux produits un de chaque sous-fraction. Pour **F 15-2**, une tache jaune sous la lampe de **Wood** et pour **F 15-3**, une tache noir-violette sous la lampe de **Wood**, les masses de ces produits ne permettent pas de faire leurs analyses structurales.

c) Étude la fraction F16

Cette fraction (71,5 mg), renferme un précipité blanc insoluble dans le méthanol, sa recrystallisation dans le méthanol avec plusieurs lavages, nous a permis de le séparer. Ce composé soluble dans l'acétone, testé dans un système d'élution $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9/1. La tache noir-violette sous la lampe de **Wood**, ainsi que la coloration jaune après révélation avec la vapeur d'ammoniaque, orientant vers un composé de type flavanoïde.

d) Étude de la fraction F17

Cette fraction de 14,8 mg, a été chromatographié sur plaques préparatives avec comme système d'élution $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$: 6/4, ce qui nous a donné trois taches : **F 17-3 / F 17-6 / F 17-9**.

Les autres taches sont des mélanges de produits leurs séparation est difficile avec les moyens que nous avons dans laboratoire.

- **F 17-3** une tache bleue sous l'UV (365 nm), avec 4 mg de masse.
- **F 17-6** une tache noir-violette sous UV (365 nm), avec 2,1 mg de masse.
- **F 17-9** une tache orange sous UV (365 nm), avec 4 mg de masse.

Pour **F17-3** et **F17-9** ce sont des mélange des produits (minimum deux produits), avec des quantités minimales leurs étude est difficile.

Pour **F 17-6** testé avec plusieurs systèmes, c'est un produit pur.

e) La fraction F20

Une fraction de 38,2 mg, a été chromatographié sur plaques préparatives avec comme système d'élution $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$: 6/4, ce qui nous a permis de séparer quatre taches : **F 20-1 / F 20-2 / F 20-4 / F 20-6**.

- **F 20-1** une tache bleu fluorescent sous l'UV (365 nm), avec 1 mg de masse.
- **F 20-2** une tache noir-violette sous l'UV (365 nm), avec 2 mg de masse.
- **F 20-4** une tache noire-violette sous l'UV (365 nm), avec 7 mg de masse.
- **F 20-6** une tache orange sous l'UV (365 nm), avec 8 mg de masse.

La sous-fraction **F 20-4**, a été chromatographié avec le système **AcOEt 100%**. Ce qui a permis d'isoler deux taches **F 20-4-1** et **F 20-4-2**.

La séparation de la sous-fraction **F 20-6**, avec système d'éluion **AcOEt 100%**, nous a permis d'isoler les produits : **F 20-6-1**, **F 20-6-2** et **F 20-6-3**. Les masses de ces produits ne permettent pas de faire leurs analyses structurales.

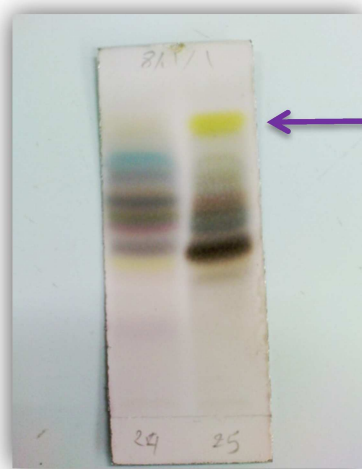
f) La fraction F24

Cette fraction (**281,3 mg**), renferme un petit précipité dans le méthanol, la séparation de ce précipité après plusieurs lavages dans le méthanol, après un test sur une plaque **CCM**, on a obtenu un produit pure de masse **2 mg**.

La même chose avec **F 25**, et **F 26**. Pour les précipités de ces fractions après un test sur une plaque **CCM**, on a trouve que c'est le même produit que celui de **F 24**.

g) La fraction F25

La chromatographie sur colonne de la fraction **F 25 (439,5 mg)**, avec comme système isocratique le **AcOEt/MeOH/H₂O : 10/1/1**. (**figure III.4**). Nous a permis de séparer un produit pur **F 25-2-1 (8 mg)** qui donne une tache noire-violette sous la lampe de **Wood**.



Tache jaune après
révélation
(Flavonoïdes)

Figure III.4:

F24 et **F25** avec le système **AcOEt/MeOH/H₂O : 10/1/1**, puis révélé

III. 7. Conclusion

Les travaux de séparation chromatographique ont permis l'obtention de 11 produits purs et natifs.

Nous n'avons pu obtenir que la structure de quatre : TC1, TC2, TC3 et TC4.

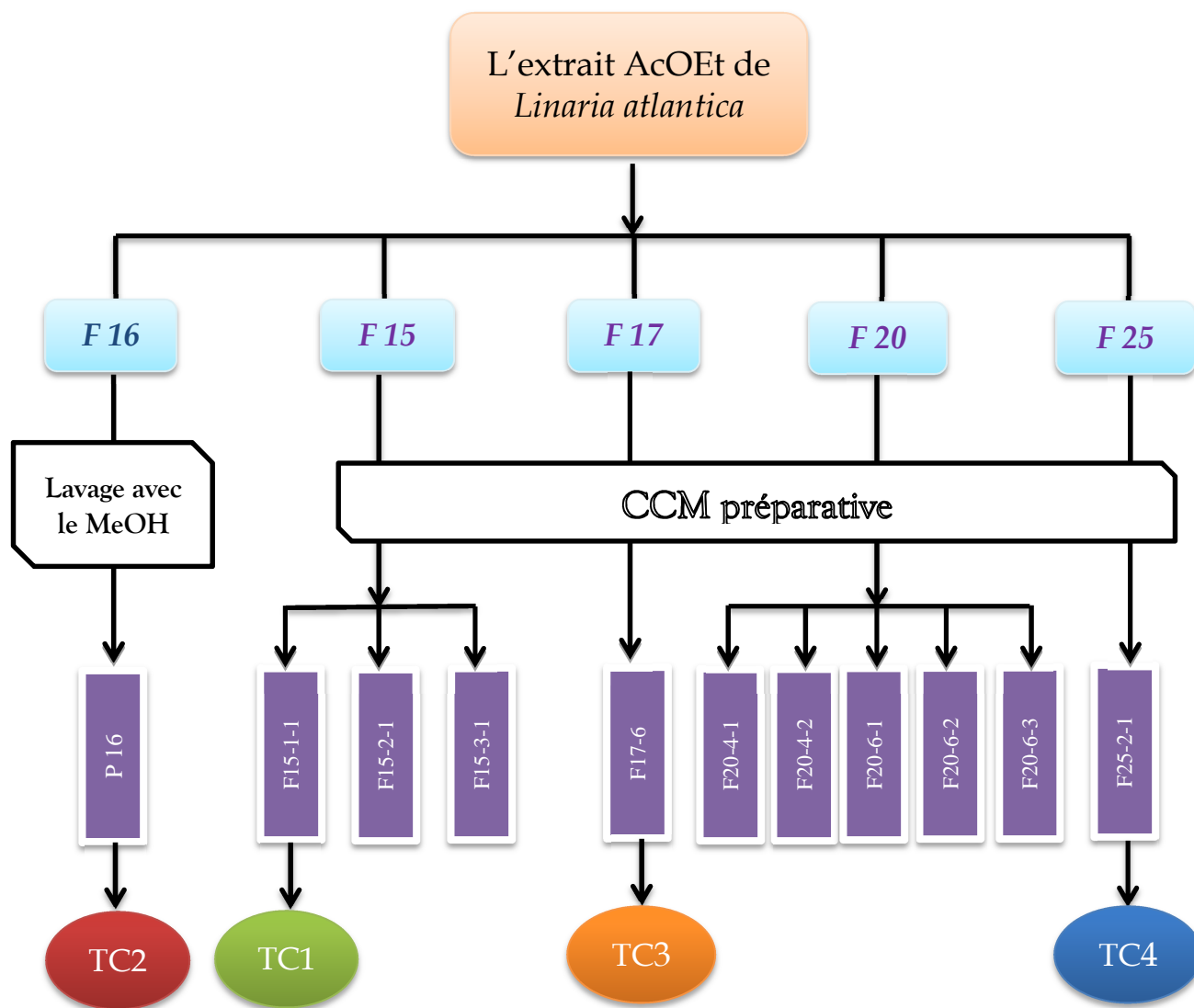


Figure III.5 : Résumé des travaux chromatographiques

III. 8. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes spectrophotométriques de détermination de l'activité antioxydante. Les tests courants utilisés à cet effet sont [9]:

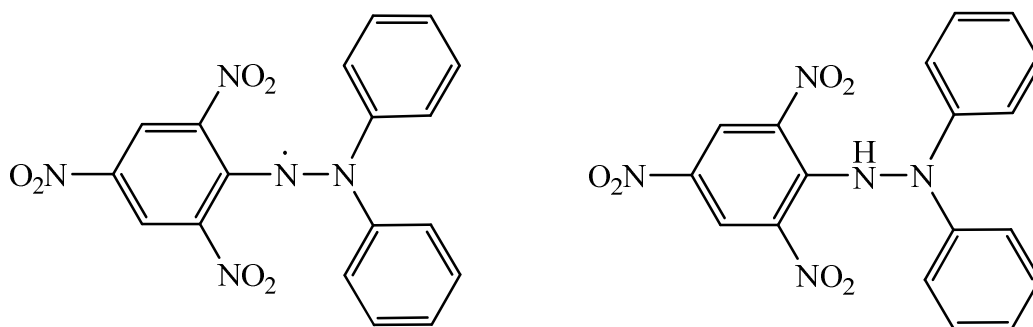
- ✓ le test de l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (**ABTS**)
- ✓ le test du diphénylpicrylhydrazyl (**DPPH**)
- ✓ le test utilisant le pouvoir réducteur des ions ferriques (**FRAP**) = ferric reducing antioxidant power

L'effet antioxydant de l'extrait envers le radical libre stable 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (**DPPH[°]**) a été évalué par la méthode d'Ohinishi [10].

De notre part, nous avons choisi le test au **DPPH** pour sa facilité de mise en œuvre en vue d'évaluer l'activité antioxydante de notre extrait Acétate.

III. 8.1. Principe du test au DPPH

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (**DPPH**) est un radical libre stable de coloration violette foncée et absorbe à 517 nm, lorsqu'il est réduit, en présence des composés anti radicalaires, il change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical **DPPH**, qui est proportionnel au pouvoir antioxydant de l'échantillon.



Diphénylpicrylhydrazyl (radical libre)

Diphénylpicrylhydrazine (non radicalaire)

Figure III.6: La structure de DPPH

III. 8.2. Protocole expérimental

Le protocole utilisé est celui décrit par Chen et al. (2004) [11].

Le **DPPH** (Mm = 394,33 g/mol) est solubilisé dans du méthanol absolu pour en avoir une solution de concentration connue.

- Les extraits ont été préparés par dissolution dans le méthanol absolu. Pour chaque extrait, on prépare une solution à raison de 1 mg/ml, à partir de laquelle on fait ensuite des dilutions pour en avoir une gamme de concentrations allant de 5 à 150 µg/ml.
- Le blanc de chaque extrait (pour chaque concentration) est préparé par le mélange de deux volumes égaux de solution et de méthanol.
- Le contrôle négatif est préparé par le mélange de deux volumes égaux de **DPPH** et de méthanol.
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard (l'acide ascorbique), préparé par le mélange de deux volumes égaux de **DPPH** et d'acide ascorbique.

La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm au spectrophotomètre.

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du **DPPH** en solution. Celui-ci est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% d'inhibition = \frac{Abs (CN) - Abs (ech)}{Abs (CN)} \times 100$$

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures.

Références Bibliographiques

- [1]. www.ZipcodeZoo.com.
- [2]. Bednorz, L., Irmina, M.R. *Botanika–Steciana*. **2009**. Vol **13**, **177-180**.
- [3]. Pahlow, M., El Gran Libro de las Plantas Medicinales, **4ème Ed. 1979**, **273**. Everest S. A., Madrid.
- [4]. Dobrescu, D., Cristea, A., and Susanu, M. *Farmacia*. **1985**. Vol **33**, **215**.
- [5]. Kitagawa, I., Tani, T., Akita, K., and Yosioka, I., (1973) *Chem. Pharm. Bull.* **1978**. Vol **21**.
- [6]. Gordaliza, M., Jose, M., Del Corral, M., Maria, M., Mahiques, Maria, Castro, A., and San Feliciano, A. *Phytochemistry*. **1995**. Vol **40** (4), **1307-1309**.
- [7]. Quezel, P., Santa, S., Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. **1963**, vol. **2**. CNRS, Paris.
- [8]. Karin, Kraft, M.D. Christopher Hobbs, L. Ac., A.H.G. Pocket Guide to Herbal Medicine. Georg Thieme Verlag, Rüdigerstrasse **2004**, **14**, **70469** Stuttgart, Germany.
- [9]. Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio, J.R., A.Z., Scheerens, J.C., Miller, A.R. *J. Agric. Food Chemistry*. **2006**. Vol **54**, **1151-1157**.
- [10]. Morishita, M.H., Iwahashi, H., Shizuo, T., Yoshiaki, S., Kimura, M., Kido, R. *Phytochemistry*. **1994**. Vol **36**, **579–583**.
- [11]. Chen C, N., Weng, M.S., Wu, C.L., et Lin, J.K. *E CAM*. **2004**, Vol **1(2)**, **175-185**.

CHAPITRE IV

Résultats et discussion

IV. Identification des produits isolés de l'extrait Acétate de *Linaria atlantica*

On a utilisé pour l'identification structurale des composés isolés, la combinaison de deux techniques spectroscopiques l'UV-Visible et la RMN du proton.

IV. 1. Elucidation structurale du composé TC1

- La tache de ce composé sur plaque analytique donne une coloration jaune après exposition à la vapeur de l'ammoniaque, on déduit que c'est un flavonoïde.
- La fluorescence noir-violette du produit **TC1** sous la lumière de **Wood** et la valeur de la longueur d'onde de la **bande I** du spectre d'absorption enregistré dans le méthanol à **343** nm, indiquent que ce composé est un flavonoïde de type flavone.

IV.1.1. Spectroscopie de RMN ¹H

L'examen du spectre RMN ¹H (spectre n° IV.1) enregistré dans le MeOH ainsi que ces spectres étalés (spectre n° IV.1.1) montre :

- Un singulet à 3,95 ppm d'intégration **3H**. On peut l'attribuer à un méthoxyle.
- Un singulet d'intégration **1H** à 8,55 ppm, c'est un proton d'un **OH** aromatique.
- Un doublet dédoublé d'intégration **1H** à 7,48 ppm, ($J = 8,5; 2,1$ Hz), on peut l'attribuer à **H-6'**.
- Un doublet d'intégration **1H** à 7,38 ppm, ($J = 2,1$ Hz), on peut l'attribuer à **H-2'**.
- Un doublet d'intégration **1H** à 7,08 ppm, ($J = 8,5$ Hz). Attribuable à **H-5'**.
- Un singulet d'intégration **1H** à 6,52 ppm. C'est le **H-3**.
- Un singulet d'intégration **1H** à 6,30 ppm. C'est le **H-6** ou bien le **H-8**.

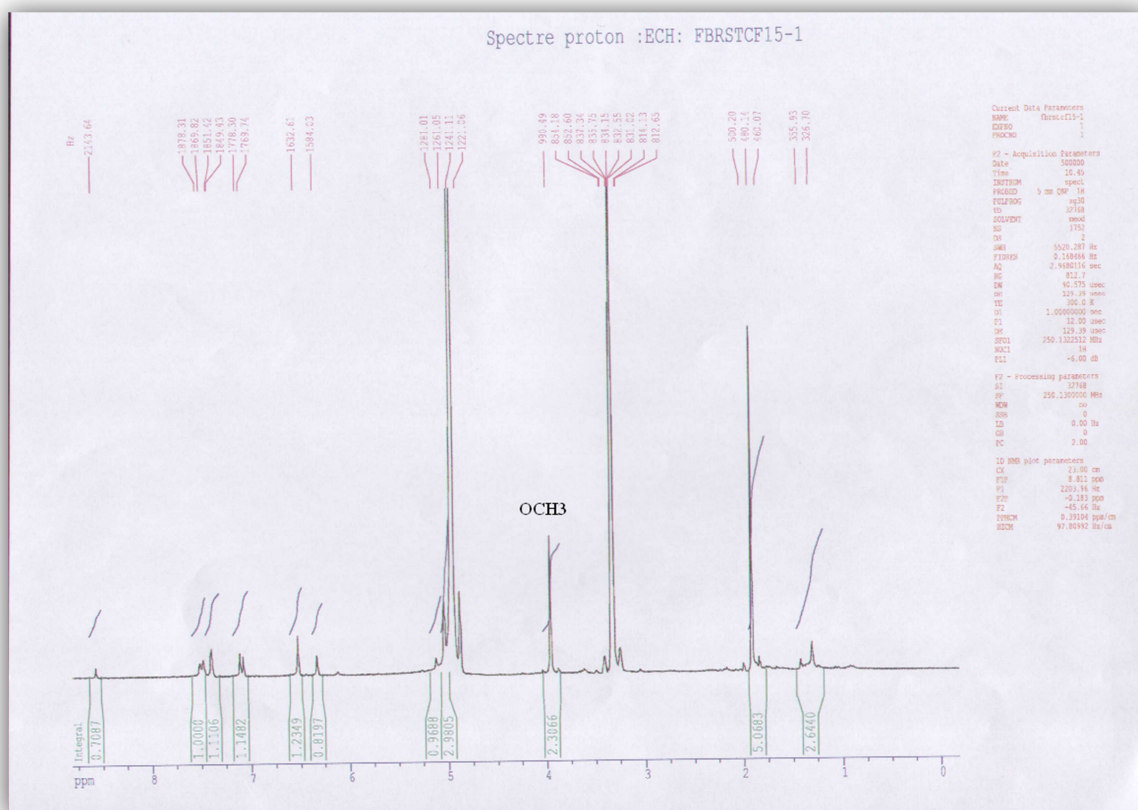
Le noyau **A** est trisubstitué en **5, 7, 8** ou bien **5, 6, 7** alors que le noyau **B** est disubstitué en **3', 4'**.

Ces données spectroscopiques sont rassemblées dans le **tableau n° IV.1.1**

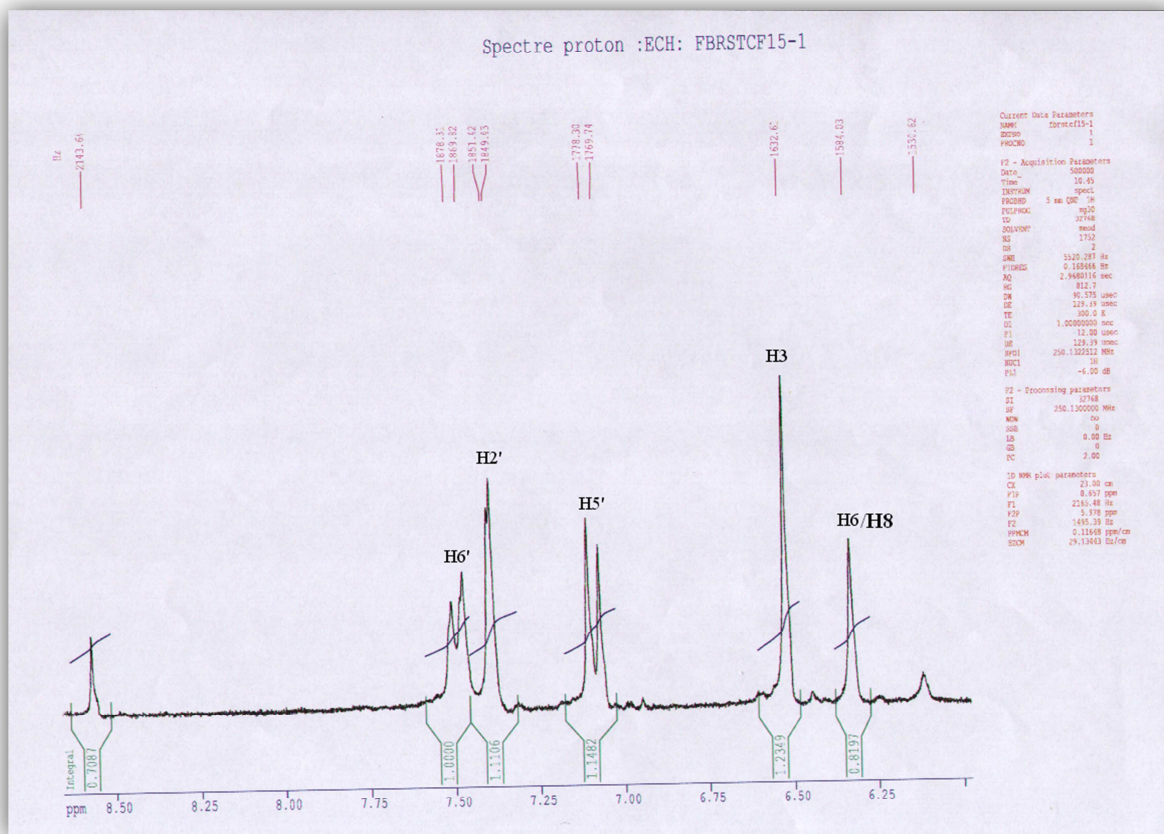
Tableau n° IV.1.1:

Les résultats de la spectroscopie RMN ¹H de TC1 (250 MHz; méthanol)

Déplacement chimique Δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
8,55	1H	s	OH aromatique
7,48	1H	dd (8,5; 2,1)	H-6'
7,38	1H	d (2,1)	H-2'
7,08	1H	d (8,5)	H-5'
6,52	1H	s	H-3
6,30	1H	s	H-6 ou H-8
3,95	3H	s	OCH ₃



Spectre n° IV.1.1: spectre RMN ¹H du composé TC1



Spectre n° IV.1.2:
 Spectre RMN ¹H étalée de 6 à 8.75 ppm du composé TC1

La figure suivante présente le couplage des protons de noyaux **B** du composé **TC1** avec ces constants de couplages (*J*).

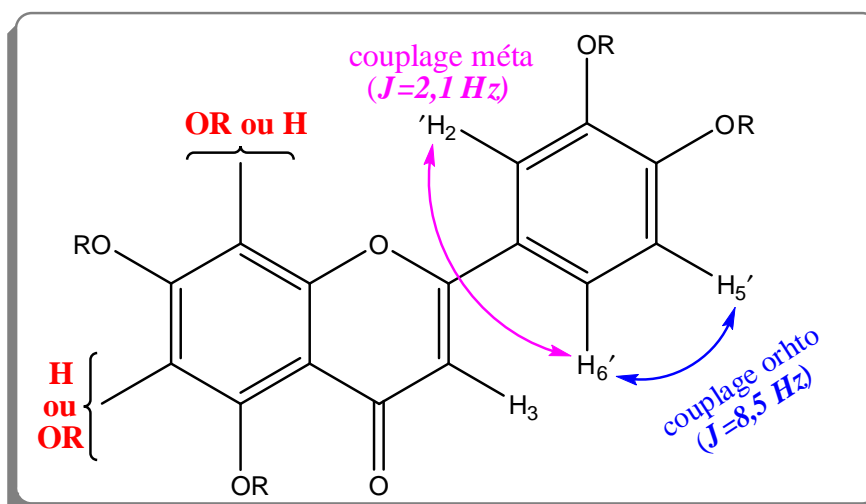
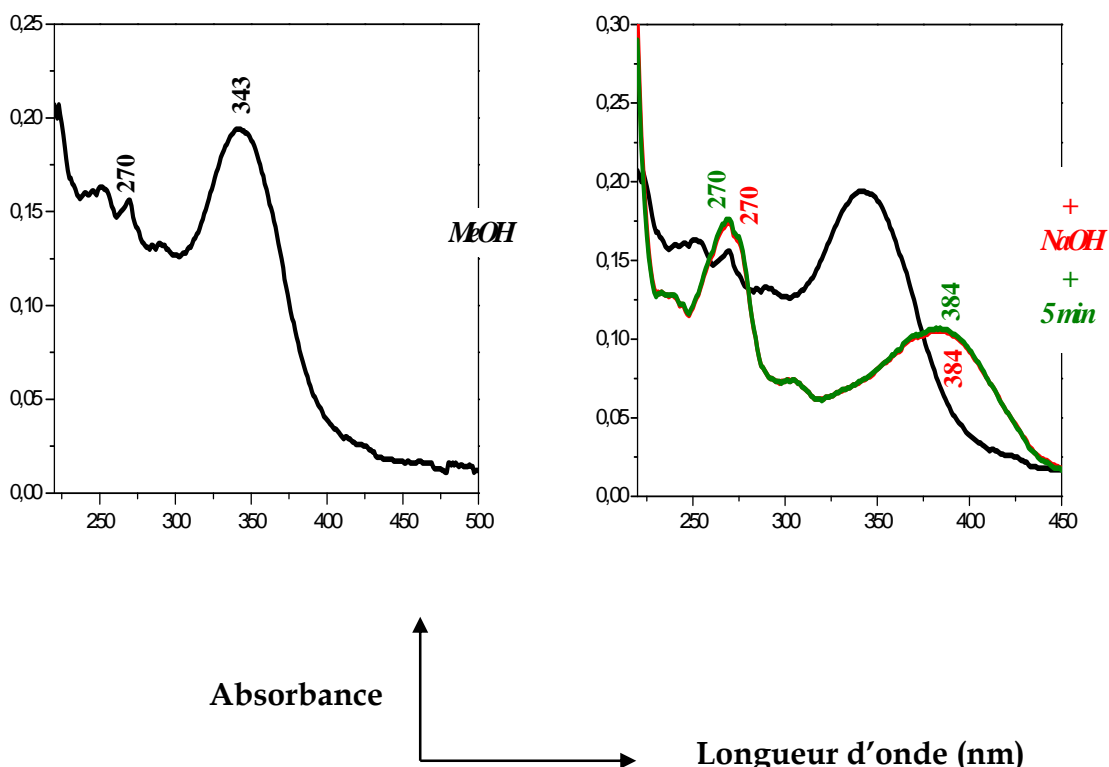
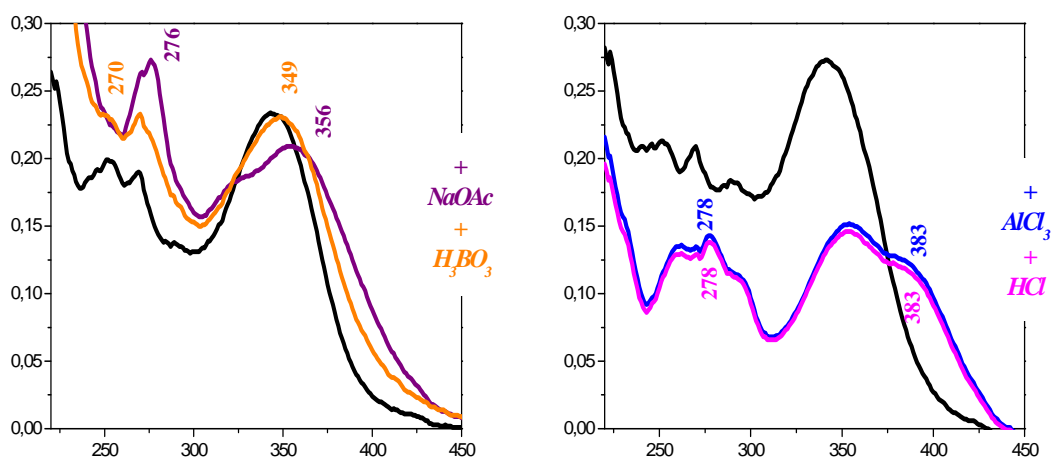


Figure n° IV.1.1 :
 La structure partielle de TC1

IV.1.2. L'examen de la série spectrale UV (spectre n° IV.2)

- Le spectre d'absorption UV enregistré dans le méthanol donnant la valeur de la longueur d'onde d'adsorption maximale de la **bande I** à 343 nm, oriente vers la structure d'une flavone.
- L'ajout de **NaOH** provoque un déplacement bathochrome +41 nm de la **bande I** par rapport à celui enregistré dans le **MeOH**, avec diminution de l'intensité ce qui révèle la présence d'un **OR (OCH₃)** en position 4'.
- L'addition de **AlCl₃** provoque un déplacement bathochrome +40 nm de la **bande I** par rapport au **MeOH**, révèle la présence d'un **OH** en position 5.
- La comparaison du spectre après l'ajout de **AlCl₃+HCl** avec celui enregistré dans le **MeOH** donne un déplacement bathochrome +40 nm de la **bande I**, qui prouve que le carbone 6 n'est pas oxygéné, avec **OH** en C-5.
- L'ajout de **NaOAc** provoque un déplacement +06 nm de la **bande II**, par rapport à celui enregistré dans le **MeOH**, y a un **OH** en C-7, le spectre se décompose avec le temps, révèle la présence d'un **tri OH** en 5, 7, 8.
- L'addition **H₃BO₃** sur **NaOAc** provoque un déplacement bathochrome de la **bande I** par rapport au spectre enregistré dans le **MeOH** ($\Delta\lambda_I = +6$ nm), révèle un di **OH** en 7, 8.





Spectre n° IV.1.3 :
Série spectrale UV du composé TC1

Les résultats de la série spectrale UV-Visible du composé TC1 sont rassemblés dans le tableau n° IV.1.2:

Tableau n° IV.1.2 :
Résultats de la série spectrale UV-visible Pour TC1

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	343	270
+NaOH	384	270
+NaOAc	356	276
+NaOAc+H ₃ BO ₃	349	270
+AlCl ₃	383	278
+AlCl ₃ +HCl	383	278

IV.1.3. Conclusion

L'ensemble des données spectrales de RMN ^1H ainsi que ceux de la série spectrale UV-visible prouve l'existence de : OCH_3 sur le $\text{C-4}'$, OH-5 , OH-7 , H-3 et H-6 , indiquent que la structure finale de **TC1** est comme suit :

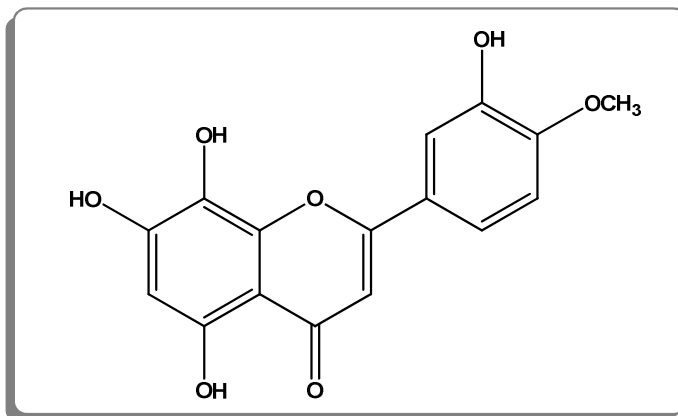


Figure n° IV.1.2 :
La structure finale de TC1

C'est le **3',5, 7, 8-tetrahydroxy-4'-méthylflavone** ou bien la **hypolaetine-4'-méthyl éther**.
Ce produit est isolé pour la première fois du genre *Linaria*.

IV.2 Elucidation structurale du composé TC2

- ✓ La tache de ce composé sur une plaque analytique (**CCM**), donne une coloration jaune après exposition aux vapeurs de l'ammoniaque, on déduit que c'est un flavonoïde.
- ✓ La fluorescence noir-violette de ce flavonoïde sous la lampe de **Wood** et la valeur de la longueur d'onde de la **bande I** du spectre enregistré dans le **MeOH** à **343** nm indique qu'il s'agit d'un flavanoïde de type flavone.

IV.2.1. Spectroscopie de RMN ¹H

Ce spectre est enregistré dans l'acétone.

- Un singulet d'intégration **3H** à 3,80 ppm, c'est un méthoxyle (**OCH₃**).
- Un singulet d'intégration **1H** à 12,85 ppm, c'est le **OH** en position **5**.
- Un doublet dédoublé (**J=8,5; 2,3 Hz**) d'intégration **1H** à 7,45 ppm, on peut l'attribuer à **H-6'**.
- Un doublet (**J=2,3 Hz**), d'intégration **1H** à 7,37 ppm, c'est le **H-2'**.
- Un doublet d'intégration **1H** à 7,00 ppm, (**J=8,5 Hz**), c'est le **H-5'**.
- Un singulet d'intégration **1H** à 6,52 ppm que l'on peut attribuer à **H-3**.
- Un doublet d'intégration **1H** à 6,44 ppm, (**J=2,1 Hz**), que l'en peut attribuer à **H-8**.
- Un doublet (**J=2,1 Hz**), d'intégration **1H** à 6,13 ppm, c'est le **H-6**.

La présence des signaux des protons **H6** et **H8**, montre que le noyau **A**, est disubstitué en position 5 et 7 par des groupements **OR**.

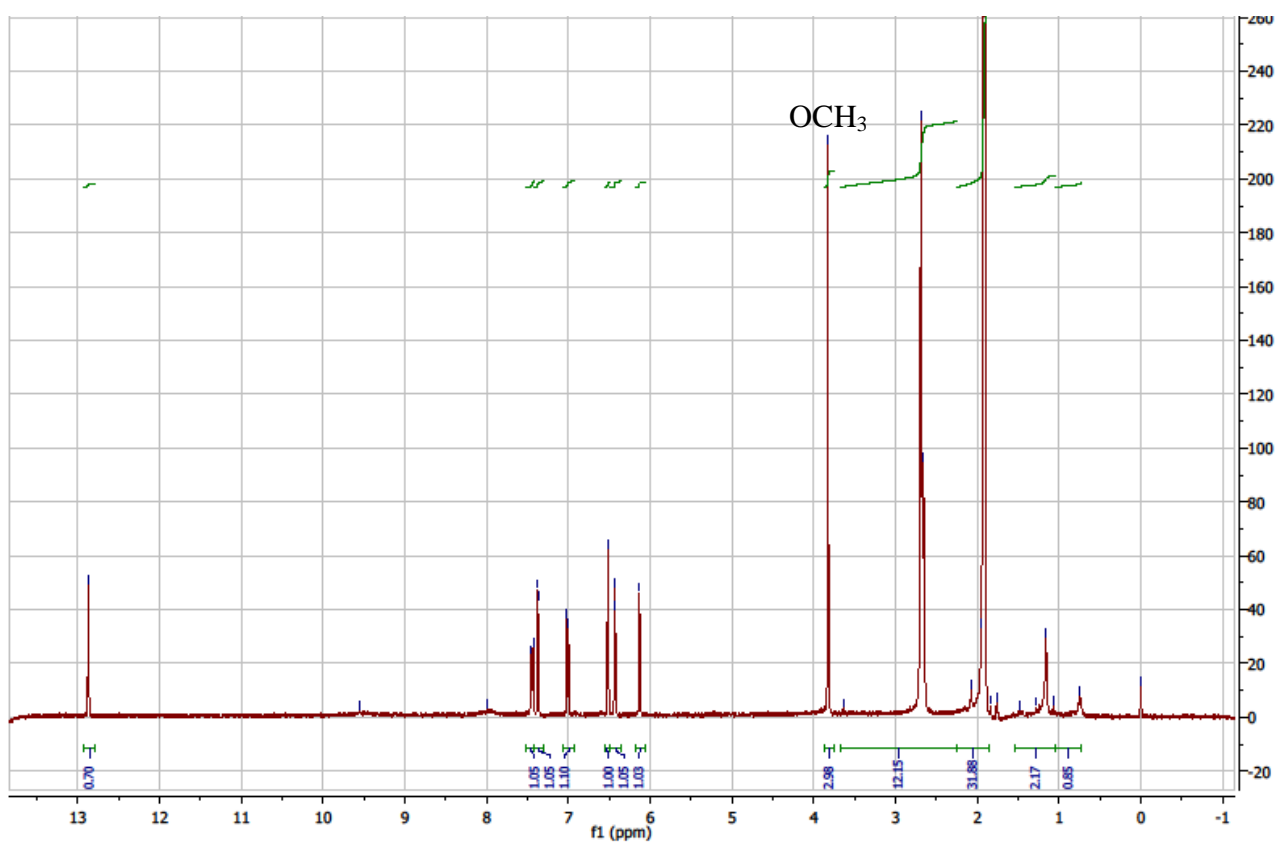
Pour le noyau **B**, la présence des signaux **H-2'**, **H-5'** et **H-6'**, montre la disubstitution de ce cycle sur les carbonés **3'** et **4'** par des groupements **OR**.

Les signaux et leurs attributions sont présentés ou **Tableau n° IV.2.1**.

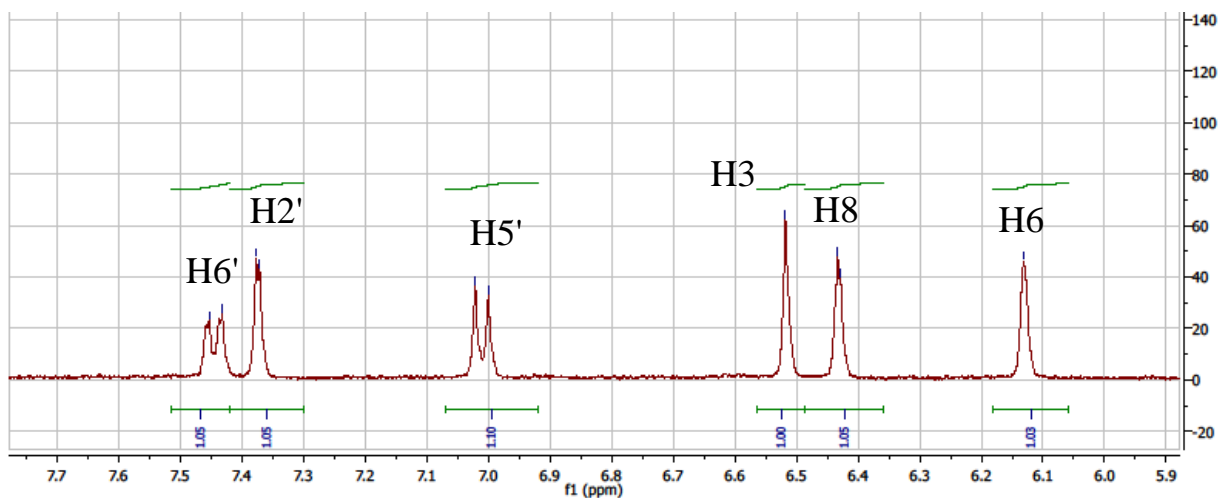
Tableau n° IV.2.1:

Les résultats de la spectroscopie RMN ^1H (250 MHz; acétone)

Déplacement chimique Δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
12,85	1H	s	OH-5
7,45	1H	dd ($J=8,5; 2,3$)	H-6'
7,37	1H	d ($J=2,3$)	H-2'
7,00	1H	d ($J=8,5$)	H-5'
6,52	1H	s	H-3
6,44	1H	d ($J=2,1$)	H-8
6,13	1H	d ($J=2,1$)	H-6
3,80	3H	s	OCH ₃



Spectre n° IV.2.1: spectre RMN ^1H du composé TC2



Spectre n° IV.2.2:
Spectre RMN ^1H étalée de 5 à 7.75 ppm du composé TC2

Avec ces résultats on peut trouver la base de cette structure comme suit :

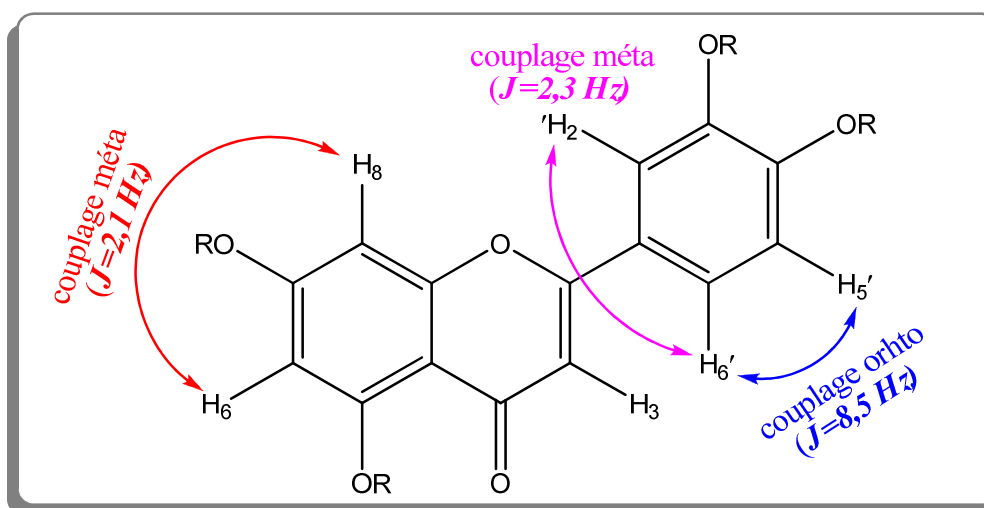


Figure n° IV.2.1 :
La structure partielle de TC2

IV.2.2. L'examen de la série spectrale UV (spectre n° IV.2.3)

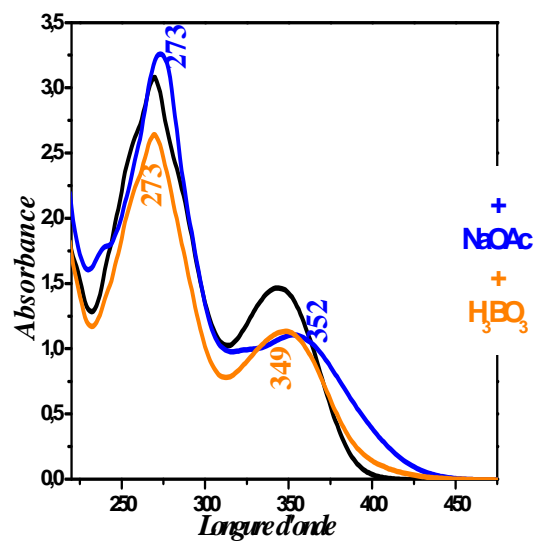
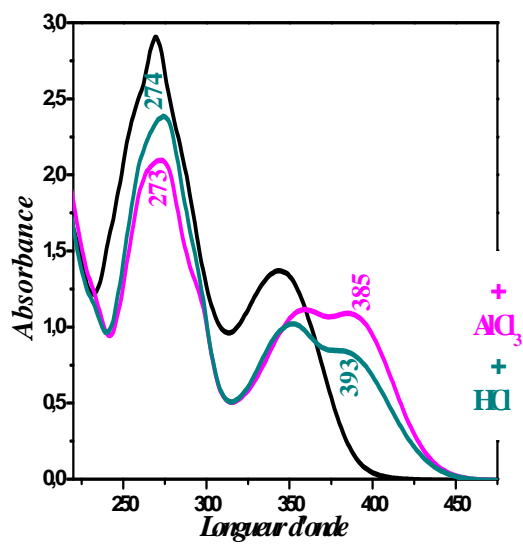
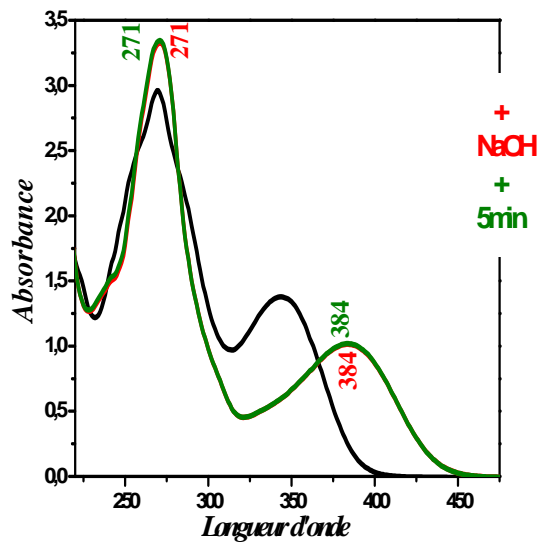
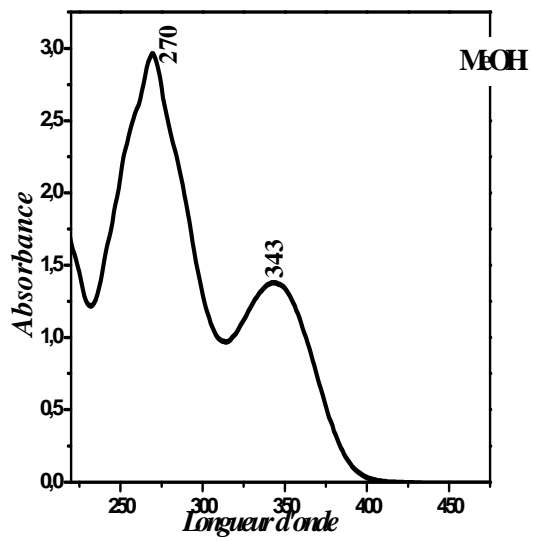
La fluorescence noir-violette du produit **TC2** sous la lumière UV-Visible **365 nm**, et la valeur de la longueur d'onde de la **bande I** en présence du méthanol à **343 nm**, indique que ce composé est une flavone.

- L'addition de **NaOH** conduit à un déplacement bathochrome **+40 nm** de la **bande I** par rapport au spectre enregistré dans le **MeOH**, avec une diminution de l'intensité, ce qui prouve l'existence d'un **OR (OCH₃)** en **C-4'**.
- L'ajoute de **AlCl₃**/ provoque un déplacement bathochrome **+41 nm** de la **bande I**, par rapport au spectre enregistré dans le **MeOH**, révèle la présence d'un **OH** en position **5**.
- L'addition du **HCl** à **AlCl₃**, provoque un déplacement bathochrome **+48 nm** de la **bande I** par rapport au spectre enregistré dans le **MeOH**, révèle la non-existence d'un groupement oxygéné en **C-6**, avec la présence d'un **OH** en position **5**.
- L'addition **HCl+AlCl₃** par rapport au spectre enregistré dans **AlCl₃** donne un déplacement hypsochrome **-7 nm** très faible de la **bande I**, ca prouve la non-existence de **Ortho di OH** sur le noyau **A** ou **B**.
- L'ajout de **NaOAc** provoque un déplacement bathochrome **+3 nm** de la **bande II** par rapport au spectre enregistré dans le **MeOH**, révèle la présence d'un **OH** libre en position **7**.
- L'addition de **H₃BO₃** à **NaOAc** donne un déplacement bathochrome de la **bande I** ($\Delta\lambda_1 = +5$ nm) par rapport au spectre enregistré dans le **MeOH**, qui prouve la non-existence Ortho di OH sur les carbonnes **7** et **8**.

Les résultats de la série spectrale UV-Visible du **TC2** sont rassemblés dans le **tableau n° IV.2.2** :

Tableau n° IV.2.2 :
Résultats de la série spectrale UV-visible Pour TC2

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	344	270
NaOH	384	271
AlCl₃	385	273
AlCl₃+HCl	392	274
NaOAc	352	273
NaOAc+H₃BO₃	349	270



Spectre n° IV.2.3 :
Série spectrale UV du composé TC2

IV.2.3. Conclusion

L'ensemble des données spectrales RMN ^1H et ceux de la série spectrale UV, donne la structure finale du composé **TC2** (Figure n°IV.2.2).

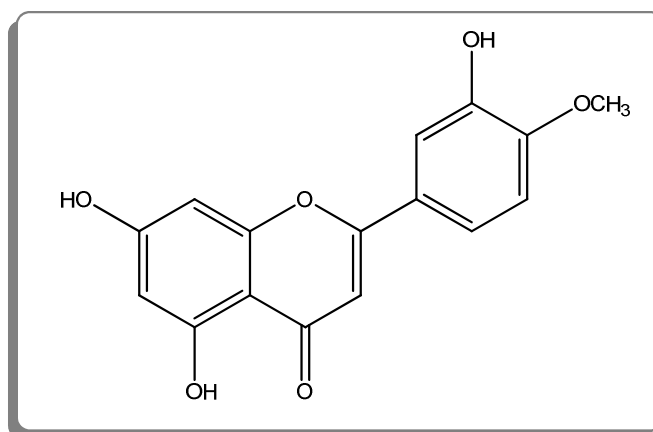


Figure n° IV.2.2 :
La structure finale de TC2 Diosmétine

3', 5, 7-trihydroxy-4'-méthoxyflavone. La structure est déjà connue sous le nom : La **Diosmétine** [1]. Ce produit est isolé pour la première fois du genre *Linaria*.

IV.3. Elucidation structurale du composé TC3

- Le spot de ce composé sur plaque analytique donne une coloration jaune après révélation avec l'ammoniaque, on déduit que c'est un flavonoïde.
- La fluorescence noir-violette de ce flavonoïde sous lumière de **Wood** indique qu'il s'agit d'une flavone ou bien d'un flavonol 3-OR.

IV.3.1. Spectroscopie de RMN ^1H

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV.3.1) ainsi que ces spectres étalés (spectre n° IV.3.2) montre :

- Deux singulets d'intégration **3H** chacun à 3,99; 3,70 ppm. Ce sont deux groupements méthoxyles (**2 OCH₃**).
- Un doublet dédoublé à 7,53 ppm d'intégration **1H** ($J=8,6$; $2,3$ Hz), c'est le **H-6'**.
- Un doublet ($J=2,3$ Hz), à 7,43 ppm d'intégration **1H**, c'est le **H-2'**.
- Un doublet ($J=8,6$ Hz), à 7,15 ppm d'intégration **1H**, c'est le **H-5'**.
- Un singulet à 6,63 ppm d'intégration **1H**, c'est le **H-3**.
- Un doublet à 6,49 ppm d'intégration **1H** ($J=2,1$ Hz), que l'on peut l'attribuer à **H-8**.

- Un doublet à 6,25 ppm avec intégration **1H** ($J=2,1$ Hz), que on peut l'attribuer à **H-6**.

Le noyau **A** est disubstitué, en **5** et **7**. Le noyau **B** et aussi disubstitué en **3'** et **4'**.

Le tableau suivant présente les résultats du spectre RMN ^1H :

Tableau n° IV.3.1: Les résultats de la spectroscopie RMN ^1H de TC3 (250 MHz ; méthanol)

Déplacement Chimique Δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7,53	1H	<i>dd</i> ($J=8,6; 2,3$)	H-6'
7,43	1H	<i>d</i> ($J=2,3$)	H-2'
7,15	1H	<i>d</i> ($J=8,6$)	H-5'
6,63	1H	<i>s</i>	H-3
6,49	1H	<i>d</i> ($J=2,1$)	H-8
6,25	1H	<i>d</i> ($J=2,1$)	H-6
3,99	3H	<i>s</i>	OCH₃
3,70	3H	<i>s</i>	OCH₃

La figure suivante présente le couplage entre les protons aromatique des noyaux **A** et **B** avec les constants de couplages (J).

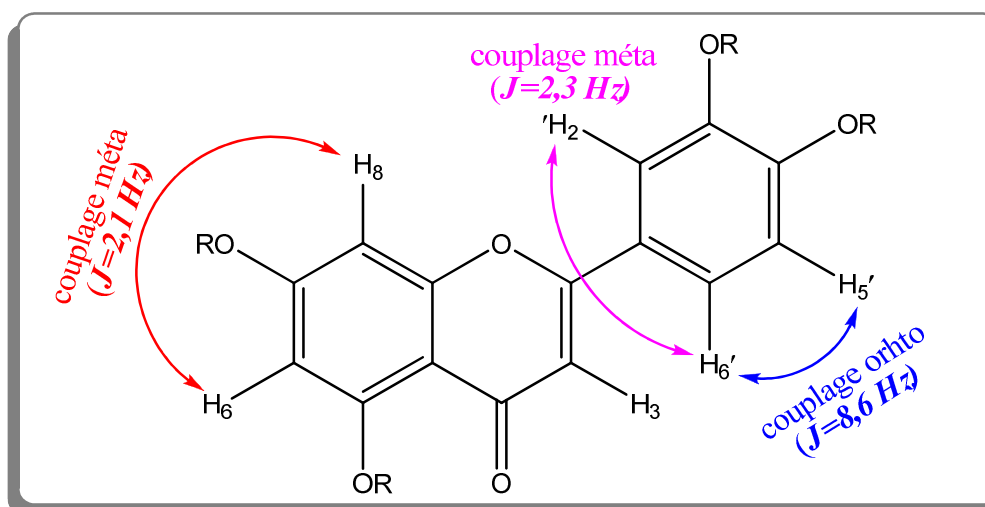
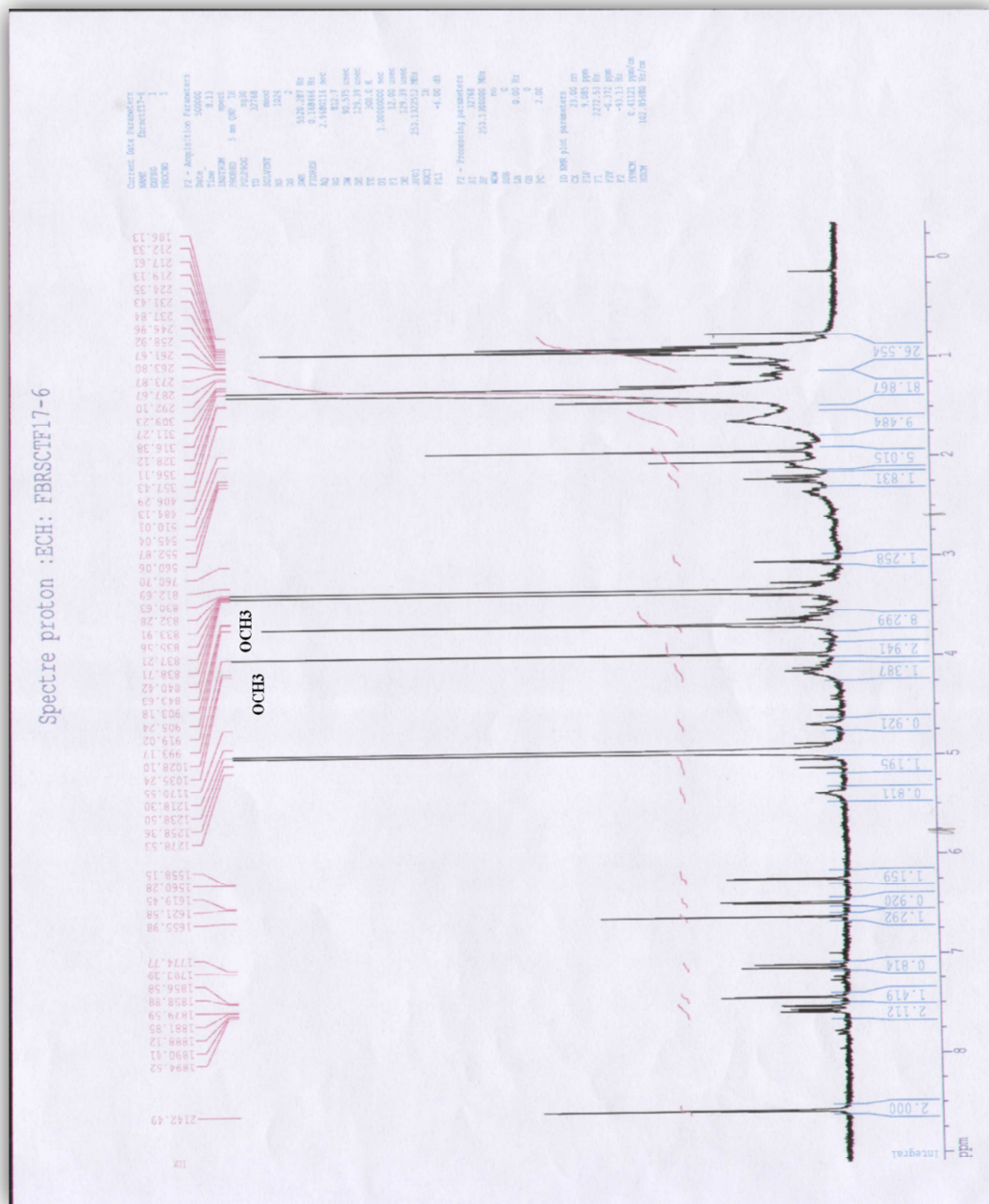
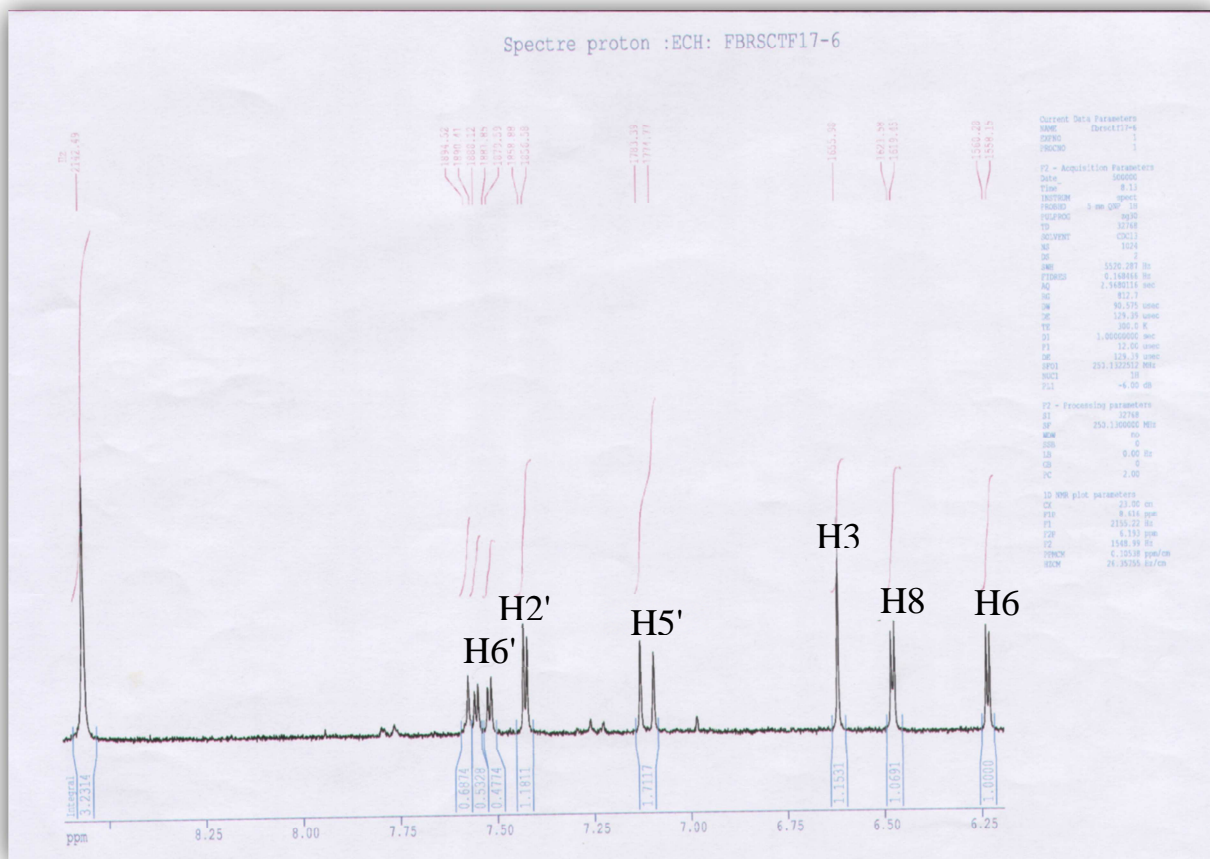


Figure n° IV.3.1 :
La structure partielle de TC3



Spectre n° IV.3.1: spectre RMN ¹H du composé TC3



Spectre n° IV.3.2:
Spectre RMN ¹H étalée de 6 à 8.75 ppm du composé TC3

IV.3.2. L'examen de la série spectrale UV (spectre n° IV.3.3)

Le spectre d'absorption UV enregistré dans le méthanol donnant la valeur de la longueur d'onde d'adsorption maximale de la **bande I** à 346 nm, oriente vers la structure d'une flavone.

- L'analyse structurale

Les résultats de la série spectrale UV-Visible du composé **TC3** sont rassemblés dans le **tableau n° IV.3.2** :

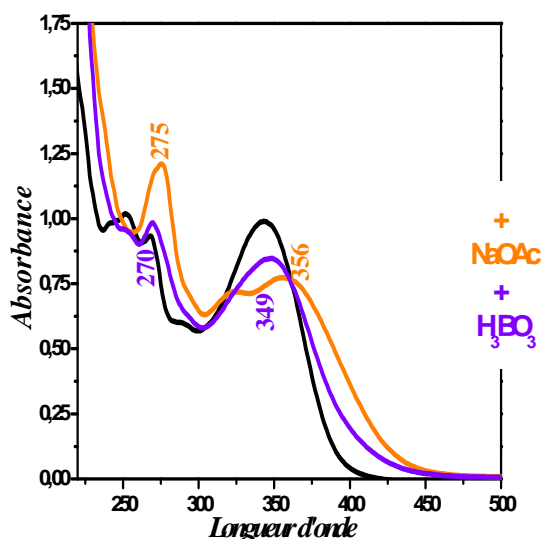
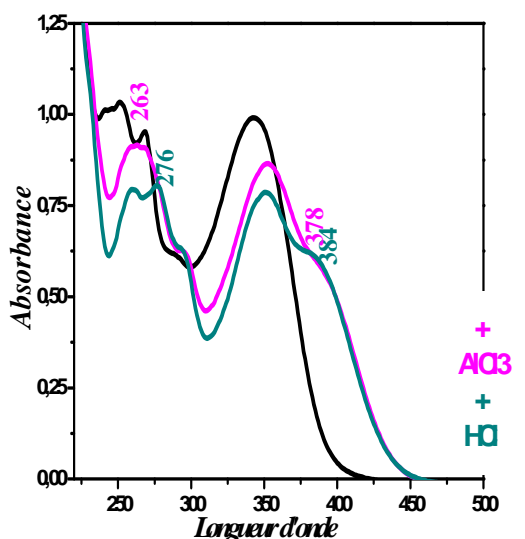
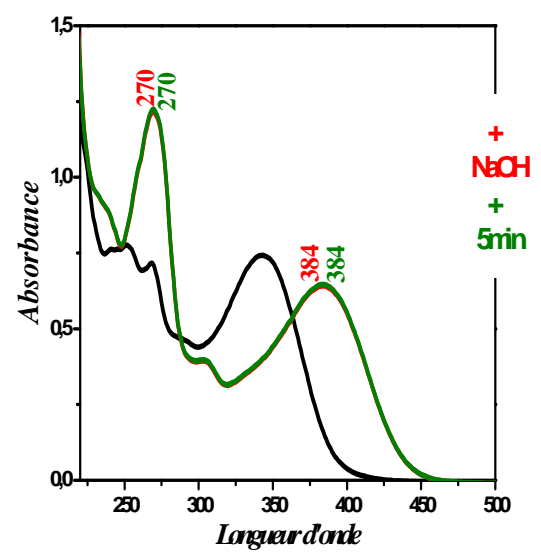
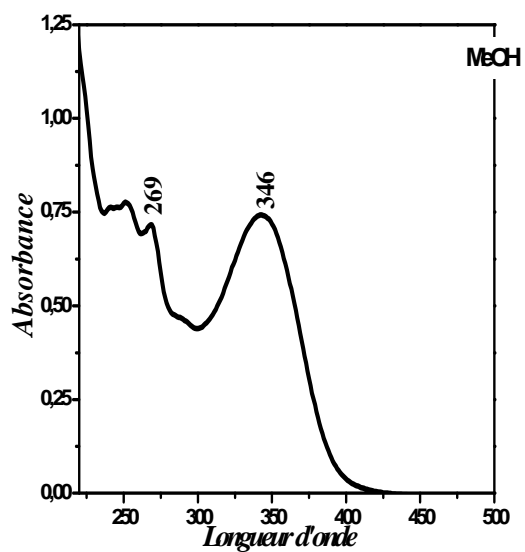
- L'ajout de **NaOH** provoque un déplacement bathochrome +38 nm de la **bande I** du spectre enregistré dans le MeOH avec diminution de l'intensité ce qui révèle la présence d'un **OCH₃** en position **4'**.
- L'addition de **AlCl₃** provoque un déplacement bathochrome +35 nm de la **bande I** du spectre enregistré dans le MeOH ce qui révèle la présence d'un **OH** en position **5**.

- L'addition de **HCl** à **AlCl₃/MeOH**, provoque un déplacement bathochrome +41 nm de la **bande I** par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, ce qui confirme le **OH** en position **5**, avec la non-existence d'oxygénation en position **6**.
- L'ajout de **NaOAc** provoque un déplacement bathochrome +06 nm de la **bande II**, du spectre enregistré dans le MeOH ce qui révèle la présence d'un **OH** libre en position **7**.
- L'addition **H₃BO₃** à **NaOAc** provoque un déplacement bathochrome +03 nm de la **bande I**, par rapport au spectre enregistré dans le MeOH ce qui révèle la non-existence d'un ortho di **OH** en **6, 7** ou **7, 8**.

Les résultats de la série spectrale UV-Visible du composé **TC3** sont rassemblés dans le **tableau n° IV.3.2** :

Tableau n° IV.3.2 :
Résultats de la série spectrale UV-visible Pour TC3

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	346	269
NaOH	384	270
AlCl₃	378	263
AlCl₃+HCl	384	276
NaOAc	356	275
NaOAc+H₃BO₃	349	270



Spectre n° IV.3.3 :
Série spectrale UV du composé TC3

IV.3.3. Conclusion

L'ensemble des données spectrales RMN ^1H et ceux de la série spectrale UV, prouve l'existence de : 2-OCH₃, OH-5, OH-7, H-3, H-6 et H-8 et donne la structure finale du composé TC3 (Figure n°IV.2.2):

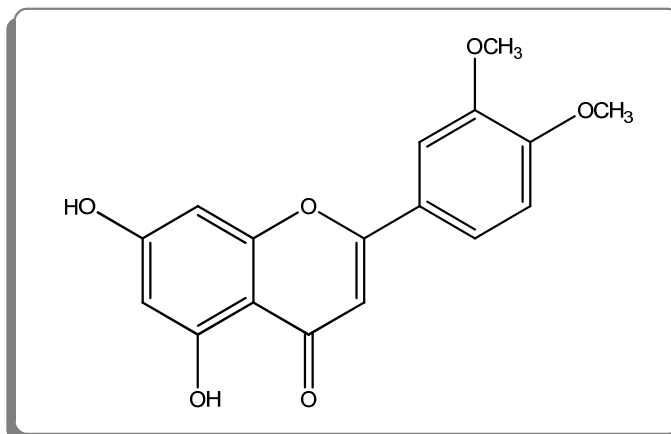


Figure n° IV.3.2 :
La structure finale de TC3

Cette structure est connu sous le nom de 5,7-dihydroxy-3',4'-diméthoxyflavone, ou luteolin 3', 4'-diméthyl éther [2].

IV.4. Elucidation structurale du composé TC4

- Le spot de ce composé sur plaque analytique donne une coloration jaune après révélation avec les vapeurs d'ammoniaque, on déduit que c'est un flavonoïde.
- La fluorescence noir-violette de ce flavonoïde sous lumière de Wood indique qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol 3-OR.

IV.4.1. Spectroscopie de RMN ^1H

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre n° IV.4.1) et le partie étalée (spectre n° IV.4.2) montre :

- Un doublet dédoublé ($J=8,9$; $2,6\text{Hz}$), d'intégration 1H à 7,42 ppm, c'est le H-6'.
- Un doublet ($J=2,6\text{ Hz}$), d'intégration 1H à 7,40 ppm, c'est le H-2'.
- Un doublet à 6,92 ppm d'intégration 1H, ($J=8,9\text{ Hz}$), c'est le H-5'.
- Un singulet à 6,54 ppm d'intégration 1H, que l'on peut attribuer au H-3.
- Un singulet à 6,45 ppm d'intégration 1H, que l'on peut attribuer à l'H-6/H-8.

Le noyau **A** est disubstitué, en positions **5** et **7**. Le noyau **B** est également disubstitué en **C-3'** et **C-4'**.

Le tableau suivant présente les résultats du spectre **RMN ¹H** :

Tableau n° IV.4.1: Les résultats de la spectroscopie RMN ¹H TC4 (250 MHz ; méthanol)

Déplacement Chimique Δ (ppm)	Intégration	Multiplicité (J Hz)	Attribution
7,42	1H	<i>dd</i> ($J=8,9; 2,6$)	H-6'
7,4	1H	<i>d</i> ($J=2,6$)	H-2'
6,92	1H	<i>d</i> ($J=8,9$)	H-5'
6,54	1H	<i>s</i>	H-3
6,45	1H	<i>s</i>	H-6 ou H-8

La figure suivante présente le couplage entre les protons aromatique de **B** avec les constants de couplages (**J**).

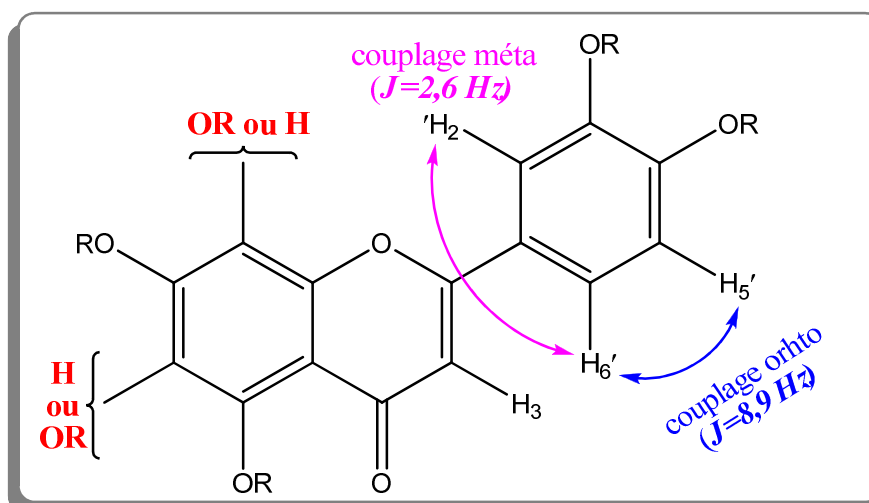
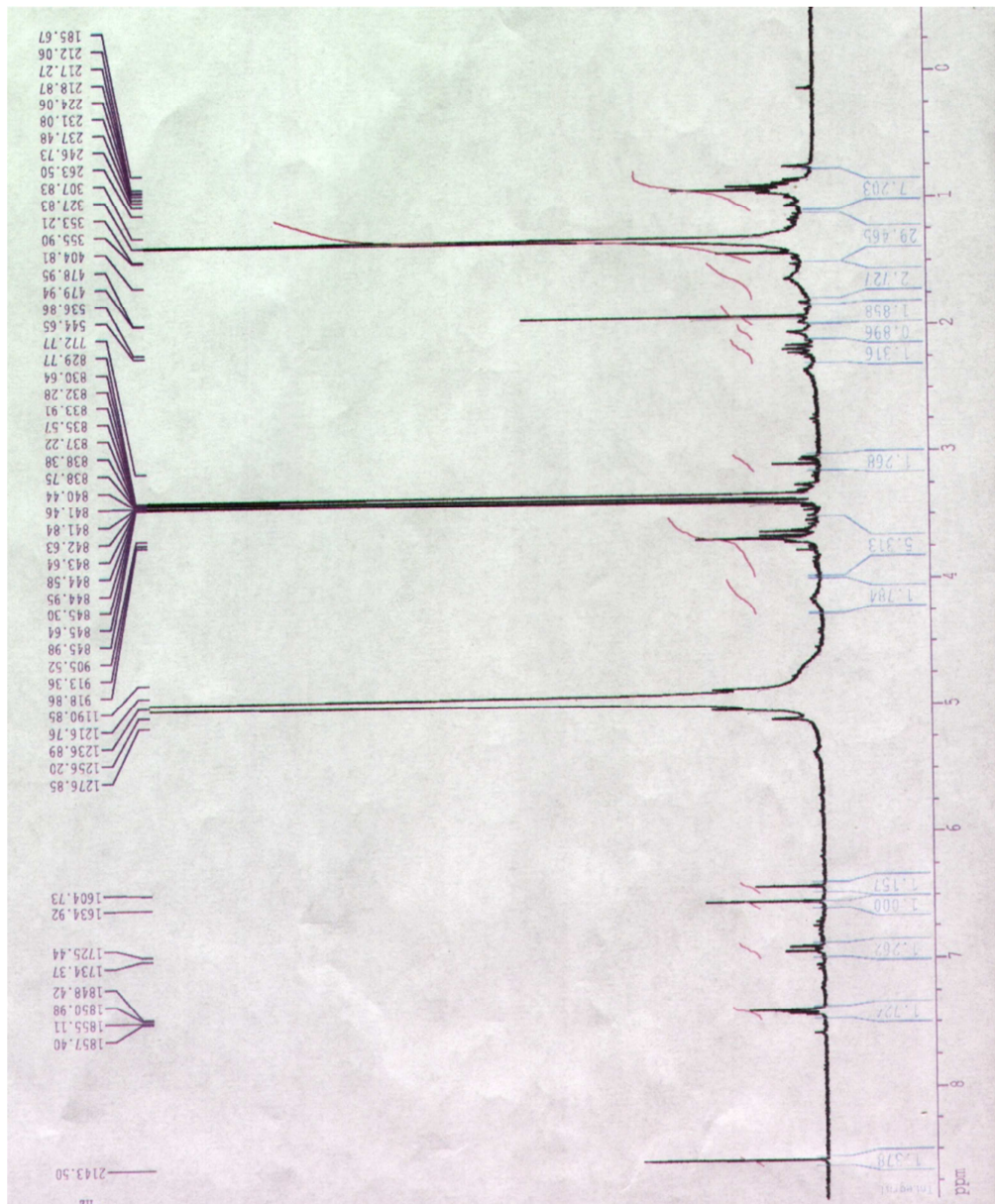
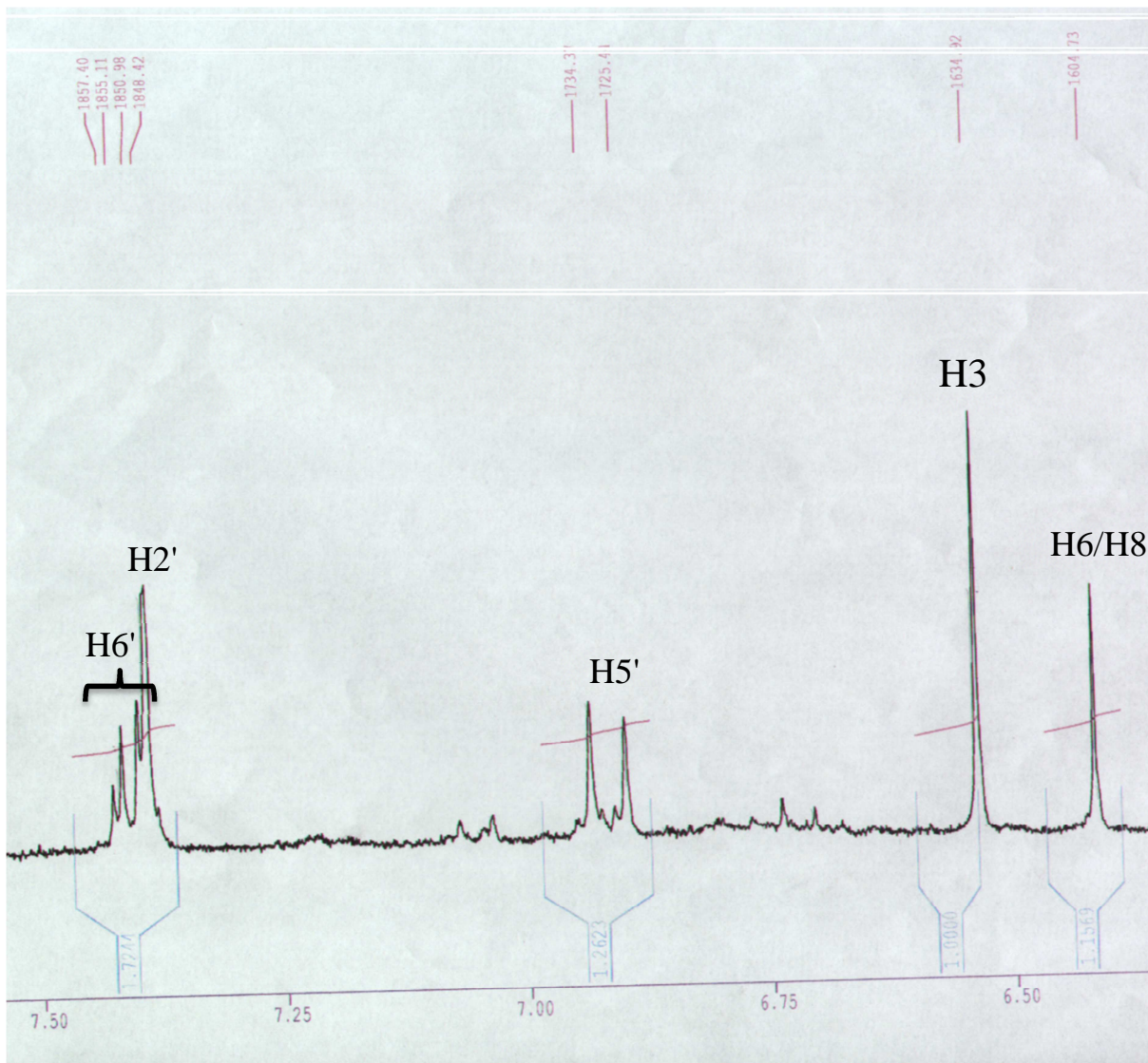


Figure n° IV.4.1 :
La structure partielle de TC4



Spectre n° IV.4.1: spectre RMN ¹H du composé TC4



Spectre n° IV.4.2:
Spectre RMN ^1H étalée de 6 à 7.50 ppm du composé TC4

IV.4.2. L'examen de la série spectrale UV de TC4 (spectre n°IV.4.3)

- L'analyse structurale

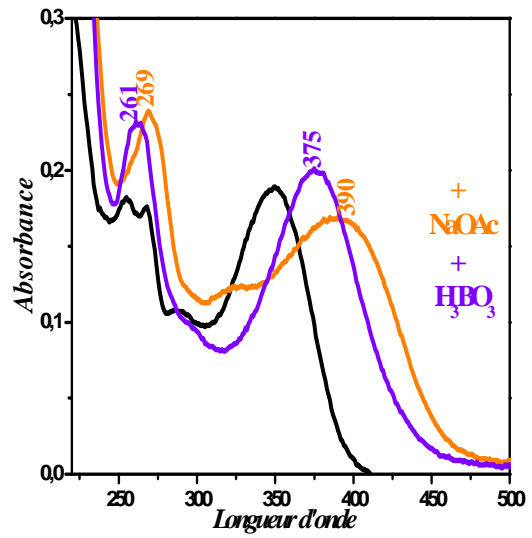
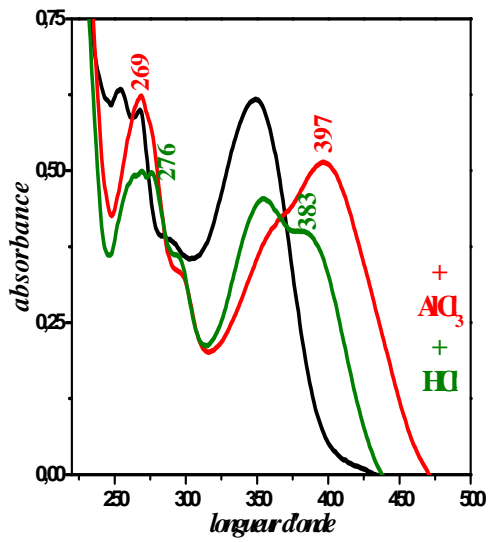
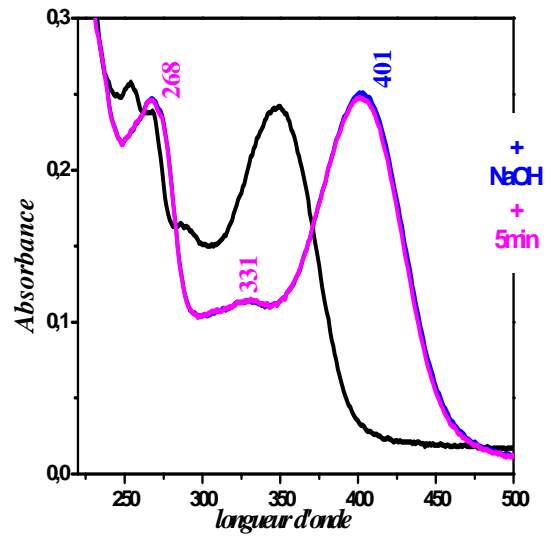
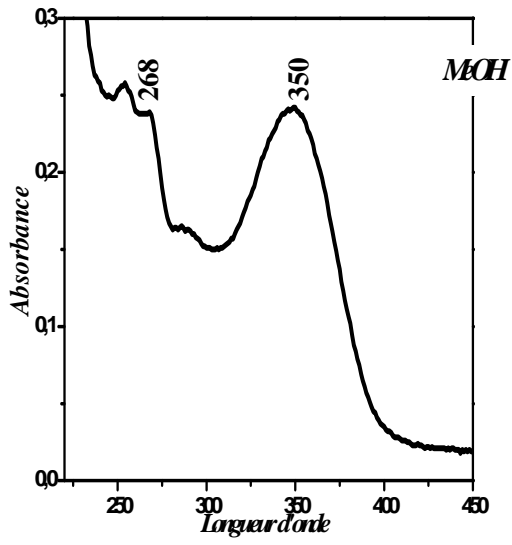
Les résultats de la série spectrale UV-Visible du composé TC4 sont rassemblés dans le tableau n° IV.4.2 :

Tableau n° IV.4.2 :
Résultats de la série spectrale UV-visible Pour TC4

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)
MeOH	350	268
NaOH	401	268
AlCl ₃	397	269
AlCl ₃ +HCl	383	276
NaOAc	390	269
NaOAc+H ₃ BO ₃	375	261

La fluorescence noire-violette du produit TC4 sous la lampe de Wood, et la valeur de la longueur d'onde de la bande I en présence du méthanol à 350 nm, indique que ce composé est une flavone ou bien un flavonol 3-OR. Alors d'après la RMN ¹H on a le H-3 donc ce composé ne pourra être qu'une flavone.

- L'addition de NaOH, conduit à un déplacement bathochrome +51 nm de la bande I du spectre enregistré dans le MeOH, avec une légère augmentation de l'intensité, ce qui prouve l'existence d'un OH libre sur le C-4'.
- L'apparition d'une nouvelle bande à 331 nm, révèle la présence d'un OH en C-7. Cela est confirmé par le spectre après ajout de NaOAc, qui provoque un déplacement bathochrome +1 nm de la bande II.
- L'ajout de AlCl₃ provoque un déplacement bathochrome +47 nm de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, révèle la présence d'un OH en position 5.
- L'addition du HCl+AlCl₃, provoque un déplacement bathochrome +33 nm de la bande I, par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, révèle la non-existence d'un groupement oxygéné en C-6, avec la présence d'un OH en position 5.
- L'addition de H₃BO₃ à NaOAc, donne un déplacement bathochrome +25 nm de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, qui prouve l'existence d'un ortho di OH sur les carbones 3' et 4'.



Spectre n° IV.4.3 :
Série spectrale UV du composé TC4

IV.4.3. Conclusion

L'ensemble des données spectrales RMN ^1H et ceux de la série spectrale UV, prouve l'existence de : OH-7, OH-5, OH-4', H-6 et H-3, donnent la structure finale du composé TC4 (Figure n°IV.4.2).

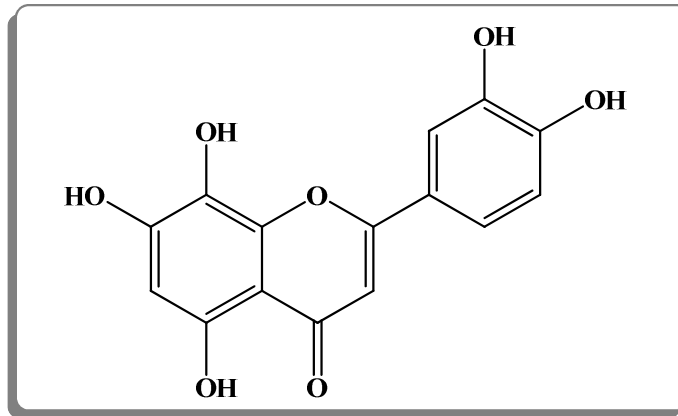


Figure n° IV.4.2 :
La structure finale de TC4

3', 4', 5, 7, 8-pentahydroxyflavone. La structure est déjà connue sous le nom de la hypolaetine, et isolée pour la première fois du genre *Linaria*.

IV.5. Résultat de l'activité antioxydante testée par la méthode du DPPH

Cette étude porte sur l'activité antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de l'espèce *Linaria atlantica* par rapport à l'acide ascorbique et la Quercétine utilisés comme contrôles positifs. Les résultats obtenus montrent que l'extrait étudié a manifesté un effet scavenger à partir d'une concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$ qui représente une dose réponse (Figure IV.5.1).

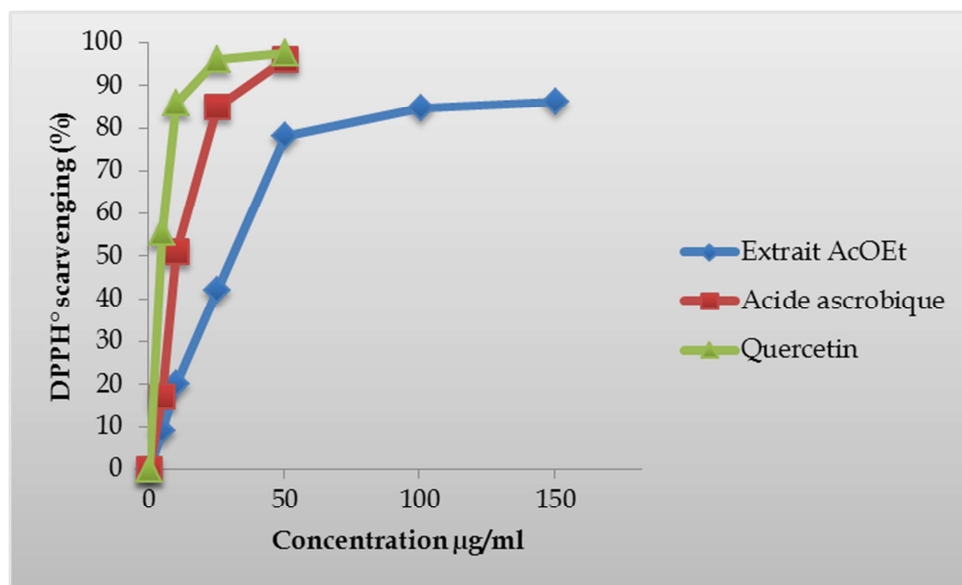


Figure n° IV.5.1: L'activité antioxydante de l'extrait acétate *Linaria atlantica*, l'acide ascorbique et la quercétine vis-à-vis de radical libre DPPH°, chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart type (n = 3), P < 0.05

Tableau n° IV.5.1 : L'activité antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle de *Linaria atlantica*, l'acide ascorbique et la quercétine vis-à-vis le radical libre DPPH°, chaque valeur représente la moyenne \pm Ecart type (n = 3), P < 0.05

Concentration µg/ml	Moyenne inhibition		
	Extrait	L'acid ascorbique	Quercétine
5	8,93 \pm 2,39	17,25 \pm 2,39	55,62 \pm 0,59
10	20,04 \pm 2,65	51,11 \pm 2,30	85,91 \pm 0,25
25	41,93 \pm 4,30	85,00 \pm 3,17	96,08 \pm 0,39
50	78,07 \pm 0,19	96,00 \pm 0,64	97,51 \pm 0,57
100	84,61 \pm 1,26		
150	86,08 \pm 0,15		

Le tableau IV.5.2 montre une valeur de la concentration inhibitrice, IC₅₀ de l'extrait acétate d'éthyle de 28.61 \pm 1.31 µg/ml, celle des contrôles positifs, acide ascorbique et quercétine de 3,80 \pm 0,05 et 2,54 \pm 0,040 µg/ml successivement.

Tableau n°IV.5.2: Moyenne IC₅₀ de L'activité antioxydante de l'extrait acétate de *L. atlantica*, l'acide ascorbique et la quercétine vis-à-vis de radical libre DPPH°, chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type (n = 3).

	IC ₅₀	Moy IC ₅₀
Extrait	28,99	28,61±1,31
	27,15	
	29,70	
l'acide ascorbique	3,86	3,80 ±0,05
	3,76	
	3,78	
la quercétine	2,56	2,54±0,040
	2,58	
	2,49	

Ces résultats sont présentés aussi sous forme d'histogramme comme le montre la **figure n° IV.5.2.**

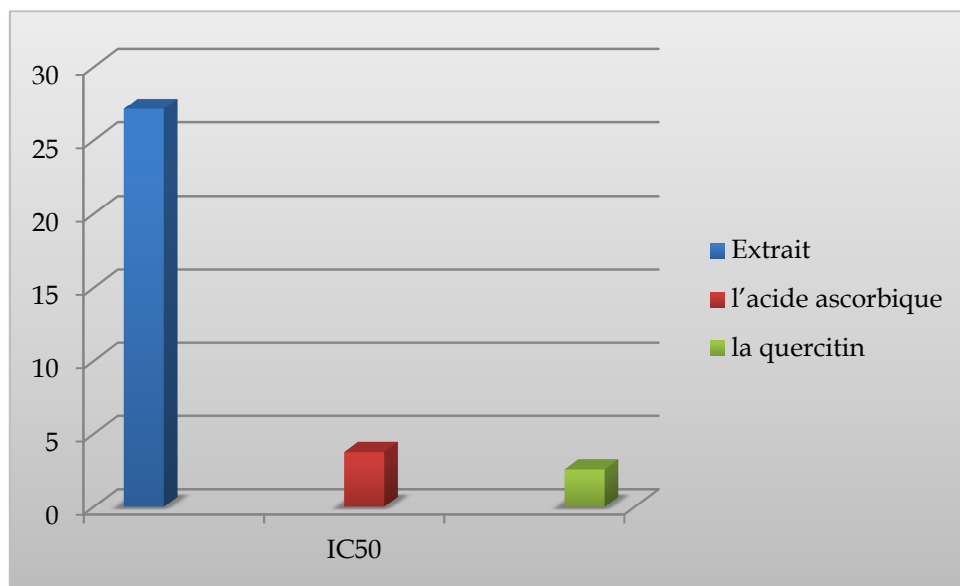


Figure n° IV.5.2: Moyenne IC₅₀ de L'activité antioxydante de l'extrait acétate *Linaria atlantica*, l'acide ascorbique et la quercétine vis-à-vis de radical libre DPPH°, chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type (n = 3), P < 0.05

D'après les figures ci-dessus, on remarque bien que l'extrait en question présente un assez bon pouvoir antioxydant comparativement avec celui de l'acide ascorbique utilisé comme standard puisqu'il agit à de faibles doses (**50 $\mu\text{g/ml}$**), ce qui est confirmé par les bibliographies que, généralement, les polyphénols naturels sont des piègeurs puissants de radicaux libre [3].

En conclusion, nos observations sur l'activité de piéger les radicaux libres par l'extrait semi polaire viennent renforcer les données bibliographiques et orientent vers la présence d'un type de molécules bien déterminés dans cet extrait, probablement des flavonoïdes aglycones et/ou présentant un groupement catéchol sur le cycle **B**.

Enfin, cette étude montre le potentiel scavenger de radicaux libres de la plante médicinale et pourrait être considérée comme une source d'antioxydants naturels.

Références bibliographiques

- [1]. Timmermann, B.N. *Phytochemistry*. **1979**. Vol **18**, **1855**.
- [2]. Nakanishi, T., Ogaki, J., Inada, A., Murata, H., Nishi, M. *Journal of natural products*. **1985**. Vol **48** (3), **491-493**.
- [3]. Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P., Manian, S. *Food chemistry*. **2008**. Vol **107**, **1000-1007**.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Le but principal de ce travail est l'isolement et l'identification des métabolites secondaires notamment les flavonoïdes de l'espèce du genre *Linaria*, *Linaria atlantica* Boiss. & Reut., appartenant à la flore algérienne.

Notre choix pour cette espèce est justifié par le fait qu'elle est endémique et riche en composés phénoliques notamment les flavonoïdes connus pour leurs activités biologiques diverses.

Après extraction hydroalcoolique des parties aériennes de l'espèce, concentration et affrontement au chloroforme, acétate d'éthyle et le *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. Les structures des produits isolés ont été déterminées par la combinaison des différentes méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN de proton (^1H -250 MHz).

L'étude phytochimique menée sur *Linaria atlantica* Boiss. & Reut. a permis l'obtention de *II* produits purs. Parmi les quels nous avons établi à l'heure actuelle la structure de quatre. Il s'agit de quatre flavonoïdes de type flavones:

- Le **TC1** : la hypolaetine 4'-méthyl éther.
- Le **TC2** : la Diosmétine.
- Le **TC3** : la luteolin 3', 4'-diméthyl éther.
- Le **TC4** : l'hypolaetine.

Ces quatre produits sont isolés pour la première fois à partir du genre *Linaria*.

Les résultats obtenus montrent que cette espèce est riche en composés phénoliques notamment les flavones et sans oublier l'activité biologique antioxydante significative.

Résumé

Le but principal de notre travail concerne principalement l'étude phytochimique de *L. atlantica* appartenant à la flore algérienne. Ils consistent à identifier le maximum de composés afin d'élargir et d'approfondir la connaissance phytochimique de cette plante.

Notre choix pour cette espèce est justifié par le fait qu'elle soit endémique d'une part et d'autre part parce qu'elle est très riche en métabolites secondaires notamment les composés phénoliques présentant diverses activités biologiques.

L'objectif phytochimique correspond, en effet, à l'isolement et à la détermination structurale des molécules naturelles de *L. atlantica*. Pour ce faire, nous avons procédé à la séparation et à la purification des différents phytoconstituants de l'extrait *AcOEt* obtenu après extraction, par différentes méthodes chromatographiques notamment la chromatographie sur colonne de gel de silice et sur plaques préparatives de gel de silice ce qui a permis l'isolement de 11 produits purs. On a pu déterminer la structure de quatre d'entre eux par la combinaison de méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN ^1H .

Il s'agit de:

- **La hyolaetine 4'-méthyl éther.**
- **La Diosmétine.**
- **La luteoline 3', 4'-diméthyl éther.**
- **La hypolaetine.**

Les résultats obtenus confirment que *L. atlantica* est très riche en composés phénoliques notamment les flavonoïdes.

ملخص

هدفنا الرئيسي هو الدراسة الفيتوكيميائية لـ *L. atlantica* والذي يتمثل في تحديد أكبر عدد من المركبات لتوسيع وتعميق المعرفة الفيتوكيميائية لهذه النبتة.

اختيارنا لهذه النبتة يرجع الى محليتها من جهة و من جهة اخرى الى غناها بمنتجات الايض الثانوى المعروفة بنشاطاتها البيولوجية المتعددة.

الغرض من الدراسة الفيتوكيميائية يتمثل فى عزل و تحديد البنية الكيميائية للمركبات الطبيعية و لهذا قمنا بفصل و تنقية بعض المركبات الطبيعية للمستخلص ن أسيتات الايثيل باستعمال مختلف التقنيات الكروماتوغرافية.

و هذا ما سمح بعزل 4 فلافونويدات التى تم تحديد بنياتها باستعمال تقنيات التحليل المعروفة بما فيها مطيافية الرنين المغنطيسى ومطيافية الأشعة فوق البنفسجية.

سمحت الدراسة الفيتوكيميائية لـ *L. atlantica* بعزل 11 مركبات نقية تم الحصول على بنية ثلاث منها

- **La hyolaetine 4'-méthyl éther.**
- **La Diosmétine.**
- **La luteoline 3', 4'-diméthyl éther.**
- **La hypolaetine.**

النتائج المتحصل عليها تؤكد ان *L. atlantica* جد غنية بالمركبات الفينولية خصوصا الفلافونويدات التى تمتلك خصائص بيولوجية معتبرة تمت الاشارة اليها في العديد من المنشورات العلمية.

Summary

The main purpose of our work concerns mainly the phytochemical study of *L. atlantica* belonging to the Algerian flora in which consist to identify the maximum of compounds to widen and to deepen the phytochemical knowledge of this plant.

Our choice for this species is justified by the fact that it is endemic in one hand and on the other hand because it is very rich in secondary métabolites which known by their biological activities.

The phytochemical objective corresponds, indeed, to the isolation and the elucidation of structural molecules of *L. atlantica*.

We proceeded to the separation and to the purification of the various phytoconstituants of ethyl acetate extract using various chromatographic methods in particular the column chromatography of silica gel and préparative thin layer chromatography of silica gel in which allowed us the insulation of four compounds their structures were determined by the combination of spectral methods (UV-VISIBLE spectrophotométrie, RMN ¹H).

The study phytochimic led on *L. atlantica* allowed the obtaining of 11 pure products among them 4 flavones aglycosyd:

- **the hyolaetin 4'-méthyl éther.**
- **the Diosmetin.**
- **the luteolin 3', 4'-diméthyl éhter.**
- **the hypolaetin.**

The obtained results emphasis that *L. atlantica* is very rich in phenolic compounds in particular the flavonoids.