

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

## Mémoire du Projet de fin d'étude

2<sup>ème</sup> Année Master



**Département: Génie des Procédés**

**Spécialité : Génie chimique**

*Présenté par :*

**BENKACHER Nora**

**AIDOUD Besma**

=====  
**Etude par HPLC-DAD des interactions flavonol - stilbène**  
=====

**Sous la Direction de :**

**Dr. BELGUIDOUM Karima**

**Juillet 2021**

### Résumé

Dans ce travail, la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC UV-visible) ; a été utilisée pour l'analyse des interactions possibles dans le méthanol pur entre un prooxydant " (Z) stilbène " et la quercétine étant un antioxydant puissant, dans des conditions de phase inverse, à température de 25 °C et en régime isocratique. Les paramètres suivants ont été pris en compte pour les analyses effectuées: Le temps de rétention, l'amplitude et les spectres UV des pics.

La différence entre les divers paramètres étudiés dans le mélange par rapport aux réactifs purs affirme la formation de nouveaux composés (complexes).

Une isomérisation probable d'une partie du (Z) stilbène en (E) explique l'apparition de deux pics dans le chromatogramme du mélange.

L'étude paramétrique qui a été effectuée pour montrer l'effet de la concentration, de la température et du temps sur le mélange réactionnel indique que:

- Les deux composés obtenus sont stables au cours du temps (réaction spontanée).
- L'élévation de la température de la colonne réduit le temps de rétention du pic majoritaire.
- Les intensités des pics obtenus sont directement proportionnelles avec l'augmentation de la concentration.

On outre l'étude théorique de l'activité antioxydante de la quercétine montre que la position 4'-OH de la quercétine présente la plus faible valeur de BDE (341,05718 KJ/mol) et de PDE (055,717 KJ/mol), c'est donc le premier site réactif.

**Mots clés:** HPLC-UV-DAD, polyphénols, prooxydant, antioxydant, isomérisation, stilbène, quercétine, interactions.

**Abstract**

In this work, high performance liquid chromatography (HPLC UV- visible); was used for the analysis of the possible interactions in pure methanol between a prooxidant "(Z) stilbene" and quercetin as a powerful antioxidant, under reverse phase conditions, at a temperature of 25 ° C and in an isocratic mode. The following parameters were considered for the trials carried out: The retention time, the amplitude and the UV spectra of the peaks.

The difference between the various parameters studied in the mixture compared to the pure reagents affirms the formation of new compounds (complex).

A probable isomerization of a part of (Z) stilbene to (E) explains the appearance of two peaks in the chromatogram of the mixture.

The parametric study which was carried out to show the effect of concentration, temperature and time on the reaction mixture indicates that:

- The two compounds obtained are stable over time (spontaneous reaction).
- Raising the temperature of the column reduces the retention time of the predominant peak.
- The amplitude of the peaks obtained are directly proportional with the increase in concentration.

In addition, the theoretical study of the antioxidant activity of quercetin shows that the 4'-OH position of quercetin has the lowest value of BDE (dissociation enthalpie of bonds) and of PDE (dissociation enthalpy of proton), it is therefore the first responsive site.

**Key words:** HPLC-UV-DAD, polyphenols, prooxidant, antioxidant, isomerization, stilbene, quercetin, interactions.

ملخص

في هذا العمل ، تم إجراء تحليل كروماتوجرافي سائل عالي الأداء (HPLC UV-visible)؛ حيث تم استخدامه لتحليل التفاعلات الممكنة في الميثانول النقي بين المؤكسد (Z) ستيلبان "و" كرسيتين" كونها أحد مضادات الأكسدة القوية ، في ظل ظروف المرحلة العكسية ، عند درجة حرارة 25 درجة مئوية وفي نظام إيزوكراتي. تم أخذ المعاملات التالية بعين الاعتبار لإجراء التحاليل: زمن الاستبقاء والسعة وأطياف الأشعة فوق البنفسجية للقمم.

يؤكد الاختلاف بين المتغيرات المختلفة المدروسة في الخليط مقارنة بالكواشف النقية تكوين مركبات جديدة (معقدات).

المصاوغه المحتملة لجزء من (Z) ستيلبان إليفير (E) ظهور قمتين في المخطط الكروماتوجرافي للخليط.

تشير دراسة المعاملات التي أجريت لتوضيح تأثير التركيز ، درجة الحرارة والزمن على خليط التفاعل إلى أن:

- المركبان المتحصل عليهما مستقرين بمرور الوقت (تفاعل تلقائي).

- يؤدي رفع درجة حرارة أسطوانة التفاعل إلى تقليل وقت الاستبقاء للقيمة الغالبة.

- شدة القمم التي تم الحصول عليها تتناسب طرديا مع زيادة التركيز.

بالإضافة إلى ذلك ، تُظهر الدراسة النظرية للنشاط المضاد للأكسدة في كرسيتين أن موضع -OH -4 من كرسيتين يحتوي على أقل قيمة لـ BDE (341.05718 KJ / mol) و PDE (055.717 KJ / mol) ، وبالتالي فهو يمثل الموقع الأكثر تفاعلا.

**الكلمات المفتاحية:** HPLC-UV-DAD ، البوليفينول ، المؤكسد ، مضادات الأكسدة ، المصاوغه ، ستيلبان ، كرسيتين ، التفاعلات.

# DEDICACE

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi Mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur ma vie et mon bonheur ; Maman que j'aime beaucoup.

A mes sœurs et mon frère je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

A mes nièces Jinan et Aya

A tous la famille BENKACHER et OUARTI

A mes amies qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieurs

A ma camarade Besma AIDOUD

A tous ceux qui m'aiment et que j'aime.

BENKACHER Nora

# DEDICACE

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi Mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur ma vie et mon bonheur ; Maman qui j'adore.

A mes sœurs et mes frères je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

A tout la famille AIDOUUD et KHOUIDMI

Je dédie ce travail à monsieur AIDOUUD Yassine

A mes amies qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieurs

A ma camarade BENCKACHER Nora

A tous ceux qui m'aiment et que j'aime.

AIDOUUD Besma

## **REMERCIEMENTS**

*Tout d'abord, nous tenons à remercier **ALLAH** le tout puissant pour nous avoir donné la foi et la force, d'avoir éclairé notre route et de nous guider dans le meilleur et le bon chemin.*

*Nous remercions infiniment nos parents qui nous ont encouragé et aidé à arriver à ce stade de notre formation.*

*Nous tenons à la fin de ce mémoire à remercier du fond du cœur notre encadreur **Dr. Karima BELGUIDOUM** ; pour nous avoir offert les conditions nécessaires et nous avoir guidé dans l'élaboration de ce travail et contribuer largement à sa réalisation avec la patience et le dynamisme qui la caractérise et aussi son soutien tout au long de notre projet.*

*Nos remerciements sont aussi adressés particulièrement à **Habiba GUEBAILIA** ; professeur à l'université 08 Mai 1945 pour l'aide qu'elle nous a apportée au cours de la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions également **Dr. Yamina BOULMOKH** ; enseignante à l'université 08 Mai 1945 pour son aide précieuse à la partie théorique de notre mémoire.*

*Nous remercions le directeur du laboratoire LAIGM, ainsi que Dr .R. Selaimia de nous avoir aidé pour effectuer des analyses sur le spectromètre infrarouge.*

*Nous exprimons notre gratitude aux membres de jury pour le temps consacré à lire et à juger notre travail.*

*Nous tenons également à remercier tous nos professeurs du département de génie des procédés de l'Université 08 Mai 1945– Guelma.*

*Nos remerciements vont aussi à toutes les personnes qui nous ont apporté de l'aide et que nous aurions malencontreusement oubliées.*

## Sommaire

Sommaire	
	Page
<b>LISTE DES FIGURES</b>	I
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	IV
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	V
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	02
<i>Chapitre I : Les Polyphénols</i>	
<b>I.1. Introduction</b>	06
<b>I.2. Définition</b>	06
<b>I.3. Biosynthèse des polyphénols</b>	06
<b>I.4. Structures chimiques et classification</b>	06
<b>I.4.1. Les composés non flavonoïdes</b>	07
<b>I.4.1.1. Les acides phénoliques</b>	08
<b>I.4.1.2. Les lignines (C6-C3) n</b>	09
<b>I.4.1.3. Les stilbènes C6-C2-C6</b>	09
<b>I.4.2. Les composés flavonoïdes C6-C3-C6</b>	11
<b>I.4.2.1. Flavonols</b>	11
<b>I.4.2.2. Flavanones</b>	12
<b>I.4.2.3. Flavanols ou flavan-3-ols</b>	13
<b>I.4.2.4. Anthocyanes</b>	13
<b>I.4.2.5. Isoflavones</b>	14
<b>I.5. Propriétés des flavonoïdes</b>	15
<b>I.5.1. Les propriétés physico-chimiques</b>	15
<b>I.5.2. Propriétés antiradicalaires</b>	15
<b>I.5.3. Propriétés antivirales</b>	16
<b>I.5.4. Propriétés anti-allergiques</b>	16
<b>I.6. Conclusion</b>	16
<i>Chapitre II : La chromatographie liquide à haute performance</i>	
<b>II.1. La théorie de la chromatographie en phase liquide</b>	18
<b>II.1.1. Introduction</b>	18
<b>II.1.2. Principe</b>	18
<b>II.1.3. Les différents modes de séparation</b>	18
<b>II.1.3.1. La chromatographie d'adsorption</b>	18
<b>II.1.3.2. La chromatographie de partage</b>	19
<b>II.1.4. Polarité et chromatographie</b>	19
<b>II.1.4.1. Polarité d'une molécule</b>	19
<b>II.1.4.2. Interactions entre molécules</b>	19
<b>II.1.4.3. Notion de polarisabilité</b>	20
<b>II.1.4.4. Application à la chromatographie</b>	20
<b>II.1.5. Notions fondamentales</b>	21
<b>II.1.5.1. Phases mobile et stationnaire</b>	21
<b>II.1.5.2. Notion de temps</b>	21
<b>II.1.5.3. Notion de concentration</b>	22
<b>II.1.5.4. Notion d'efficacité</b>	23
<b>II.1.5.5. Qualité de la séparation</b>	24

<b>II.2. Appareillage</b>	25
<b>II.2.1. Réservoir de la phase mobile (solvant)</b>	26
<b>II.2.2. Pompe</b>	26
<b>II.2.3. Injecteur</b>	26
<b>II.2.4. Colonne</b>	27
<b>II.2.5. Détecteur</b>	28
<b>II.2.6. Intégrateur</b>	28
<b>III.3. Conclusion</b>	29
<i>Chapitre III: Matériels et méthodes</i>	
<b>III.1. Introduction</b>	31
<b>III.2. Matériels</b>	31
<b>III.3. Solvants et réactifs</b>	31
<b>III.4. La méthode d'analyse (chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes « HPLC-UV-DAD »</b>	31
<b>III.4. 1. Constituants de l'appareil pour HPLC (Agilent, série 1260 Infinité)</b>	31
<b>III.5. Propriétés physicochimiques des réactifs</b>	32
<b>III.6. Méthodes de préparation et d'injection des réactifs</b>	33
<b>III.7. Méthodes de préparation et injection des mélanges quercétine-stilbène</b>	34
<b>III.7.1. Etude de l'effet de la concentration</b>	34
<b>III.7.2. Etude de l'effet de la température</b>	35
<b>III.7.3. Effet du temps</b>	36
<b>III.8. Analyse par HPLC-UV-DAD des réactifs et des mélanges</b>	36
<b>III.8.1. Conditions de l'analyse</b>	36
<b>III.8.2. Phase mobile</b>	36
<b>III.8.3. Phase stationnaire</b>	36
<b>III.9. Injection</b>	36
<b>III.10. Étude par modélisation moléculaire</b>	36
<b>III.10.1. La modélisation moléculaire</b>	36
<b>III.11. La méthode de calcul</b>	37
<b>III.12. Logiciel utilisé</b>	37
<b>III.12.1. Gaussian</b>	37
<b>III.13. Etude de l'activité antioxydante</b>	38
<b>III.14. Conclusion</b>	39
<b>Chapitre IV : Résultats et discussions</b>	
<b>IV.1. Introduction</b>	41
<b>IV.2. Résultats</b>	41
<b>IV.2.1. Partie expérimentale</b>	41
<b>IV.2.1.1. Données chromatographiques de la quercétine (Q)</b>	41
<b>IV.2.1.2 Données Chromatographiques du stilbène (S)</b>	42
<b>IV.2.1.3 Données Chromatographiques du mélange (S+Q)</b>	42
<b>IV.2.1.4. Etude paramétrique du mélange</b>	46
<b>IV.2.1.4.1. Effet de la concentration</b>	46
<b>IV.2.1.4.2. Effet de la température</b>	51

## *Sommaire*

---

<b>IV.2.1.4.3. Effet du temps</b>	57
<b>IV.2.2. Discussions</b>	58
<b>IV.2.2.1. Mise en évidence des interactions entre le stilbène (S) et la quercétine (Q)</b>	58
<b>IV.2.2.2. Etude paramétrique</b>	61
<b>IV.2.2.2.1. Influence de la concentration sur le mélange réactionnel</b>	61
<b>IV.2.2.2.2. Influence de la température sur le mélange réactionnel</b>	61
<b>IV.2.2.2.3. Influence du temps de la réaction sur le mélange réactionnel</b>	61
<b>IV. 2.3. Etude théorique</b>	62
<b>IV.2.3.1. Etude de l'activité antioxydante de la quercétine</b>	62
<b>IV.2.3.1.1. Mécanismes de l'activité antioxydante de la quercétine</b>	62
<b>IV.3. Conclusion</b>	63
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	66
<b>REFERENCES</b>	69

# *Liste des figures*

## Liste des figures

### Liste des figures

<i>Numéro de figure</i>	<i>Titre de figure</i>	<i>page</i>
<b>Chapitre I</b>		
<i>Figure I.01</i>	<i>Différentes classifications des polyphénols végétaux et des classes polyphénoliques basées sur le nombre de cycles phénol et leurs éléments structurels.</i>	07
<i>Figure I.02</i>	<i>Structure des Acides hydroxybenzoïques.</i>	08
<i>Figure I.03</i>	<i>Structure des Acides hydroxycinnamiques.</i>	08
<i>Figure I.04</i>	<i>Structure d'une lignine.</i>	09
<i>Figure I.05</i>	<i>Trans(E)-stilbène.</i>	10
<i>Figure I.06</i>	<i>Cis (Z)-stilbène.</i>	10
<i>Figure I.07</i>	<i>Structure de base des flavonols.</i>	11
<i>Figure I.08</i>	<i>Structure de la quercétine.</i>	12
<i>Figure I.09</i>	<i>Structure des flavanones.</i>	12
<i>Figure I.10</i>	<i>Structure de base des flavoan-3-ols.</i>	13
<i>Figure I.11</i>	<i>Deux exemples des structures chimiques des flavan-3-ols. a) épicatechine (EC) b) épigallocatechin(EGC).</i>	13
<i>Figure I.12</i>	<i>Structure des Anthocyanidines.</i>	14
<i>Figure I.13</i>	<i>Structure des Isoflavones.</i>	15
<b>Chapitre II</b>		
<i>Figure II.01</i>	<i>La phase stationnaire et la phase mobile</i>	20
<i>Figure II.02</i>	<i>La valeur de détection en fonction du temps avec un seul pic.</i>	21
<i>Figure II.03</i>	<i>Types de temps pour un pic chromatographique</i>	22
<i>Figure II.04</i>	<i>La valeur de détection en fonction du temps avec deux pics.</i>	24
<i>Figure II.05</i>	<i>Composition d'une chaîne HPLC.</i>	25
<i>Figure II.06</i>	<i>Quelques types de colonnes pour HPLC.</i>	27

*Liste des figures*

<b>Chapitre III</b>		
<i>Figure III.01</i>	<i>Appareil HPLC (Agilent série 1260 Infinity) utilisé. (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma)</i>	32
<i>Figure III.02</i>	<i>Structure de la quercétine.</i>	32
<i>Figure III.03</i>	<i>Structure de cis-stilbène.</i>	32
<i>Figure III.04</i>	<i>Protocole de préparation du mélange quercétine-stilbène (Q+S).</i>	35
<i>Figure III.05</i>	<i>Menu graphique du logiciel GaussianView 6.0.16.</i>	38
<b>Chapitre IV</b>		
<i>Figure IV.01</i>	<i>Chromatogramme de la quercétine ; <math>T_{R\text{ moy}} = 2.95</math> min, <math>\lambda_{\text{max}}=375</math> nm.</i>	41
<i>Figure IV.02</i>	<i>Chromatogramme de cis-stilbène; <math>T_{R\text{ moy}}= 20.89</math> min, <math>\lambda_{\text{max}}=286</math> nm.</i>	42
<i>Figure IV.03</i>	<i>Figure IV.03 : Chromatogramme du mélange (pic 01: <math>T_{R\text{ moy}}= 02,50</math> min, <math>\lambda_{\text{max}}=310</math> nm, pic 02: <math>T_{R\text{ moy}}=24,00</math> min, <math>\lambda_{\text{max}}=310</math> nm).</i>	42
<i>Figure IV.04</i>	<i>Spectre UV-visible de la quercétine (a) et de (Z)-stilbène (b) en 2D et 3D.</i>	43
<i>Figure IV.05</i>	<i>Spectre UV-visible du mélange; pic 01 (d) et pic 02 (c) en 2D et 3D.</i>	44
<i>Figure IV.06</i>	<i>Spectres infrarouge des réactifs et du produit de réaction : quercétine (a), cis stilbène (b), et produit de réaction du cis stilbène et de la quercétine (c).</i>	46
<i>Figure IV.07</i>	<i>Chromatogrammes des mélanges (Q+S) à différentes concentrations de Q (C, 2C, 4 C, 8 C, 12 C et 16 C).</i>	48
<i>Figure IV.08</i>	<i>Effet de la concentration sur l'intensité du mélange (pic majoritaire).</i>	50
<i>Figure IV.09</i>	<i>Diagramme représentant la variation de l'amplitude du mélange en fonction de la concentration.</i>	50
<i>Figure IV.10</i>	<i>Variation du temps de rétention du pic majoritaire en fonction de la concentration.</i>	51

### Liste des figures

<i>Figure IV.11</i>	<i>Chromatogrammes du mélange (12 Q+S) à différentes températures de la colonne (°C).</i>	53
<i>Figure IV.12</i>	<i>Variation de l'intensité du pic majoritaire du mélange en fonction de la température.</i>	55
<i>Figure IV.13</i>	<i>Diagramme représentant l'effet de la température sur l'intensité des pics dans le mélange (S+12 Q).</i>	55
<i>Figure IV.14</i>	<i>Variation du temps de rétention du pic 02 en fonction de la température.</i>	56
<i>Figure IV.15</i>	<i>Variation du temps de rétention du pic majoritaire en fonction de la température.</i>	56
<i>Figure IV.16</i>	<i>Effet du temps de la réaction sur le mélange (S+12 Q).</i>	55
<i>Figure IV.17</i>	<i>Structure de la quercétine (Q) optimisée par DFT/B3LYP-6-311++G (d,p).</i>	62

# *Liste des tableaux*

**Liste des tableaux**

<i>Numéro de tableau</i>	<i>Titre de tableau</i>	<b>Page</b>
<b>Chapitre II</b>		
<i>Tableau II.01</i>	<i>Solvants utilisés en HPLC avec degré de polarité approximatif (0 à 10).</i>	26
<b>Chapitre III</b>		
<i>Tableau III.01</i>	<i>Quelques propriétés physicochimiques des réactifs.</i>	33
<i>Tableau III.03</i>	<i>Différentes concentrations et volumes de la quercétine.</i>	34
<b>Chapitre IV</b>		
<i>Tableau IV.01</i>	<i>Données HPLC de la quercétine (Q).</i>	41
<i>Tableau IV.02</i>	<i>Données HPLC du cis-stilbène.</i>	42
<i>Tableau IV.03</i>	<i>Données HPLC du mélange (S+Q).</i>	43
<i>Tableau IV.04</i>	<i>Données HPLC du mélange (pic 1 et pic 2) à différentes concentrations de Q (C, 2 C, 4 C, 8 C, 12 C et 16 C). Volume d'injection (1 µl)</i>	49
<i>Tableau IV.05</i>	<i>Données HPLC du mélange (pic 1 et pic 2) à différentes températures de la colonne (10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 40 °C et 45 °C). Volume d'injection (1 µl).</i>	54
<i>Tableau IV.06</i>	<i>Données HPLC du mélange (S+12Q) (pic 1 et pic 2) à divers temps de la réaction (une heure, 03 heures, 24 heures et 72 heures). Volume d'injection (1 µl).</i>	57
<i>Tableau IV.07</i>	<i>BDE et PDE, de la quercétine (Q), en kJ/mol par B3LYP/6-311++ G (d,p), dans le MeOH.</i>	63

# *Liste des abréviations*

**Liste des abréviations**

°C	Degré Celsius
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate.
ArO <sup>•</sup>	Radical flavoxyl
ArO-H	Molécule de flavonoïde
ArO-H <sup>•+</sup>	Molécule de flavonoïde radical de charge +
ATP	Adénosine triphosphate.
ATPase	Enzyme, de la famille des hydrolases
B3LYP	Becke-3-paramètres Lee-Yang-Parr
BDE	Enthalpie de dissociation des liaisons
C	Concentration
Ca <sup>2+</sup>	Calcium sous forme du cation
Cl-Si (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> R	Gel de silice
cm	Centimètre
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DAD	Détecteur à barrette de diodes (Diode-array detector)
DFT	Théorie de la fonctionnelle de la Densité
g	Gramme
h	Heure

## *Liste des abréviations*

---

H	Atome d'hydrogène
H(X)	Enthalpie de X
H <sup>+</sup>	Hydrogène de charge +
H <sup>•</sup>	Hydrogène radical
H <sub>2</sub> O	Eau
HAT	Transfert d'atome d'hydrogène
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IR	Infrarouge
M	Molaire
m	Mètre
mAU	Mili unité d'absorbance
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mol	Mole
Moy	Moyenne
nm	Nanomètre
O	Atome d'oxygène
PDE	Enthalpie de dissociation des protons
pH	Potentielle d'hydrogène
Q	Quercétine

### *Liste des abréviations*

---

R <sup>•</sup>	Radical libre
RH	Radical+atome d'hydrogène
RMN	Résonance magnétique nucléaire
S	Stilbène
SET-PT	Transfert d'un seul électron-transferts des protons
Si	Silicium
Si <sub>2</sub> -OH	Groupement Silanol
Si <sub>2</sub> -O-Si (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> R	Silices greffées
TFA	Acide trifluoroacétique
T <sub>R moy</sub>	Temps de rétention moyenne
T <sub>R</sub>	Temps de rétention
UV	Ultra-Violet
λ <sub>max</sub>	Longueur d'onde d'absorption maximale
μl	Micro litre

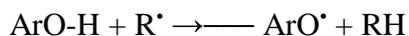
# *Introduction générale*

## **Introduction générale**

Les polyphénols forment une vaste famille de métabolites secondaires naturels constituée de plusieurs milliers de molécules. Les flavonoïdes constituent la plus importante catégorie de polyphénols, des molécules très réputées pour leurs vertus antioxydantes. Ils entrent dans la composition des produits de consommation les plus courants, en particulier les fruits et légumes mais également les produits transformés comme le chocolat et le thé. Leur étude connaît un regain d'intérêt depuis qu'on leur prête, notamment, des propriétés anticancéreuses mais aussi des effets dans le domaine cardiovasculaire.

En effet les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres générés par le stress oxydant. Leur propriété anti radicalaire est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques.

Le mécanisme principal de piégeage des radicaux libres par les polyphénols se fait par le transfert de l'atome d'hydrogène (H-atom transfer ou HAT). Le radical libre est réduit par transfert de l'atome d'hydrogène de l'antioxydant (ArO-H) vers le radical (R<sup>\*</sup>).



Le radical ArO<sup>\*</sup> ainsi formé sera stabilisé d'abord par délocalisation des électrons  $\pi$ , puis par un nouveau transfert d'atome d'hydrogène conduisant à la formation de quinone ou par réaction avec un autre radical libre [01].

La quercétine (Q) est un flavonoïde de type flavonol présent chez les plantes comme métabolite secondaire. Comme tous les flavonoïdes, la quercétine (Q) est un antioxydant reconnu. Elle permet de lutter contre le stress oxydatif qui est le résultat d'un déséquilibre de la balance entre les espèces oxydantes et les systèmes de défense (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule. L'antioxydant peut donc, prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles.

Le stilbène (S), dont il existe deux formes [*trans*-1,2-diphényléthylène ((*E*)-stilbène) et *cis*-1,2-diphényléthylène ((*Z*)-stilbène)], est un hydrocarbure aromatique de formule C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>. Ce dernier est utilisé comme luminophore et comme scintillateur. Il est principalement utilisé dans la production de colorants et d'azurants optiques. Étant le moins stable pour cause de gênes stériques et présentant un point de fusion compris entre 5 °C et 6 °C [02], sous

certaines conditions (lumière et air), le stilbène caractérisé aussi par l'absence des groupements hydroxyles et la forte réactivité de son pont éthylène (délocalisation des électrons  $\pi$  dans la totalité de la molécule) est cependant susceptible de se comporter comme un agent prooxydant et d'engendrer une altération des protéines, de l'ADN ou encore des lipides membranaires et des glucides [03].

L'interaction prooxydant-Antioxydant est une notion complexe. Les méthodes expérimentales peuvent montrer qu'un composé présente ou non une activité antioxydante, mais sont incapables de montrer quelle partie ou quel site dans les molécules est responsable de l'action antioxydante.

Aujourd'hui, les méthodes computationnelles telles que la théorie de la densité fonctionnelle (DFT), appliquée aux études de l'activité antioxydante, ont la caractéristique de montrer lequel des sites de molécule est le plus responsable de l'activité antioxydante et les mécanismes de réaction par lesquels les antioxydants peuvent exercer leur activité.

La DFT est une technique de mécanique quantique, elle permet de calculer: l'enthalpie de la dissociation des liaisons (BDE) et l'enthalpie de dissociation des protons (PDE), qui sont impliqués dans les principaux mécanismes de l'activité antioxydante et de mieux comprendre la réactivité chimique; c'est-à-dire la plus ou moins grande facilité qu'a une molécule de se transformer ou de réagir avec d'autres molécules.

Dans ce travail, notre objectif est d'une part, l'étude par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode; HPLC -UV-DAD, vu qu'elle est d'une grande précision, fiable et facile à mettre en œuvre, des interactions entre le 1,2-diphényléthylène en tant que prooxydant et la quercétine étant un antioxydant et détecter la formation du complexe (S+Q) en effectuant une étude paramétrique qui illustre l'effet du temps de la réaction, de la température de la colonne et de la concentration des réactifs sur le mélange réactionnel et la stabilité du complexe. Et d'autre part, l'étude théorique de l'activité antioxydante de la quercétine par la méthode DFT en utilisant Gaussian 09. Les paramètres calculés sont: BDE et PDE.

Ce mémoire s'articule autour de quatre chapitres :

- Le premier chapitre consistera à présenter des généralités sur les polyphénols (définition, classification et propriétés).

## *Introduction générale*

---

- Le deuxième chapitre s'intéressera d'assez près à la chromatographie liquide à haute performance.
- Dans le troisième chapitre, sera présentée la méthode d'analyse utilisée dans ce travail ainsi que les modes opératoires mis en œuvre.
- L'interprétation des différents résultats obtenus sera détaillée dans le quatrième chapitre.
- Enfin, une conclusion générale achèvera ce travail et portera sur une lecture attentive et succincte des résultats obtenus et une présentation des perspectives envisagées.

*Chapitre I*  
*Les polyphénols*

### **I.1. Introduction**

Ce chapitre consistera en une revue de la littérature concernant les polyphénols, leur définition, leurs structures chimiques, leur classification, ainsi que leurs effets sur un certain nombre de pathologies.

### **I.2. Définition**

Les polyphénols sont un groupe bien connu de systèmes phénoliques caractérisés par au moins deux cycles phényle et un ou plusieurs substituants hydroxyle. Cette description comprend un grand nombre de composés hétérogènes en référence à leur complexité [04, 05].

### **I.3. Biosynthèse des polyphénols**

Deux voies principales existent pour la biosynthèse des composés polyphénoliques :

- La voie de l'acide shikimique : Qui peut conduire directement à des acides benzoïques substitués, ou via acide préphéniques à une variété de composés phénylpropane. Il a été suggéré que dans cette voie également, les positions de substitution hydroxyle dans les molécules élaborées sont fixées par l'orientation des groupes dans l'acide shikimique lui-même [06].
- La voie de l'acétate : Qui conduit à des cycles aromatiques contenant des groupes hydroxyles, sur des atomes de carbone alternés tels que le cycle A des flavonoïdes [06].

### **I.4. Structures chimiques et classification**

Les polyphénols sont des composés naturels synthétisés exclusivement par les plantes, avec des caractéristiques chimiques liées aux substances phénoliques et de fortes propriétés antioxydantes. Ces molécules ou classes de substances sont principalement présentes dans les fruits, les légumes, le thé vert et les grains entiers.

Les polyphénols peuvent être simplement classés en flavonoïdes et non flavonoïdes ou subdivisés en plusieurs sous-classes en fonction du nombre d'unités phénol dans leur structure moléculaire, leurs groupes substituants et le type de liaison entre unités phénol. Les polyphénols sont synthétisés par les plantes et largement distribués dans les tissus végétaux, où ils existent principalement sous forme de glycosides [07].

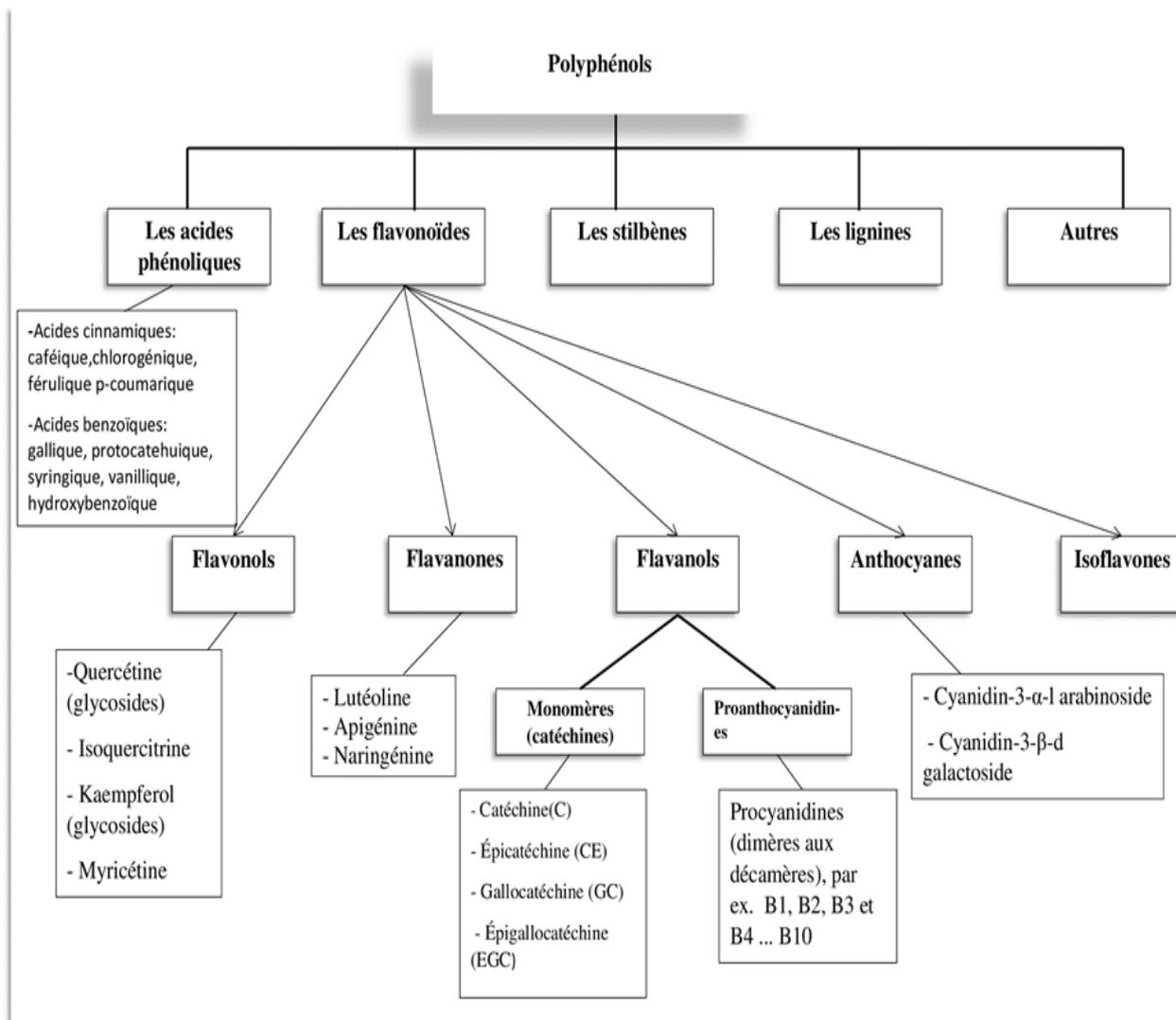


Figure I.01: Différentes classifications des polyphénols végétaux et des classes polyphénoliques basées sur le nombre de cycles phénol et leurs éléments structurels [07].

#### I.4.1. Les composés non flavonoïdes

Bien que le squelette structural du polyphénol contienne plusieurs groupes hydroxyle sur des cycles aromatiques, la structure de base des non flavonoïdes est un seul cycle aromatique. Les composés non flavonoïdes comprennent les acides phénoliques, les stilbènes et les lignines. La classe principale de ce groupe est représentée par les acides phénoliques, principalement l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Ces molécules existent rarement sous leur forme libre, mais se trouvent le plus souvent en conjugaison avec d'autres

polyphénols, du glucose, de l'acide quinique ou des composants structurels de la plante d'origine [05].

#### I.4.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés polyphénoliques non flavonoïdes qui peuvent être divisés en deux types principaux : dérivés d'acide benzoïque et dérivés d'acide cinnamique basés sur les squelettes C1–C6 et C3–C6.

Les acides phénoliques ne peuvent être libérés ou hydrolysés que par hydrolyse acide ou alcaline, ou par des enzymes.

- A) **Acides hydroxybenzoïques C6-C1** : Les acides hydroxybenzoïques dérivent par hydroxylation de l'acide benzoïque avec une structure de base de type C6-C1. Ces hydroxyles phénoliques OH peuvent ensuite être méthylés [08].

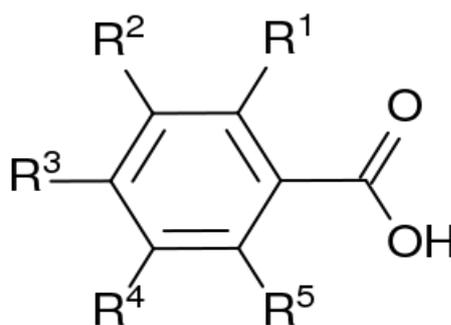


Figure I.02 : Structure des Acides hydroxybenzoïques.

- B) **Acides hydroxycinnamiques C3-C6** : Les dérivés de l'acide cinnamique, les acides hydroxycinnamiques ont une structure de base de type C6-C3. Ils appartiennent à la grande famille des phénylpropanoïdes. Les hydroxyles phénoliques OH de ces dérivés peuvent aussi être méthylés (-O-CH<sub>3</sub>).

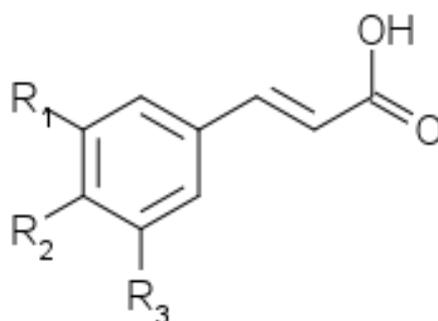


Figure I.03 : Structure des Acides hydroxycinnamiques.

### I.4.1.2. Les lignines (C6-C3) n

La lignine est un polymère fortement ramifié, formé par trois alcools phénoliques simples. Les alcools sont oxydés en radicaux libres par une enzyme ubiquiste chez les plantes, la peroxydase. Les radicaux libres réagissent ensuite spontanément et au hasard pour former la lignine.

La lignine est localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois secondaires des éléments conducteurs, contribuant à la résistance mécanique et à la rigidité des tiges lignifiées. La lignine est un très grand polymère, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, et il est donc impossible de l'extraire sans lui faire subir d'importantes dégradations [09].

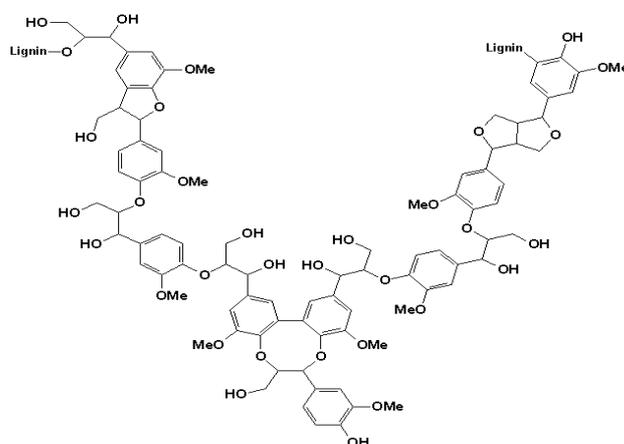


Figure I.04 : Structure d'une lignine.

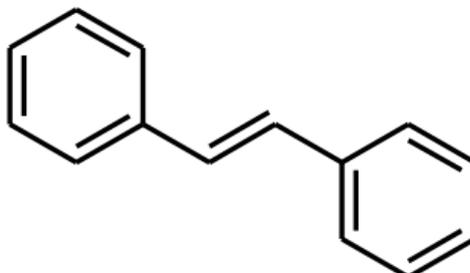
### I.4.1.3. Les stilbènes C6-C2-C6

Les stilbènes sont des composés phénoliques issus du métabolisme secondaire végétal, et qui dérivent de la voie des phénylpropanoïdes. Les stilbènes (1,2-diphényléthylène) sont des composés de deux noyaux phényles reliés entre eux par un double pont éthène pouvant exister sous deux formes : la forme *trans*(E) et la forme *cis* (Z), cette dernière étant obtenue par photo isomérisation ou par l'action de la chaleur. La forme *trans*-stilbène étant la forme la plus stable et bioactive, elle est retrouvée en général plus abondamment dans les différentes espèces végétales productrices de stilbènes [10].

Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques.

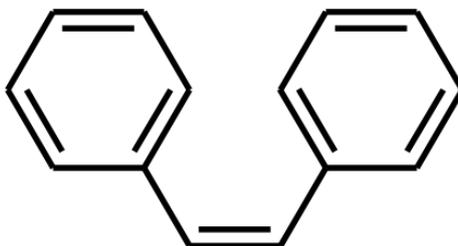
**A) Trans-stilbène (E):** Est un composé organique représenté par la formule développée condensée  $C_6H_5CH = CHC_6H_5$ . Classé comme diaryléthène, il comporte un groupement éthylène central avec un substituant de groupe phényle à chaque extrémité

de la double liaison carbone-carbone. Il a une stéréochimie (E), ce qui signifie que les groupes phényle sont situés sur les côtés opposés de la double liaison, à l'opposé de son isomère géométrique [08].



*Figure I.05 : Trans(E)-stilbène*

**B) Cis-stilbène (Z):** Liquide huileux, incolore, à odeur de fleurs ; il s'isomérisé facilement en forme trans (E), c'est un diaryléthène, c'est-à-dire un hydrocarbure constitué d'une double liaison cis éthène substituée par un groupe phényle sur les deux atomes de carbone de la double liaison. Le nom stilbène est dérivé du mot grec stilbos, qui signifie brillant [08].



*Figure I.06 : Cis (Z)-stilbène.*

Les deux formes ont des propriétés chimiques semblables. La double liaison peut donner lieu à des réactions d'addition. Ainsi, l'hydrogénation, par action de l'hydrogène naissant ou de l'hydrogène en présence de catalyseurs, engendre un dibenzyle. Les produits d'oxydation dépendent des conditions réactionnelles : à la lumière et à l'air, on obtient de l'acide benzoïque et des résines ; en présence d'ozone, on obtient du benzaldéhyde. Le stilbène peut aussi fixer deux atomes d'un métal monovalent ; les composés obtenus sont très réactifs [08].

### I.4.2. Les composés flavonoïdes C6-C3-C6

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques contenant un squelette basique de diphenylpropane (C6-C3-C6). Plus de 4000 types des flavonoïdes existent et sont classés dans les sous-classes de flavonoïdes ; flavonols, flavan-3-ols (catéchines), isoflavones, flavonoïdes, anthocyanes et les chalcones [11].

Les flavonoïdes se forment dans les plantes à partir des acides aminés aromatiques phénylalanine et tyrosine, et malonate. La structure de base des flavonoïdes est le flavane noyau, qui se compose de 15 atomes de carbone disposés en trois anneaux (C6-C3-C6), qui sont étiquetés A, B et C. Les différentes classes de flavonoïdes diffèrent par le niveau d'oxydation et la substitution du cycle C, tandis que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent dans le modèle de substitution des cycles A et B [12].

#### I.4.2.1. Flavonols

Les flavonols sont des flavonoïdes avec un groupe cétone. Ce sont des blocs de construction de proanthocyanes. Les flavonols sont présents en abondance dans une variété de fruits et légumes. Les oignons, le chou frisé, la laitue, les tomates, les pommes, les raisins et les baies sont de riches sources de flavonols. La consommation de flavonols s'avère associée à un large éventail d'avantages pour la santé, notamment un potentiel antioxydant et un risque réduit de maladie vasculaire. Par rapport aux flavones, les flavonols ont un groupe hydroxyle en position 3 de Cycle C, qui peut également être glycosylé [13].

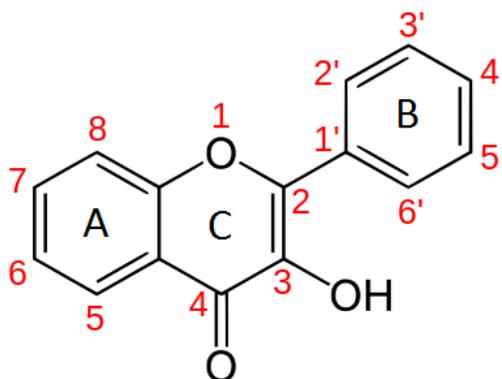


Figure I.07 : Structure de base des flavonols.

La quercétine ou le quercétol est un composé organique de la famille des flavonoïdes, plus précisément du sous-groupe des flavonols. C'est un métabolite secondaire présent dans certaines plantes. C'est le plus actif des flavonoïdes. De nombreuses études *in vitro* ont montré que le quercétol était un excellent antioxydant. De tous les flavonoïdes, c'est même le plus puissant capteur d'espèces réactives oxygénées ERO (ou radicaux oxygénés libres) [14].

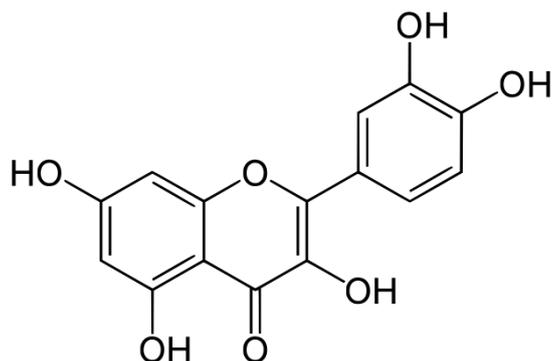


Figure I.08 : Structure de la quercétine.

Sa structure particulière lui confère les caractéristiques les plus souvent mises en avant dans l'activité d'un flavonoïde : le cycle catéchol et l'insaturation en position 2 conjuguée avec la fonction carbonyle en position 4. De plus elle possède les trois sites de complexation communément admis pour les flavonoïdes [14].

#### I.4.2.2. Flavanones

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2. Chez les flavanones naturelles, le carbone 2 est normalement de configuration S. Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylée.

La principale source des flavanones reste les agrumes qui sont caractérisés par l'accumulation des montants élevés en ces composés. Les agrumes incluent les oranges amères, les citrons, les pamplemousses, les mandarines, les clémentines et les oranges douces. Parmi les formes libres des flavanones, on cite la naringénine qui est retrouvée dans le pamplemousse et l'orange amère. Le plus souvent, les flavanones existent sous forme glycosylée en position 7, comme L'hésperidine, qui est retrouvée dans le citron, l'orange douce et la mandarine, et les néohesperidosi des responsables du goût amer du pamplemousse et de l'orange [15].

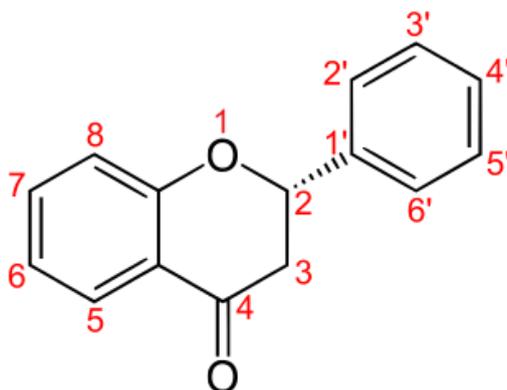


Figure I.09 : Structure des flavanones.

### I.4.2.3. Flavanols ou flavan-3-ols

Les flavanes-3-ols (parfois appelés flavanols) sont des dérivés de flavanes qui possèdent un squelette 2-phényl-3,4-dihydro-2H-chromen-3-ol. Ces composés comprennent la catéchine, le gallate d'épicatéchine, l'épigallocatechine, le gallate d'épigallocatechine, les proanthocyanidines, les théaflavines, les théarubigines.

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4. Elles sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés. Les flavan-3-ols sont très abondant dans les fruits comme les abricots, les cerises, les raisins, etc.

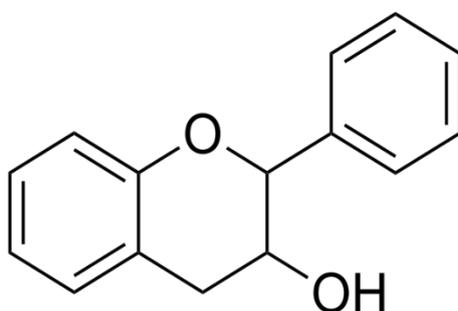


Figure I.10 : Structure de base des flavan-3-ols.

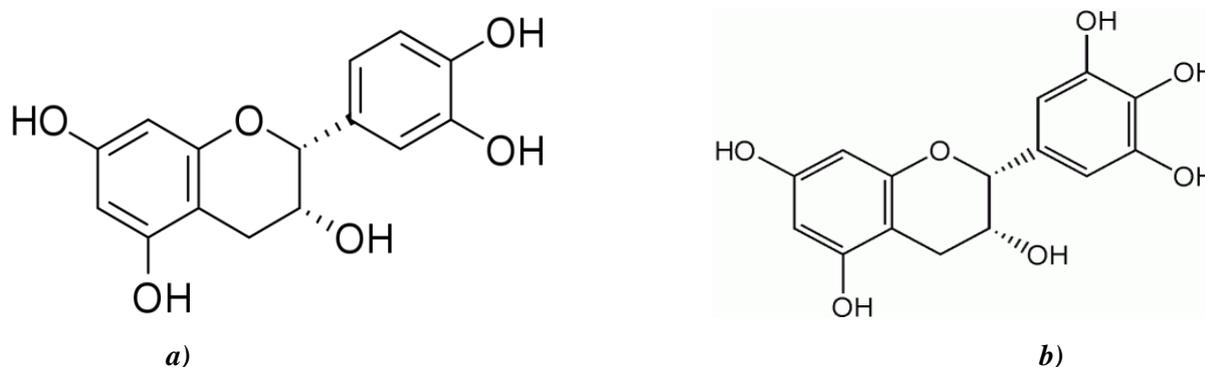


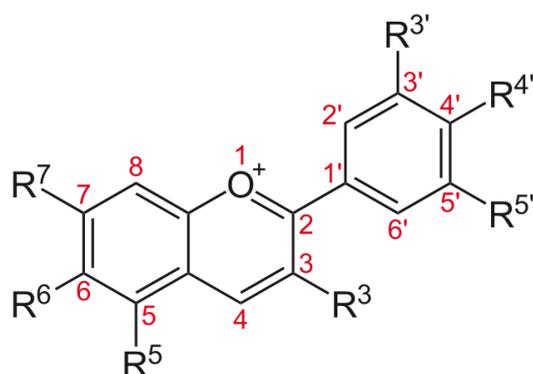
Figure I.11 : Deux exemples des structures chimiques des flavan-3-ols. a) épicatéchin (EC)  
b) épigallocatechin (EGC).

### I.4.2.4. Anthocyanes

Les anthocyanes (en grec Anthos signifie fleur, et kyanos signifie bleu) sont des pigments hydrosolubles présents dans la plupart des espèces. Ces pigments sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium plus communément appelé cation flavylum.

Les anthocyanidines sont les principaux composants des pigments rouges, bleus et violets de la majorité des pétales de fleurs, fruits et légumes et certaines variétés spéciales de céréales, par exemple le riz noir. Les anthocyanidines dans les plantes existent principalement

sous des formes glycosidiques qui sont communément appelées anthocyanes. La cyanidine, la delphinine et la pélagonidine sont les anthocyanidines les plus répandues, avec plus de deux douzaines d'autres anthocyanidines monomères (un total de 31 anthocyanidines). En fait, 90 % des anthocyanes sont à base de cyanidine, delphinidé et pélagonidine et leurs dérivés méthylés. On connaît au total plus de 500 anthocyanes selon l'hydroxylation modèles de méthylation sur le cycle B et glycosylation avec différentes unités de sucre. La couleur des anthocyanes dépendent du pH, c'est-à-dire le rouge dans les conditions acides et le bleu dans les conditions basiques. Cependant, d'autres facteurs tels que le degré d'hydroxylation ou le schéma de méthylation des cycles aromatiques et la glycosylation motif, c'est-à-dire que le sucre par rapport au sucre acylé peut également affecter la couleur des composés anthocyanes. Les anthocyanes sont chimiquement stables dans les solutions acides.



*Figure I.12 : Structure des Anthocyanidines.*

#### **I.4.2.5. Isoflavones**

Les isoflavones sont considérées comme des dérivés des flavones, elles représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoïdes. Contrairement à la plupart des autres flavonoïdes, les isoflavones sont caractérisées par la présence d'un cycle B fixé à C3 plutôt que la position C2. Ils ont une distribution très limitée dans le règne végétal.

Les isoflavones sont des substances naturelles qui provoquent un certain nombre d'effets physiologiques sur les organismes vivants. Les substances sont synthétisées dans les tissus végétaux en tant qu'agents protecteurs contre le stress biotique (c'est-à-dire une infection bactérienne). Les isoflavones sont également un constituant alimentaire important dans la nutrition humaine [16].

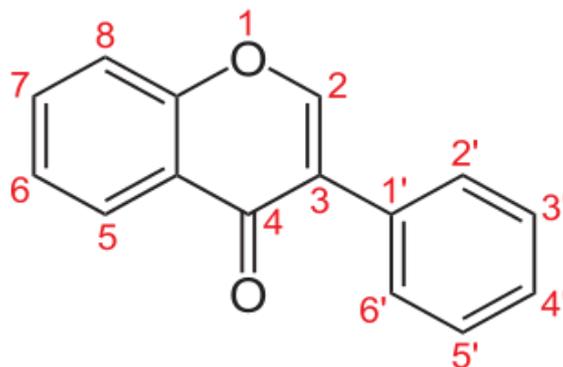


Figure I.13 : Structure des Isoflavones.

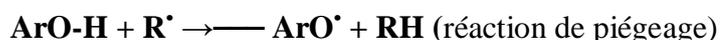
## I.5. Propriétés des flavonoïdes

### I.5.1. Les propriétés physico-chimiques

- Les flavonoïdes (polyphénols) sont des acides faibles (dû aux phénols)
- Les flavonoïdes sont des solides cristallisés de coloration jaune plus ou moins intense selon les catégories.
- Les flavonoïdes en solutions alcalines donnent une coloration jaune qui disparaît par l'ajout d'un acide.
- Ils possèdent un spectre UV caractéristique au type de noyau ce qui permet leur identification [17].

### I.5.2. Propriétés antiradicalaires

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous :



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyyle ( $\text{ArO}^{\bullet}$ ), ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R ; en outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs.

La propriété antiradicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques, cette activité nécessite :

- Structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), cette structure est importante pour l'activité antiradicalaire des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.
- La double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité antiradicalaire.
- Les groupements hydroxyles libres en C3 et C5.
- A titre d'exemple ; la quercétine répond à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité anti-radicalaire efficace et importante.

### **I.5.3. Propriétés antivirales**

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale des cellules en culture, une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral :

- Au niveau de l'adsorption du virus sur la cellule hôte.
- Au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte.
- Au niveau de la réplication du virus et la synthèse des protéines virales.
- Au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte.

### **I.5.4. Propriétés antiallergiques**

Les effets antiallergiques des flavonoïdes sont attribués à leur influence sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase  $Ca^{2+}$  dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase  $Ca^{2+}$  dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme [17].

### **I.6. Conclusion**

Les polyphénols, principalement les flavonoïdes constituent une vaste famille de métabolites secondaires naturels constituée de plusieurs milliers de molécules. Leurs propriétés très intéressantes et en particulier l'activité antioxydante sont dues essentiellement à leur structure chimique spécifique.

***Chapitre II***  
***Chromatographie liquide à***  
***haute performance (HPLC)***

## **II.1. La théorie de la chromatographie en phase liquide**

### **II.1.1. Introduction**

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse [19].

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire c'est-à-dire la régularité de cette phase) [21].

### **II.1.2. Principe**

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [22].

### **II.1.3. Les différents modes de séparation**

Il existe différents modes de séparation en chromatographie en phase liquide :

- L'adsorption.
- Le partage (80 % des séparations).
- L'échange d'ions.
- L'exclusion.

Les trois premiers types utilisent la polarité des solutés pour les séparer [20].

### **II.1.3.1. La chromatographie d'adsorption**

La chromatographie d'adsorption met en œuvre des phases stationnaires ayant des propriétés adsorbantes, principalement les gels de silice poreuse et les gels d'alumine. On parle aussi de chromatographie liquide-solide. La chromatographie liquide d'adsorption s'applique surtout à la séparation des composés organiques relativement non polaires, insolubles dans l'eau et dont les masses molaires sont inférieures à environ  $5000 \text{ g mol}^{-1}$ . Sur ces phases, les molécules polaires sont souvent adsorbées de façon irréversible.

Cette technique est utilisée essentiellement pour fractionner les mélanges de composés présentant des groupements fonctionnels différents et des isomères de position tels que les dérivés du benzène substitués en méta et en para [20].

### **II.1.3.2. La chromatographie de partage**

C'est la technique chromatographique la plus utilisée de toutes les méthodes chromatographiques en phase liquide. Elle met en œuvre des phases stationnaires greffées. La séparation des solutés dépend des différences de solubilité des solutés dans la phase mobile, et des différentes interactions des solutés avec la phase stationnaire (force de Van der Waals, forces électrostatiques). La phase stationnaire est un liquide immobilisé par greffage sur gel de silice. La phase mobile est un liquide dont les interactions avec la phase stationnaire doivent être faibles, ce qui est obtenu lorsque leurs polarités sont différentes [23].

## **II.1.4. Polarité et chromatographie**

### **II.1.4.1. Polarité d'une molécule**

La polarité d'une molécule est une notion intrinsèque. Certaines molécules étant dissymétriques, les électrons ne sont pas uniformément répartis autour d'elles. De ce fait il existe un moment dipolaire permanent qui crée un champ électrique local. Ces molécules sont dites polaires [23].

### **II.1.4.2. Interactions entre molécules**

Dans la nature, les molécules ne sont pas isolées. Entre elles il existe différents types d'interactions [24] :

- Les interactions diélectriques ou ioniques ;
- Les liaisons " hydrogène " ;
- Les forces de Van Der Waals.

#### **II.1.4.3. Notion de polarisabilité**

Sur certaines molécules isolées qui ne possèdent pas de moment dipolaire permanent, un champ électrique peut créer un champ dipolaire induit, en déformant les orbitales électroniques ou en modifiant la position relative des atomes. Ces molécules sont dites polarisables [25].

#### **II.1.4.4. Application à la chromatographie**

Il existe des échelles de polarité, mais on utilise la notion de polarité comme une donnée comparative entre molécules. On dit que tel composé est plus polaire ou moins polaire qu'un autre. De même on dit que la phase mobile et la phase stationnaire sont polaires, peu polaires ou apolaires.

Pour qu'il y ait séparation chromatographique de composés, il faut que leurs molécules interagissent de manières différentes avec au moins une des phases (stationnaire et mobile). Ces phases doivent avoir des polarités différentes. On peut appliquer la règle "qui se ressemble s'assemble" à l'ensemble soluté - phase stationnaire [26].

- Si la phase stationnaire est polaire, les composés polaires seront plus retenus que les composés non polaires.
- Si la phase stationnaire est apolaire, les composés apolaires seront plus retenus que les composés polaires.

##### ✓ *Polarité de phase*

A l'origine, les colonnes étaient remplies de silice (phase stationnaire polaire). Elle doit sa polarité aux groupements silanols Si-OH qui sont polaires. Pour que la séparation soit efficace, la phase mobile doit alors être peu polaire. L'ensemble "phase stationnaire polaire et phase mobile peu polaire" forme la chromatographie à polarité de phase normale.

Par la suite, les particules de silice (support) ont été enrobées de paraffine en C 18 pour faire une phase apolaire. Dans ce cas, pour que la séparation soit efficace, la phase mobile est polaire (généralement à base d'eau). L'ensemble "phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire" forme la chromatographie à polarité de phase inversée [19].

##### ✓ *Composition de la phase mobile*

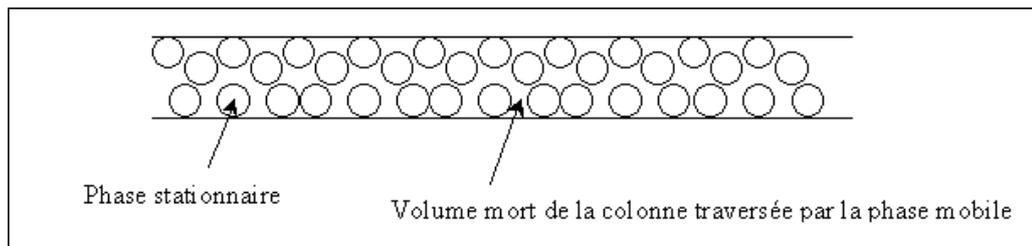
Dans la pratique, chaque séparation nécessite une polarité de la phase mobile qui lui est propre. Chaque solvant ayant une polarité donnée, on ajuste la polarité globale de la phase mobile en mélangeant plusieurs solvants miscibles. A cette composition de phase mobile correspond une force éluant qui caractérise le pouvoir d'entraîner les solutés.

Il faut ajuster la force éluant en fonction des solutés à séparer. Pour cela, on peut utiliser un solvant pur ou un mélange de solvants : on dit travailler en mode isocratique. Dans certains cas il est utile de faire varier la force éluant au cours de l'analyse. Si le mélange de différents solvants varie au cours de la séparation, on réalise alors un gradient d'éluant, car la meilleure force éluant pour le début de l'analyse n'est pas forcément adaptée pour une bonne séparation des solutés sortant en fin de chromatogramme. Ces 2 modes sont utilisés pour des analyses en chromatographie à polarité de phase normale ou inversée [19].

### II.1.5. Notions fondamentales

#### II.1.5.1. Phases mobiles et stationnaire

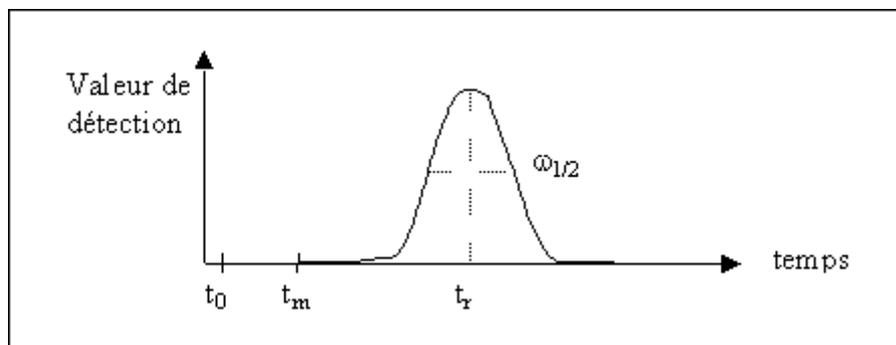
La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés. La phase mobile ou éluant est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne [21].



*Figure II.01 : La phase stationnaire et la phase mobile [21].*

#### II.1.5.2. Notion de temps

En chromatographie, le temps est un paramètre important pour l'analyse qualitative d'un mélange de différents solutés.



*Figure II.02 : La valeur de détection en fonction du temps avec un seul pic [21].*

- $t_0$  est le temps du début de l'injection.
- $t_m$  (le temps mort) qui est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).
- $t_R$  (le temps de rétention) est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant étudié.
- Le temps de rétention réduit  $t'_R$  est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t'_R = t_R - t_m$$

II.01

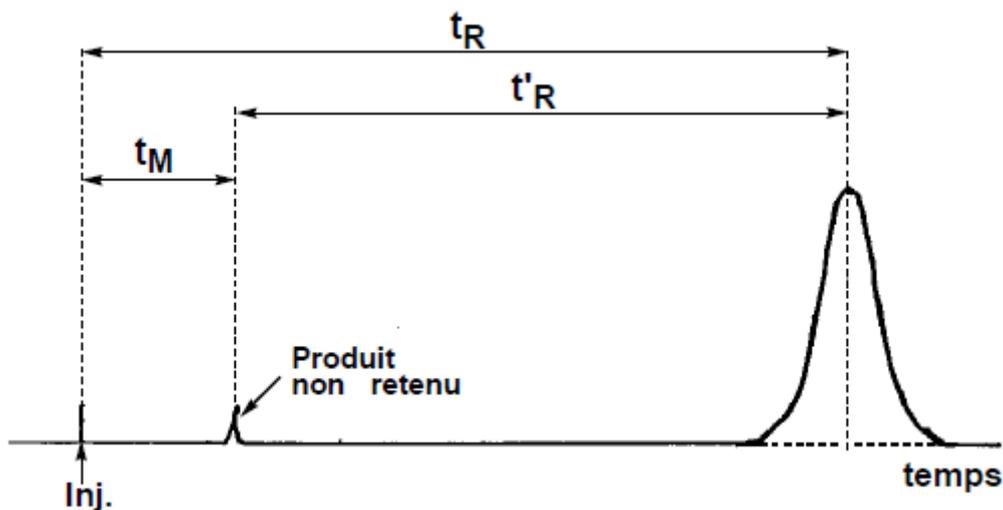


Figure II.03: Types de temps pour un pic chromatographique [19].

### II.1.5.3. Notion de concentration

- **Le coefficient de partage K**

A un instant donné, le soluté est à la concentration  $C_m$  dans la phase mobile et  $C_s$  dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K [19].

$$K = C_s / C_m$$

II.02

Ce coefficient est fonction de 2 types d'affinités :

- Celle entre le soluté et la phase mobile.
- Celle entre le soluté et la phase stationnaire.

- **Le facteur de capacité K'**

Le facteur de capacité K' est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K' = \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m} = K \times \frac{V_s}{V_m}$$

**II.03**

V<sub>s</sub> : volume de la phase stationnaire.

V<sub>m</sub> : volume de la phase mobile ou volume mort.

K' est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

**II.04**

#### **II.1.5.4. Notion d'efficacité**

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par :

- **Le nombre de plateaux théoriques N<sub>th</sub>**

$$N_{th} = 5,54 \left[ \frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right]^2$$

**II.05**

t<sub>r</sub> : temps de rétention.

ω<sub>1/2</sub> : largeur du pic à mi-hauteur.

- **La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT, qui est défini comme :**

$$HEPT = \frac{L}{N_{th}}$$

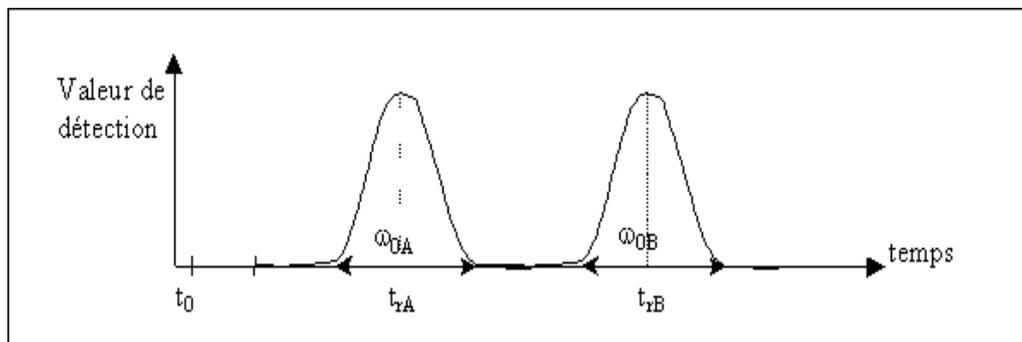
**II.06**

L : Longueur de la colonne.

$N_{th}$  : Nombre de plateaux théoriques.

### II.1.5.5. Qualité de la séparation

Supposons un mélange liquide de deux constituants, analysé par chromatographie liquide. Le schéma ci-dessous représente le chromatogramme correspondant :



*Figure II.04 : La valeur de détection en fonction du temps avec deux pics.*

- **La sélectivité ( $\alpha$ )**

Elle est définie comme le rapport des temps de rétention réduits.  $\alpha$  est toujours  $> 1$  car on choisit  $t'_{rB} > t'_{rA}$ .

A et B : Solutés dans le mélange à analyser.

$$\alpha = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}}$$

**II.07**

- **La résolution (R)**

Elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non chevauchement de 2 pics contigus.

$$R = \frac{(t'_{rB} - t'_{rA})}{(\omega_{0B} - \omega_{0A})}$$

**II.08**

$\omega_{0A}$  et  $\omega_{0B}$  sont les largeurs des pics des composés A et B respectivement.

$R < 1$  : mauvaise résolution.

$1 < R < 1,4$  : résolution acceptable.

$1,4 < R < 1,6$  : résolution optimale.

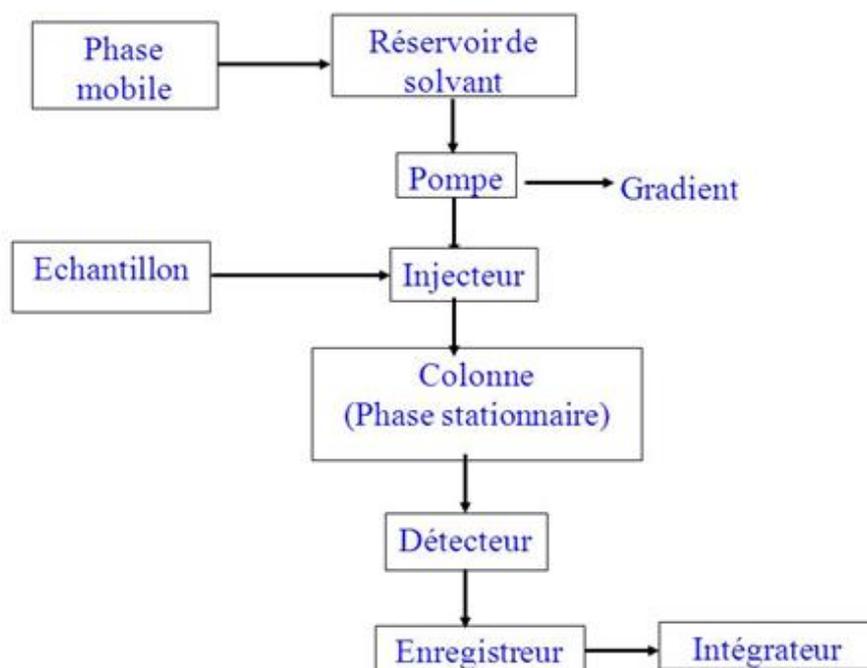
$R > 1,6$  : résolution trop bonne car le temps d'analyse est allongé.

## II.2. Appareillage

En raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications, la chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC) est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de séparation. Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse [20].

- Des composés thermosensibles ;
- Des composés très polaires ;
- Ainsi que des composés de masses molaires élevées.

Un appareil d'HPLC comprend différents modules : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition de données [27].



*Figure II.05 : Composition d'une chaîne HPLC.*

### II.2.1. Réservoir de la phase mobile (solvant)

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. Le dégazage de la phase mobile (solvants) est indispensable avant de commencer une analyse par HPLC [20].

*Tableau II.01 : Solvants utilisés en HPLC avec degré de polarité approximatif (0 à 10).*

Solvants polaires	Solvants de polarité moyenne	Solvants de polarité faible ou apolaires
Eau (10)	Ethanol (4)	Biométhane (2)
DMSO (7)	Chloroforme (4)	Chlorométhane (1)
Acétonitrile (6)	Propan-2-ol (4)	Cyclohexane (0)
Acide acétique (6)	THF (4)	Isooctane (0)
Méthanol (5)	Propanol (4)	
	Fluor benzène (3)	
	Chlorure de Méthylène (3)	

### II.2.2. Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux [20].

### II.2.3. Injecteur

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (1, 10, 20, 50  $\mu\text{L}$ ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne [19].

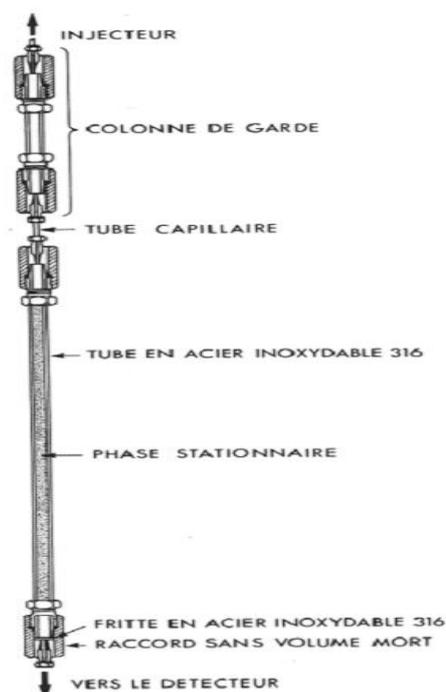
- *Vanne à boucle d'échantillonnage*

Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (injecte).

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue. Actuellement, les appareils pour HPLC sont munis des auto-échantillonneurs et injecteurs, le volume injecté est programmé.

#### II.2.4. Colonne

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne inférieur ou égal à 4,6 mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25 cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10  $\mu\text{m}$  ou même moins. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme des colonnes de gros diamètre seront nécessaires [20].



*Figure II.06 : Quelques types de colonnes pour HPLC [18].*

- **Les gels de silice**

Excepté quelques nouvelles phases constituées par des polymères organiques, le gel de silice est le matériau de base des phases stationnaires des colonnes HPLC [18].

Ce matériau doit être exempt de tout ion métallique et les grains doivent être de dimension régulière. Ces gels de silices :

- Sont résistants à la pression (ils résistent à l'écrasement sous 1000 bars) ;
- ont des surfaces spécifiques de l'ordre de  $350 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  ;
- comportent des groupements silanols (groupement Si-OH) à leur surface à raison de 5 groupements par  $\mu\text{m}^2$  environ, ce qui confère au gel de silice ses propriétés polaires.

- **Les gels de silice greffée**

La plupart des silices greffées sont préparées par la réaction d'un organochlorosilane avec les groupements silanols à la surface du gel de silice. Cette réaction se fait par hydrolyse dans l'acide chlorhydrique dilué et chaud :



Où R est un groupement n-octyle (-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>) ou un groupement octadécylique (-C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>). D'autres groupements fonctionnels peuvent être greffés (amines aliphatiques, éthers, nitriles, hydrocarbures aromatiques) pour étendre la gamme de polarité des phases stationnaires.

Ces supports chromatographiques sont stables thermiquement et difficilement hydrolysables dans le domaine de pH compris entre 2 et 7.

### **II.2.5. Détecteur**

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule. Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne [20].

Il existe d'autres détecteurs :

- Réfractomètre différentiel.
- UV à barrette de diodes.
- Electrochimique.
- Fluor métrique.

Ainsi, il existe aussi différents types de couplage :

- Spectrométrie infrarouge.
- Spectrométrie de masse.
- Résonance magnétique nucléaire.

### **II.2.6. Intégrateur**

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Il faut donc avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic. La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres :

- ✓ La largeur attendue des pics.
- ✓ Le seuil d'intégration (sensibilité).

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic [19].

### **III.3. Conclusion**

A partir des informations exposées dans ce chapitre, on peut conclure que :

- La chromatographie de partage est la plus usuelle et permet la mise en œuvre de deux types de phase stationnaire :
  - Une phase stationnaire normale (polaire) : qui nécessite l'utilisation d'une phase mobile peu polaire (hydrocarbures).
  - Une phase stationnaire inverse ou greffée (non polaire) : qui nécessite l'utilisation d'une phase mobile polaire (mélange : eau-méthanol ; eau-acétonitrile ; eau-tétrahydrofurane).
- Dans tout appareil de chromatographie liquide à haute performance, on retrouvera toujours les éléments de base suivant : réservoir de la phase mobile, pompe, injecteur, colonne, détecteur et intégrateur.

***Chapitre III***  
***Matériels et méthodes***

### **III.1. Introduction**

Ce chapitre est consacré à présenter en détail tout le nécessaire pour réaliser la partie expérimentale et celle théorique de ce travail en l'occurrence : matériel, réactifs, modes opératoires et méthodes de calcul et d'analyse des interactions entre la quercétine (Q) et le cis-stilbène (S).

### **III.2. Matériels**

La conduite de ce travail a nécessité l'utilisation de différents matériels d'importance variée tels que :

- Verrerie usuelle de laboratoire.
- Balance analytique (sortoniuscp 2245).
- HPLC-DAD du type Agilent, série 1260 Infinity.

### **III.3. Solvants et réactifs**

Les solvants que nous avons utilisés en chromatographie sont de grade HPLC (l'acétonitrile et le méthanol). L'acide trifluoroacétique ajouté à la phase mobile et les composés purs étudiés (Quercétine et cis-stilbène) sont d'une pureté supérieure à 96 %. L'eau utilisée est l'eau ultra pure.

### **III.4. La méthode d'analyse (chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes « HPLC-UV-DAD »)**

#### **III.4.1. Constituants de l'appareil pour HPLC (Agilent, série 1260 Infinity)**

Un appareil HPLC-DAD de type Agilent, série 1260 Infinity (**Figure III.01**) est muni d'un réservoir contenant la phase mobile, d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur (G1354A), d'un auto-échantillonneur (G1313A), d'un compartiment de colonne thermostatée (G1316A) et d'un détecteur à barrette de photodiodes (G1315B). La colonne de type C18 à silice greffée.

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel de chromatographie ChemStation.

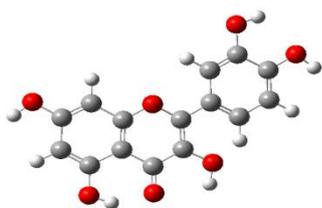
Les appareils à barrette de diodes donnent la lecture simultanée des intensités lumineuses sur tout le spectre et permettent l'obtention de chromatogrammes en trois dimensions [11].



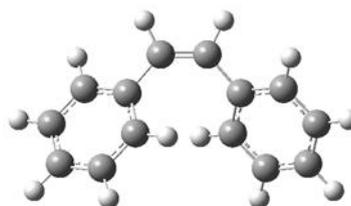
*Figure III.01: Appareil HPLC (Agilent série 1260 Infinity) utilisé. (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).*

### III.5. Propriétés physicochimiques des réactifs

Les structures moléculaires et quelques caractéristiques physicochimiques des réactifs étudiés (quercétine et cis-stilbène) sont représentées par les figures (III.02) et (III.03), respectivement et regroupées dans le tableau (III.01).



*Figure III.02: Structure de la quercétine.*



*Figure III.03: Structure de cis-stilbène.*

Tableau III.01: Quelques propriétés physicochimiques des réactifs [02, 37].

Molécule	Formule brute	Masse Molaire (g/mol)	Solubilité	Apparence
Quercétine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302,2357 ± 0,0148 g/mol C 59,61 %, H 3,33 %, O 37,06 %	Pratiquement insoluble dans l'eau; soluble dans le méthanol et les solutions alcalines aqueuses	Jaune, poudre cristalline
Cis-stilbène	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub>	180,250	Pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol et le méthanol	Liquide

### III.6. Méthodes de préparation et d'injection des réactifs

Nous avons préparé une solution mère de la quercétine par solubilisation de 1mg de ce composé pur dans 10 ml de méthanol.

La solution mère de stilbène pur a été préparée à partir de 180 µl de ce dernier dans 1ml de méthanol.

Comme le stilbène est très visqueux, une dilution a été effectuée en prélevant 10 µl de la solution mère pour préparer une solution méthanolique de 1000 µl de volume.

Un volume de 01 µl de chaque réactif pur a été injecté en triplicata dans l'HPLC.

Il est a signalé que toutes les solutions obtenues ont été bien conservées dans un congélateur.

### III.7. Méthodes de préparation et d'injection des mélanges quercétine-stilbène

Les interactions entre la quercétine et le stilbène ont été étudiées en faisant réagir les deux substances pures dans le méthanol, la température de la colonne a été fixée à  $25 \pm 0,1$  °C. Tout d'abord 0,1  $\mu\text{l}$  de cis-stilbène seul a été injecté ; le pic correspondant avait la même intensité que celui obtenu par l'injection de 0,9  $\mu\text{l}$  de la quercétine pure. Pour cela le mélange a été préparé en prélevant 1  $\mu\text{l}$  de (S) et 9  $\mu\text{l}$  de (Q). Un volume de 1  $\mu\text{l}$  du mélange réactionnel a été analysé en HPLC-DAD.

#### III.7.1. Etude de l'effet de la concentration

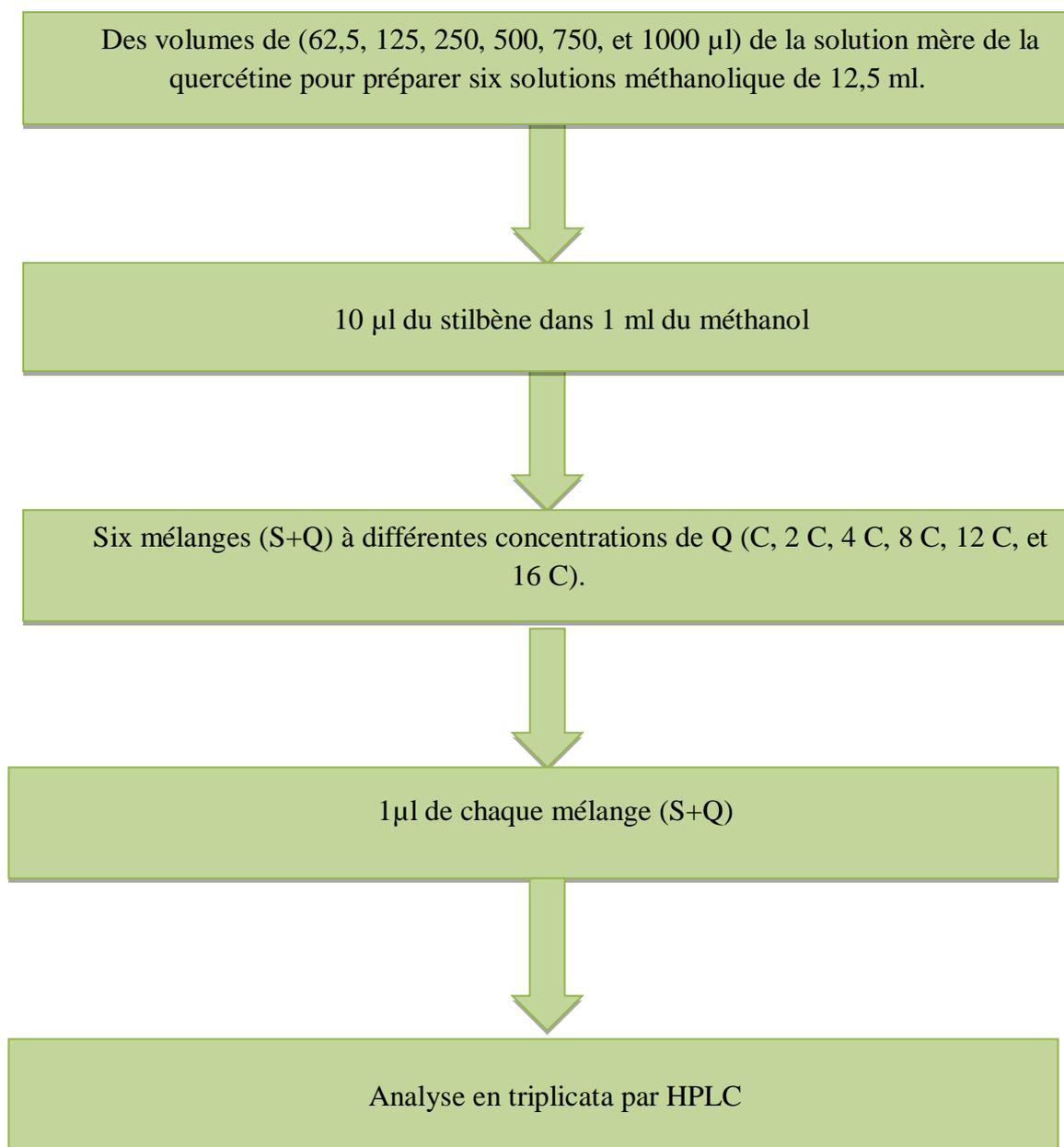
L'effet de la concentration sur la réaction a été étudié en préparant six mélanges réactionnels de (Q+S). La concentration de (S) a été fixée ( $C=1,8 \cdot 10^{-6}$  M). En revanche la quercétine (Q) a été préparée à différentes concentrations (C, 2 C, 4 C, 8 C, 12C et 16 C). (Tableau III.02).

L'analyse par HPLC des six mélanges a été réalisée en fixant la température de la colonne à  $25 \pm 0,1$  °C.

Tableau III.02: Différentes concentrations et volumes de la quercétine.

Volume de quercétine en $\mu\text{l}$	Volume de méthanol en ml	Concentration de la quercétine en (M)
62,5	12,5	$C= 01,80 \cdot 10^{-6}$
125	12,5	$2 C= 03,60 \cdot 10^{-6}$
250	12,5	$4 C= 07,06 \cdot 10^{-6}$
500	12,5	$8 C= 13,80 \cdot 10^{-6}$
750	12,5	$12 C= 20,40 \cdot 10^{-6}$
1000	12,5	$16 C= 26,70 \cdot 10^{-6}$

La figure (III.04) illustre le protocole expérimental utilisé pour l'analyse du mélange réactionnel (S+Q).



*Figure III.04: Protocole de préparation du mélange quercétine- stilbène (Q+S).*

### III.7.2. Etude de l'effet de la Température

L'effet de la température sur le mélange réactionnel a également été étudié. Les analyses ont été effectuées sur le mélange ayant l'intensité du pic la plus élevée, en faisant varier la température de la colonne selon l'ordre suivant ( $10 \pm 0,1$  °C,  $20 \pm 0,1$  °C,  $25 \pm 0,1$  °C,  $30 \pm 0,1$  °C,  $40 \pm 0,1$  °C et  $45 \pm 0,1$  °C).

### **III.7.3. Effet du temps**

L'effet du temps sur la stabilité des complexes obtenus a été étudié après 01 heure, 03 heures, 24 heures et 72 heures de la réaction. Une analyse en triplicata à une température de  $25 \pm 0.1$  °C a été réalisée sur l'un des mélanges (S+Q).

### **III.8. Analyse par HPLC-UV-DAD des réactifs et des mélanges**

#### **III.8.1. Conditions de l'analyse**

Pour cette analyse, le débit de la phase mobile a été fixé à 1ml /min. La détection du stilbène a été réalisée à 286 nm ; la longueur d'onde maximale d'absorption de la quercétine est 375 nm. La séparation a été réalisée en mode isocratique et en phase inverse.

#### **III.8.2. Phase mobile**

Dans cette étude le solvant de la phase mobile utilisé est l'acétonitrile aqueux; (ACN/H<sub>2</sub>O) 60%/ 40% avec 0.0025 % de TFA.

#### **III.8.3. Phase stationnaire**

Le matériau de la phase stationnaire est la silice greffée avec C18. Ce matériau est contenu dans une colonne de marque Zorbax Eclipse Plus C 18 (analytique 4,6 x 250 mm, 5-Micron) (Agilent, USA).

### **III.9. Injection**

L'appareil HPLC-UV-DAD analytique est équipé d'un injecteur automatique, les échantillons ont été préparés dans des cupules spéciales et injectés dans la colonne. Le volume d'injection était de 1µl. L'appareil HPLC a été programmé pour exécuter une série de trois analyses consécutives.

### **III.10. Étude par modélisation moléculaire**

#### **III.10.1. La modélisation moléculaire**

La modélisation moléculaire a pour but de prévoir la structure et la réactivité des molécules ou des systèmes de molécules. Les méthodes de la modélisation moléculaire comprennent : les méthodes quantiques, la mécanique moléculaire et la dynamique moléculaire [28].

Dans ce travail, les calculs de modélisation des réactifs et du mélange réactionnel (quercétine et stilbène) ont été effectués avec le logiciel GAUSSIAN 09.

Les structures obtenues ont été optimisées par la méthode DFT avec la fonctionnelle hybride B3LYP et la base 6-311++G (d,p) dans le méthanol. B3LYP est connu pour fournir des résultats précis de la structure et des propriétés thermodynamiques des composés phénoliques. Les calculs incluent l'optimisation de la géométrie de la quercétine et l'étude de son activité antioxydante.

### **III.11. La méthode de calcul**

La Théorie de la fonctionnelle de la densité DFT (Density Functional Theory) est une reformulation du problème quantique à N corps en un problème monocorps avec pour paramètre la densité électronique. Elle a été développée par Hohenberg, Kohn et Sham pour le calcul de la structure électronique de la matière dans le cadre de la théorie quantique non-relativiste [29,30]. L'idée centrale de la DFT est que la seule densité électronique de l'état fondamental du système détermine entièrement les valeurs moyennes des observables comme l'énergie, par exemple [31,32]. Aujourd'hui, la DFT constitue l'une des méthodes les plus utilisées pour les calculs quantiques de structure électronique en chimie quantique et en physique de la matière condensée. La DFT a été étendue au domaine de la mécanique quantique dépendante du temps et au domaine relativiste [33].

### **III.12. Logiciel utilisé**

Les méthodes DFT sont maintenant standards dans pratiquement tous les logiciels les plus populaires, y compris Gaussian.

#### **III.12.1. Gaussian**

D'actualité dans le monde scientifique, le programme GAUSSIAN a permis de faire entrer la chimie quantique dans les laboratoires de chimie, de biochimie, de biotechnologie, de physique et de pharmacologie. De son histoire, ce logiciel est basé sur le travail de John Pople qui consistait à développer des simplifications dans l'équation de Schrödinger dans le but de la rendre aisément applicable à l'étude des molécules aussi bien simples que complexes. De part ces simplifications, John Pople a développé en 1970 un programme informatique nommé GAUSSIAN permettant de calculer la conformation moléculaire des molécules avec les longueurs des liaisons chimiques ainsi que les angles de liaison entre les atomes. Ce programme a été ensuite amélioré progressivement. En 1992, la théorie de Walter Kohn a été intégrée. Différentes approches de la chimie quantique ont été rajoutées depuis, 1992 à ce programme, notamment celle des fonctions de densité électronique de Walter Kohn. Ce programme a révolutionné les méthodes de travail : il a permis aux chercheurs de prévoir

et de visualiser par le calcul et avec des images virtuelles l'évolution d'une réaction chimique sans passer par l'expérience [34].

Un logiciel de modélisation moléculaire comprend de manière générale les modules suivants :

- Construction, visualisation et manipulation des molécules.
- Calculs.
- Sauvegarde des structures et gestion des fichiers.
- Etude des propriétés moléculaires.

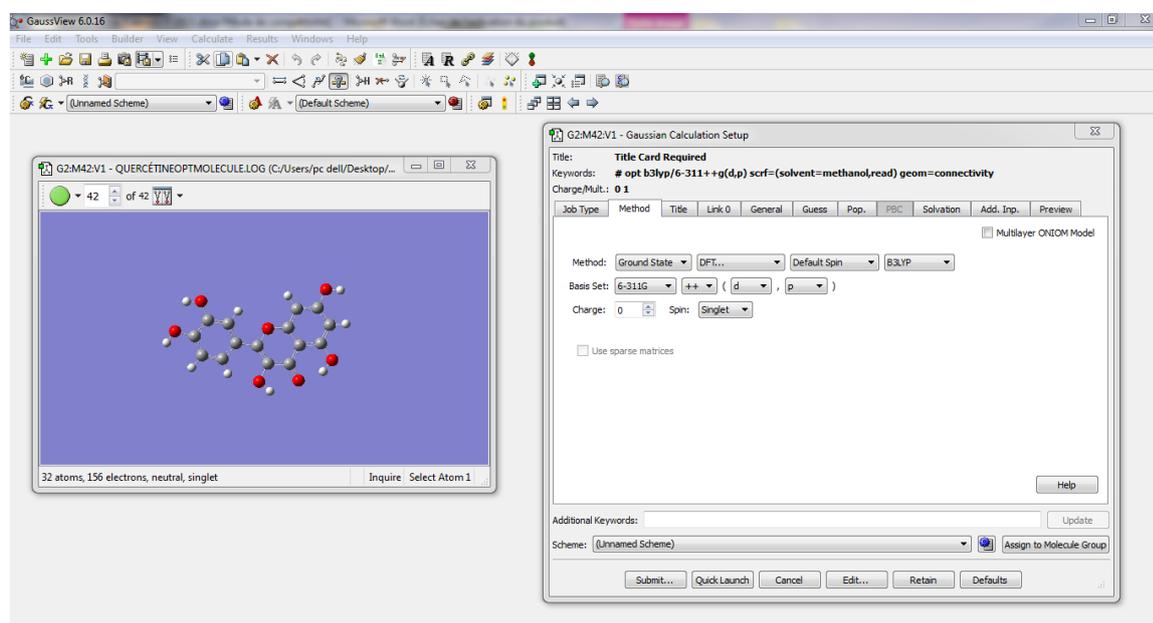


Figure III.05 : Menu graphique du logiciel GaussianView 6.0.16.

### III.13. Etude de l'activité antioxydante

Deux descripteurs ont été utilisés pour étudier l'activité antioxydante de la quercétine :  
**L'enthalpie de dissociation de liaison (BDE):** Qui est un paramètre thermodynamique très important pour évaluer la capacité des antioxydants à piéger les radicaux libres. Il est associé au mécanisme "HAT" (transfert d'atome d'hydrogène). Plus la valeur de BDE est faible, plus la capacité antioxydante est élevée [35].

$$\text{BDE} = \text{H}(\text{ArO}\cdot) + \text{H}(\text{H}\cdot) - \text{H}(\text{ArOH}) \quad \text{III.01}$$

**L'enthalpie de dissociation du proton (PDE) :** L'enthalpie de dissociation des protons est un paramètre physique important décrivant les propriétés antioxydantes du composé étudié,

car il montre sa capacité à donner des protons. Les composés qui ont les plus faibles valeurs de PDE sont plus sensibles à l'abstraction des protons et sont donc les antioxydants les plus puissants [36].

$$\text{PDE} = \text{H}(\text{ArO}\cdot) + \text{H}(\text{H}^+) - \text{H}(\text{ArOH}^{\cdot+}) \quad \text{III.02}$$

#### **III.14. Conclusion**

Après le détail du matériel et des méthodes mises en œuvre dans ce chapitre, nous pouvons constater que la méthode d'analyse choisie pour notre étude est une méthode simple, efficace et adéquate ; en fait, l'HPLC-UV-DAD a permis d'identifier et d'analyser avec une grande précision, les réactifs. En revanche la modélisation moléculaire qui joue un rôle complémentaire de la chimie expérimentale a permis de représenter graphiquement la géométrie et la configuration la plus stable de la quercétine (Q), et d'étudier son activité antioxydante.

***Chapier IV***  
***Résultats et discussions***

## IV.1. Introduction

Dans ce chapitre nous commençons par la présentation des principaux résultats auxquels cette étude a mené. En l'occurrence, les chromatogrammes obtenus par HPLC- UV-DAD des réactifs et de leur mélange, la mise en évidence des interactions entre le stilbène (S) et la quercétine (Q) en tant que prooxydant et antioxydant et la formation de leur complexe ainsi que l'étude de l'effet de quelques paramètres (la concentration, la température et le temps) sur ces interactions.

Ensuite nous présenterons l'étude de l'activité antioxydante de la quercétine (Q).

## IV.2. Résultats

### IV.2.1. Partie expérimentale

#### IV.2.1.1. Données chromatographiques de la quercétine (Q)

La figure (IV.01) montre le chromatogramme de la quercétine pure (Q). La longueur d'onde maximale d'absorption étant à 375 nm et le temps de rétention est 2,95 min.

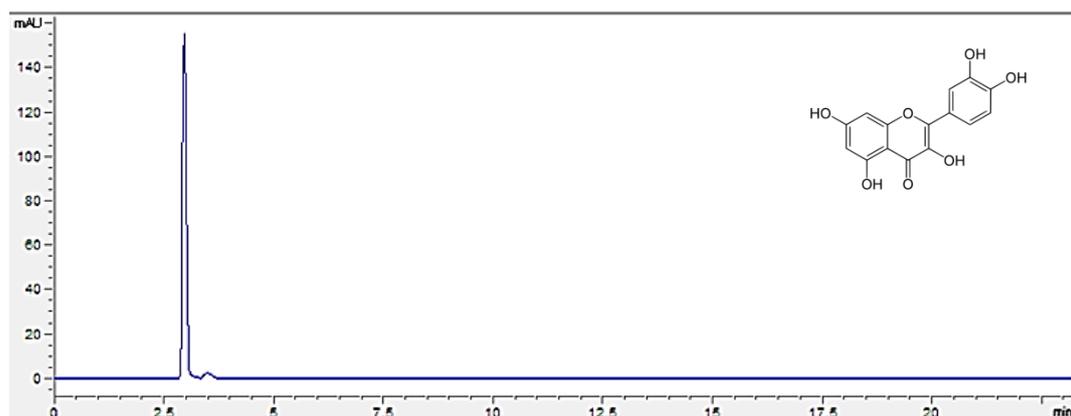


Figure IV.01 : Chromatogramme de la quercétine ;  $T_{R\ moy}=2,95\ min$ ,  $\lambda_{max}=375\ nm$ .

Tableau IV.01 : Données HPLC de la quercétine (Q).

Volume injecté (µl)	$T_R$ (Moy) (min)	Amplitude 1 (mAU)	Amplitude 2 (mAU)	Amplitude 3 (mAU)	Ecart type
01	02,95	155,80	144,50	148,00	05,78

#### IV.2.1.2 Données Chromatographiques du stilbène (S)

La figure (IV.02) montre le chromatogramme du stilbène pur (S). La longueur d'onde maximale d'absorption étant à 286 nm et le temps de rétention est 20,89 min.

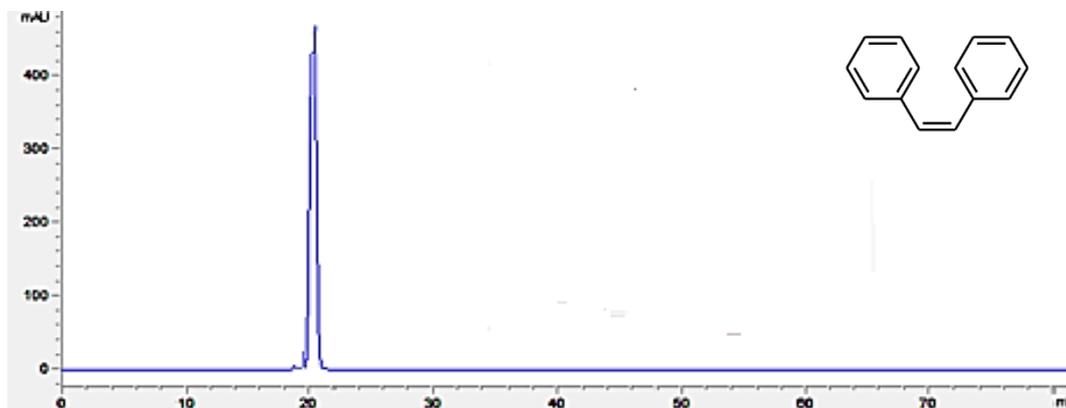


Figure IV.02 : Chromatogramme de cis-stilbène;  $T_{R\text{ moy}}=20,89\text{ min}$ ,  $\lambda_{\text{max}}=286\text{ nm}$ .

Tableau IV.02 : Données HPLC du cis-stilbène.

Volume injecté (µl)	$T_R$ (Moy) (min)	Amplitude 1 (mAU)	Amplitude 2 (mAU)	Amplitude 3 (mAU)	Ecart type
01	20,89	467,30	490,30	481,20	11,45

#### IV.2.1.3 Données Chromatographiques du mélange (S+Q)

Le chromatogramme du mélange (S + Q) dans lequel ; il y a apparition de deux pics distincts qui correspondent à deux nouveaux composés (produits de la réaction), est montré par la figure (IV.03).

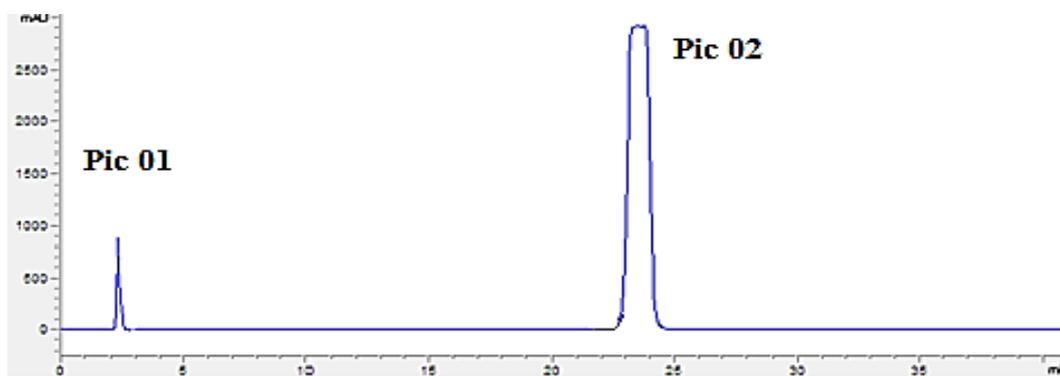
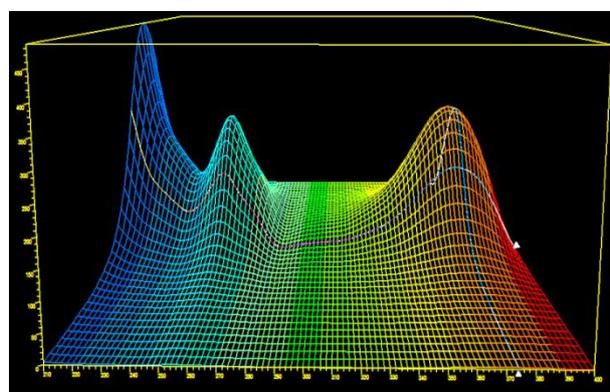
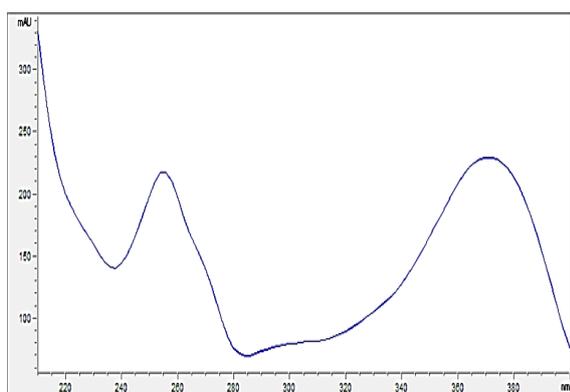


Figure IV.03 : Chromatogramme du mélange (pic 01:  $T_{R\text{ moy}}=02,50\text{ min}$ ,  $\lambda_{\text{max}}=310\text{ nm}$ , pic 02:  $T_{R\text{ moy}}=24,00\text{ min}$ ,  $\lambda_{\text{max}}=310\text{ nm}$ ).

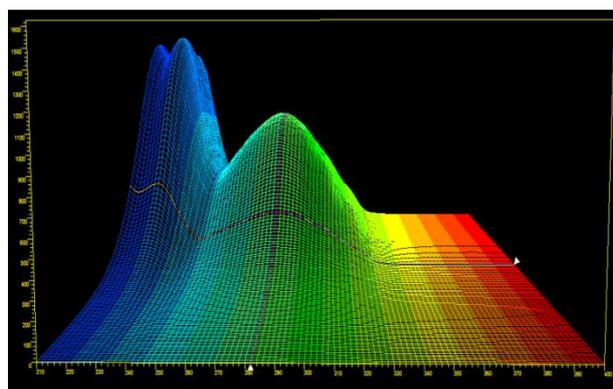
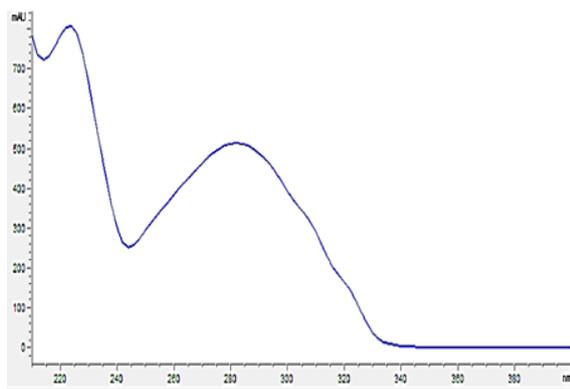
Tableau IV.03 : Données HPLC du mélange (S+Q).

Pic	T <sub>R</sub> (Moy) min	Amplitude 1 mAU	Amplitude 2 mAU	Amplitude 3 mAU	Ecart type
1	02,50	0900	897	898	1,53
2	24,00	2998	3000	2995	2,52

Les spectres UV-visible en 2D et 3D des réactifs et de leurs mélanges ont été obtenus par HPLC-UV-DAD; *Figure (IV.04) à (IV.05)*.

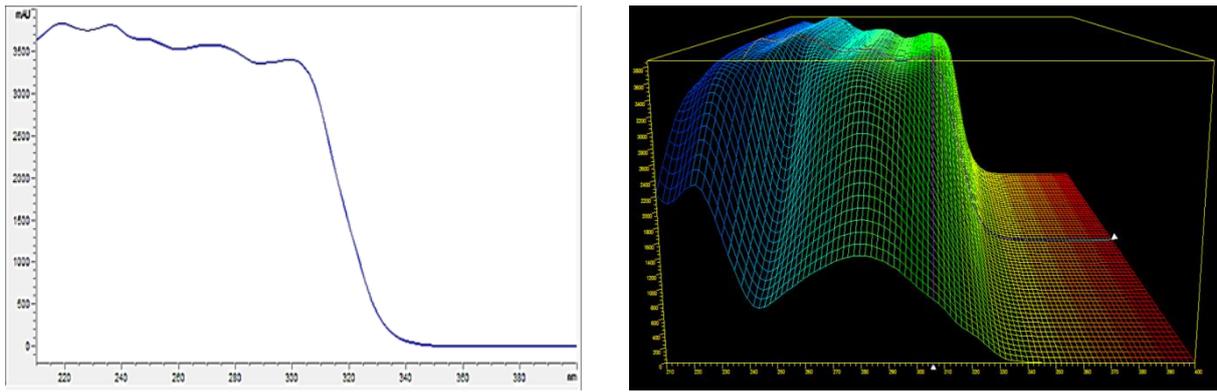


(a)

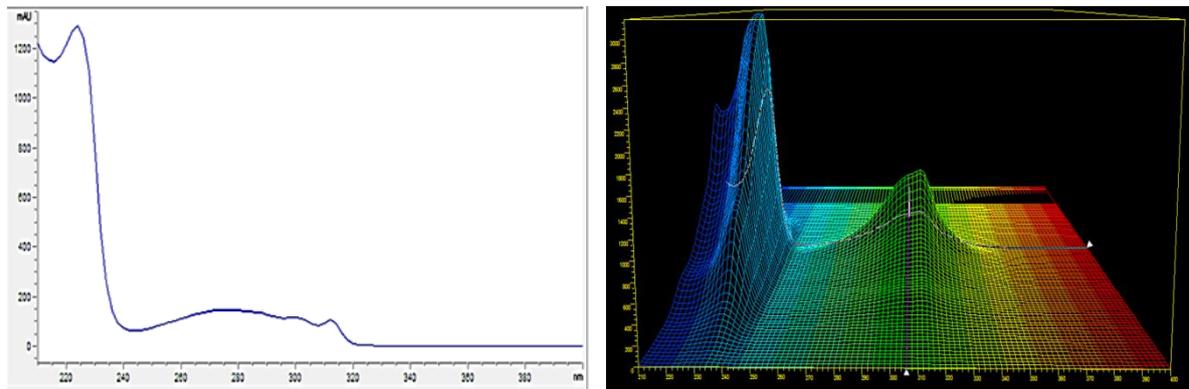


(b)

Figure IV.04 : Spectre UV-visible de la quercétine (a) et de (Z)-stilbène (b) en 2D et 3D.



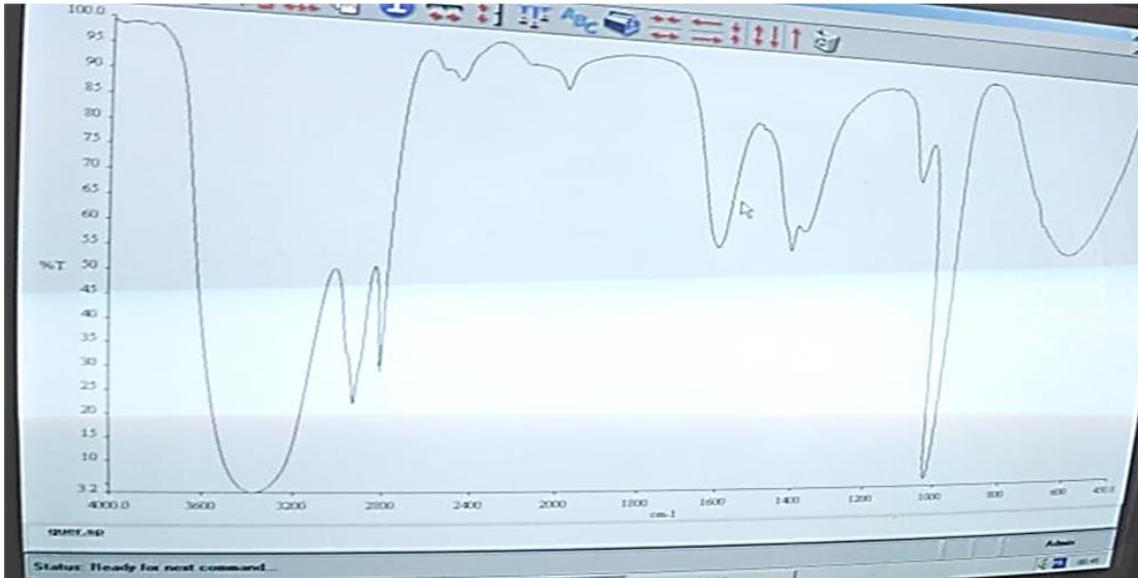
(c)



(d)

Figure IV.05 : Spectre UV-visible du mélange; pic 01 (d) et pic 02 (c) en 2D et 3D.

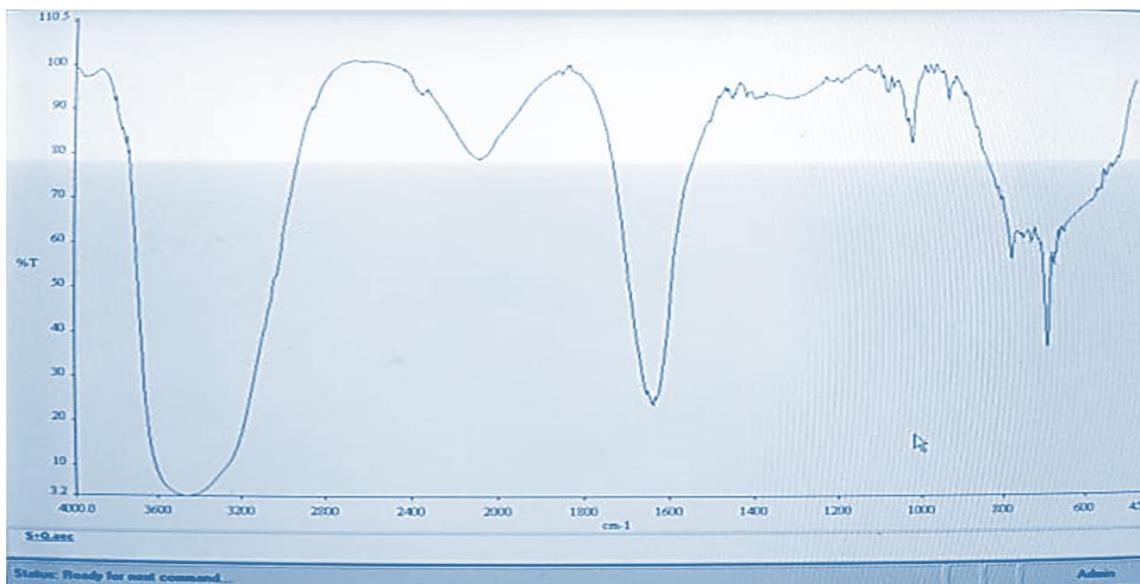
Un autre moyen préliminaire attestant la formation d'un complexe à partir de deux réactifs libres, est la spectroscopie infrarouge. Les spectres infrarouges des réactifs et de leur mélange ont été réalisés au laboratoire de recherches et d'analyses industrielles et génie des matériaux (LAIGM) de l'université de Guelma; **Figure (IV.06)**.



(a)



(b)



(c)

Figure IV.06 : Spectres infrarouge des réactifs et du produit de réaction : quercétine (a), cis stilbène (b), et produit de réaction du cis stilbène et de la quercétine (c).

#### IV.2.1.4. Etude paramétrique du mélange

##### IV.2.1.4.1. Effet de la concentration

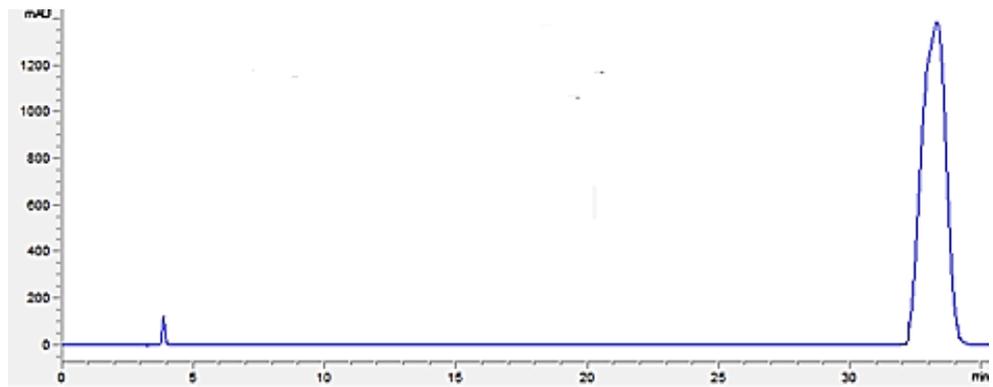
Les analyses du mélange ont été réalisées à une température de  $25 \pm 0,1$  °C et à différentes concentrations de (Q) (C, 2 C, 4 C, 8 C, 12 C et 16 C) tout en fixant celle de (S) ( $C=1,8 \cdot 10^{-6}$  M).

La figure (IV.07) regroupe les différents chromatogrammes obtenus par cette analyse.

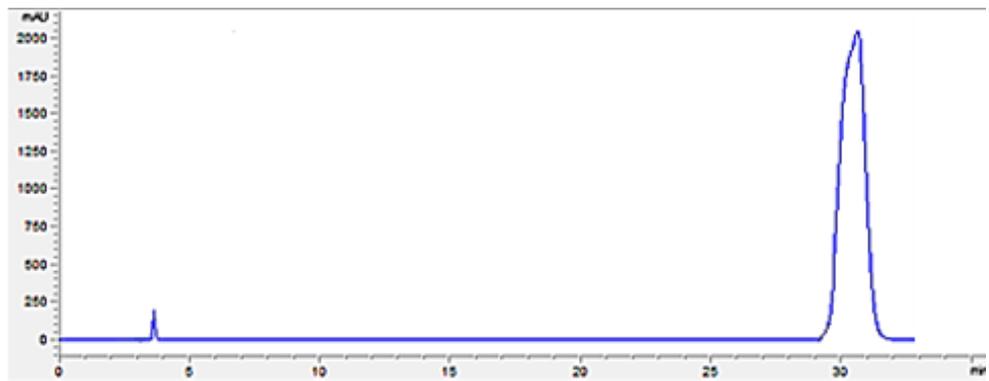
- (Q+S)



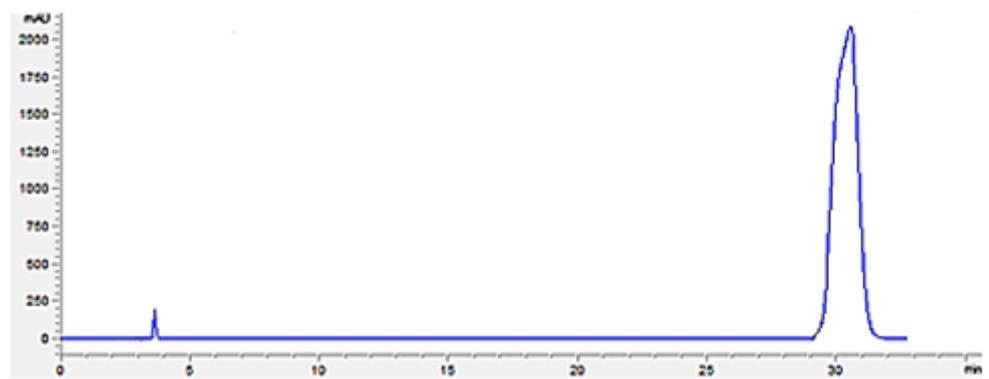
- (2Q+S)



- (4Q+S)



- (8Q+S)



- (12Q+S)



- (16Q+S)



Figure IV.07 : Chromatogrammes des mélanges (Q+S) à différentes concentrations de Q (C, 2C, 4 C, 8 C, 12 C et 16 C).

Les résultats de l'effet de la concentration sur le mélange sont résumés dans le tableau (IV.04).

**Tableau IV.04 : Données HPLC du mélange (pic 1 et pic 2) à différentes concentrations de Q (C, 2 C, 4 C, 8 C, 12 C et 16 C). Volume d'injection (1 µl).**

<b>Concentration de Q (M)</b>	<b>Mélange</b>	<b>Pic</b>	<b>Temps de rétention T<sub>R</sub> (Moy) (min)</b>	<b>Amplitude (Moy) (mAU)</b>
C	(Q+S)	1	03,85	0126,9
		2	33,30	1305,1
2 C	(2 Q+S)	1	03,86	0125,0
		2	33,29	1385,1
4C	(4 Q+S)	1	03,60	0198,2
		2	30,40	2082,6
8 C	(8 Q+S)	1	03,70	0142,1
		2	30,20	2120,6
12 C	(12 Q+S)	1	03,82	0180,6
		2	28,10	2170,1
16 C	(16 Q+S)	1	03,80	0177,7
		2	27,40	2135,8

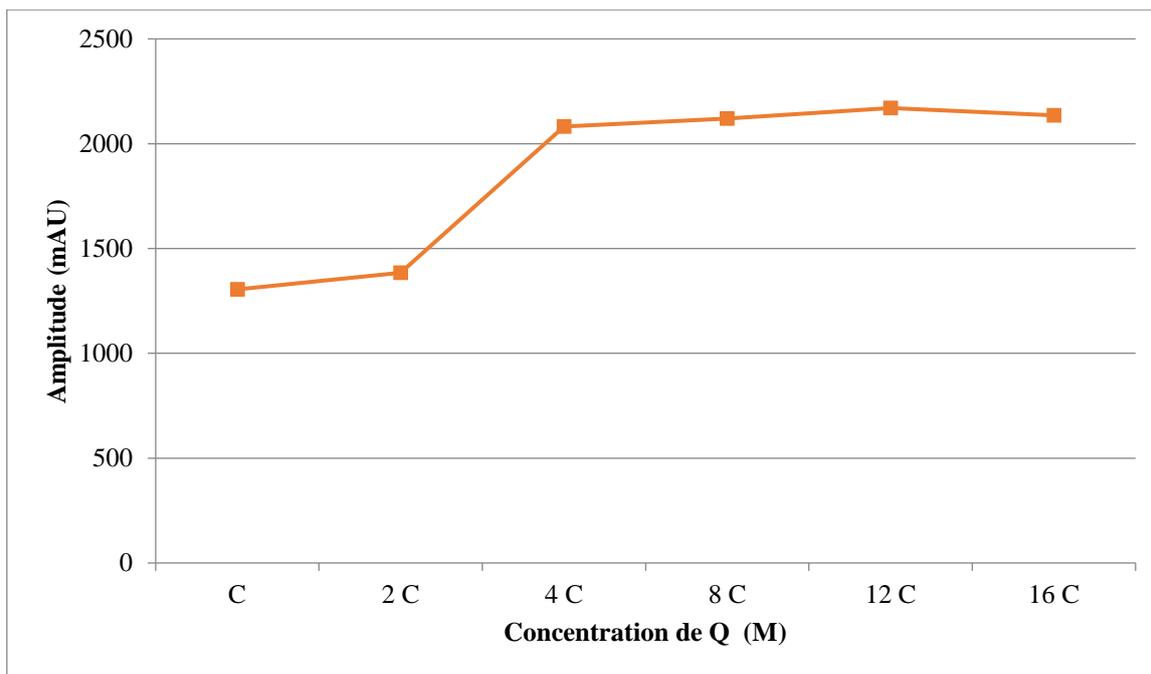


Figure IV.08 : Effet de la concentration sur l'intensité du mélange (pic majoritaire).

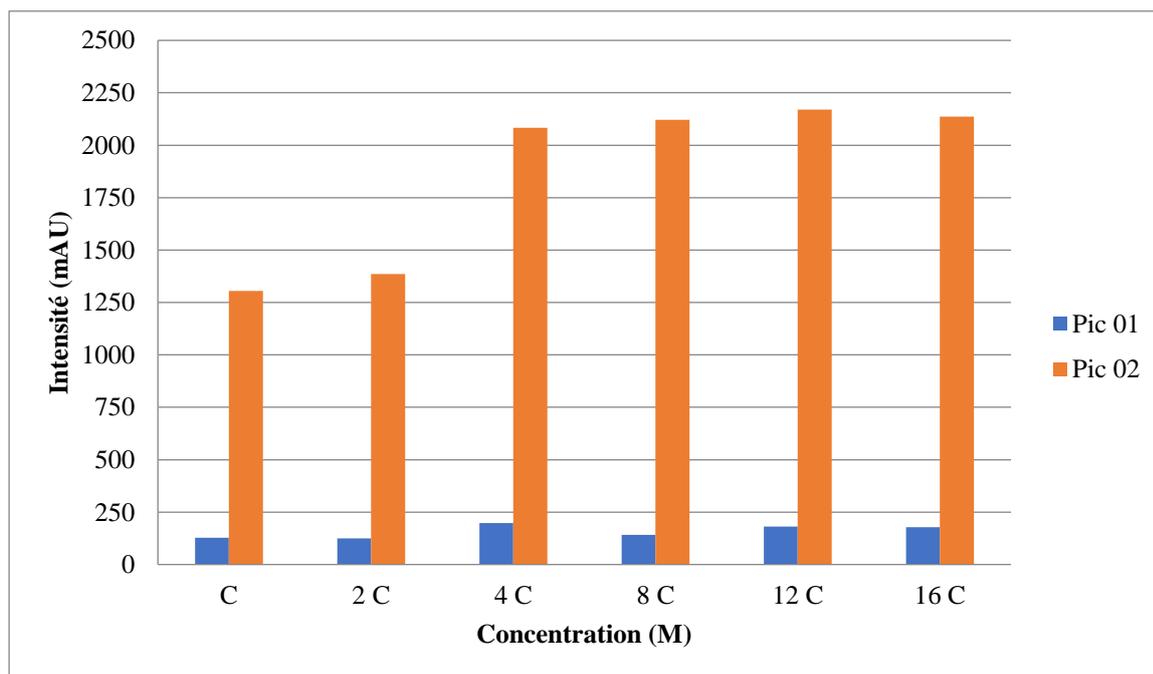


Figure IV.09 : Diagramme représentant la variation de l'amplitude du mélange en fonction de la concentration.

Le temps de rétention des pics obtenus, est aussi affecté par la variation de la concentration de la quercétine dans le mélange réactionnel; **Figure (IV.10)**.

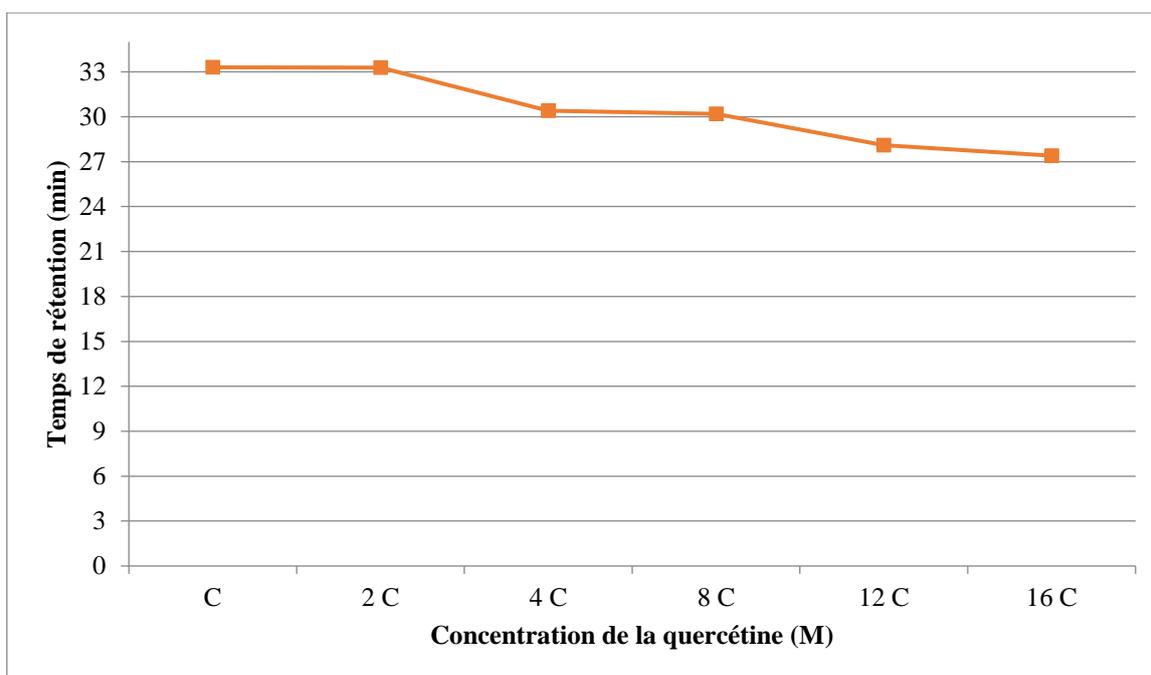


Figure IV.10 : Variation du temps de rétention du pic majoritaire en fonction de la concentration.

#### IV.2.1.4.2.Effet de la température

Ayant l'intensité du pic la plus élevée Le mélange (S+12 Q) a été choisi pour l'étude par HPLC-UV-DAD de l'effet de la température de la colonne sur les interactions stilbène-quercétine.

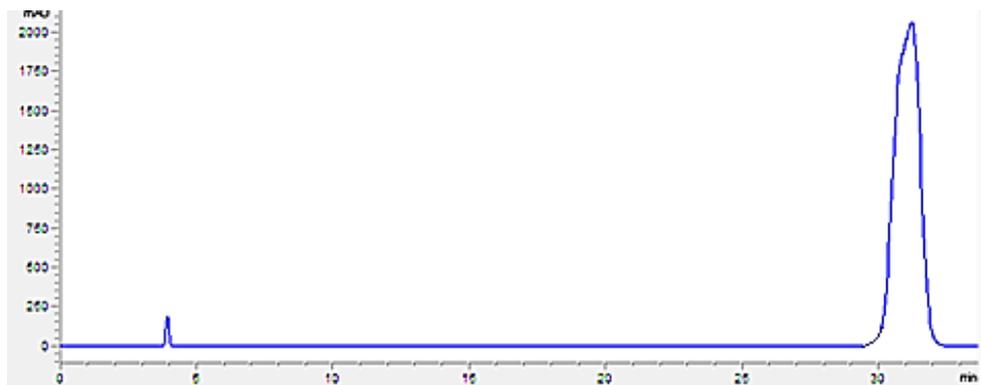
Les températures étudiées pour cette analyse sont (10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 40 °C et 45 °C).

Les résultats obtenus sont montrés par les chromatogrammes (**Figure (IV.11)**) et récapitulés dans le tableau (IV.05).

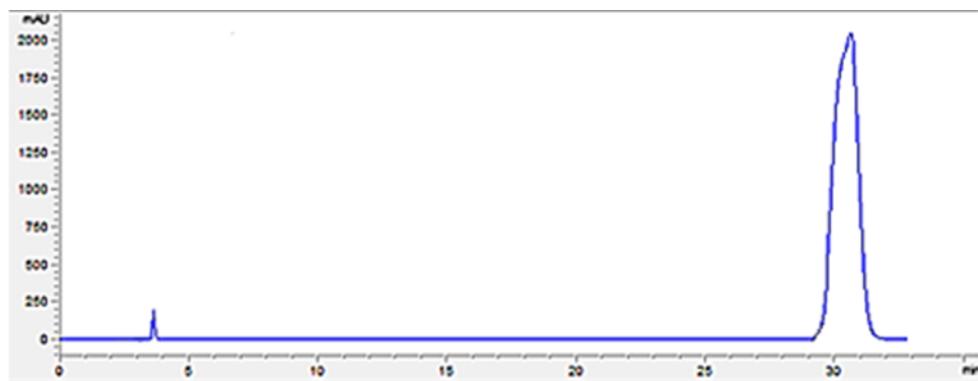
- 10 °C



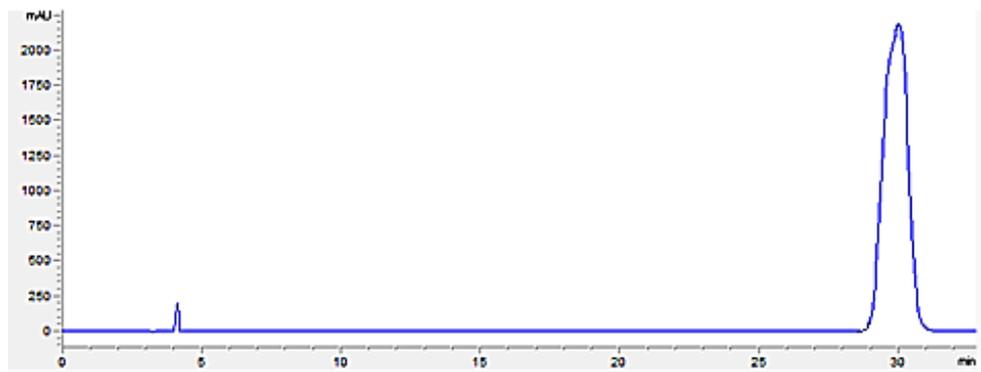
- 20°C



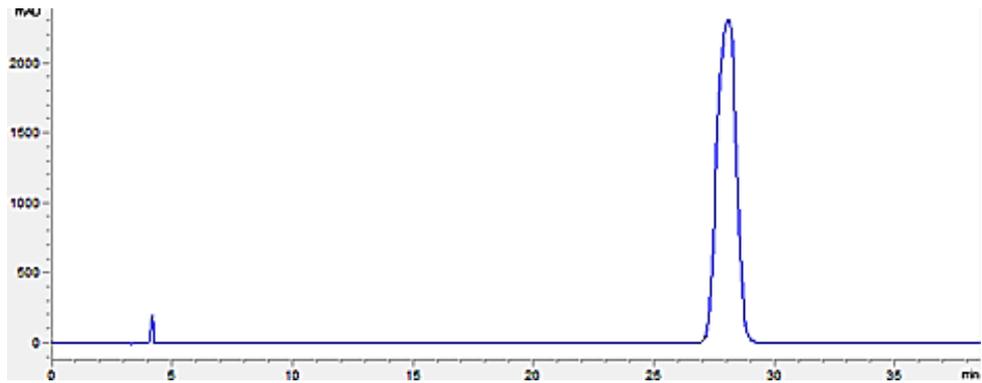
- 25°C



- 30°C



- 40°C



- 45°C

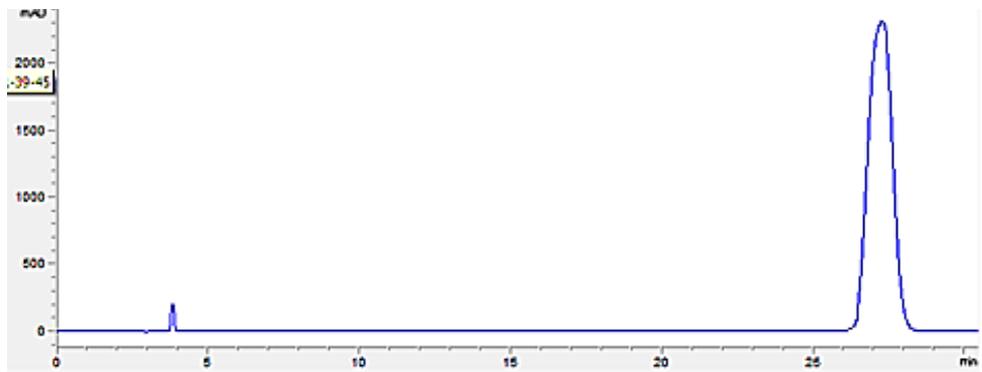


Figure IV.11 : Chromatogrammes du mélange (12 Q+S) à différentes températures de la colonne (°C).

**Tableau IV.05: Données HPLC du mélange (pic 1 et pic 2) à différentes températures de la colonne (10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 40 °C et 45 °C). Volume d'injection (1 µl).**

<b>Température (valeur ± 0,1 °C)</b>	<b>Mélange (S+12 Q)</b>	<b>Temps de rétention T<sub>R</sub> (Moy) (min)</b>	<b>Intensité (Moy) (mAU)</b>
10	Pic 1	03,85	0192,3
	Pic 2	32,70	2038,6
20	Pic 1	03,90	0193,6
	Pic 2	31,20	2064,9
25	Pic 1	03,82	0198,2
	Pic 2	30,40	2082,6
30	Pic 1	04,11	0201,0
	Pic 2	30,00	2186,7
40	Pic 1	04,15	0202,9
	Pic 2	28,10	2304,5
45	Pic 1	04,21	0215,7
	Pic 2	26,38	2499,3

Les figures (IV.12) et (IV.13) montrent les variations des amplitudes des pics du mélange en fonction de la température de la colonne, en particulier le pic 02 (composé majoritaire).

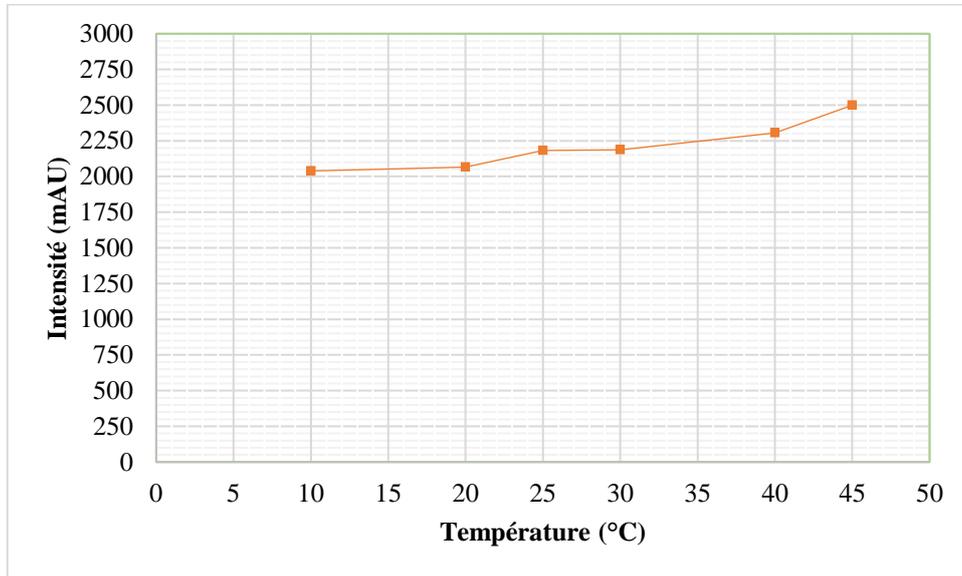


Figure IV.12 : Variation de l'intensité du pic majoritaire du mélange en fonction de la température.

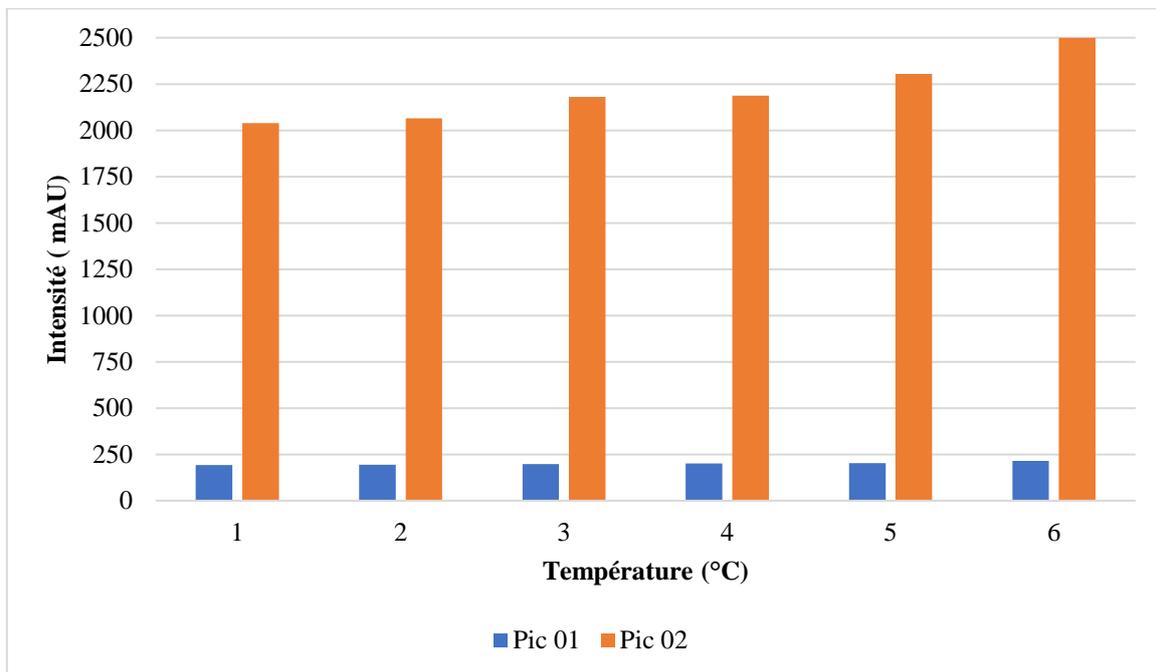


Figure IV.13 : Diagramme représentant l'effet de la température sur l'intensité des pics dans le mélange (S+12Q).

Les figures (IV.14) et (IV.15) illustrent l'influence de la température de la colonne sur le temps de rétention du produit de la réaction.

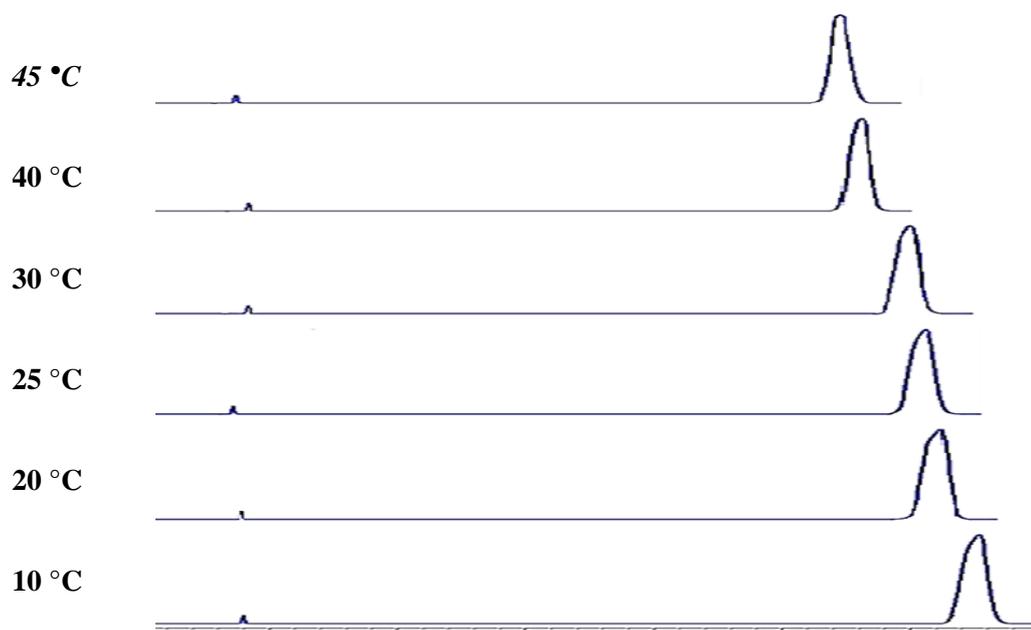


Figure IV.14 : Variation du temps de rétention du pic 02 en fonction de la température.

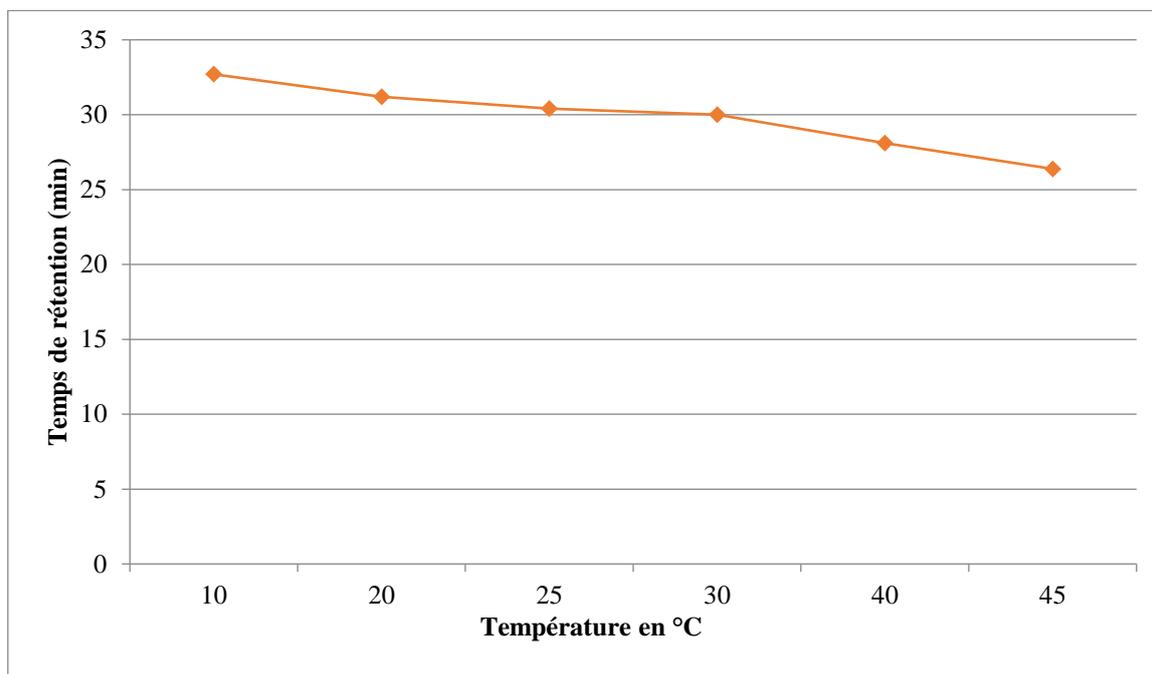


Figure IV.15 : Variation du temps de rétention du pic majoritaire en fonction de la température.

#### IV.2.1.4.3. Effet du temps

Le mélange (S+12Q) a été également analysé après une heure, trois heures, 24 heures et même 72 heures à 25 °C de température, afin d'étudier l'effet du temps de la réaction sur les nouveaux composés (pic 1 et pic 2). Les résultats de cette analyse sont rassemblés dans le tableau (IV.06) et montrés par la figure (IV.16).

**Tableau IV.06: Données HPLC du mélange (S+12Q) (pic 1 et pic 2) à divers temps de la réaction (une heure, 03 heures, 24 heures et 72 heures). Volume d'injection (1 µl).**

Le temps (h)	Mélange (S+12Q)	Temps de rétention $T_R$ (Moy) (min)	Intensité (Moy) (mAU)
01	Pic 1	03,82	0180,6
	Pic 2	28,10	2170,1
03	Pic 1	03,82	0180,6
	Pic 2	28,10	2170,1
24	Pic 1	03,82	0180,6
	Pic 2	28,10	2170,1
72	Pic 1	04,00	0182,3
	Pic 2	29,10	2169,6

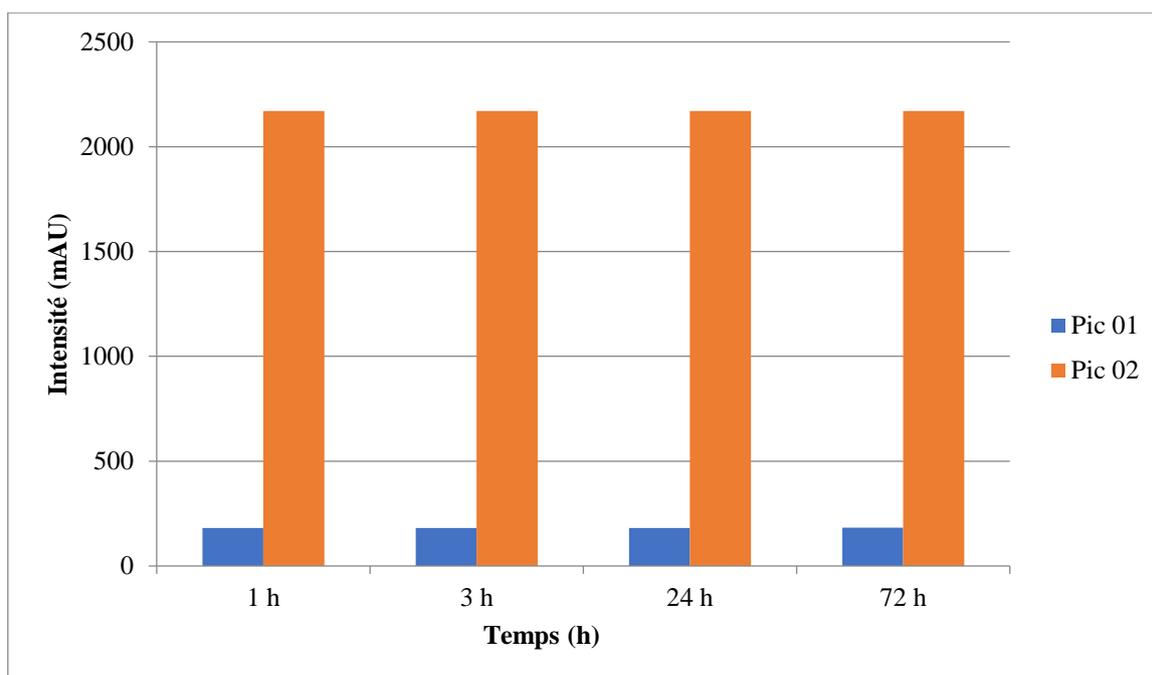


Figure IV.16 : Effet du temps de la réaction sur le mélange (S+I2Q).

## IV.2.2. Discussions

### IV.2.2.1. Mise en évidence des interactions entre le stilbène (S) et la quercétine (Q)

Le cis-stilbène est un perturbateur endocrinien largement présent dans notre quotidien utilisé principalement dans la production de colorants et d'azurants optiques. [38, 39, 40]. Alors qu'il favoriserait certains cancers. Dans le présent travail et pour la première fois, les interactions possibles dans le méthanol pur entre cette substance nocive et la quercétine étant un antioxydant puissant, ont été étudiées par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC-DAD) qui a été utilisée dans des conditions de phase inverse, à température de 25 °C et en régime isocratique.

L'analyse des chromatogrammes obtenus montre que le (Z)-stilbène se détecte à 286 nm et à un temps de rétention de 20,89 min. Alors que la quercétine possède une longueur d'onde d'absorption maximale de 375 nm, et un temps de rétention de 2,95 min. Toutefois le chromatogramme du mélange (S+Q) montre deux pics ; l'un est majoritaire (pic 2) qui se détecte à 24,0 min, l'autre de faible intensité (pic 1) qui a un temps de rétention de 02,5 min.

L'apparition de ces deux pics à des temps de rétention différents de ceux des réactifs et même à des longueurs d'ondes différentes pourrait être expliquée par le déplacement de la configuration de la liaison double; c'est-à-dire la réaction est accompagnée par une

isomérisation du (Z)-stilbène étant le moins stable pour cause de gênes stériques en (E)-stilbène. Il apparaît que lors de ses interactions avec la quercétine une partie de (Z)-stilbène qui cherche à être plus stable, s'est transformée en (E). A partir de là, on peut dire que l'apparition des deux pics est expliquée par la formation de deux nouveaux composés (complexes). L'un correspond à des interactions entre l'isomère (E)-stilbène et la quercétine (pic 1) qui a une affinité avec la phase mobile; donc il est polaire, l'autre est dû aux interactions entre le (Z)-stilbène et la quercétine (pic 2). Ce dernier est retenu par la phase stationnaire, c'est à dire il a une affinité avec cette phase apolaire.

Quatre paramètres ont été étudiés pour la mise en évidence des interactions quercétine–stilbène:

- **L'amplitude :** En comparant les chromatogrammes des réactifs purs et de leur mélange équimolaire, on a constaté qu'il y a une augmentation significative des amplitudes par rapport à celles des composés purs, ce qui est expliqué par les interactions entre le stilbène et la quercétine avec la formation de deux nouveaux composés (pic 1 et pic 2).
- **Le temps de rétention :** Les temps de rétention des deux pics du mélange sont différents à ceux des réactifs purs. Un décalage remarquable du temps s'est produit dans le mélange réactionnel ce qui confirme que les deux pics (1 et 2) ne correspondent plus aux réactifs purs mais aux interactions entre l'isomère (E)-stilbène et la quercétine et entre le (Z)-stilbène et la quercétine, respectivement.
- **Spectres UV :** L'analyse des spectres UV- visible des deux pics du mélange montre qu'ils sont aussi différents de ceux des réactifs, ceci est probablement dû aux interactions entre le stilbène et la quercétine qui ont influencé les positions et les intensités des bandes en induisant la formation de nouveaux composés. En outre, un effet hypsochrome est constaté; qui pourrait être dû à la saturation des doubles liaisons, c'est-à-dire l'augmentation des nombres de conjugaison dans les chromophores, en effet les composés aromatiques conjugués, se stabilisent par saturation des doubles liaisons pour compenser la perte d'énergie de conjugaison [41, 42]. Ou, aux transitions  $n-\pi^*$ , qui nécessite un groupe insaturé (groupe aromatique par exemple) pour fournir les

électrons. Donc, les pics résultants des transitions  $n-\pi^*$ , sont déplacés vers des faibles longueurs d'onde.

- **Spectres infrarouge (IR) :** Le spectre infrarouge de la quercétine; **Figure (IV.06-a)** montre une bande entre  $[700-800] \text{ cm}^{-1}$  qui correspondent aux déformations des C-H des cycles aromatiques. On a une bande à  $1050 \text{ cm}^{-1}$  attribuée aux vibrations des C-O d'un ester, et une autre à  $1400 \text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations des liaisons C=C aromatique. Une bande apparait à  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , elle est attribuée aux vibrations du C=O. On a une bande à  $2900 \text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations des C-H aromatiques (=C-H). Une large bande apparait à  $3010 \text{ cm}^{-1}$ , elle correspond à la vibration des O-H.

Le spectre infrarouge du cis-stilbène ; **Figure (IV.06-b)** ; montre deux bandes entre  $[700-800] \text{ cm}^{-1}$  qui correspondent aux déformations des C-H des cycles aromatiques. On a deux bandes donc il s'agit bien d'un cycle aromatique monosubstitué.

Une bande à  $1050 \text{ cm}^{-1}$  attribuée aux vibrations des C-C et deux bandes à  $1500 \text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations des liaisons C=C aromatique. Une bande apparait à  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , elle est attribuée aux vibrations des C=C éthyléniques. On a deux bande, l'une à  $2900 \text{ cm}^{-1}$  et l'autre à  $3010 \text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations des C-H aromatiques (=C-H).

Le spectre du produit de réaction du cis stilbène et de la quercétine ; **Figure (IV. 06-c)**; montre :

Une Bande à  $650 \text{ cm}^{-1}$  → Déformation des C-H du cycle aromatique dont l'aspect est différent de celle dans le stilbène et la quercétine pure. Une bande beaucoup moins intense à  $1010 \text{ cm}^{-1}$  → C-O.

On note l'augmentation de l'intensité de la bande du carbonyle ( $1670 \text{ cm}^{-1}$ ), disparition de la double liaison de pont éthylène ( $1600 \text{ cm}^{-1}$ ) et l'augmentation de l'intensité de la bande C-O. On note aussi un effet bathochrome de la bande O-H ( $3450 \text{ cm}^{-1}$ ) par rapport à la quercétine pure.

Ceci permet de conclure que la réaction a eu lieu au niveau de ces sites, la quercétine attaque donc le stilbène au niveau du pont éthylène plus réactif en s'aidant des groupes hydroxyles.

Plusieurs mécanismes peuvent être proposés, parmi lesquels on cite:

- Transfert d'un atome H ou plus de la quercétine au stilbène
- Formation d'époxyde de stilbène

Des études plus poussées (RMN, Spectroscopie de Masse) permettront de confirmer la nature des adduits formés entre le polyphénol quercétine et le cis-stilbène.

#### **IV.2.2.2. Etude paramétrique**

##### **IV.2.2.2.1. Influence de la concentration sur le mélange réactionnel**

Les résultats chromatographiques montrent que les amplitudes des pics sont directement proportionnelles avec l'augmentation de la concentration de la quercétine dans le mélange. L'intensité du pic (1) varie de 125 mAU jusqu'à 198,2 mAU, et celle du pic (2) varie de 1305,1 mAU à 2170,1 mAU. La plus grande intensité (2170,1 mAU) est notée pour le mélange qui contient une dose du stilbène et douze doses de la quercétine (S+12Q), au-delà, un excès en quercétine est constaté (pic 3) et la réaction est défavorisée; **Figure (IV.04)**.

##### **IV.2.2.2.2. Influence de la température sur le mélange réactionnel**

Les temps de rétention et les intensités des pics sont affectés par la variation de la température de la colonne.

Le temps de rétention du composé majoritaire varie de 32,70 min à 26,38 min, il est inversement proportionnel à la température, un déplacement du pic vers la gauche est observé, ceci est conforme avec la littérature [43]. Par contre, l'élévation de la température a entraîné une augmentation des intensités des pics 01 et 02, la réaction est favorisée même à 45 °C car à cette température la quercétine est plus soluble [44].

##### **IV.2.2.2.3. Influence du temps de la réaction sur le mélange réactionnel**

Le mélange (S+12Q) possédant les plus élevées des pics a été choisi pour l'étude de l'effet du temps de la réaction, sur le mélange et les interactions entre les substances impliquées. Les résultats obtenus montrent que même après 72 heures de la réaction, les

complexes obtenus n'ont pas été dissociés, ce qui confirme leur stabilité au cours du temps (réaction spontanée).

### IV.2.3. Etudes théoriques

Les calculs par DFT ont été effectués avec le logiciel Gaussian 09. Nous avons utilisé la fonctionnelle hybride B3LYP qui donne des résultats précis de la structure associée à l'ensemble de base 6-311++G (d,p) dans le méthanol, dans le but d'optimiser la molécule de la quercétine et de calculer les enthalpies de dissociation des liaisons (BDE), et les enthalpies de dissociation des protons (PDE). La molécule d'intérêt optimisée est représentée sur la figure (IV.17).

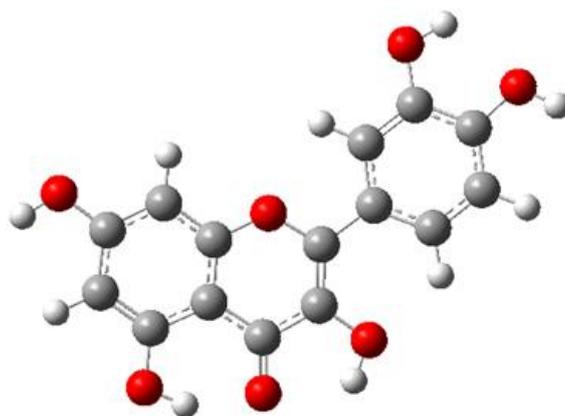


Figure IV.17 : Structure de la quercétine (Q) optimisée par DFT/ B3LYP-6-311++G (d,p).

#### IV.2.3.1. Etude de l'activité antioxydante de la quercétine

##### IV.2.3.1.1. Mécanismes de l'activité antioxydante de la quercétine

En ce qui concerne l'activité antioxydante de la quercétine, Deux mécanismes ont été étudiés :

##### a) Transfert d'atome d'hydrogène (HAT)

Pour étudier le mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène (HAT), les énergies de dissociation des liaisons (BDE) ont été calculées. Le BDE est un paramètre numérique caractérisant la stabilité de la liaison dans le groupe hydroxyle. Plus cette liaison est faible, plus l'activité antioxydante est élevée et donc plus la réaction avec les radicaux libres est favorable. Par conséquent, les molécules avec de faibles valeurs de BDE devraient montrer une activité antioxydante élevée. Les valeurs BDE calculées pour le composé étudié sont présentées dans le tableau (IV.07).

Nos résultats révèlent que, BDE (4'-OH) < BDE (3-OH) < BDE (3'-OH) < BDE (7-OH) < BDE (5-OH). Donc, le pouvoir antioxydant des sites réactifs est de l'ordre suivant : (4'-OH) > (3-OH) > (3'-OH) > (7-OH) > (5-OH). Ces résultats sont en accord avec la littérature [45].

#### b) Mécanisme de transfert d'un seul électron-transferts de protons (SET-PT)

Pour étudier le transfert d'un seul électron suivi d'un transfert de protons, des valeurs de PDE ont été calculées. Le PDE est un paramètre physique important décrivant les propriétés antioxydantes du composé étudié car elle montre sa capacité à donner des protons. En règle générale, les composés avec des valeurs de PDE plus faibles sont plus sensibles à l'abstraction de protons et sont donc les antioxydants les plus puissants. Les enthalpies de dissociation de protons (PDE) calculées de la molécule d'intérêt dans le méthanol sont également présentées dans le tableau (IV.07). Nos résultats indiquent que les valeurs de PDE les plus faibles sont trouvées pour le 4'-OH dans le cycle B. Ce résultat renforce celui du transfert "HAT" et conduit à conclure que le 4'-OH dans le cycle B est le plus acide et le plus sensible à l'abstraction de H. Ces résultats corroborent également avec ceux du BDE et affirme que dans la molécule étudiée le groupe 4'-OH est le plus réactif et détermine son activité biologique. Ceci est en accord avec ceux rapportés dans la littérature [45].

Tableau IV.07: BDE et PDE, de la quercétine (Q), en kJ/mol par B3LYP/6-311++ G (d,p), dans le MeOH.

Le site	BDE	PDE	Cycle
3-OH	355,93318	070,593	C
5-OH	409,61118	124,271	A
7-OH	391,94718	106,607	A
3'-OH	370,93018	085,590	B
4'-OH	341,05718	055,717	B

### IV.3. Conclusion

Cette étude est menée sur l'analyse par HPLC-UV-DAD des interactions entre le cis-stilbène et la quercétine, ainsi que l'étude de l'activité antioxydante de ce flavonol par deux mécanismes: Le transfert d'atome d'hydrogène « HAT » et le transfert d'un seul électron suivi d'un transfert de proton « SET-PT ».

Les résultats chromatographiques indiquent que les temps de rétention, les intensités et les aires des deux pics obtenus dans le mélange équimolaire (S+Q) sont totalement différents de ceux des réactifs. Ce qui affirme la formation de nouveaux composés.

L'étude de l'activité anti radicalaire de la quercétine montre que:

- BDE (4'-OH) < BDE (3-OH) < BDE (3'-OH) < BDE (7-OH) < BDE (5-OH).
- PDE (4'-OH) < PDE (3-OH) < PDE (3'-OH) < PDE (7-OH) < PDE (5-OH).

Donc, le pouvoir antioxydant des sites réactifs est de l'ordre suivant :

(4'-OH) > (3-OH) > (3'-OH) > (7-OH) > (5-OH).

# *Conclusion générale*

### **Conclusion générale**

Ce travail a porté sur La quercétine réputé pour ses propriétés antioxydantes (Q) et le cis-stilbène (S) en tant que prooxydant.

La première partie est focalisée sur l'étude des interactions stilbène-quercétine, par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC-DAD).

La deuxième partie est consacrée à l'étude théorique de l'activité antioxydante de la quercétine.

A partir des résultats obtenus, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- L'écart existant entre les temps de rétention et les intensités des pics du mélange et des réactifs purs, confirme la constitution de nouveaux composés.
- La différence des spectres UV- visible des deux pics du mélange et ceux des réactifs, est probablement due aux interactions entre le stilbène et la quercétine qui ont influencé les positions et les intensités des bandes en induisant la formation de nouveaux composés.
- Une isomérisation probable d'une partie du (Z)-stilbène en (E) au cours de la réaction S+Q, traduit l'apparition des deux pics dans le chromatogramme du mélange.
- Les pics (1 et 2) correspondent à deux composés (complexes) issues des interactions entre la quercétine et les deux formes isomères du stilbène (E) et (Z) respectivement. Ce dernier a une affinité avec la phase stationnaire apolaire, l'autre a une affinité avec la phase mobile polaire.
- Les amplitudes des pics des deux nouveaux composés et en particulier le composé majoritaire sont directement proportionnelles avec l'augmentation de la concentration en quercétine dans le mélange. La réaction est défavorisée à une concentration en quercétine de  $26,70 \cdot 10^{-6}$  M.
- Les temps de rétention et les intensités des pics et en particulier le pic 2 sont affectés par la variation de la température de la colonne. La réaction est favorisée même à 45 °C car à cette température la quercétine est plus soluble [37].

## *Conclusion générale*

---

- Les complexes obtenus n'ont pas été dissociés, au cours du temps (réaction spontanée) ce qui confirme leur stabilité.
- Par ailleurs, l'analyse des spectres infrarouge des substances impliquées et de leur mélange suggère que; la quercétine attaque le stilbène au niveau du pont éthylène plus réactif en s'aidant des groupes hydroxyles.

Les résultats théoriques de l'activité antioxydante de la quercétine révèlent que 4'-OH dans le cycle B est le site le plus réactif pour les deux mécanismes (HAT, SET-PT).

En perspective, Il nous semble important d'effectuer:

- Une étude par modélisation moléculaire des mécanismes possibles de la réaction du cis-stilbène radical qui possède un pont éthylène réactif avec la quercétine.

# *Références*

---

## Références

- [01]: **Desmier, T.** Les Antioxydants De Nos Jours : Définition et Applications. Thèse de Doctorat. *Université De LIMOGES*. 2016, pp. 36.
- [02]: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cis-Stilbene#section=Melting-Point>. Le 07/05/2021.
- [03]: **Salem, J.H.** Extraction, Identification, Caractérisation Des Activités Biologiques De Flavonoïdes De *Nitraria Retusa* Et Synthèse De Dérivés Acylés De Ces Molécules Par Voie Enzymatique. *Institut National Polytechnique de Lorraine*, 2009. pp. 28.
- [04]: **Hennebelle, T. S. S.** Polyphénols Végétaux, Sources, Utilisations et Potentiel Dans La Lutte Contre Le Stress Oxydatif. *Springer-Verlag*, pp. 1.
- [05]: **Singla, RK., Dubey, A K., Garg, A., Sharma, RK., Fiorino, M., Ameen, SM., Haddad, MA., Al-Hiary.** Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures references. *Journal of AOAC International*. 2019, Vol. 102, No. 5, pp. 1-2.
- [06]: **Tsao, Rong.** Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2010, Vols. 1231-1246, 2, pp. 2-8.
- [07]: **Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D.** Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. *Elsevier*, 2018. pp. 6-8.
- [08]: [www.wikiwand.com](http://www.wikiwand.com). Le 01/06/2021.
- [09]: **Hopkins, G.** Physiologie Végétale. *Boeck Supérieur*, 2003. pp. 280.
- [10]: **Parage, C.** Génomique Fonctionnelle De La Biosynthèse Des Stilbènes. *Université de STRASBOURG : HAL*, 2013. pp.1-3.
- [11]: [Http://despace.univ-bba.dz.pdf](http://despace.univ-bba.dz.pdf) –Tang and halli well ,2010-mémoire 2018,2019. Le 30/05/2021.
- [12]: **Pietta, Pier-Giorgio.** Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000, Vol. 36, 7, pp. 1-2.

- 
- [13]: **Koffas, Zachary L. Fowler&Mattheos A. G.** Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Springer*. 2009, Vol. 799–808, 83, pp. 1-2.
- [14]: **Panche A. N., Diwan A. D. et Chandra S. R.** Flavonoids: An Overview. *Journal Of Nutritional Science*. 2016, Vol. 5, 47, pp. 2-3.
- [15]: **Borbulevych, O.Y., Jankun, J., Selman, S.H., Skrzypczak-Jankun, E.** Lipoxygenase Interactions With Natural Flavonoid, Quercetin, Reveal A Complex With Protocatechuic Acid In Its X-Ray Structure At 2.1 A Resolution. *Proteins: Structure, Function And Bioinformatics*. 2004, Vol. 54, pp. 13-19.
- [16]: **Vacek, J., Klejdus, B., Lojková, L., & Kubán, V.** Current Trends In Isolation, Separation, Determination And Identification Of Isoflavones: A Review. *Journal of Separation Science*. 2008, Vol. 31, 2054–2067, pp. 1-2.
- [17]: <https://bu.umc.edu.dz/theses/biologie/ZEG5532.pdf>. Le 06/06/2021.
- [18]: **Izzo, A.A.** PAF And The Digestive Tract. A Review. *Pharm Pharmacol*. 1996, Vol. 48: 1103-11, pp.2-3.
- [19]: HPLC Principe et appareillage, Ressources pédagogiques, Biochimie et Bio moléculaire, *Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine, Académie de Rouen*, 2010.
- [20]: **Benchanaa, N., Boukerche, I.**, Etude De L'influence De Degré De Torréfaction Du Café Sur La Formation De L'acrylamide Par Chromatographie Liquide A Haute Performance, Mémoire de Mastre, *Université 08 Mai 1945, GUELMA*, 2017.
- [21]: <https://www.etudier.com/dissertations/Hplc/407350.html>. Le 26/06/2021.
- [22]: **Ben Saad, L.** Étude De La Séparation Des fluoroquinolones Par Hplc: Application À l'étude De Leur Dégradation Par Rayonnement Gamma, Mémoire de Master, *Université Tunis El Manar, Faculté des Sciences de TUNIS, TUNIS*, 2013.
- [23]: <https://sms-bse-bgb.discip.ac-caen.fr/spip.php?article475>, le 06/07/2021.
- [24]: <https://cahier-de-prepa.fr/ats-pascal/download?id=431>, le 06/07/2021.
- [25]: **Benchegra, K.** Introduction Aux Techniques Analytiques, Cours De Chimie Analytique, *Université d'ORAN*.

- 
- [26]: [http://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/ancien\\_site/CHIM/Chromato01/chromato1.htm](http://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/ancien_site/CHIM/Chromato01/chromato1.htm).  
Le 07/06/2021.
- [27]: [https://fr.wikipedia.org/wiki/Chromatographie\\_en\\_phase\\_liquide\\_à\\_haute\\_performance](https://fr.wikipedia.org/wiki/Chromatographie_en_phase_liquide_à_haute_performance).  
Le 15/06/2021.
- [28]: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/molecular-modeling>. Le 26/06/2021.
- [29]: **Hartree, D. R.** The Wave Mechanics of an Atom with a Non-Coulomb Central Field. Part I. Theory and Methods. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*. 1928, Vol. 24(01), 89, pp. 1-17.
- [30]: **Roothaan, C. C. J.** New Developments in Molecular Orbital Theory. *Reviews of Modern Physics*. 1951, Vol 23(2), pp. 69–89.
- [31]: **Kohn, W., Sham, L. J.** Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review*. 1965, Vol 140(4A), pp. A1133–A1138.
- [32]: **Parr, R. G.** Density Functional Theory of Atoms and Molecules. *Horizons of Quantum Chemistry*, 1980, Vol 3, pp. 5–15.
- [33]: **Colas, C.**, Développement de méthodes physico-chimiques pour le contrôle de la médication par l'Harpagophytum et l'Eleutherococcus, principes actifs utilisés en phytothérapie équine. : Etude par spectrométrie de masse des harpagosides, des éléuthérosides et du cycloarténol, principes actifs utilisés en phytothérapie équine. Thèse de Doctorat, *École Polytechnique-Chimie, PARIS*, 2006, pp.130.
- [34]: **Zohra, M. F.** Etude Théorique De L'effet Des Méthylxanthines Sur Le Système Nerveux Central, Thèse de Magister, *Université Des Sciences Et De La Technologie D'oran « Mohamed Boudiaf »*, Faculté Des Sciences De La Nature Et Vie. 2014, p. 34.
- [35]: **Urbaniak1, A., Molski1, M., Szeląg, M.** Quantum-chemical Calculations of the Antioxidant Properties of *trans-p*-coumaric Acid and *trans*-sinapinic Acid. *Computational Methods In Science And Technology*. 2012, Vol 18(2), pp.2-10.
- [36]: **Boulmakh, Y., Belguidoum, K., Meddour, F., Amira-Guebailia, H.** Investigation Of Antioxidant Activity Of Epigallocatechin Gallate And Epicatechin As Compared To Resveratrol And Ascorbic Acid: Experimental And Theoretical Insights. *Springer*. 2021, pp.1-17.

- 
- [37]: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin>, Le 07/05/2021.
- [38]: <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Stilbene.html>. Le 06/05/2021.
- [39]: <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-sante-du-quotidien/2554792-perturbateur-endocrinien-definition-liste-effets-grossesse>. Le 06/07/2021.
- [40]: <https://fr.wikipedia.org/wiki/Stilb%C3%A8ne>. Le 06/06/2021.
- [41]: <https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/uvvisab1.htm>. Le 07/06/2021.
- [42]: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/saturation-chimie-organique>. Le 04/07/2021.
- [43]: **Heidorn, M.** The Role of Temperature and Column Thermostatting in Liquid Chromatography. *Thermo Fisher Scientific, Germering, German*. 2016. pp. 1-6.
- [44]: <https://nutrixel-info.fr/index/quercetine>. Le 15/06/2021.
- [45]: **La Rocca, M. V., Rutkowski, M., Ringeissen, S., Gomar, J., Frantz, M.-C., Ngom, S., & Adamo, C.** BENCHMARKING THE DFT METHODOLOGY FOR ASSESSING ANTIOXIDANT-RELATED PROPERTIES: QUERCETIN AND EDARAVONE AS CASE STUDIES. *Journal of Molecular Modeling*, Vol 22(10), pp. 5-10.