

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la recherche scientifique
Université de Guelma

Faculté des Mathématiques et de l'Informatique et des Sciences de la Matière
Département des Sciences de la Matière

Mémoire de fin d'études
Master



Spécialité : Chimie physique

Présenté par :

Boukertouta Ghadir

Intitulé

ETUDE PAR RP-HPLC DES INTERACTIONS MOLECULAIRES ENTRE UN PRO-OXYDANT ; LE CIS STILBENE ET UN ANTIOXYDANT ; L'EPIGALLOCATECHINE GALLATE

Sous la Direction de :

Pr. AMIRA-GUEBAILIA HABIBA

Co-encadreur : Dr Belguidoum Karima

Juillet 2021

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions le bon Dieu le tout puissant pour nous avoir donné la force, le courage, la volonté et surtout la patience pour pouvoir réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer mes profondes reconnaissances et gratitude et mes remerciements les plus sincères à **Mme AMIRA-GUEBAILIA HABIBA** professeur à l'université de Guelma, d'avoir accepté de m'encadrer, pour ses conseils, ses qualités humaines et scientifiques, ses encouragements qui m'ont permis de mener à bon terme ce travail et pour les précieuses corrections apportées à ce manuscrit, mais également pour son humeur quotidien et sa simplicité.

J'adresse aussi mes profonds remerciements à **Mme Dr. BELGUIDOUM KARIMA** pour son aide précieuse et inestimable.

Je remercie particulièrement **Mme Dr. BOULMOUKH** pour son aide.

Mes remerciements vont aussi à :

- Tous les membres du laboratoire de chimie appliquée LCA
- **Mme Pr. NOUAR. L, Mme Pr. MADI. F** et tous les membres du laboratoire de chimie computationnelle et nanostructures LCCN.
- **Mme Dr. BENGOURNA. N, Mme Pr. NIGRI. S et Dr. SELAIMIA.R** pour leur aide à réaliser l'Infra-rouge.
- Tous les enseignants de département des sciences de la matière.
- Je remercie aussi les membres de jury pour avoir évalué mon travail, pour leurs questions et remarques lors de la soutenance.

Mes derniers remerciements vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour réaliser ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes parents : aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mes sœurs « **MARWA et HOUYEM** » et mon frère « **MOUNDJED** » qui m'ont soutenue tout au long de ma vie, et bien sûr sans oublier ma nièce « **MILINA** ».

A toute ma famille « **BOUKERTOUTA et MERABTI** », mes chers amis et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que j'atteigne ce stade.

GHADIR

SOMMAIRES

REMERCEIMENTS

DEDICACE

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	i
LISTE DES TABLEAUX.....	iv
LISTE DES ABREVIATIONS.....	v
RESUME.....	viii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
Références bibliographiques	3

CHAPITRE I *RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE*

Introduction	4
I.1 Le stilbène	4
I.1.1 Réactivité du stilbène	5
a. Réaction de photoisomérisation	5
a. Réaction de photocyclisation	6
I.1.2 Les pro-oxydants	7
I.1.3 Effets des pro-oxydants sur la santé	7
I.1.4 Différentes classes de pro-oxydants	7
I.2 Activité antioxydante.....	9
I.2.1 Les radicaux libres	9
a. Réaction d'oxydoréduction	9
b. Fission Homolytique.....	10
I.2.2 Le stress oxydant	11

I.2.3 Les antioxydants	12
I.3 Les Polyphénols	13
I.4 Les flavonoïdes	14
I.4.1 Classe de flavonoïdes	14
I.4.2 L'épigallocatechine gallate (EGCG)	16
I.4.3 Les activités biologiques de l'épigallocatechine gallate	17
a. Effet protecteur contre le cancer	17
b. Protection du système cardio-vasculaire	17
c. Prévention de l'obésité et du diabète.....	18
d. Préservation des cellules cérébrales	18
Références bibliographiques	19

CHAPITRE II

La chromatographie

Introduction	22
II.1 Processus chromatographique	22
II.2 Méthodes chromatographiques	23
II.2.1 Classification selon la nature des phases	23
II.3 Paramètres chromatographiques	23
II.3.1 Chromatogramme	23
II.3.2 Grandeurs de rétention	24
a. Le temps de rétention t_r	24
b. Le temps mort t_m	24
c. Le volume de rétention V_r	24
d. Le volume mort V_m	24
e. Le volume de rétention réduit (corrigé) V_r'	24
f. Le temps de rétention réduit (corrigé) t_r'	25
g. Facteur de capacité K'	25
h. Sélectivité α	25
i. Facteur de résolution R	25

j. Efficacité N	25
II.4 La chromatographie liquide à haute performance HPLC	26
II.4.1 Principe général	26
II.4.2 Types d'HPLC	26
e. Chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC)	27
f. Chromatographie liquide en phase normale (NP-HPLC)	27
II.4.3 Principe physicochimique de la séparation chromatographique	27
a. Chromatographie d'adsorption	28
b. Chromatographie de partage	28
c. Chromatographie par échange d'ions	29
d. Chromatographie d'exclusion stérique	29
e. la chromatographie d'affinité	30
II.4.4 Appareillage en HPLC	30
a. Réservoir de la phase mobile.....	31
b. Système de pompage.....	32
c. Injecteur.....	32
d. Colonne.....	33
e. Détecteur.....	33
Références bibliographiques.....	34

CHAPITRE III

Matériel et méthodes

Introduction	36
Partie expérimentale	
III.1 Matériels utilisés	35
III.2 Solvants et réactifs	36
III.2.1 Propriétés des réactifs utilisés	36
III.3 Protocole expérimental.....	38
III.3.1 Préparation des solutions.....	38

III.3.2 Préparation de la phase mobile.....	38
III.3.3 Préparation des mélanges réactionnels.....	38
III.4 Analyse par HPLC	39
III.4.1 Conditions d'analyse.....	39
III.4.2 Injection de blanc.....	40
III.4.3 Injection des produits purs	40
III.4.4 Injection des mélanges.....	40
III.4.5 Etude de l'effet de température	40
III.4.6 Etude de l'effet du temps de contact	42
III.5 Etude spectrométrique.....	41
III.5.1 Spectroscopie d'absorption UV-Visible	42
III.5.2 Spectroscopie Infrarouge (IR).....	42
Partie Théorique	
III.6 Logiciel Gaussian.....	43
III.7 Théorie de la fonctionnelle de la densité DFT.....	43
III.8 Les structures des réactifs.....	44
Références bibliographiques.....	45

CHAPITRE IV

Résultats et discussions

Introduction	46
IV.1 Mise en évidence des interactions entre l'EGCG (antioxydant) et le cis stilbène (pro-oxydant).....	46
IV.1.1 Interprétation des chromatogrammes HPLC.....	46
VI.1.2 Interprétation des spectres UV-Vis.....	49
IV .2 Mécanismes probables.....	51
IV.2.1 Formation d'un adduit.....	52
IV.2.2 Formation d'un complexe à transfert de charge.....	53
IV. 3 Etude paramétrique des interactions pro-oxydants/antioxydants.....	53
IV. 3.1 Effet de la concentration	53
IV.3.2 Effet de la température de la colonne.....	54

a) Effet de la température sur le temps de rétention t_r (min).....	54
b) Effet de la température sur l'intensité des pics (mUA).....	54
IV.3.3 Effet du temps de contact	55
IV. 4. Identification des produits par Spectroscopie Infrarouge.....	56
IV. 5 Etude par modélisation moléculaire.....	58
IV.5.1 Mécanisme 1 : Transfert d'atome d'hydrogène	59
IV.5.2 Mécanisme 2: Mise en contact de l'EGCG et du cis stilbène.....	59
IV.5.5 Etats de transition	62
IV.5.4 Orbitales frontières HOMO et LUMO.....	63
IV.5.5 Potentiel électrostatique moléculaire et densité de spin.....	65
Références bibliographique	67
Conclusion générale.....	68

LISTE DES FIGURES

Chapitre I : Recherche bibliographique

Figure I.1 : Structures chimiques des isomères de stilbène (trans à gauche et cis à droite).....	5
Figure I.2 : Photoisomérisation du stilbène : (a) isomère trans, (b) état de transition et (c) isomère cis.....	6
Figure I.3 : Réaction de photocyclisation du cis-stilbène et formation du DHP et du PHE	6
Figure I.5: Schéma montrant le stress oxydant, qui est un état de déséquilibre entre le système de défense par les antioxydants et la surproduction des radicaux libres.....	12
Figure I.6 : Structure chimique des flavonoïdes	14
Figure I.7: Structure de la (+) – catéchine (Gauche) et de la (-) - Epicatéchine (droite)....	16
Figure I.8: Structures des catéchines.....	16
Figure I.9: Structure de l'epigallocatechin-3-gallate. [(2R, 3R) 3'',4'',5''-trihydroxybenzoate de [-5,7-dihydroxy-2-(3',4',5'-trihydroxyphenyl) chroman-3-yl]	17

Chapitre II : La chromatographie

Figure II.1 : Pic chromatographique.....	23
Figure II.2 : Caractéristiques d'un pic chromatographique idéal.....	24
Figure II.3 : Modes chromatographiques.....	28
Figure II.4 : Schéma représentatif d'HPLC.....	31
Figure II.5 : Représentation schématique d'un système de pompage (a) mode isocratique (b) mode gradient d'élution.....	32

LISTE DES FIGURES

Chapitre III : Matériel et Méthodes

Figure III.1 : Appareil HPLC utilisé. HPLC-DAD, Agilent technologies (LCA, université de Guelma).....	40
Figure III.2 : Les transitions électroniques.....	41
Figure III.3 : Modes vibrationnels infrarouge d'une liaison CH.....	42
Figure III.4 : Fenêtre principale de Gauss-view.....	43
Figure III.5 : Structure du cis stilbène optimisé dans le MeOH (DFT/B3LYP/6-311G (d, p) ++).....	44
Figure III.6 : Structure du cis stilbène radicalaire optimisé dans le MeOH (DFT/B3LYP/6-311G (d, p) ++).....	44
Figure III.7 : Structure de l'Epigallocatechine gallate EGCG optimisée dans le MeOH (DFT/B3LYP/6-311G (d, p) ++).....	44

Chapitre IV : Résultats et discussions

Figure IV.1 : Chromatogramme du cis stilbène, $t_r=21$ min.....	46
Figure IV.2 : Chromatogramme de l'EGCG, $t_r=2.11$ min.....	47
Figure IV.3 : Chromatogramme typique du mélange réactionnel du cis stilbène avec l'EGCG.....	48
Figure IV.4 : Spectre UV-Vis de l'EGCG.....	49
Figure IV.5 : Spectre UV-Vis du cis stilbène.....	50
Figure IV.6 : Spectre UV-Vis du mélange réactionnel (pic1).....	51
Figure IV.7 : Spectre UV-Vis du mélange réactionnel (pic2).....	51
Figure IV.8 : Mécanisme possible de transfert de charge entre l'EGCG et le cis stilbène.....	53
Figure IV.9 : Spectre infrarouge du cis Stilbène.....	57
Figure IV.10 : Spectre infrarouge de l'EGCG.....	57
Figure IV.11 : Spectre infrarouge du produit de réaction du cis stilbène avec l'EGCG....	58
Figure IV.12 : trans stilbène obtenue par rapprochement du radical cis stilbène de	59

LISTE DES FIGURES

l'atome H.....	
Figure IV.13 : Complexe A (trans).....	60
Figure IV.14 : complexe B (cis).....	60
Figure IV.15 : Formation d'un stilbène époxyde.....	61
Figure IV.16 : Etats de transition des produits de réaction obtenus par modélisation moléculaire (TS-QST3).....	63
Figure IV.17 : Orbitales frontières des réactifs et produits de réaction.....	64
Figure IV. 18 : Potentiel électrostatique(MEP) des molécules a : EGCG b : cis stilbène, c- Produit A, d : Produit B.....	65
Figure.IV.19 : Contours de densité de spin.....	66

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I : Recherche bibliographique

Tableau I.1 : Différentes classes de pro-oxydants.....	8
Tableau I.2 : Liste des principaux radicaux libres.....	10
Tableau I.3 : Différentes classes des composés phénoliques.....	13
Tableau I.4: Tableau récapitulatif des six classes de flavonoïdes.....	15

Chapitre III : Matériel et méthodes

Tableau III.1 : Propriétés des réactifs utilisés.....	37
--	----

Chapitre IV : Résultats et discussions

Tableau IV.1 : Données chromatographiques de l'EGCG, du cis stilbène et de leur mélange réactionnel, obtenu par RP-HPLC, C18, phase mobile, 60/40 ACN/H2O.....	48
Tableau IV.2 : Résultats de l'effet de concentrations.....	53
Tableau IV.3 : Effet de la température sur les temps de rétention tr.....	54
Tableau IV.4 : Effet de la température sur l'intensité des pics.....	55
Tableau IV.5 : Effet du temps de contact sur le temps de rétention.....	56
Tableau IV.6 : Effet du temps de contact sur l'intensité des pics.....	56
Tableau IV.7 : Energies des réactifs optimisées par DFT au niveau B3LYP (6-311) de la théorie.....	59
Tableau IV.8: Energies des produits optimisés par DFT au niveau B3LYP (6-311) de la théorie.....	61

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN : Acétonitrile.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AVC : Accident vasculaire cérébral.

CAD : Détecteur d'aérosols chargés (Charged aerosol detector).

CAS : Numéro d'une substance chimique (Chemical Abstracts Service).

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CFS : Chromatographie à fluide supercritique.

CL : Chromatographie liquide.

CPG : Chromatographie en phase gazeuse.

CPL : Chromatographie en phase liquide.

CEI : Chromatographie par partage d'ions.

DHP : Dihydrophénanthrène.

EC: Epicatéchine.

ECG: Epicatéchine gallate.

EGC: Epigallocatechine.

EGCG: Epigallocatechine gallate.

ELSD : Détecteur de diffusion de lumière par évaporation (Evaporative light scattering detector).

ERN : Espèces réactives nitrogénées.

ERO (ROS) : Espèces réactives d'oxygène.

HOMO : Orbitale moléculaire la plus haute en énergie occupée (Highest Occupied Molecular Orbital).

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

HOO[·]: Hydroperoxyde.

LISTE DES ABREVIATIONS

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.

HPLC-DAD : Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrettes de photodiodes.

IRFT : Infrarouge à Transformée de Fourier.

LUMO : Orbitale la plus basse en énergie non occupée (Lowest Unoccupied Molecular Orbital).

MeOH : Méthanol.

MEP : Potentiel électrostatique moléculaire.

MS : spectrométrie de masse.

NO[•] : Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote.

SOD: Superoxyde dismutase.

NOS : Oxyde Nitrique Synthase.

O₂^{•-}: Superoxide.

OH[•]: Radical hydroxyl.

PHE: Phénanthrène.

PM : Phase mobile.

PS : Phase stationnaire

RMN: Résonance magnétique nucléaire.

RO[•] : Radical Alcoxyle.

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique.

T °C : Température en degré Celsius.

TFA : Acide trifluoroacétique.

TS : Etat de transition (transition state).

UV-vis : Spectroscopie ultraviolet-visible.

δ : Largeur à mi-hauteur du pic.

LISTE DES ABREVIATIONS

σ : Variance du pic.

ω : Largeur à la base du pic.

λ : Longueur d'onde.

ϵ : Coefficient d'extinction molaire.

Résumé

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier les interactions qui peuvent avoir lieu lorsqu'une molécule pro-oxydante (le cis stilbène) est mise en contact avec un antioxydant, l'épigallocatechine gallate (EGCG) au niveau d'une colonne chromatographique d'un appareil HPLC. En jouant sur les paramètres, concentration de l'EGCG, température de la colonne et temps de contact, on peut avoir une idée sur la stabilité des adduits formés, ces derniers sont analysés par les méthodes spectroscopiques (UV-visible et IR).

Pour confirmer les résultats obtenus expérimentalement, nous avons eu recours à la modélisation moléculaire par la méthode de DFT dont le but était de tenter de proposer des mécanismes réactionnels entre le pro-oxydant et l'antioxydant et déterminer les structures probables des adduits formés. En plus du trans stilbène obtenu par rapprochement du radical du cis stilbène et du radical H, deux complexes de structures différentes ont été obtenus, dans l'un, le cis stilbène se transforme en trans et se lie par covalence à l'EGCG entre le carbone portant le 4'OH de l'EGCG et un carbone du pont éthylène du cis stilbène (A) dans l'autre il garde la configuration cis et forme une liaison C-O covalente l'un des carbones du pont éthylène et l'oxygène du groupement 4''-OH du gallate (B). Le quatrième composé est obtenu par formation d'un pont oxygène avec le groupe éthène du cis stilbène.

En outre, on a déterminé les états de transition des trois premiers mécanismes par TS-QST3 qui ont montré que le composé B est le plus probable ayant donné le gap énergétique le plus faible entre l'état de transition et le produit final.

De plus, l'étude des orbitales HOMO et LUMO, le potentiel électrostatique moléculaire MEP et la densité de spin, nous a aidé à déterminer les sites nucléophiles et électrophiles et de là, la réactivité des molécules étudiées.

Mots clés : Stilbène, activité antioxydante, pro-oxydant, EGCG, CLHP, DFT, HOMO, LUMO, MEP.

Abstract

The aim of this work is to study the interactions that can take place when a pro-oxidant molecule (cis stilbene) is brought into contact with antioxidant; epigallocatechin gallate (EGCG) within a chromatographic column of an HPLC apparatus. By adjusting the parameters, EGCG concentration, column temperature and contact time, we can get an idea on the stability of the formed adducts; the latter are analyzed by spectroscopic methods (UV-visible and IR).

To confirm the results obtained experimentally, we used molecular modeling by the DFT method, the aim of which was to attempt to propose reaction mechanisms between the pro-oxidant and the antioxidant and to determine the probable structures of the adducts formed. In addition to trans stilbene obtained by bringing together the radical of cis stilbene and the radical H, two complexes of different structures were obtained, in one, the cis stilbene turns into trans and binds covalently to EGCG between the carbon carrying the 4'OH of EGCG and a carbon of the ethylene bridge of cis stilbene (A) in the other adduct, it keeps the cis configuration and forms a covalent C-O bond between one of the carbons of the ethylene bridge and the oxygen of the 4 " -OH group of the gallate (B). The fourth compound is obtained by forming an oxygen bridge C-O-C within the ethylene carbons of cis stilbene.

In addition, the transition states of the first three mechanisms were determined by TS-QST3, which showed that compound B is the most likely occur since it gave the smallest energy gap between the transition state and the final product.

In addition, the study of the HOMO and LUMO orbitals, the molecular electrostatic potential MEP and the spin density, helped us to determine the nucleophilic and electrophilic sites and hence the reactivity of studied molecules.

Keywords: Stilbene, antioxidant activity, pro-oxidant, EGCG, HPLC, DFT, HOMO, LUMO, MEP.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة التفاعلات التي يمكن أن تحدث عندما يتلامس الجزيء المؤيد للأوكسدة (cis stilbene) مع مضاد الأوكسدة (EGCG) (epigallocatechin gallate) على مستوى العمود الكروماتوغرافي. لجهاز HPLC. من خلال تعديل المعلمات بتركيز EGCG ودرجة حرارة العمود ووقت التلامس ، يمكننا الحصول على فكرة عن ثبات المقاربات المتكونة ، ويتم تحليل هذه الأخيرة بالطرق الطيفية (الأشعة فوق البنفسجية المرئية والأشعة تحت الحمراء). لتأكيد النتائج التي تم الحصول عليها تجريبياً ، استخدمنا النمذجة الجزيئية بطريقة DFT ، والتي كان الهدف منها محاولة اقتراح آليات التفاعل بين المؤيد للأوكسدة ومضاد الأوكسدة وتحديد الهياكل المحتملة للعقد المتكون. بالإضافة إلى trans stilbene الذي تم الحصول عليه من خلال الجمع بين جذري cis stilbene و H الجذري ، تم الحصول على مجموعين لهياكل مختلفة ، في أحدهما ، يتحول cis stilbene إلى trans ويرتبط تساهمياً بـ EGCG بين الكربون الذي يحمل OH-4 من EGCG وكربون جسر الإيثيلين الخاص بـ cis stilbene (A) في الآخر ، فإنه يشكل رابطة تساهمية CO بين احد الكربونين في جسر الإيثيلين والأوكسجين 4-OH- في مجموعة gallate (ب). يتم الحصول على المركب الرابع عن طريق تكوين جسر أكسجين مع مجموعة ethene من cis stilbene. بالإضافة إلى ذلك ، تم تحديد حالات الانتقال للآليات الثلاث الأولى بواسطة TS-QST3 والتي أظهرت أن المركب B هو الأكثر احتمالية لإعطاء أصغر فجوة طاقة بين حالة الانتقال والمنتج النهائي. بالإضافة إلى ذلك ، ساعدتنا دراسة مداري HOMO و LUMO ، والإمكانات الكهروستاتيكية الجزيئية لـ MEP وكثافة الدوران ، في تحديد المواقع المحبة للنووية و electrophilic وبالتالي تفاعل الجزيئات المدروسة.

الكلمات المفتاحية: الستيلبين، نشاط مضاد للاكسدة، MEP, LUMO, HOMO, DFT, HPLC, EGCG.

Introduction générale

Introduction générale

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable [1]. Cependant, l'excès de la production des espèces radicalaires oxygénées (EROs) peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule, les lipides, les protéines et les acides nucléiques, et donne lieu au stress oxydatif qui sera impliqué dans diverses pathologies à savoir les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), le diabète, les cancers, les maladies inflammatoires, le vieillissement, etc. [2]. Les métabolites ou facteurs favorisant ou stimulant la production de ces (EROs) sont des pro-oxydants

Le potentiel pro-oxydant des systèmes biologiques et leur capacité antioxydante sont généralement dans un équilibre approximatif [3]. La connaissance des mécanismes impliqués dans l'action pro-oxydante des systèmes physiologiques permettrait une meilleure compréhension de la contribution de chaque système aux déséquilibres de la balance anti-/pro-oxydant, aux agressions oxydatives et finalement aux pathologies liées au stress oxydant [4]. Une meilleure connaissance des systèmes d'oxydation permettrait également d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques, soit pour diminuer les phénomènes de stress oxydant, soit pour les augmenter, en fonction des objectifs thérapeutiques visés [5].

La recherche de molécules antioxydantes ayant la capacité de piéger les pro-oxydants est un sujet d'actualité suscitant l'intérêt des chercheurs dans plusieurs domaines, y compris la chimie, la biologie, la médecine et la pharmacologie. Les plantes ont depuis toujours été une source de matière thérapeutique, parmi lesquels les flavonoïdes qui sont des polyphénols ayant montré un large spectre d'activités biologiques, telle que, l'activité antioxydante. Cette dernière tient son importance du fait que si une molécule exerce cette activité, elle a de fortes chances d'avoir un effet anticancéreux, anti-cardiovasculaire...etc.

Parmi les flavonoïdes ayant montré une activité antioxydante certaine, on trouve les catéchines et surtout l'épigallocatechine gallate (EGCG). Plusieurs mécanismes d'antioxydation de cette molécule ont été investigués, le travail entamé dans ce mémoire, a pour but de tester le pouvoir qu'a cette molécule à piéger un pro-oxydant, le cis stilbène. Ce dernier est un perturbateur endocrinien mais qui trouve son application dans plusieurs

domaines tels que l'optoélectronique, les lasers, etc et pourra trouver son chemin pour s'infiltrer dans notre métabolisme. Actuellement le stilbène est interdit dans plusieurs pays tel que la France.

Dans ce contexte, nous avons présenté dans ce mémoire une étude sur les interactions de l'EGCG comme antioxydant et le cis stilbène comme pro-oxydant. Le suivi de ces interactions a été réalisé par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP ou de l'Anglais HPLC) couplée à un détecteur à barrettes de diode, permettant non seulement d'avoir les chromatogrammes des molécules à séparer mais aussi leurs spectres UV-Visible. On a examiné notamment les facteurs qui peuvent influencer ces interactions, tels que la concentration des solutés, la température de la colonne et le temps de contact entre le cis stilbène et l'EGCG. La spectroscopie infrarouge a été réalisée pour obtenir des informations supplémentaires sur les sites d'interaction entre l'EGCG et le cis stilbène. Cette étude expérimentale a été complétée par une modélisation moléculaire dont le but était d'avoir de plus amples informations sur les mécanismes d'interaction et les structures les plus probables des adduits formés par rapprochement des deux molécules d'intérêt.

Ce mémoire comprend quatre chapitres

- Le premier chapitre est consacré à la recherche bibliographique sur les molécules étudiées et leurs effets sur la santé humaine. Les différentes classes de pro-oxydants, l'activité antioxydante, les classes des polyphénols et des flavonoïdes ont aussi fait partie de ce chapitre.
- Le deuxième chapitre décrit un rappel sur les principes de la chromatographie, notamment l'HPLC qui est la technique utilisée dans notre étude.
- Le troisième chapitre comprend le matériel et les différentes méthodes utilisées expérimentalement et dans l'étude théorique.
- Le quatrième chapitre concerne les résultats des deux parties expérimentale et théorique ainsi que leur interprétation.

Une conclusion générale achèvera ce mémoire.

Références

- [1] **Favier. A.** 2003. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, 6 : 108-115
- [2] **BENBRINIS. S.** 2012. Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*. (Mémoire de magister).
- [3] **Sotler. R.** 2019. Prooxidant Activities of Antioxidants and Their Impact on Health. Acta Clinica Croatica, 58.
- [4] **Thomas. D.** 2016. Les antioxydants de nos jours : Définition et applications. (Thèse de doctorat). P 13.
- [5] **Milica. E.** 2001. Rôle pro-oxydant de la gamma-glutamyltransférase et de la gamma-glutamyltransférase « related » dans la peroxydation lipidique. (Thèse de doctorat). P2-3.

Recherche bibliographique

Introduction

Dans ce chapitre, nous allons présenter les deux molécules ; pro-oxydante (le cis stilbène) et antioxydante (l'Epigallocatechine gallate) auxquelles on s'intéresse dans cette étude et leurs propriétés, réactivité, effet sur la santé humaine...

I.1 Le stilbène

Le nom du stilbène ou 1,2-diphényléthylène est dérivé du mot grec *stilbos*, qui signifie brillant. Il existe en deux formes isomères: le (E) -stilbène (trans-stilbène), qui n'est pas stériquement encombré, et le (Z) -stilbène (cis-stilbène), qui est stériquement encombré et donc moins stable (**figure I.1**) [1]. Il est à noter que le terme stilbène au singulier (le stilbène) est un produit de synthèse et au pluriel (les stilbènes ou stilbénoides) sont des molécules d'origine naturelle, la vigne *Vitis vinifera L.*, en est la source principale. A partir de ces métabolites naturels, une multitude de dérivés synthétiques ont été produits. Les propriétés physico-chimiques et biologiques du stilbène diffèrent de celles des stilbènes et de leurs dérivés.

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont essayé de comprendre les effets de l'environnement chimique sur les propriétés physiques du stilbène [2].

Le stilbène (1,2-diphényléthylène) a été considéré comme un système prototype, en raison du rôle important de l'isomérisation cis-trans photoinduite des doubles liaisons éthyléniques dans les systèmes biologiques et les sciences des matériaux. Ce domaine est d'un intérêt croissant pour les chimistes tant théoriciens qu'expérimentalistes [1].

Les stilbènes sont largement utilisés dans la fabrication de colorants industriels et des lasers à colorants qui sont des lasers qui utilisent des colorants organiques, tel que le stilbène, comme support laser, généralement sous forme de solution liquide. Par rapport aux gaz et à la plupart des supports laser à l'état solide, un colorant peut généralement être utilisé pour une gamme de longueurs d'onde beaucoup plus large. Les stilbènes sont aussi utilisés comme azurants optiques car ils absorbent les rayonnements électromagnétiques ultraviolets entre 300 et 400 nm de longueur d'onde et réémettent ensuite cette énergie par fluorescence dans le visible entre 400 et 500 nm, soit les longueurs d'onde entre le bleu-violet et le bleu-vert avec un maximum dans le bleu. Cette particularité a un intérêt lorsque l'agent est combiné à certains matériaux nécessitant ou recherchant une certaine blancheur.

Une autre utilisation non moins importante des stilbènes consiste à les exploiter comme agents phosphorescents qui présentent le phénomène de luminescence ; ils émettent de la lumière lorsqu'ils sont exposés à un certain type d'énergie rayonnante. Ils jouent un rôle de

plus en plus important dans le domaine de la photophysique, photochimie, biophysique et prospections biomédicales [2].

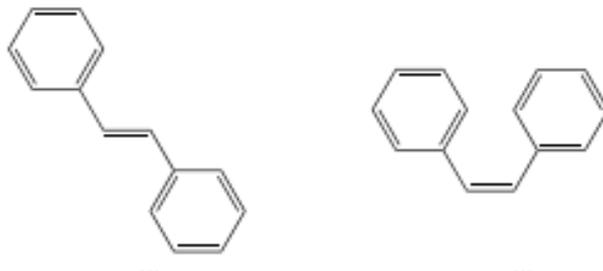


Figure I.1 : Structures chimiques des isomères de stilbène (trans à gauche et cis à droite).

En raison de la stabilité chimique du fragment phényle du 1,2-diphényléthylène, le stilbène n'est pas un composé de départ approprié pour la synthèse de dérivés du stilbène. Afin de former des molécules plus complexes dérivés du stilbène, il est nécessaire d'introduire des groupements fonctionnels plus réactifs. Les dérivés hydroxylés du stilbène ou stilbénoides sont généralement stables [2].

I.1.1 Réactivités du stilbène

La double liaison peut donner lieu à des réactions d'addition. Ainsi, l'hydrogénation, par action de l'hydrogène naissant (hydrogène produit dans le milieu réactionnel) ou de l'hydrogène en présence de catalyseurs, engendre un dibenzyle. La double liaison peut aussi fixer une molécule de chlore ou de brome. En chauffant le stilbène au rouge, on obtient du phénanthrène par une réaction de déshydrogénation. 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.

On prépare les formes cis et trans par décarboxylation des acides phénylcinnamiques ou par une réaction de Wittig (réaction de condensation avec des composés carbonyles faisant intervenir des phosphines). La forme trans peut être préparée par de nombreuses méthodes, en particulier par des réactions de pyrogénéation, car c'est un hydrocarbure très stable. [3]

Les réactions les plus courantes sont :

a. Réaction de photoisomérisation

L'isomérisation du stilbène implique une torsion considérable du groupe C=C et a donc associé une barrière énergétique élevée.

Il a été suggéré trois mécanismes photochimiques différents pour la photoisomérisation des stilbènes substitués. Le premier implique une conversion interne du premier état excité singulet S_1 vers des états vibrationnels hautement énergétiques de l'état fondamental électronique (ou de l'Anglais GS, ground state). D'autre part, le deuxième mécanisme comprend une réaction diabatique dans laquelle l'isomérisation a lieu dans un état triplet excité suivi d'un croisement intersystème près de la structure représentée sur la figure I.2 (b) Enfin, le troisième mécanisme entraîne une torsion de la liaison C=C dans l'état excité S_1 qui conduit le système à une intersection conique (CI) et ainsi à une conversion interne à l'état fondamental après que l'isomérisation a eu lieu (**Figure I.2**) [4].

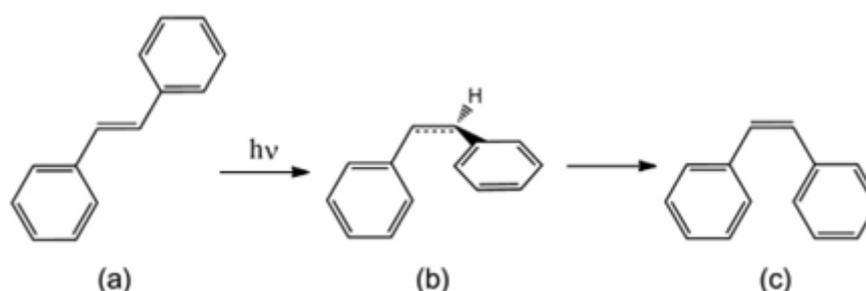


Figure I.2 : Photoisomérisation du stilbène : (a) isomère trans, (b) état de transition et (c) isomère cis.

b. Réaction de photocyclisation

La réaction de photocyclisation sous irradiation lumineuse conduisant à la formation d'un dihydrophénanthrène (DHP). Cette réaction de photocyclisation est réversible dans l'obscurité si le milieu est exempt d'oxygène. Autrement, le dihydrophénanthrène se transforme en phénanthrène (PHE) par élimination de dihydrogène (**Figure I.3**). Cette réaction est particulièrement favorable, car elle permet d'accroître l'aromaticité. L'utilisation de substituants sur les carbones réactifs 2 et 6' des cycles aromatiques permet d'éviter la réaction irréversible d'élimination des atomes d'hydrogène [5].



Figure I.3 : Réaction de photocyclisation du cis-stilbène et formation du DHP et du PHE

Le stilbène (1,2-diphényléthylène) est interdit en France [6], à cause de sa dégradation et sa haute réactivité surtout avec les métaux, il est considéré comme un pro-oxydant et est dangereux pour la santé humaine.

I.1.2 Les pro-oxydants

Les pro-oxydants sont définis comme des substances chimiques qui induisent un stress oxydatif, par la formation d'espèces oxygénées réactives (Reactive Oxygen Species ou ROS) ou en inhibant le système antioxydant. Ils peuvent être classés en plusieurs catégories dont les plus importants sont les médicaments et les métaux redox-actifs, les plus abondants d'entre eux sont les métaux de transition, surtout le fer et le cuivre. Ces deux ions métalliques redox-actifs ont la capacité d'occuper plusieurs états de valence dans les protéines et notamment d'activer l'oxygène utilisé par diverses enzymes impliquées dans la respiration cellulaire. Les pesticides, l'exercice physique, l'anxiété mentale, les conditions physiopathologiques et les facteurs environnementaux, tels que les polluants atmosphériques et rayonnements ionisants et non ionisants sont aussi des sources de pro-oxydants [7].

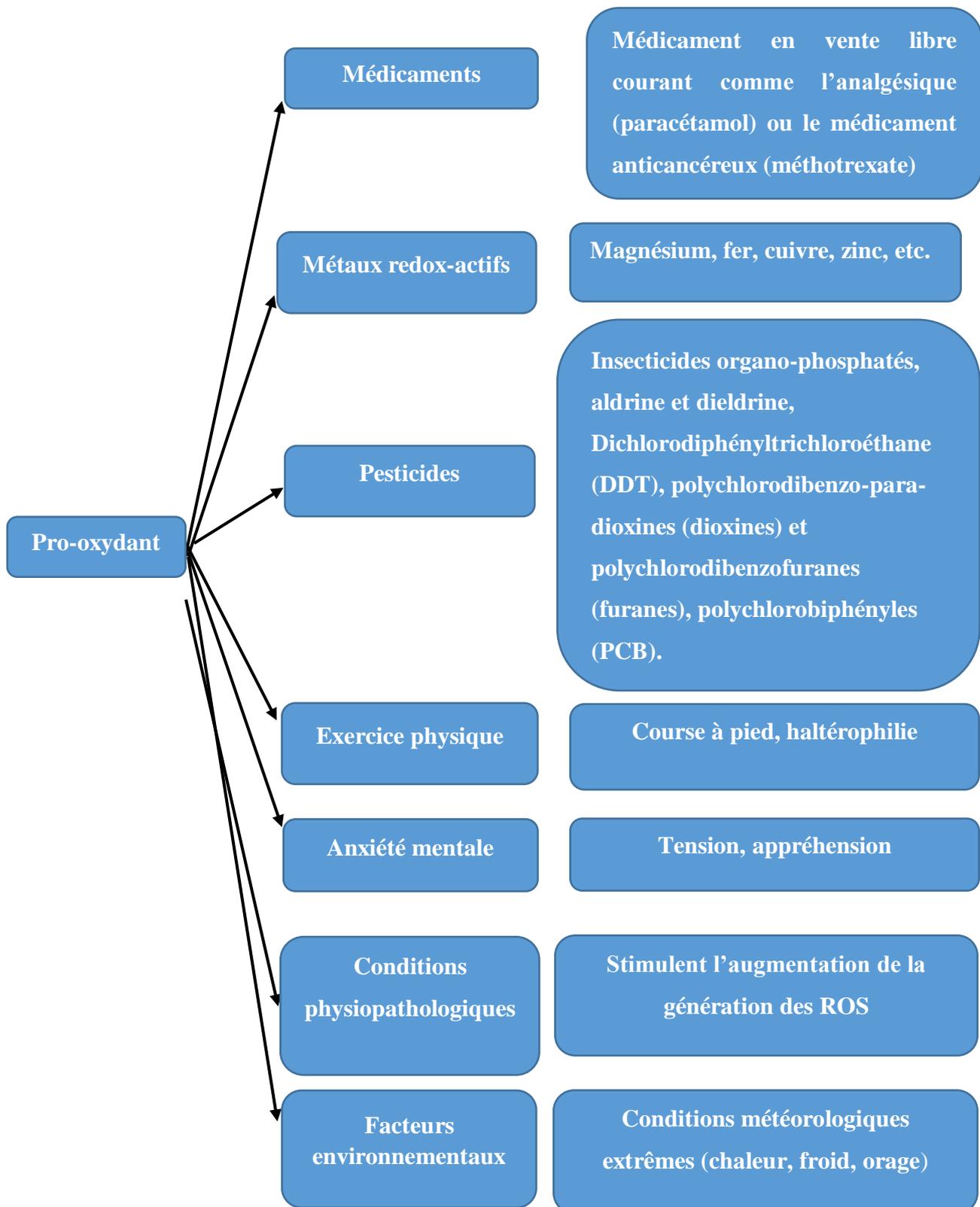
I.1.3 Effet des pro-oxydants sur la santé

La production élevée des pro-oxydants est responsable de nombreuses pathologies telles que la sénescence cellulaire, divers cancers, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, et bien d'autres... C'est pourquoi les industriels de divers domaines tels que, agroalimentaire, médical et pharmaceutique sont toujours à la recherche de nouvelles molécules qui ont une activité antioxydante et peuvent réduire les effets néfastes de ces pro-oxydants [8].

I.1.4 Différentes classes des pro-oxydants

Les différentes classes des pro-oxydants sont représentées dans le **tableau I.1**.

Tableau I.1 : Différentes classes de pro-oxydants [7-9]



I.2 Activité antioxydante

Lorsqu'une molécule présente des propriétés dites anti-oxydantes, cela veut dire qu'elle a pour fonction de bloquer les réactions internes et néfastes pour l'organisme qui sont provoquées par des molécules, appelées radicaux libres.

I.2.1 Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atome, molécule ou ion) possédant un électron célibataire (non appariés) dans l'orbital externe qu'ils cherchent à appairer en attaquant et en endommageant les molécules voisines [10].

Ce déséquilibre n'est que transitoire car il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron, soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. La probabilité entre ces deux possibilités dépend essentiellement de l'instabilité du radical libre considéré. Si cette instabilité est modérée, la probabilité d'accepter un second électron est grande et dans ce cas, le radical libre ne représente qu'une étape transitoire dans une réaction d'oxydo-réduction classique. Si, au contraire, cette instabilité est importante, l'électron libre est rapidement transféré sur une autre molécule. Pour autant, le caractère radicalaire de la molécule ne disparaît pas et l'électron libre peut passer sur d'autres molécules entraînant des phénomènes d'oxydation en chaîne [11]. Cette réaction en chaîne va produire des nouveaux radicaux libres.

Les radicaux libres dénaturent les constituants de notre corps :

- Les protéines, lipides et sucres.
- L'ADN.
- Les cellules et leurs membranes.

Ainsi, sous l'action des radicaux libres, nos cellules et leurs constituants « rouillent » pareil à un morceau de métal laissé à l'air libre [12]

➤ Mécanismes chimiques de formation des radicaux libres

a. Réaction d'oxydoréduction

Un radical libre peut être formé par oxydation, qui désigne la perte d'un ou plusieurs électrons et peut aussi être formé par gain d'un ou de plusieurs électrons, réaction appelée réduction [13].



b. Fission Homolytique

La fission homolytique ou la rupture homolytique d'une liaison chimique covalente où les deux électrons de la liaison sont réparties équitablement, Ce qui entraîne la formation de deux radicaux libres ayant chacune un électron célibataire [13].



Les radicaux libres sont toxiques en raison de leur pouvoir oxydant (**Figure I.4**).

En dehors des radicaux libres, il existe d'autres dérivés de l'oxygène qui sont très réactifs, bien qu'ils n'aient pas d'électrons non appariés (**Tableau I.2**).

- ROS (Reactive Oxygen Species) ou espèces oxygénées réactives radicalaires [anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyle ($OH\cdot$)] et non radicalaire (ROS) tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).
- A côté des ROS, il existe des espèces réactives nitrogénées (ERN) dont le représentant majeur est le monoxyde d'azote ($NO\cdot$). C'est un agent vasodilatateur. Il est synthétisé par les NO synthases (NOS). Le $NO\cdot$ est un radical peu réactif mais peut se lier aux radicaux libres oxygénés pour former des molécules plus toxiques comme les peroxy-nitrites [14-15].

Radical	Formule
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Hydroxyle	$OH\cdot$
Hydroperoxyde	$HOO\cdot$
Alcoxydes	$RO\cdot$
Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote	$NO\cdot$

Tableau I.2 : Liste des principaux radicaux libres [15-16].

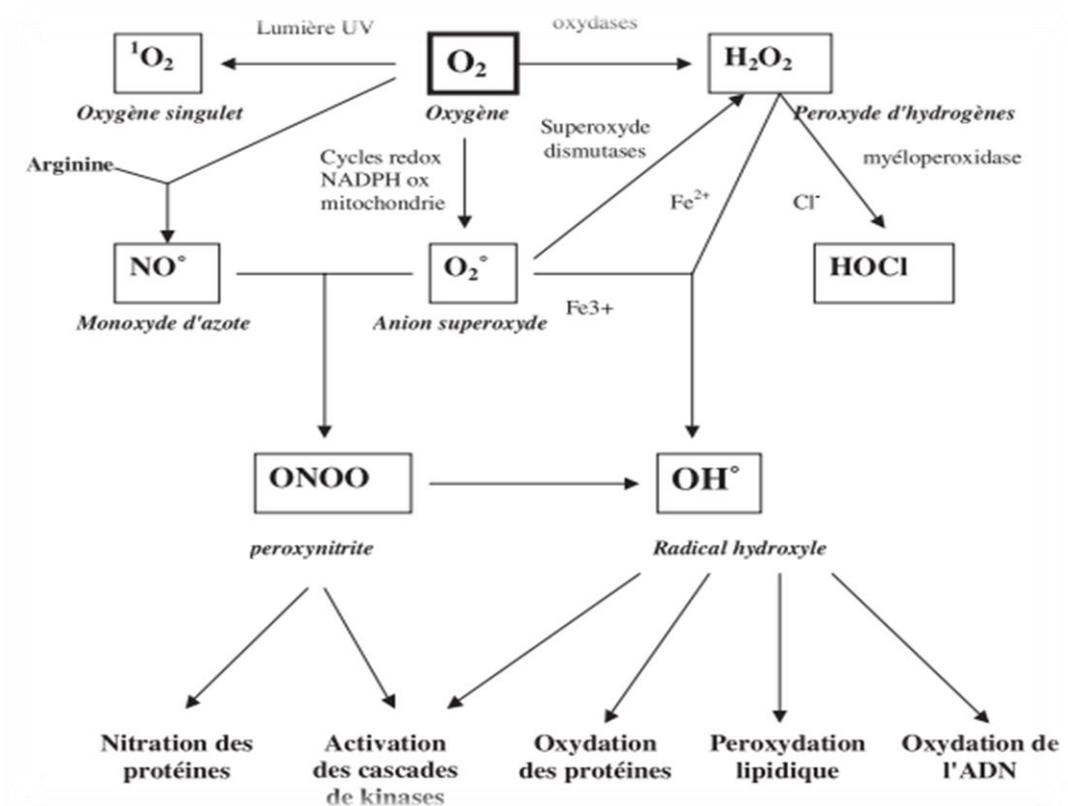


Figure I.4: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie [17].

Toutefois, un déséquilibre entre la production de radicaux libres et les mécanismes de défense antioxydante conduit à un stress oxydatif pouvant entraîner des altérations moléculaires et cellulaires [18].

I.2.2 Le stress oxydant

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire [19]. Ce déséquilibre provient, soit d'une production exagérée d'agents oxydants (radicaux libres et ROS), soit d'une altération des mécanismes de défense (Figure I.5) [20].



Figure I.5: Schéma montrant le stress oxydant, [21].

Sur la base de la théorie des radicaux libres liés au stress oxydatif, les antioxydants sont la première ligne de choix pour lutter contre le stress [22].

I.2.3 Antioxydants

Les antioxydants sont des produits chimiques plus ou moins complexes qui peuvent réduire le stress oxydatif dans l'organisme.

Un antioxydant peut donc :

- Empêcher la synthèse des radicaux libres en inhibant l'initiation de la chaîne réactionnelle
- Désactiver directement les ROS

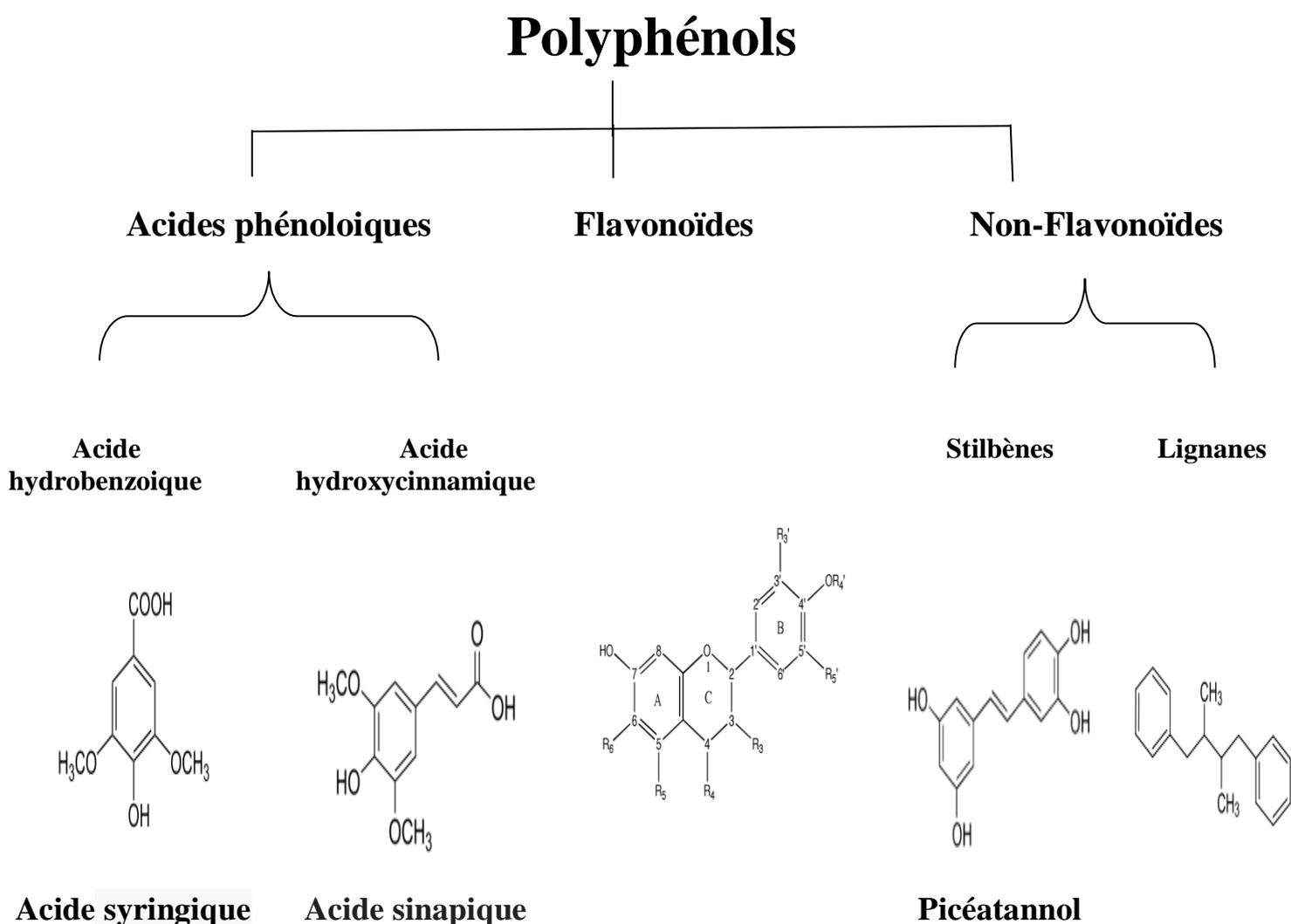
Les antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'actions : systèmes enzymatiques, inhibiteurs d'enzymes oxydantes, chélateurs de métaux et piègeurs de radicaux libres.

Il existe également de nombreux antioxydants exogènes dans l'alimentation, qui apportent un soutien important aux antioxydants. On les retrouve dans les fruits (pommes, poires, fruits rouges ...), les légumes (brocoli, oignons ...), les boissons (café, thé, ...) ainsi que les épices, le cacao en poudre et même les céréales [23].

La défense antioxydante est basée sur le système enzymatique (Superoxyde dismutase [SOD], catalase, glutathion peroxydase) et agents non enzymatiques (vitamines C et E, polyphénols, ...etc.) [10].

I.3 Polyphénols

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) [24]. L'effet protecteur des polyphénols a été attribué à leurs propriétés antioxydantes, agents antiallergiques, anti-inflammatoires, anticancéreux, antihypertenseurs et antimicrobiens [24-26]. Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes. Les plus importants sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (Tableau I.3) [27]



Parmi les polyphénols, les flavonoïdes sont les plus étudiés et possèdent un large éventail de propriétés pharmacologiques, y compris la protection contre l'oxydation [28].

I.4 Les flavonoïdes

Le nom flavonoïde est issu du latin « Flavus » qui signifie jaune. Ce sont des pigments qui sont responsables de la coloration des fruits et des fleurs. Les différentes couleurs dépendent de la structure mais également du pH du milieu [29]. Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que les jus et le thé. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales [30]

Les flavonoïdes sont constitués de deux cycles aromatiques liés par trois atomes de carbone qui peuvent se lier en formant un cycle oxygéné (**Figure I.6**) [29]

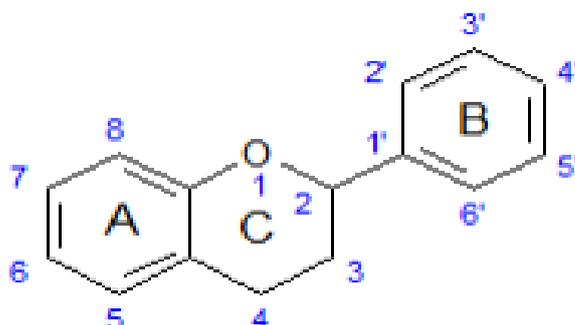


Figure I.6 : Structure chimique des flavonoïdes

I.4.1 Classe des flavonoïdes

Selon le degré d'oxydation, les flavonoïdes sont classés en six classes : anthocyane, flavonol, flavone, flavanone, isoflavone, flavanol (**Tableau I.4**) [29].

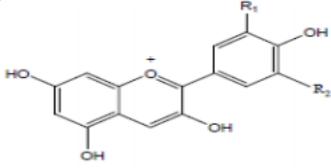
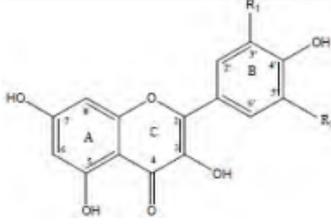
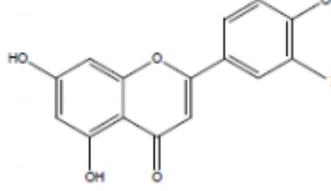
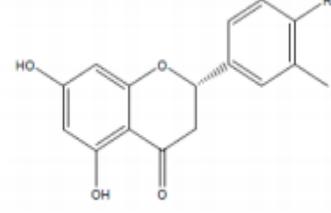
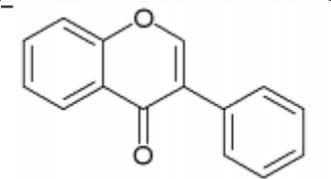
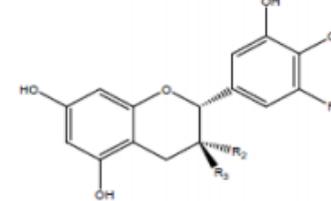
	Structure de base	Formule chimique	Origine	Principales molécules
Anthocyan e			Baies, fruits rouges, vin	Cyanidine, pélagonidine, malvidine, delphinidine
Flavonol		3-hydroxy-2- phénylchromen 4-one	Oignons, brocolis, tomate, thé	Quercétine, kaempférol, myricétine
Flavone		2- phénylchromen 4-one	Tisanes, plantes aromatiques	Apigénine, lutéoline
Flavanone		2,3-dihydro-2- phénylchromen 4-one	Agrumes	Herpérétine, naringénine, ériodictyol
Isoflavone			Soja, légumineuses	Daïdzéine, génistéine
Flavanol		2-phényl-3- chromanol	Fruits, cacao, thé, vin	Catéchines, gallocatéchines (monomères), proanthocyanidines (polymères)

Tableau I.4: Tableau récapitulatif des six classes de flavonoïdes [29].

En particulier les Flavanols ou catéchines sous forme monomères (catéchine, epicatéchine) (**Figure I.7**). Ces composés vont des simples monomères ((+) – catéchine et son isomère (–) – epicatéchine) à des polymères appelés tannins. [30]

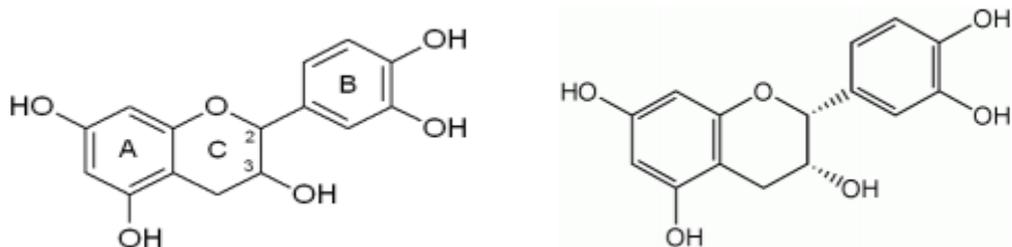


Figure I.7: Structure de la (+) – catéchine (Gauche) et de la (-) - Epicatechine (droite)

Les flavanols peuvent être estérifiés avec l'acide gallique ou bien hydroxylés, pour former des gallocatéchines (epicatechine gallate, épigallicatéchine, épigallicatéchine gallate) et des gallotanins, les structures sont représentées en **figure I.8** [30].

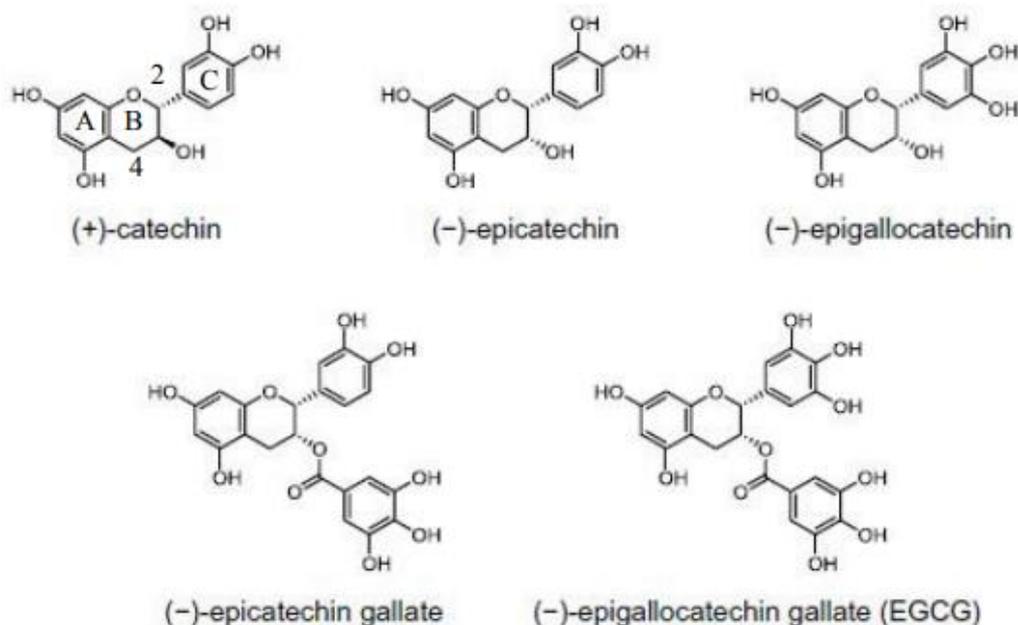


Figure I.8: Structures des catéchines [30].

I.4.2 Épigallocatechine gallate (EGCG)

De formule $C_{22}H_{18}O_{11}$

La structure de l'EGCG est constituée de quatre cycles aromatiques résultant de l'estérification de l'EGC avec l'acide gallique : les cycles A et C constituent le cycle benzopyrane avec un groupement pyrogallol en position 2, le cycle B, avec un groupement gallate en position 3, et le cycle D (**Figure I.9**). La présence de ce carbone ester rend l'EGCG très sensible aux attaques nucléophiles. Les cycles B et D de l'EGCG ont respectivement des groupes

trihydroxy vicinaux 3', 4', 5' et 3'', 4'' et 5'', qui confèrent à l'EGCG son potentiel antioxydant.

L'EGCG est un piègeur de radicaux plus efficace que ses analogues structuraux EGC, EC et ECG, qui ont tous moins de groupes hydroxyles [31].

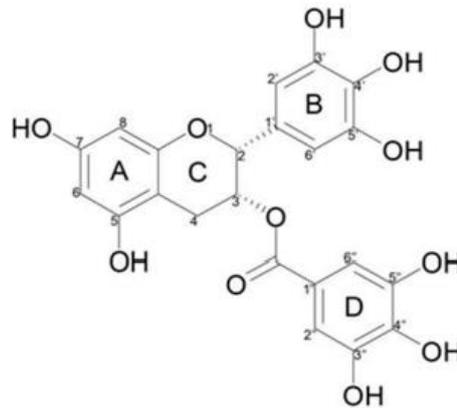


Figure I.9: Structure de l' epigallocatechin-3-gallate. [(2R,3R) 3'',4'',5''-trihydroxybenzoate de [-5,7-dihydroxy-2-(3',4',5'-trihydroxyphenyl)chroman-3-yl] [31]

L'EGCG présente une variété d'activités biologiques, y compris anti-inflammatoire, antidiabétique, antiobésité et antitumorale [32]. Cette molécule se lie à de nombreuses molécules biologiques et module différentes enzymes et voies de signalisation [33].

I.4.3 Les activités biologiques d'epigallocatechine gallate

a. Effet protecteur contre le cancer

L'EGCG inhibe l'activité cancérogène, la tumorigénèse, la prolifération et l'angiogénèse, et induit la mort cellulaire. Ces effets sont liés à la modulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [24].

En outre, l'EGCG pourrait également induire une modification épigénétique par inhibition de l'activité de la méthyltransférase de l'ADN et la régulation de l'acétylation de l'histone, conduisant à une régulation positive (upregulation) de l'apoptose. Bien que l'EGCG possède des effets anticancéreux et agit selon des mécanismes multiples, des études encore plus poussées sont nécessaires pour définir un traitement clinique à base d'EGCG [24].

b. Protection du système cardio-vasculaire

L'EGCG améliore la dilatation médiée par le flux de l'artère brachiale chez les patients atteints de coronaropathie et peuvent inverser le dysfonctionnement endothélial. Les

catéchines du thé induisent généralement une vasorelaxation dépendante de l'endothélium et du NO. L'EGCG peut également augmenter la biodisponibilité du NO et améliorer la fonction endothéliale en neutralisant les ROS. Ces derniers peuvent réagir directement avec le NO et éliminer son activité biologique. L'EGCG élimine fortement le superoxyde, ce qui suggère que les catéchines peuvent augmenter la biodisponibilité du NO en piégeant le superoxyde, ce qui peut à son tour contribuer à la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium [34].

c. Prévention de l'obésité et le diabète

L'obésité et le diabète sont deux maladies courantes associées l'une à l'autre et présente des risques de cancer, d'hypertension, de troubles neurologiques et de maladies cardiovasculaires. L'EGCG peut réduire le poids corporel ainsi que les tissus et la graisse sanguine. De plus, l'EGCG commence à jouer un rôle dans la régulation de la glycémie et du diabète [35].

L'EGCG semble affecter principalement l'appétit ou l'absorption d'énergie du tube digestif, de sorte qu'il permet à un organisme de brûler les graisses. Cependant, l'EGCG peut augmenter l'oxydation des graisses et réduire la masse du tissu adipeux sans altérer l'absorption alimentaire [35].

d. Préservation des cellules cérébrales

L'EGCG exerce un effet neuroprotecteur contre les troubles neurologiques tels que la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et les accidents vasculaires cérébraux. Il améliore les déficits d'apprentissage et de mémoire dans les lésions ischémiques grâce à la modulation du stress oxydatif et de la neuroinflammation [36].

L'EGCG agit comme un antioxydant puissant et protège les cellules neuronales contre les dommages induits par le stress oxydatif. Il induit une prolifération et une différenciation neuronales dans les cellules progénitrices neurales ; cellules issues de cellules souches multipotentes, qui ne présentent pas encore de signe de différenciation mais qui, après trois ou quatre divisions, donnent naissance à une ou plusieurs lignées cellulaires et favorise ainsi la neurogenèse après un AVC ischémique [36].

References

- [1] **Perng, J.-H.** 2002. Luminescence Study of cis- and trans-Stilbenes in the Sol Gel System. *Journal of Fluorescence*, 12(3/4), 311–316.
- [2] **Gertz, Likhtenshtein.** 2010. Stilbenes Preparation and Analysis. *Stilbenes. Applications in Chemistry, Life Sciences and Materials Science*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, P1.
- [3] <https://www.universalis.fr/encyclopedie/stilbene/>. Visité le 27/06/2021 ; 23 :28.
- [4] **Gutiérrez-Arzaluz. L., Rocha-Rinza. T., & Cortés-Guzmán. F.** 2015. Stilbène photoisomerization driving force as revealed by the topology of the electron density and QTAIM properties. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1053, 214–219.
- [5] **PIARD. J, MÉTIVIER. R, AUBERT. P, CHEREF. Y, Corentin. B et GIRAUDON-COLAS. G** .2017. Étude d'un photochrome de la famille des diaryléthènes B - Étude cinétique (expérimental). *Union des professeurs de physique et de chimie*. 619-640.
- [6] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Stilb%C3%A8ne> , visité le 15/06/2021 13 :45
- [7] **Sotler. R.** 2019. Prooxidant Activities of Antioxidants and Their Impact on Health. *ActaClinicaCroatica*, 58.
- [8] <https://www.ie-antioxydants.com/sante-stress-oxydant/> , visité le 15/06/2021 16 :00
- [9] **Rahal. A, Kumar. A, Singh. V, Yadav. B., Tiwari. R, Chakraborty. S, & Dhama. K.** 2014. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*, 1–19.
- [10] **Leverve. X.** 2009. Stress oxydant et antioxydants ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219–224.
- [11] **FONTAINE. E, BARNOUD. D, SCHWEBEL. C, & LEVERVE. X.** 2002. Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique Antioxydants in critically ill patients. *Réanimation*, 11(6), 411–420.
- [12] <https://stress.ooreka.fr/astuce/voir/751351/stress-oxydatif> , visité le 15/06/2021 14 :41
- [13] **DUBOIS. B.** 2015. Implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlète : Revue bibliographique. (Thèse de doctorat), page 17.
- [14] **Bartosz. G.** 2003. Generation of Reactive Oxygen Species in Biological Systems. *Comments on Toxicology*, 9(1), 5–21. P6.

- [15], **Mohammedi. Z.** 2013. Stress oxydatif, radicaux libres et antioxydants. Edilivre-Aparis, p6.
- [16] **GARDES-ALBERT. M, BONNEFONT-ROUSSELOT.D, ABEDINZADEH. Z, JORE. D.** 2003. Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique, n°277-278, 91-96. P92.
- [17] **Favier. A.** 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. 108-115.P109.
- [18] **Goudable. J, & Favier. A.** 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition Clinique et Métabolisme, 11(2), 115–120.p1.
- [19] **Barouki. R.** 2006. Stress oxydant et vieillissement. Médecine/sciences, 22(3), 266–272
- [20] **BARAKA-VIDOT. J.** 2014. Stress oxydant et pathologie diabétique à l'île de La Réunion -Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée. (Thèse de doctorat). Page36
- [21] **Belaïch. R, & Boujraf. S.** 2016. Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés : effets et stratégies thérapeutiques. Médecine Des Maladies Métaboliques, 10(1), 38–42
- [22] **Rahal. A, Kumar. A, Singh. V, Yadav. B, Tiwari. R, Chakraborty. S, & Dhama. K.** 2014. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. BioMed Research International, 1–19.
- [23] **DESMIER. T.** 2016. Les antioxydants de nos jours: Définition et applications. (Thèse de doctorat). Page 29.
- [24] **Boizot.N, Charpentier.J, P.** 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foresti. Cahier des Techniques de l'INRA, pp.79-82.
- [25] **Amiot. M-J, Riollet. C., & Landrier, J.-F.** 2009. Polyphénols et syndrome métabolique. Médecine Des Maladies Métaboliques, 3(5), 476–482.
- [26] **Daglia. M. 2012.** Polyphenols as antimicrobial agents. Current Opinion in Biotechnology, 23(2), 174–181

- [27] **Hmid. I.** 2013. Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*PunicaGranatum L.*): Caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leurs jus frais (thèse de doctorat), page 31- 32.
- [28] **Lahouel. M, Amedah. S, Zellagui. A, Touil. A, Rhouati. S, Benyache. F, Bousseboua. H.** 2006. The Interaction of New Plant Flavonoids with Rat Liver Mitochondria: Relation between the Anti- and Pro-oxydant Effect and Flavonoids Concentration. *Thérapie*, 61(4), 347–355.
- [29] **GUILLOUTY. A.** 2016. Plantes médicinales et antioxydants (thèse de doctorat). Page 28-29.
- [30] **Ghedira. K.** 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Springer Link. *Phytotherapy* **3**, 162–169
- [31] **Casanova. E, Salvadó. J, Crescenti. A, & Gibert-Ramos. A.** 2019. Epigallocatechin Gallate Modulates Muscle Homeostasis in Type 2 Diabetes and Obesity by Targeting Energetic and Redox Pathways: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 532.P2
- [32] **Kyoung-jin. M, TaegKyu. K.** 2012. Anticancer effects and molecular mechanisms of epigallocatechin-3-gallate, 3(1): 16–24. PubMed.
- [33] **CALLAND. N.** 2012. L'EGCG et la delphinidine : deux nouvelles molécules naturelles inhibant l'entrée du virus de l'hépatite C. *Médecine humaine et pathologie*. (Thèse de doctorat). Université du Droit et de la Santé - Lille II, Page 116.
- [34] **AnandhBabu. P, & Liu. D.** 2008. Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update. *Current Medicinal Chemistry*, 15(18), 1840–1850. P09.
- [35] **Kao. Y-H, Chang. H-H, Lee. M-J, & Chen. C-L.** 2006. Tea, obesity, and diabetes. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(2), 188–210.
- [36] **PARK. D-J, KANG. J-B, & KOH. P-O.**2020. Epigallocatechingallate (EGCG) alleviates neuronal cell damage against focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 82(5): 639–645.

LA CHROMATOGRAPHIE

Introduction

La chromatographie est l'une des méthodes physico-chimiques d'analyse de mélanges homogènes liquides ou gazeux, les plus utilisées dans plusieurs domaines ; industrie chimique, pétrochimie, chimie fine...etc. La chromatographie possède deux champs d'application :

- Analytique pour l'identification des constituants.
- Préparatif pour la séparation et la purification.

II.1 Processus chromatographique

La chromatographie est un processus thermodynamique basé sur l'entraînement différentiel de la composition présente dans la colonne. Le mécanisme de la séparation chromatographique est basé sur la différence d'affinité des substances à analyser envers la phase mobile (gaz ou liquide), et la phase stationnaire ou fixe (solide ou liquide) [1-2].

1. **Phases Stationnaires** : Particules solides finement divisées modifiées en surface contenues dans une colonne, ou molécules greffées directement sur la paroi interne de la colonne chromatographique.
2. **Phases mobiles** : Phase liquide ou gazeuse, qui entraîne les solutés au travers de la phase stationnaire.

Ce phénomène est dynamique et les molécules passent en continu d'une phase à l'autre, ce qui établit un état d'équilibre entre les deux phases pour chaque composé du mélange impliqué. Le rapport de distribution des phases mobile et stationnaire est appelé coefficient de partage K_p . (Équation 1) [2].

$$K_p = C_s / C_m \quad (1)$$

Où C_s : concentration du soluté dans la phase stationnaire.

C_m : concentration du soluté dans la phase mobile.

Plus K_p est grand, plus l'adsorption du composé sur la phase stationnaire est forte, et la rétention est élevée et vice versa. La valeur de K_p dépend de la structure du composé, la nature des deux phases (phase mobile et phase stationnaire) et la température qui influe sur la pression de vapeur et la solubilité.

II.2 Méthodes chromatographiques

Classification selon la nature des phases

Selon la nature de la phase stationnaire et de la phase mobile, ainsi que la nature des interactions entre ces phases et les molécules du mélange, Les différentes méthodes chromatographiques sont les suivantes :

- La chromatographie sur couche mince CCM
- La chromatographie en phase gazeuse CPG
- Chromatographie sur colonne.
- La chromatographie liquide à haute performance HPLC

II.3 Paramètres chromatographiques

II.3.1 Chromatogramme

Le chromatogramme est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration ou à la quantité du soluté en sortie de colonne, c'est l'absorbance en mAU (milli unité d'absorbance), c'est en fait La réponse du détecteur, elle est portée en ordonnée. Le temps (ou très rarement le volume d'élution) est porté en abscisse, l'origine de l'axe des temps coïncide avec l'introduction de l'échantillon dans le système d'injection. La ligne de base correspond à la réponse du détecteur en dehors de tout passage de soluté (**Figure II.1**) [3].

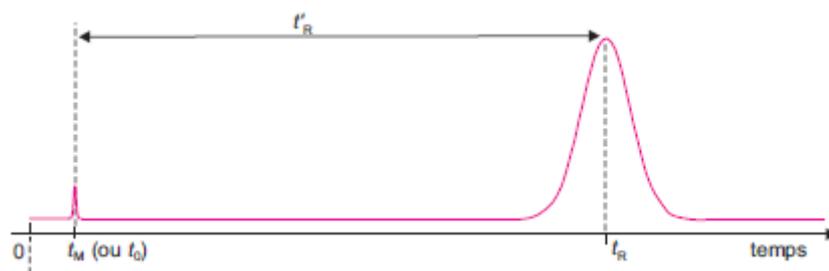


Figure II.1 : Pic chromatographique [3]

Les caractéristiques d'un pic sont illustrées dans la **figure II.2**

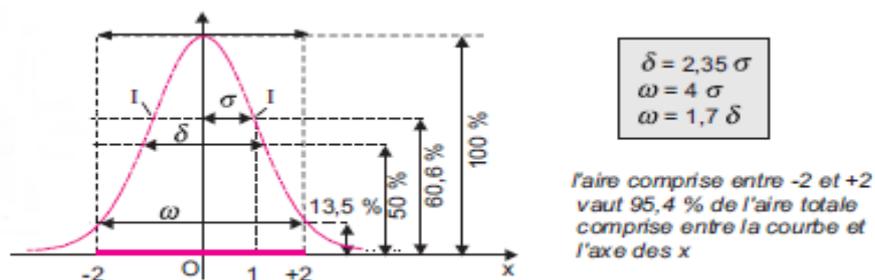


Figure II.2 : Caractéristiques d'un pic chromatographique idéal.

En chromatographie, δ désigne la largeur à mi-hauteur du pic ($\delta = 2,35 \sigma$) et σ^2 la variance du pic. La largeur « à la base » du pic, notée ω correspond à la base du triangle construit sur les tangentes aux points d'inflexion I de la courbe gaussienne. Elle est en fait mesurée à **13,5%** de la hauteur du pic. Pour des raisons d'homothétie, $\omega = 4 \sigma$.

II.3.2 Grandeurs de rétention

a. Le temps de rétention t_r

C'est le temps d'élution au maximum du pic, mesuré à partir de l'injection. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse données. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant [4].

b. Le temps mort t_m

C'est le temps de rétention d'un composé non retenu par la colonne c'est généralement le pic du solvant.

c. Le volume de rétention V_r

Le volume de la phase mobile nécessaire pour éluer le produit

$$V_r = t_r \times D$$

t_r : temps de rétention du composé.

D : Le débit (ml/min).

d. Le volume mort V_m

Le volume occupé par la phase mobile dans une colonne

$$V_m = t_m \times D$$

e. Le volume de rétention réduit (corrigé) V_r'

Le volume qui doit passer à travers la colonne pour éluer le composé.

$$V_r' = V_r - V_m$$

f. Le temps de rétention réduit (corrigé) t'_r

Le temps qui sépare les deux sommets du pic du soluté à analyser et celui non retenu par la colonne (pic du solvant), correspondant au temps mort.

$$t'_r = t_r - t_m$$

g. Facteur de capacité K'

C'est le rapport entre le temps de rétention réduit et le temps mort.

$$K' = t'_r / t_m = (t_r - t_m) / t_m$$

$$K' = V'_r / V_m = (V_r - V_m) / V_m$$

h. Sélectivité α

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics consécutifs, on utilise la sélectivité.

α : C'est le facteur de séparation entre deux pics adjacents, il correspond au rapport des facteurs de capacité de la colonne pour les deux composés

$$\alpha = (t'_r)_2 / (t'_r)_1 = (K'_2 / K'_1)$$

i. Facteur de résolution R

Le facteur de résolution R entre deux pics est donné par la formule :

$$R = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (\omega_1 + \omega_2)$$

Il découle directement de cette définition que la séparation entre deux pics est d'autant meilleure que R est plus grand [4].

t_{R1} : temps de rétention du premier composé élué.

t_{R2} : temps de rétention du deuxième composé élué.

ω_1 : largeur à la base du pic du premier composé élué.

ω_2 : largeur à la base du pic du deuxième composé élué.

j. Efficacité N

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques N correspondant à la colonne.

Plus N est grand, plus le pouvoir de séparation de la colonne est grand [5].

$$N = 16(t_r / \omega)^2$$

t_r : temps de rétention du composé.

ω : largeur du pic à la base.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince (CCM) ou en phase gazeuse (CPG). [6]

II.4 La chromatographie liquide à haute performance HPLC

La chromatographie liquide haute performance (ou chromatographie liquide haute pression, HPLC) est une forme spécifique de la chromatographie sur colonne généralement utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composés [7].

Une caractéristique remarquable de la HPLC est qu'elle convient souvent à des composés organiques thermolabiles ou insuffisamment volatils pour pouvoir être analysée par chromatographie en phase gazeuse sans dérivatisation préalable. Il convient à la séparation d'une large gamme de produits chimiques, y compris les produits pharmaceutiques, les aliments, les produits industriels lourds et les produits biochimiques [8].

II.4.1 Principe général

La HPLC utilise principalement une colonne qui contient la phase stationnaire, une pompe qui déplace la phase mobile à travers la colonne et un détecteur qui décèle le passage de chaque molécule à la sortie de la colonne. Le temps de rétention varie en fonction des interactions entre la phase stationnaire, les molécules analysées et le ou les solvants utilisés. L'échantillon à analyser est introduit en petit volume dans le flux de phase mobile et est retardé par des interactions chimiques ou physiques spécifiques avec la phase stationnaire. Le retard dépend de la nature de l'analyte et de la composition des phases stationnaire et mobile [7].

Le moment auquel un analyte spécifique est élué (sort de la colonne) Il est appelé rétention. Les solvants couramment utilisés comprennent diverses combinaisons de liquides organiques, les plus courants sont le méthanol ou l'acétonitrile et l'eau [7].

II.4.2 Types d'HPLC

Plusieurs types de phase stationnaire sont utilisés et cette méthode chromatographique peut être associée à de nombreux détecteurs (UV, ELSD, CAD, IR-TF, MS et RMN) offrant ainsi plusieurs possibilités pour l'analyse de différentes classes de composés chimiques.

On distingue en fonction des phases stationnaires, deux types de chromatographie liquide à haute performance :

- a. **Chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC)** : où la phase stationnaire est de nature non polaire (par exemple, hydrocarbure) et le solvant d'élution (ou phase mobile) est polaire (par exemple, eau ou méthanol). Les composés non polaires seront conservés plus longtemps sur la colonne alors que les composés polaires sont élués en premier [9,8].
- b. **Chromatographie liquide en phase normale (NP-HPLC)** : la phase stationnaire est de nature polaire (par exemple, silice ou alumine) et la phase mobile est non polaire (par exemple, hexane). Dans ce mode, les échantillons polaires sont plus fortement retenus par la colonne, permettant ainsi l'élution des composés non polaires en premier [9,8].

Pour changer la polarité de la phase mobile, un mélange de solvants peut être utilisé pour éluer les composés. Lorsque la composition d'un tel mélange de solvants reste fixe tout au long de l'étape d'élution, on parle d'élution isocratique. Par contre, lorsque la composition du mélange de solvants est modifiée au cours de l'étape d'élution, on utilise une élution dite par gradient. [9]

II.4.3 Principe physicochimique de la séparation chromatographique

Plusieurs principes physico-chimiques (illustrés sur la figure II.3) sont impliqués dans les mécanismes de chromatographie utilisés pour séparer ou fractionner divers composés d'intérêt, quelles que soient les techniques spécifiques appliquées. Les cinq principaux types de CL basés sur le mécanisme de séparation sont (1) la chromatographie par adsorption, (2) la chromatographie de partition, (3) la chromatographie par partage d'ions CEI, (4) la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et (5) la chromatographie d'affinité. [10-11]

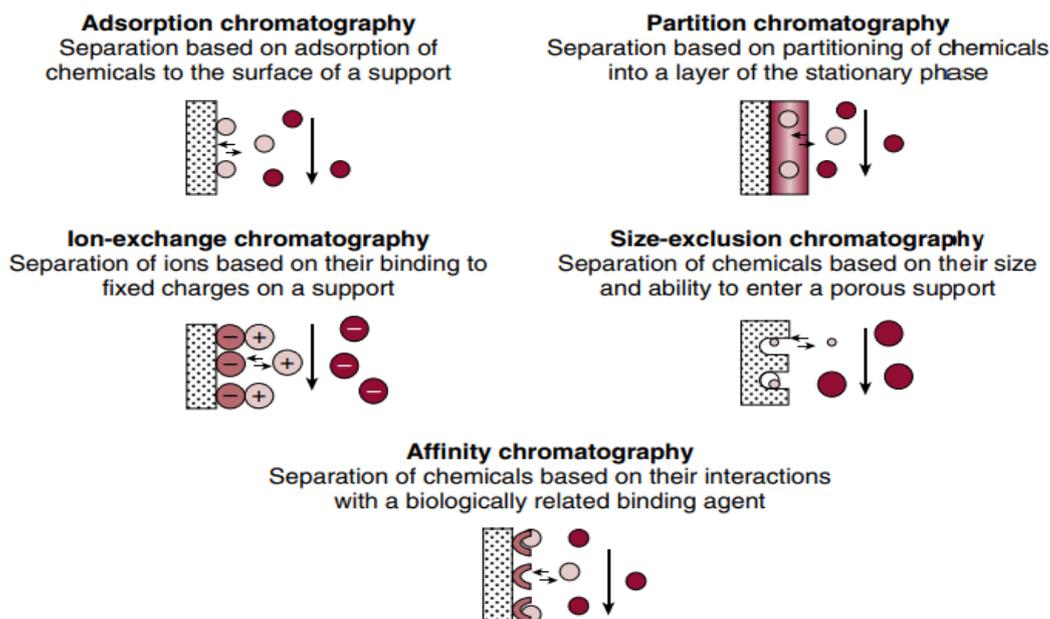


Figure II.3 : Modes chromatographiques [11]

a. Chromatographie d'adsorption

La chromatographie par adsorption est un type de CL dans lequel les produits chimiques sont retenus en fonction de leur adsorption et de leur désorption à la surface du support, qui agit également comme phase stationnaire. La rétention dans cette méthode est basée sur la compétition de l'analyte avec des molécules de la phase mobile car les deux se lient à la surface du support. Le degré de rétention d'un produit chimique dans la chromatographie par adsorption dépendra

- De la force de liaison de ce produit chimique au support.
- De la surface du support.
- De la quantité de phase mobile déplacée du support par le produit chimique.
- La force de liaison de la phase mobile au support.

Les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogène, les interactions dipôle-dipôle et les interactions dispersives (c'est-à-dire les forces de van der Waals) peuvent toutes affecter la rétention dans ce type de chromatographie [11].

b. Chromatographie de partage

C'est une chromatographie liquide-liquide, dans laquelle la phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte. Les deux phases (PS et PM) sont non miscibles.

La chromatographie de partage est basée sur la différence de solubilité des molécules à séparer entre les deux phases utilisées. Cette technique est similaire à l'extraction liquide / liquide basée sur la différence de solubilité dans deux phases non miscibles, mais ici l'une des deux phases est fixée sur un solide de très petit diamètre de particules (d_p). L'augmentation significative de la surface de contact entre les deux phases signifie que cette phase peut atteindre une efficacité supérieure par rapport à l'extraction liquide / liquide traditionnelle.

Comme en extraction, il faut que la solubilité de l'une des deux phases dans l'autre soit aussi faible que possible.

c. Chromatographie par échange d'ions CEI

La chromatographie par échange d'ions (anions ou cations) peut être considérée comme un type de chromatographie par adsorption dans lequel les interactions entre le soluté et la phase stationnaire sont principalement de nature électrostatique. La phase stationnaire (échangeur d'ions) est une résine contenant des groupes fonctionnels fixes qui sont chargés négativement ou positivement [10].

Les contre-ions échangeables préservent la neutralité de la charge. Un ion de l'échantillon (ou des sites chargés sur de grosses molécules) peut être échangé avec le contre-ion pour devenir le partenaire de la charge fixe. Le groupe fonctionnel de la phase stationnaire détermine si des cations ou des anions sont échangés. Les échangeurs de cations contiennent des groupes fonctionnels chargés négativement liés de manière covalente, tandis que les échangeurs d'anions contiennent des groupes liés chargés positivement. La nature chimique de ces résidus acides ou basiques détermine comment l'ionisation en phase stationnaire est affectée par le pH de la phase mobile [10].

d. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC), encore connue sous le nom de chromatographie à perméation de gel permet d'obtenir une répartition « continue » des molécules dans l'échantillon selon leur taille, exprimée en poids moléculaire rapporté à une molécule modèle. La répartition des poids moléculaires moyens donne un aperçu rapide de l'hétérogénéité en taille de l'échantillon considéré. Le processus de séparation SEC est basé sur la diminution d'entropie d'une macromolécule lorsqu'elle pénètre dans un pore de diamètre comparable à ses propres dimensions. [13-14]

e. La chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est une forme de chromatographie liquide par adsorption. Cette technique est utilisée depuis des décennies pour l'isolement et la purification de cibles spécifiques en tirant parti de la liaison sélective et réversible qui se produit dans de nombreuses interactions biologiques [16].

Elle est basée sur des interactions biospécifiques qui peuvent exister entre une protéine et des petites molécules (acide nucléique, sucre, lectine...), entre un substrat et une enzyme, un anticorps et un antigène (immunosorption)...etc. Dans tous les cas, il faut que le ligand puisse former des complexes réversibles avec la protéine à adsorber, avec une spécificité appropriée, et une force d'interaction suffisante, mais permettant quand même l'éluion, dans des conditions pas trop sévères. Il faut aussi que le ligand puisse être immobilisé sur une matrice insoluble. [17]

La chromatographie d'affinité est réalisée dans trois étapes : **Fixation- purification puis éluion.**

- **Etape de fixation :** Le mélange de molécules contenant le composé à purifier est chargé sur la colonne d'affinité.
- **Etape de purification :** En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées.
- **Etape d'éluion :** La molécule purifiée est décrochée de la colonne et recueillie dans l'éluant. [18]

II.4.4 Appareillage en HPLC [4, 6,19]

L'HPLC est constituée de :

- Réservoir de la phase mobile.
- Dégazeur.
- Système pompage.
- Injecteur.
- Colonne.
- Détecteur.

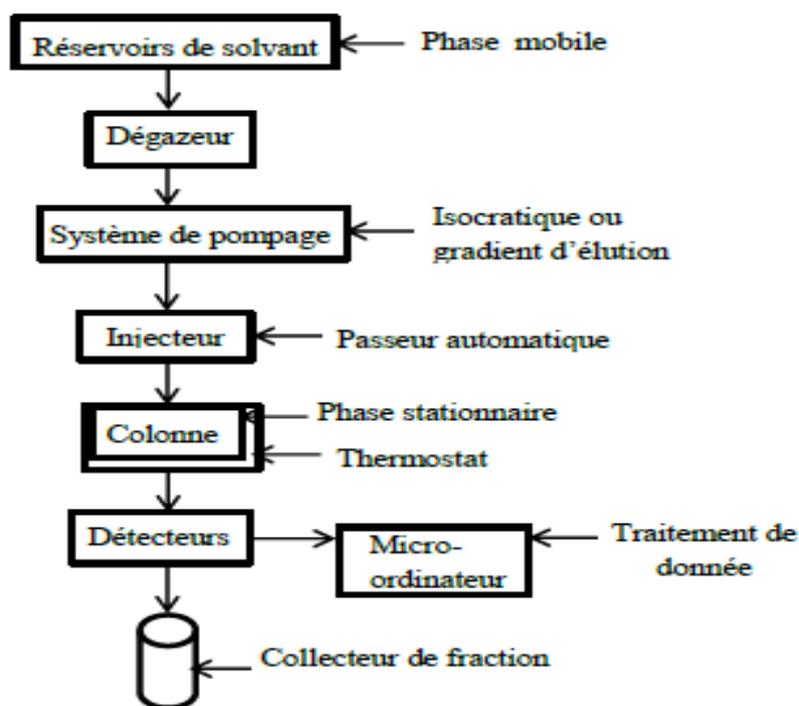
Chromatographie Liquide Haute Performance

Figure II.4 : Schéma représentatif d'HPLC.

a. Réservoir de la phase mobile

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. Le solvant utilisé doit nécessairement :

- Maintenir la stabilité de la colonne
- Être compatible avec le détecteur
- Solubiliser suffisamment l'échantillon et ne pas gêner sa récupération.
- Dégazeur

Plus la phase mobile est polaire plus la tendance de l'air à se dissoudre est forte. Il est nécessaire donc d'éliminer au maximum l'azote et l'oxygène qui peuvent être présents.

Durant le pompage, dans la chambre de mélange ou dans la colonne elle-même, si les solvants ne sont pas dégazés, l'air dissout dans le liquide soumis à de fortes pressions, forme des bulles à l'intérieur du système, c'est l'un des inconvénients majeurs pour la plupart des détecteurs en particulier ceux qui utilisent des propriétés optiques.

b. Système de pompage

Tout appareil HPLC comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne.

On utilise des pompes conçues pour maintenir un débit non pulsé et stable, même si la composition de la phase mobile varie.

Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur. Celle-ci peut atteindre 20 000 kPa (200 bars) selon le débit imposé à la phase mobile ou sa viscosité ainsi que selon la nature de la phase stationnaire.

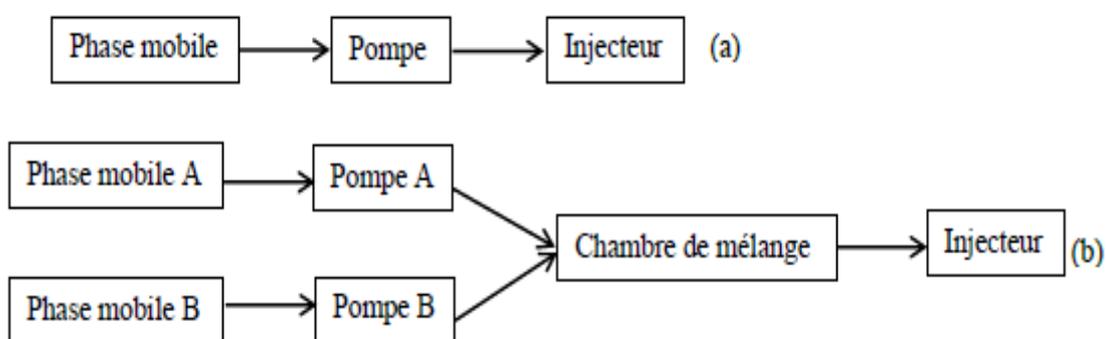


Figure II.5: Représentation schématique d'un système de pompage

(a) mode isocratique (b) mode gradient d'élution

c. Injecteur

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible, le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable, de la colonne au détecteur. On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne.

Elles doivent être capables de résister aux fortes pressions. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques mL/min. Ces colonnes ont les avantages suivants :

- Rapidité de l'analyse,
- Faible consommation de solvants
- Bonne résolution.

d. Colonne

Les colonnes CLHP sont généralement en acier inoxydable, elles sont courtes et droites et se caractérisent par leur géométrie et par la nature des phases qu'elles contiennent.

e. Détecteur

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne. Il existe d'autres détecteurs :

- Détecteur fluorimétrique.
- Détecteur réfractométrique.
- Détecteur électrochimique.
- Détecteur par spectroscopie de masse.

Références

- [1] **Nawal. T.** 2013. Procédés de séparation multi colonnes continus : Extension à la chromatographie à gradient de solvant (Thèse de doctorat), page24-25.
- [2] **Zeghilet. Noureddine.**2009. Optimisation des paramètres de détection et de quantification des résidus d'antibiotiques dans la viande blanche par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (mémoire de Magister), page 62.
- [3]**Rouessac. F, Rouessac. A.** 2019. Analyse chimique Méthodes et techniques instrumentales. 9e édition, Dunod-Sciences Sup. P06.
- [4] **Bencheraga. K.** Introduction aux techniques analytiques. HPLC Principe et appareillage.
- [5] **Nacera. B.** 2004. Suivi par HPLC de la photodégradation de L'ATRAZINE dans différents milieux (thèse de doctorat). P26-27.
- [6] **Colomb. F. 2010.** HPLC Principe et appareillage. Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen. 1-11.
- [7] **Malviya. R, Bansal. V, Pal O.P. and Sharma P.K.**2010. High performance liquid chromatography: A Short Review. Journal of Global Pharma Technology, 2(5): 22-26.
- [8] **Bélanger. J-M. R, Jocelyn Paré. J-R., & Sigouin. M.** 1997. Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. Instrumental Methods in Food Analysis, 37–59.
- [9] **Nicaise François BONY.**2013. Stratégie analytique des tradimédicaments : établissement de profils chromatographiques des métabolites phytochimiquesapolaires (Thèse de doctorat).P73-74.
- [10] **Ismail. B., & Nielsen. S-S.** (2010). Basic Principles of Chromatography. Food Analysis, 473–498.
- [11] **Hage. D-S.** 2018. Chromatography. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry, 1–32.
- [12] <http://www.123bio.net/cours/chromato/echange.html> , visité le 26/05/2021 10:20.
- [13] **Nguyen. T-Q.**1998. Chromatographie en phase liquide des polymères synthétiques : principes et applications. Analisis 26(2), 35-41.
-

- [14] **Johann. B.** 2019. Application de la chromatographie d'exclusion stérique multi-détection à l'étude de la spéciation de la matière organique dissoute en milieu estuarien et côtier (Thèse de doctorat). P57.
- [15] **Chantal. R, Éric. A.** 2017. Chromatographie d'exclusion. Laboratoire 51, Éléments de biochimie.
- [16] **Rodriguez. E-L, Poddar. S, Iftekhar. S, Suh. K, Woolfork. A-G, Ovbude. S, Hage. D-S.** (2020). Affinity Chromatography: A Review of Trends and Developments over the Past 50 Years. *Journal of Chromatography B*, 122332.
- [17] **Marie. O, NICOLAS. S.** 1991. Contribution à l'étude de la chromatographie frontale des protéines par échange d'anions. Application à l'albumine de sérum bovin (Thèse de doctorat). P16.
- [18] **Mekhalif. T.** 2018. Synthèse et Caractérisation de Résines fonctionnalisées et étude de leur affinité Vis-à-vis de L'Albumine humaine « HSA » (Thèse de doctorat). P46.
- [19] **Boucheloukh. H.** Cours Méthodes d'Analyses Chromatographiques. Chromatographie liquide haute performance. P31-37.

MATERIEL
ET
METHODES

Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons le matériel, les solvants, les réactifs et les modes opératoires ayant servis dans la partie expérimentale ainsi que le logiciel et la méthode utilisés dans la partie théorique.

La partie expérimentale de cette étude a été faite au niveau du laboratoire de chimie appliquée LCA et la partie simulation au niveau du laboratoire de chimie computationnelle et nanostructures LCCN, tous deux affiliés à l'Université 08 Mai 1945 Guelma.

Partie expérimentale**III.1 Matériels utilisés**

- Verreries usuelles de laboratoire.
- Etuve.
- Appareil HPLC-DAD.
- Spectromètre Infra-rouge (IRTF).

III.2 Solvants et réactifs

- EGCG.
- Cis stilbène.
- Méthanol grade HPLC.
- Acide trifluoroacétique TFA.
- Acétonitrile ACN.
- Eau ultra-pure.
- Chloroforme CHCl_3 .

III.2.1 Propriétés des réactifs utilisés

Les deux réactifs utilisés dans cette Etude sont le cis stilbène et l'EGCG.

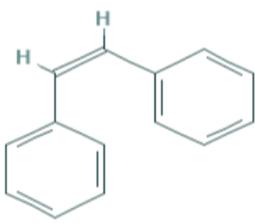
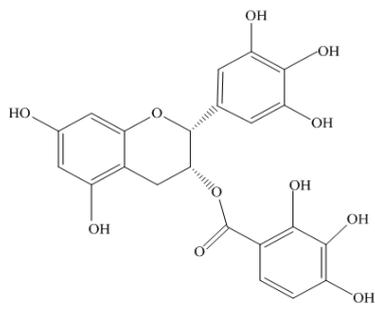
Les réactifs	Le cis stilbène	L'EGCG
Formules	C₁₄H₁₂	C₂₂H₁₈O₁₁
Structures		
Nom selon L'IUPAC	1,2-diphényléthylène.	<p>3, 4,5-trihydroxybenzoate de (2R, 3R)-5,7-dihydroxy-2-(3, 4,5-trihydroxyphényl)-3,4-dihydro-2H-chromén-3-yle.</p> <p>Autre nom :</p> <p>(2R, 3R) -5,7-Dihydroxy-2-(3, 4,5-trihydroxyphenyl) -3,4-dihydro -2H-1-benzopyran-3-yl 3, 4,5-trihydroxybenzoate.</p>
Propriétés physico-chimique	<p>Masse molaire= 180,25 g/mol</p> <p>Aspect physique : huileux.</p> <p>Couleur : jaune.</p> <p>T°_{fusion} = -5 °C</p> <p>Solubilité : Insoluble dans l'eau /Solubles dans les alcools, l'éther, l'acétone, le benzène, le chloroforme.</p>	<p>Masse molaire= 458,3717 g/mol.</p> <p>Forme : SOLIDE.</p> <p>T°_{fusion} = 218 °C</p> <p>Solubilité : Solubles dans les solvants polaires.</p>

Tableau III.1 : Propriétés des réactifs utilisés [1-2]

III.3 Protocole expérimental

III.3.1 Préparations des solutions

Préparation des solutions de l'antioxydant : une solution mère d'EGCG, appelée E_0 , a été préparée à partir de 1mg d'EGCG dans un volume de 10ml de MeOH, de concentration C_0 .

A partir de cette solution mère des dilutions ont permis d'obtenir trois solutions de concentrations différentes :

1. A un volume de 125 μ l de la solution mère on a rajouté un volume de 12.5 ml de MeOH, pour obtenir une solution E_1 de concentration C_1 .
2. On double la concentration, à un volume de 250 μ l de la solution mère, on a rajouté 12.5ml de MeOH, la solution E_2 obtenue a une concentration $C_2= 2C_1$.
3. A un volume de 375 μ l de la solution mère, on a rajouté un volume de 12.5 ml de MeOH ; la solution E_3 obtenue a une concentration $C_3= 2C_1$.

Préparation de la solution du pro-oxydant : Nous avons travaillé avec une solution S_0 de cis stilbène de concentration initiale, préparée en introduisant 180 μ l de cis-stilbène pur dans un volume de 50 ml de MeOH, de concentration C'_0 . Cette solution a ensuite été diluée en versant 10 μ l de la solution S_0 dans 10ml de MeOH, la nouvelle solution S_1 résultante Possède une concentration C'_1 .

III.3.2 Préparation de la phase mobile

Nous avons travaillé en mode isocratique qui consiste en une composition fixe de la phase mobile. Ainsi, un mélange d'ACN (600 ml) et d'eau ultra-pure (400ml) auquel 25ml d'une solution de TFA (préparée en diluant 125 μ l de soluté dans 50 ml d'eau ultra-pure), Ont été additionnés, a constitué notre phase mobile ou éluant.

III.3.3 Préparation des mélanges

- Dans une cupule, nous avons introduit 0.9ml de la solution mère d'EGCG E_0 dans 0.1 ml de la solution (S_1) ➔ Ce mélange réactionnel est appelé ES
- Puis nous avons préparé une solution de 0.5ml de la solution (E_1) avec 0.5ml de la solution (S_1) ➔ Ce mélange réactionnel est appelé (ES_1)
- Ensuite deux autres solutions équimolaires avec 0.5/0.5ml de (E_2) et (S_1) et 0.5/0.5ml de E_3 avec (S_1) ➔ Ces mélanges réactionnels sont appelé (ES_2) et (ES_3) respectivement.

III.4 Analyse par HPLC

L'appareil HPLC-DAD utilisé est du type Agilent, série 1260 Infinity (**Figure III-1**) 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 barrettes de photodiodes (G1315B). La colonne est du type C18 à silice greffée.

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

III.4.1 Conditions d'analyse

- ✓ Comme nous avons travaillé en mode isocratique : composition de phase mobile fixe tout au long de l'analyse, le mélange de solvants a été introduite dans un seul réservoir pour ne faire fonctionner qu'une seule pompe.
- ✓ La phase stationnaire utilisée est de la silice greffée avec du C18. Ce matériau est contenu dans une colonne de marque Zorbax Eclipse Plus C 18 (analytique 4.6x250mm, 5-Micron) (Agilent, USA).
- ✓ Le débit de la phase mobile a été fixé à 1ml /min et la température à $T=30\pm 0,13^{\circ}\text{C}$ et la pression à $P=74,3\pm 0,14$ 0,14 Bar.
- ✓ Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de la colonne. Dans notre cas, il s'agit d'un détecteur à barrettes de photodiodes qui nous permet de sélectionner plusieurs longueurs d'onde, à la fois. La détection du composé étudié a été réalisée aux longueurs d'onde suivantes : 280, 300, 310, 320,360 et 375nm.



Figure III.1 : Appareil HPLC utilisé. HPLC-DAD, Agilent technologies (LCA, université de Guelma)

III.4.2 Injection de blanc

Le volume d'injection du blanc (MeOH) est 80 μ l pour le nettoyage de la colonne.

III.4.3 Injection des produits purs

On injecte à chaque fois, 1 μ l de cis stilbène pur (S1) et 1 μ l de la solution mère de l'EGCG (E₀).

Après chaque injection des composés nous devons nettoyer avec le blanc (MeOH) pour éviter les traces de composés adsorbés sur la colonne.

III.4.4 Injection des mélanges

1 μ l de chacune des solutions (ES, ES1, ES2, ES3) des mélanges déjà préparés et décrits ci-dessus, est injecté dans la colonne.

III.4.5 Etude de l'effet de la température sur les interactions Pro/anti oxydant

Pour évaluer l'effet de la température sur les interactions ayant eu lieu entre l'EGCG comme antioxydant et le cis stilbène comme pro-oxydant, 4 températures ont été sélectionnées, 15, 20, 25 et 40 °C. Le mélange réactionnel choisi dans ce cas est le (ES3) où la concentration

du pro-oxydant est 3 fois moins celle de l'antioxydant, et c'est celle qui a donné la meilleure résolution des pics du mélange réactionnel.

III.4.6 Etude de l'effet du temps sur les interactions Pro/anti oxydant

En gardant le même mélange réactionnel (ES3), on a observé les changements ayant lieu après plusieurs jours, de contact entre les 2 molécules.

III.5 Etude spectrométrique

III.5.1 Spectroscopie d'absorption UV-Visible

La spectroscopie UV-Vis est l'une des techniques les plus utilisées pour caractériser les molécules. Elle correspond à l'absorption de la lumière dans les gammes de longueurs d'onde ultraviolettes et visibles (180-380 nm et 380-750 nm, respectivement). Toutes les grandes classes de biomolécules contiennent certains groupes fonctionnels absorbant la lumière est appelés chromophores. En absorbant la lumière UV/Vis, ces chromophores sont excités de l'état fondamental à un niveau d'énergie plus élevé (**Figure III.2**), donnant ainsi des spectres caractéristiques, aidant à l'identification de biomolécules [3].

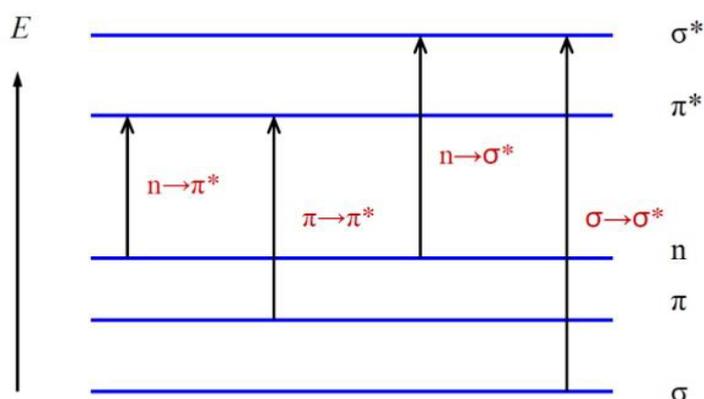


Figure III.2 : Les transitions électroniques

III.5.2 Spectroscopie Infrarouge (IR)

La spectroscopie infrarouge est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon à analyser. Cet échantillon peut être à l'état gazeux, solide ou liquide. Elle permet via l'absorption des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, de déterminer la présence de certaines fonctions chimiques présentes dans la matière [4].

Le domaine infrarouge se situe entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} ($2,5 - 25\ \mu\text{m}$) et correspond au domaine d'énergie de vibration de la plupart des molécules (infrarouge moyen). Cependant, certaines molécules ne donnent pas lieu à une absorption infrarouge, c'est le cas par exemple des molécules diatomiques homonucléaires (N_2 , O_2 , etc.) car leur moment dipolaire est nul. Il existe deux principaux types de vibrations : les élongations (stretching) le long de l'axe de la liaison, et les déformations (bending) occasionnant une modification de l'angle entre deux liaisons adjacentes, dans le plan ou hors du plan. Ces élongations et déformations peuvent être symétriques ou asymétriques. (Elles sont illustrées dans la **figure III.3** en prenant pour exemple la liaison C-H.) [4].

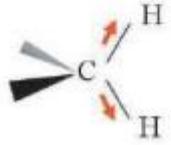
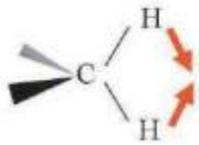
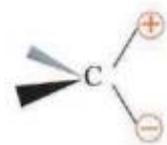
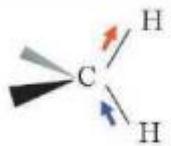
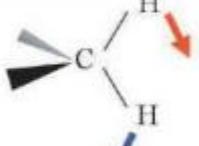
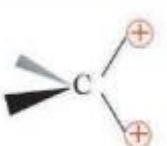
	Elongations	Déformations angulaires	
		dans le plan	hors du plan
Symétrique	 Elongation symétrique	 Cisaillement (scissoring)	 Torsion (twisting)
Asymétrique	 Elongation asymétrique	 Balancement (rocking)	 Hochement (wagging)

Figure III.3 : Modes vibrationnels infrarouge d'une liaison CH [4]

Partie Théorique

Les calculs ont été réalisés en utilisant le logiciel Gaussian version 09 et la visualisation des résultats est effectuée au moyen de Gauss-view version 6. L'optimisation des structures a été réalisée par la méthode DFT avec la fonctionnelle hybride B3LYP et la base 6-311G (d, p) ++. Pour l'optimisation des produits des réactions une base plus faible, 6-31G a été utilisée.

Pour la détermination des états de transition, un calcul de TS-QST3 a été fait.

III.6 Logiciel Gaussian

Gaussian est un logiciel de la chimie numérique basé sur les lois fondamentales de la mécanique quantique, Gaussian peut prédire l'énergie, la structure moléculaire et la fréquence de vibration de systèmes moléculaires complexes, et prédire leurs propriétés chimiques. Les molécules et les réactions peuvent être étudiées dans un large éventail de conditions, non seulement pour des espèces stables ou des composés complexes, mais aussi pour des composés qui ne peuvent pas être observés expérimentalement, tels que des intermédiaires temporaires ou des états de transition [4].

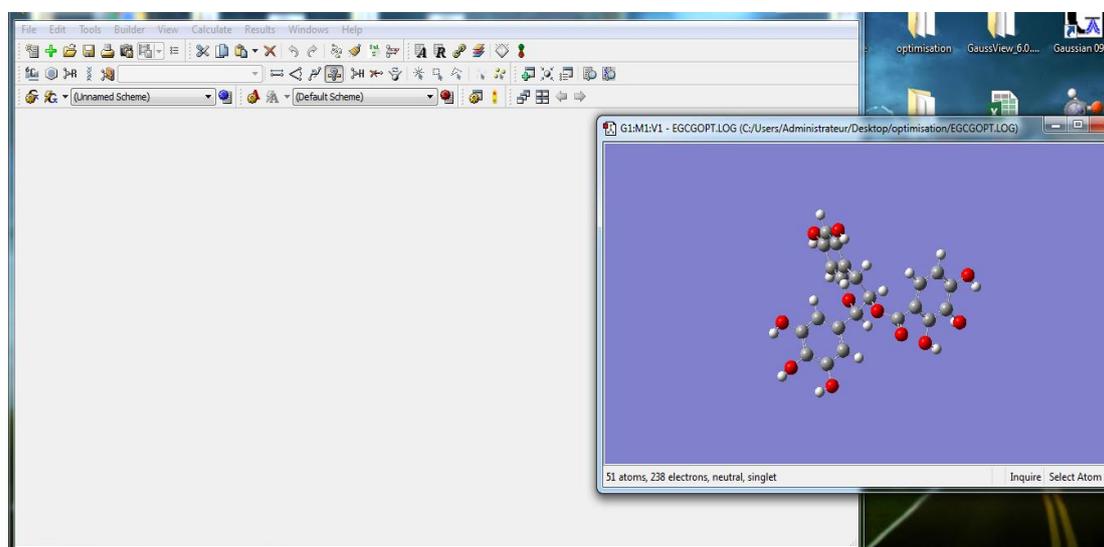


Figure III.4 : Fenêtre principale de Gauss-view.

III.7 Théorie de la fonctionnelle de la densité DFT

Le concept fondamental de la DFT est que l'énergie d'un système électronique peut être exprimée en fonction de sa densité. Cette théorie repose sur deux théorèmes fondamentaux, démontrés en 1964 par Hohenberg et Kohn, qui établissent que l'énergie d'un système dans son état fondamental est une fonctionnelle de la densité électronique de ce système. La DFT

connait un grand succès dans les calculs de structures électroniques des atomes, pris dans leurs états fondamentaux [5].

III.8 Les structures des réactifs

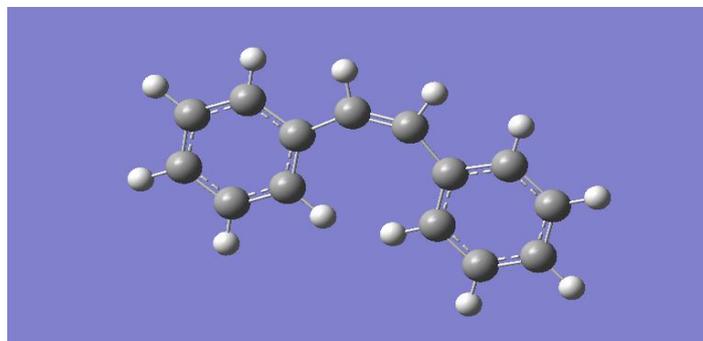


Figure III.5 : Structure du cis stilbène optimisé dans le MeOH
(DFT/B3LYP/6-311G (d, p) ++)

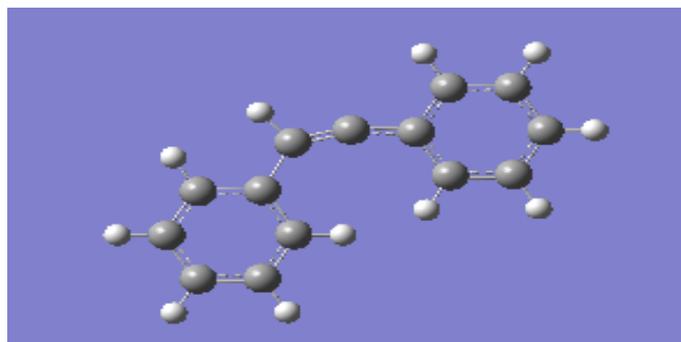


Figure III.6 : Structure du cis stilbène radicalaire optimisé dans le MeOH
(DFT/B3LYP/6-311G (d, p) ++)

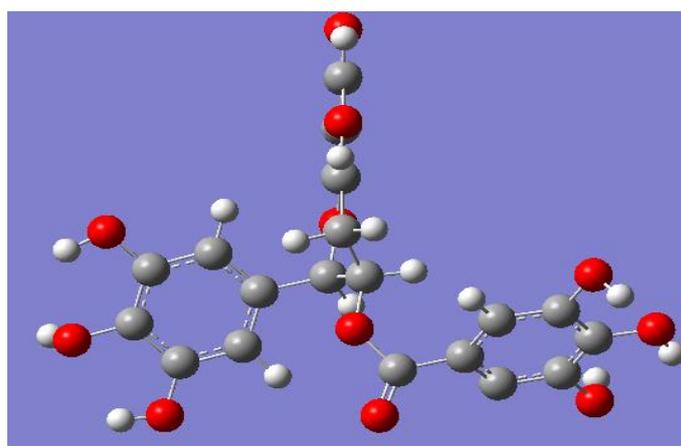


Figure III.7 : Structure de l'Epigallocatechine gallate EGCG optimisée dans le MeOH.
(DFT/B3LYP/6-311G (d, p) ++)

Référence

[1] <https://www.universalis.fr/encyclopedie/stilbene/>. visité le 21/06/2021 20 :49.

[2] **Sharifi-Rad. M, Pezzani. R, Redaelli. M, Zorzan. M, Imran. M, Ahmed Khalil. A, Sharifi-Rad. J.** 2020. Preclinical Pharmacological Activities of Epigallocatechin-3-gallate in Signaling Pathways: An Update on Cancer. *Molecules*, 25(3), 467.

[3] **Rakhee. M-J, Sharma. R-K, & Misra. K.** 2018. Characterization Techniques for Herbal Products. *Management of High Altitude Pathophysiology*, 171–202.

[4] **Magamou. G.** 2016. Caractérisation par infrarouge à transformée de Fourier des réactions chimiques entre post-décharges et précurseurs organosiliciés : cas du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES). (Thèse de doctorat) .P52.

[5] <https://ritme.com/fr/logiciels/gaussian/> , visité le 12/06/2021 18 :36

[6] **BELKHARROUBI. F.** 2015. Contribution à l'étude des propriétés structurales, magnétiques, élastiques, thermodynamiques et électroniques des alliages à base de terre rare HoX (X= N, O, S et Se) par la méthode du potentiel total des ondes planes augmentées linéarisées (FP-LAPW). (Thèse de doctorat). P16

RESULTATS
ET
DISCUSSIONS

Introduction

Ce chapitre est consacré aux résultats des deux parties expérimentale et théorique ainsi que leurs interprétations. Nous discuterons de la mise en évidence des interactions pro-oxydant/antioxydant, l'influence des paramètres tels que la température, la concentration et le temps de contact sur la stabilité des adduits formés ainsi que les mécanismes les plus probables pour leur obtention.

IV.1 Mise en évidence des interactions entre l'EGCG (antioxydant) avec le cis stilbène (pro-oxydant)

Cette étude a été faite par HPLC en phase inverse sur une colonne du type C18. Les deux molécules EGCG et cis stilbène ont été injectées séparément puis ensemble sous différentes conditions chromatographiques, l'interprétation des résultats suivra dans les sections ci-dessous.

IV.1.1 Interprétation des chromatogrammes HPLC

L'injection d'une solution de cis-stilbène en RP-HPLC, en mode isocratique a donné un pic à 20.49 min (**Figure IV.1**), indiquant une grande rétention de cette molécule sur la phase stationnaire apolaire C18, due à de fortes interactions entre cette dernière et le soluté, qui est la molécule de cis stilbène. La forme du pic est d'une symétrie acceptable et sa largeur à la base est inférieure à 1 cm, ce qui prouve sa haute pureté.

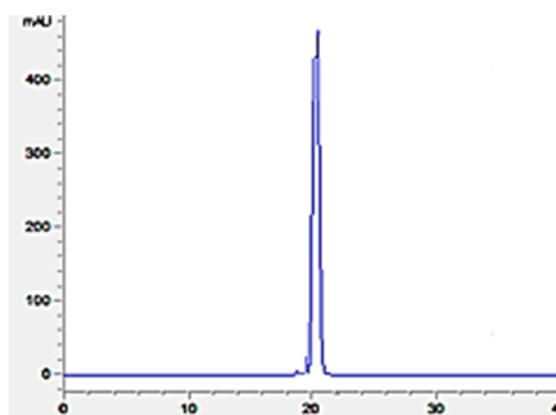


Figure IV.1 : Chromatogramme du cis stilbène, $t_r=21$ min

De même, l'injection d'une solution d'épigallocatechine gallate, nous donne un pic de forme gaussienne, symétrique et dont la largeur à la base est inférieure à 0,5 cm (**Figure IV.2**), confirmant la haute pureté de ce composé. Le temps de rétention de 2.11 min indique la faible interaction de cette molécule avec la phase stationnaire de nature apolaire, ce composé est donc polaire et il a une plus grande affinité avec la phase mobile polaire.

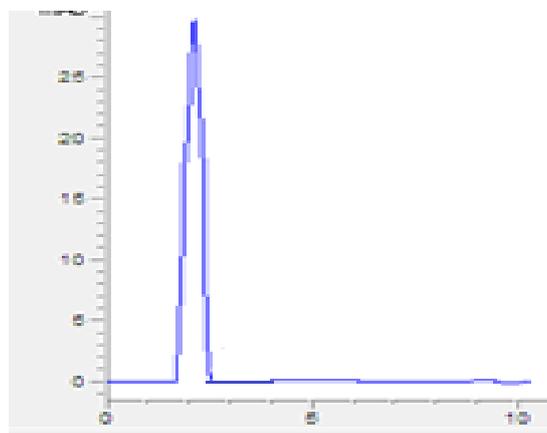


Figure IV.2 : Chromatogramme de l'EGCG, $t_r=2.11$ min

Les deux solutions de cis stilbène (S1) et d'EGCG (E1) ont été mélangées (solution ES) dans une cupule d'HPLC et laissées en contact pendant dix minutes puis analysées par HPLC.

Le résultat de cette analyse est illustré dans le chromatogramme de la **Figure IV.3**, qui montre un premier pic à $t_r= 2,21$ min et un deuxième pic à 24,4 min. En HPLC, un composé devrait avoir le même temps de rétention quand il est injecté seul ou dans un mélange et c'est ce principe qui nous permet de faire de l'analyse quantitative par HPLC. Dans notre cas, les deux molécules de départ ont disparu donnant lieu à deux nouvelles espèces qui ont des données chromatographiques différentes des celles de départ. Ces données sont le temps de rétention t_r , l'intensité du pic et le maximum d'absorption. Le temps de rétention est fonction des différentes interactions ayant lieu entre le soluté et la phase stationnaire d'une part et le soluté et la phase mobile de l'autre part, ces interactions sont fonctions de la structure de la molécule et de ses propriétés physico-chimiques. Donc si on a des temps de rétention dans les mélanges différents de celles des composés de départ, cela veut dire forcément que de nouvelles interactions entre les deux molécules ont eu lieu et ont donné deux nouveaux composés. Le premier possède des propriétés voisines de l'antioxydant EGCG et le deuxième plutôt proches de celles du pro-oxydant, le cis stilbène. On parle ici des propriétés comme la polarité et la solubilité surtout. L'intensité du pic est fonction de la concentration, et du

coefficient d'absorptivité molaire, ici la concentration n'a pas changé, selon le principe de conservation de matière, mais l'intensité du pic de l'EGCG qui était 29,7 mAU pour un volume d'injection de 1 μ l à l'état pur a augmenté à 104 mAU dans le mélange réactionnel, pour un volume d'injection de 1 μ l, donc 0,5 μ l d'EGCG. La somme des intensités des pics a augmenté de 497 mAU à 693 mAU (**Tableau IV.1**), ça veut dire que les coefficients d'absorptivité molaires ont changé, étant fonction intrinsèque de la molécule, ceci indique clairement que de nouvelles substances ont été générées par le rapprochement des deux molécules EGCG et cis stilbène.

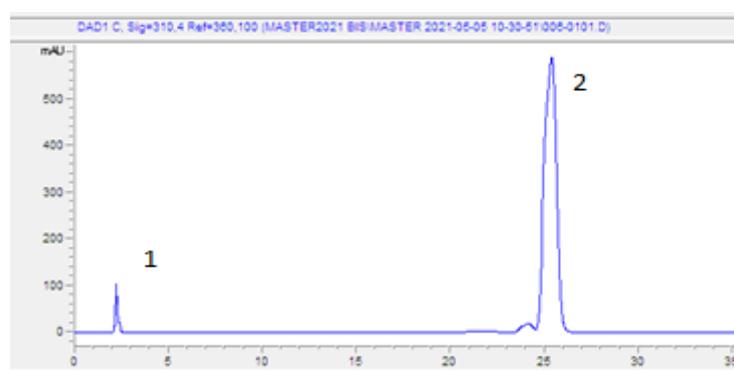


Figure IV.3 : Chromatogramme typique du mélange réactionnel du cis stilbène avec l'EGCG

Le domaine d'absorption et/ou maximum d'absorption est fonction des chromophores présents dans la molécule, tout changement dans le spectre UV-visible, indique un changement de structure ; ceci constitue une preuve supplémentaire de la formation de nouveaux produits par réaction de l'EGCG et le cis stilbène.

Tableau IV.1 : Données chromatographiques de l'EGCG, du cis stilbène et de leur mélange réactionnel, obtenu par RP-HPLC, C18, phase mobile, 60/40 ACN/H₂O

	t_r (min)	L'intensité (mUA)	Intensité totale
Cis stilbène	20,49	467,3	Réactifs
EGCG	02,11	029,7	467,3+029,7=497,0
Mélange réactionnel (Pic 1)	02,21	104,0	Mélange réactionnel
Mélange réactionnel (Pic 2)	24,40	589,1	104,0+589,1=693,1

VI.1.2 Interprétation des spectres UV-Vis

Les spectres présentés ci-dessous ont été générés automatiquement par le détecteur qui est un spectrophotomètre à barrettes de diode. Ainsi tout composé qui sort de la colonne est détecté, un pic chromatographique est tracé et un spectre UV-visible correspondant est enregistré.

➤ Spectre UV-Vis de l'EGCG

La gamme spectrale de l'EGCG (**Figure IV.4**) est comprise entre 215 et 323 nm avec $\lambda_{\max}=276$ nm. Le spectre UV-visible de l'EGCG montre deux bandes d'absorption S1 ($n \rightarrow \pi^*$) qui est une bande de transfert de charge intramoléculaire (à 210 nm) et une bande S2 ($\pi \rightarrow \pi^*$) dont le max est 276 nm et [1].

Ce résultat est en parfait accord avec ceux publiés [2,3]

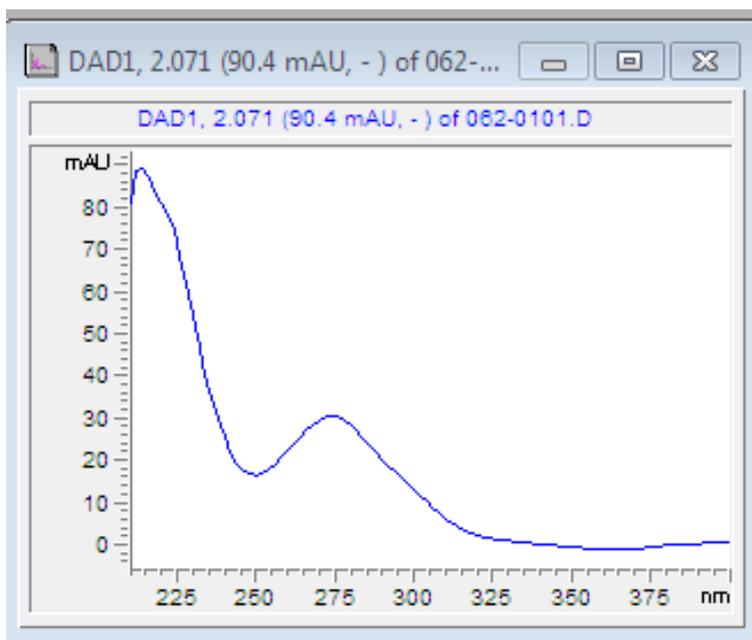


Figure IV.4 : Spectre UV-Vis de l'EGCG

➤ **Spectre UV-Vis du cis stilbène**

Pour le cis stilbène pur, son domaine d'absorption s'étend de 225 à 325 nm (**Figure IV.5**) avec $\lambda_{\max}=280$ nm. On observe la présence d'une bande S1 ($\pi\rightarrow\pi^*$) à 280 nm, qui est en parfait accord avec les résultats publiés, si on prend par exemple le handbok of chemsity, on y trouve que le stilbène (cis) dans l'éthanol possède une bande ($\pi\rightarrow\pi^*$) à 283 nm et un coefficient d'absorptivité molaire ϵ , de 12300 alors que pour son isomère trans cette band apparait à 295 nm avec un ϵ de 25000 [4].

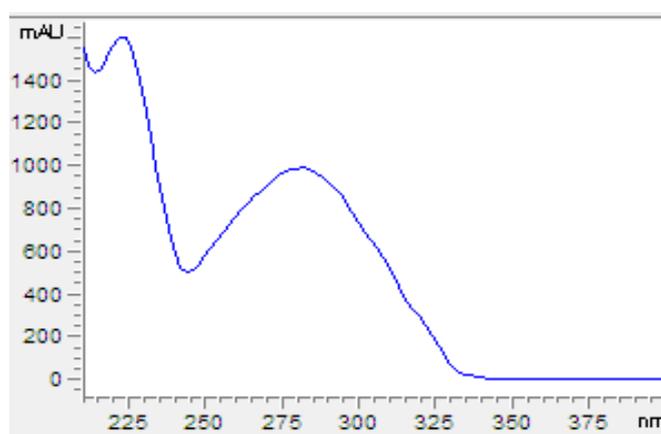


Figure IV.5 Spectre UV-Vis du cis stilbène

➤ **Spectre UV-Vis du mélange réactionnel**

Les spectres UV de mélange réactionnel comporte deux composés, on a donc 2 spectres

Le pic 1 : deux bandes d'absorption entre 225 et 346 nm avec $\lambda_{\max} = 310$ nm avec un épaulement à 275 nm.

Le pic 2 : La gamme spectrale entre 220 et 340 nm, plusieurs maximas.

La comparaison des spectres UV-visible du cis stilbène et de l'EGCG purs d'un côté et de leur mélange réactionnel de l'autre côté, montre qu'on a un effet bathochrome (augmentation de la longueur d'onde λ) observé pour les 2 pics du mélange réactionnel par rapport à ceux des réactifs de départ, ou en d'autres termes, les réactifs, ont disparu après avoir donné lieu à de nouveaux produits. Ceci confirme

qu'il y a eu des interactions entre l'EGCG et le cis stilbène, qui ont conduit à la formation possible de deux complexes de structures différentes.

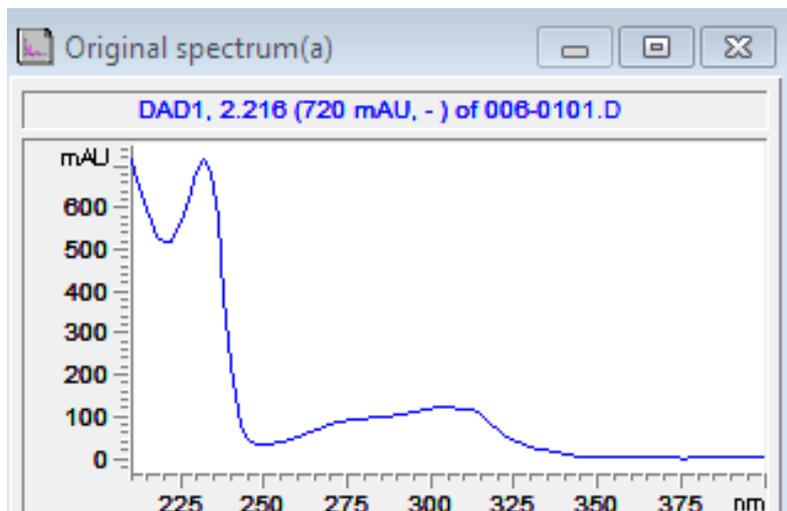


Figure IV.6 : Spectre UV-Vis du mélange réactionnel (pic1)

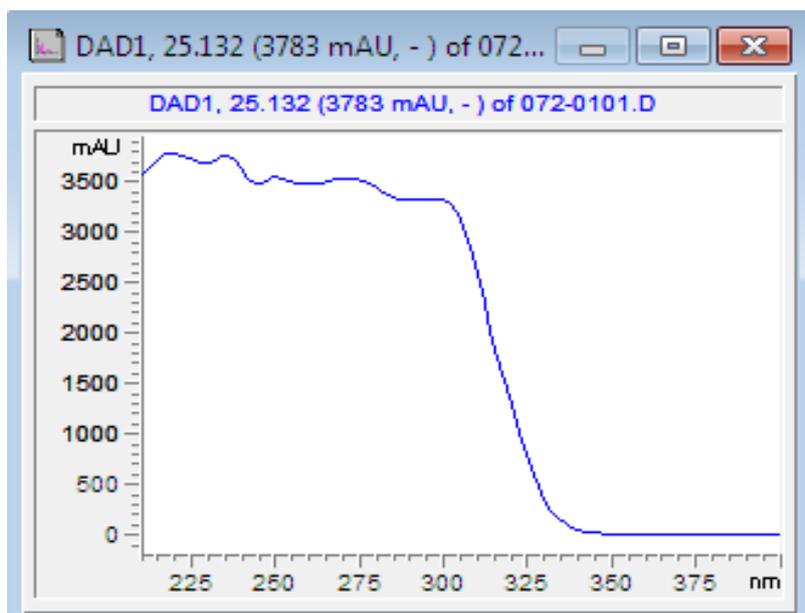


Figure IV.7 : Spectre UV-Vis du mélange réactionnel (pic2)

IV .2 Mécanismes probables

De tout ce qui précède, on pense qu'une partie du réactif cis stilbène réagit en tant que telle avec l'EGCG et donne lieu à un complexe cis stilbène/EGCG qui a des propriétés proches du cis stilbène (pic2) et une autre partie se transforme en trans à cause des interactions avec

l'EGCG et du gène stérique de la forme cis, et donne lieu à un autre type d'adduit où l'EGCG domine (pic 1).

Les interactions usuelles rencontrées en chromatographie entre les paires ; soluté/ phase mobile et soluté/ phase stationnaire et qui sont les composantes des forces de Van Der Waals sont:

- Interaction dipôle/dipôle ou force de Keesom, entre solvants polaires et groupes fonctionnels hydroxyles de l'EGCG ;
- Interaction dipôle/dipôle induit ou force de Debye entre phase mobile polaire et cis stilbène apolaire.
- Interaction dipôle induit/dipôle induit ou force de London entre le cis stilbène et la phase stationnaire apolaire, ou forces d'interactions hydrophobes

Par ailleurs, la formation de liaisons hydrogène qui est une force physique intermédiaire entre la liaison covalente et les liaisons de Van der Waals, n'est pas à écarter et elle est à l'origine de la trainée de certains pics dans la colonne. Dans notre cas elle peut être de deux types :

- Liaisons hydrogène intramoléculaires entre les OH de l'EGCG
- Liaisons hydrogène intermoléculaires entre ces derniers et le doublet libre de l'azote de l'acétonitrile ou les OH de l'eau comme solvants.

A celles-ci s'ajoutent les interactions entre les solutés et qui est dû à leur nature et leur réactivité. En effet, le cis stilbène avec la double liaison du pont éthylène, peut être très dangereux s'il existe dans des formulations cosmétiques ou autres, et l'EGCG est l'un des puissants antioxydants d'origine naturelle, trouvé dans le thé. Les interactions pro-oxydants/antioxydants auxquelles on pourrait penser et qui auraient pu avoir lieu sont de plusieurs types,

- Transfert d'atome H de l'antioxydant vers le pro-oxydant (ici étudié théoriquement seulement, présenté dans la section étude par modélisation)
- Formation d'un adduit par liaison covalente
- Complexe à transfert de charge.

IV.2.1 Formation d'un adduit

L'EGCG se lie au cis stilbène par une liaison covalente et forme un adduit, un complexe plus stable que le stilbène de départ possédant une double liaison très réactive et ne possède pas de groupements hydroxyles.

IV.2.2 Formation d'un complexe à transfert de charge

Un complexe à transfert de charge résulte de l'association de deux composés, l'un donneur de charge et l'autre accepteur. Ainsi, la charge, généralement un électron passe de l'orbitale HOMO du donneur à l'orbitale LUMO de l'accepteur [5]. Si un complexe de transfert de charge est formé entre le cis stilbène et l'EGCG, il serait possible que l'EGCG soit le donneur et le cis stilbène l'accepteur et une transition $n \rightarrow \pi^*$ entre le doublet libre de l'oxygène du carbonyle et la double liaison éthylénique du cis stilbène ait lieu (**Figure IV.8**).

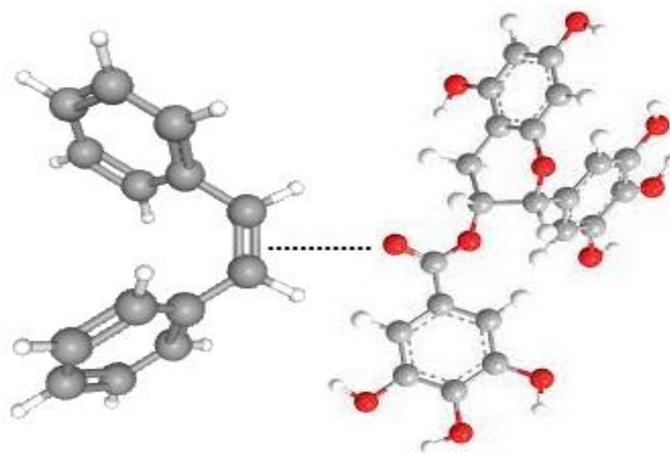


Figure IV.8 : Mécanisme possible de transfert de charge entre l'EGCG et le cis stilbène

IV. 3 Etude paramétrique des interactions pro-oxydants/antioxydants

IV. 3.1 Effet de la concentration

Dans cette partie de l'étude, on a fixé la température à $T^\circ = 30^\circ\text{C}$ et on a fait varier la concentration de l'antioxydant. Les résultats sont présentés dans le **tableau (IV.2)**.

Tableau IV.2 : Résultats de l'effet de concentrations C, égale concentration entre le cis stilbène et l'EGCG. 2C et 3C, la concentration de l'EGCG est 2fois et 3 fois celle du cis stilbène respectivement

	Pic 1		Pic2	
Concentrations	t_r (min) $\pm 0,01$	Intensité (mUA)	t_r (min) $\pm 0,018$	Intensité (mUA)
C	2,20	390,1	22,27	1786,7
2C	2,21	488,8	22,236	2333,2
3C	2,21	416,8	22,19	2293,5

Habituellement, l'intensité (l'absorbance) varie linéairement avec la concentration. D'après la loi de Beer-Lambert, l'absorbance augmente avec la concentration, mais ceci est dans le cas où les réactifs sont inertes.

$$A(\lambda) = \epsilon l C$$

En augmentant la concentration de l'antioxydant au double puis au triple de celle du pro-oxydant, en gardant le même volume d'injection, on trouve que l'intensité des pics des réactifs augmente pour une concentration de l'EGCG deux fois plus celle du cis stilbène, puis l'intensité diminue pour une concentration de l'EGCG égale au triple de celle du cis stilbène. Cela veut dire qu'à égale concentration des deux espèces, la réaction n'est pas totale et l'ajout d'une quantité supplémentaire d'EGCG est nécessaire pour consommer tout le cis stilbène et le piéger.

IV.3.2 Effet de la Température de la colonne

a) Effet de la température sur le temps de rétention t_r (min)

Dans ce cas, les concentrations sont maintenues fixes, on fait varier la température de la colonne de 15 à 40 °C. Les résultats (**Tableau IV.3**) montrent que les temps de rétention du pic 1 des produits est presque constant sauf à la température de 20°C où le temps de rétention a légèrement chuté (de 0.0 93min). Pour le pic 2, on observe que le temps va en diminuant avec l'augmentation de la température jusqu'à T= 30°C, après quoi, le t_r commence à augmenter, cela s'explique par le fait que les interactions entre les solutés (ici produits de la réaction) et la phase stationnaire sont du type électrostatique, de faible portée qui diminuent voire, disparaissent avec l'augmentation de la température d'où la rétention entre soluté et phase stationnaire diminue, le t_r diminue consécutivement.

Tableau IV.3 : Effet de la température sur les temps de rétention t_r

T °C	15	20	25	30	40
t_r (pic1) ±(0,003 – 0,01)	2,205	2,112	2,218	2,213	2,205
t_r (pic2) ±(0,06 – 0,1)	23,972	23,38	22,719	22,144	22,466

La température a un effet inverse sur le temps de rétention du pic 2; plus la température augmente, plus le temps diminue $t_r = f(1/T)$. Il est à noter qu'à $T=40^\circ\text{C}$, le temps augmente légèrement ce qui veut dire que à cette température assez haute, un autre type de composé s'est formé et ses interactions avec la colonne a influencé le temps de rétention.

b) Effet de température sur l'intensité des pics (mUA)

Nous avons examiné les résultats de l'effet de température sur l'intensité des pics des produits, les résultats (**Tableau IV .4**) montrent que la température est un facteur qui accélère la réaction car l'on observe que les intensités des pics chromatographiques augmentent avec l'augmentation de la température. Ça pourrait être dû à l'augmentation de la sélectivité de la colonne, donc l'intensité du pic augmente au dépend de sa largeur. A $T=40^\circ\text{C}$, l'intensité diminue et c'est l'effet inverse qui est observé, c'est possible que l'isomère trans est formé en quantité plus importante donnant lieu au composé du pic 1 en plus grande quantité. Il se peut aussi que la température soit suffisamment forte pour observer le dé-complexation ou la réaction dans le sens inverse.

Tableau IV.4 : Effet de la température sur l'intensité des pics

T °C	15	20	25	30	40
Intensité (pic1) ±0,01-0,1	390,7	403,4	410,7	414,8	432,2
Intensité (pic2) ±0,03-0,2	2156,3	2213,7	2222,3	2266,3	2248,6

IV.3.3 Effet du temps de contact

La réaction entre le cis stilbène et l'EGCG est spontanée, l'injection après quelques minutes de réaction donne les même résultats explicités ci-dessus. Par ailleurs, Les interactions entre les 2 molécules laissées en contact après plusieurs jours restent les même à quelques modifications du temps de rétention et intensité des pics, près (**Tableau IV.5**). Ceci indique que les adduits ou complexes formés sont d'une grande stabilité.

L'injection après plusieurs jours nous donne deux pics dont les données chromatographiques sont différentes de celles des composés purs, ce qui signifie qu'on n'a pas de décomposition des complexes formés, mais on a une augmentation des t_r de réaction ce qui indique que les interactions entre les deux molécules continuent, donnant lieu à de nouvelles espèces dont les structures devraient être déterminées par les analyses spectrales.

Tableau IV.5 : Effet du temps de contact sur le temps de rétention

Temps de rétention t_r	Pic 1	Pic 2
Mélange réactionnel	2,21	22,19
Après 2 jours	3,991	22,23
Après 4 jours	3,823	22,24

Tableau IV.6 : Effet du temps sur l'intensité des pics

L'intensité des pics	Pic 1	Pic 2
Le mélange	416,8	2293,5
Après 2 jours	415,6	2321,1
Après 4 jours	416,7	2399,6

IV. 4. Identification des produits par Spectroscopie Infrarouge

Les réactifs ainsi que les produits ont été analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Agilent technologies, Département de génie de procédés).

Le spectre infrarouge du cis stilbène (**Figure IV.9**) montre 2 bandes entre $[700-800] \text{ cm}^{-1}$ qui correspondent aux déformations des CH des cycles aromatiques.

On a deux bandes donc il s'agit bien d'un cycle aromatique monosubstitué. On a une bande à 1050 cm^{-1} attribuée aux vibrations des C-C et 2 bandes à 1500 cm^{-1} correspondant aux vibrations des liaisons C=C aromatique. Une bande apparaît à 1600 cm^{-1} , elle est attribuée aux vibrations des C=C éthyléniques. On a deux bandes, l'une à 2900 cm^{-1} et l'autre à 3010 cm^{-1} correspondant aux vibrations des C-H aromatiques (=C-H).

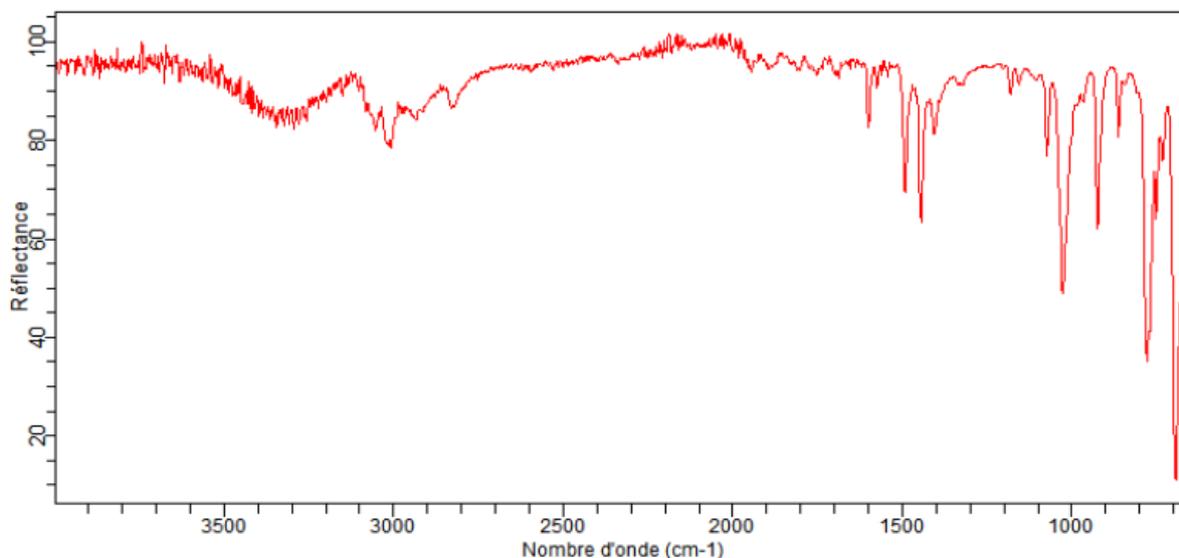


Figure IV.9 : Spectre infrarouge du cis Stilbène

Le spectre de l'EGCG (**Figure IV.10**) montre trois principales bandes :

Bande à 1670cm^{-1} qui correspond au C=O d'un ester.

Une bande trop faible à 1080cm^{-1} → C-O.

Une large bande à 3300cm^{-1} → OH.

Il faut noter que ce spectre est tout à fait différent de celui publié, car plusieurs bandes sont absentes ceci est dû à une erreur de manipulation.

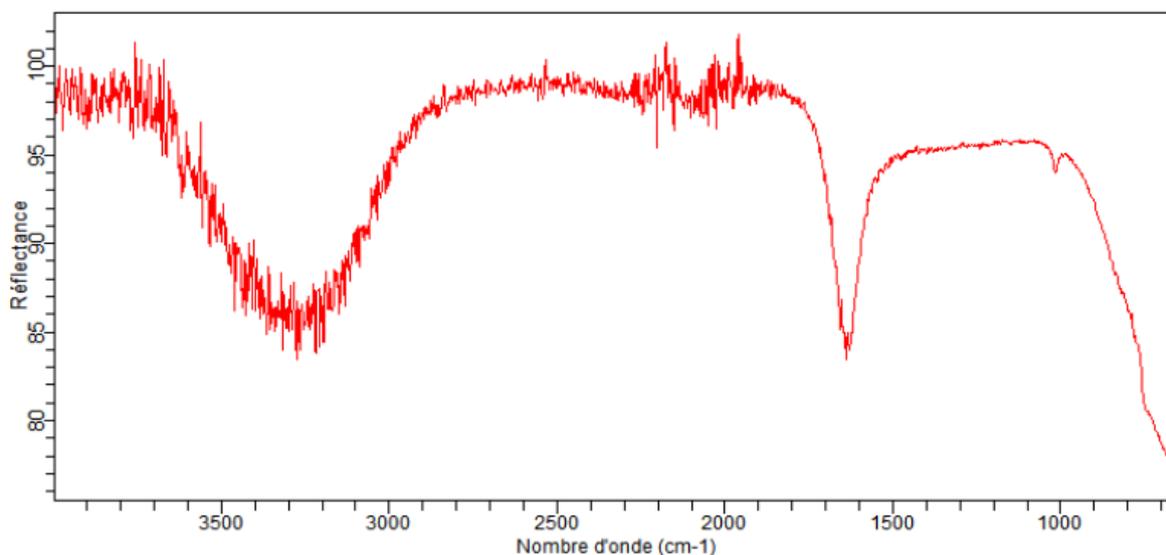


Figure IV.10 : Spectre infrarouge de l'EGCG

Le spectre du produit de réaction du cis stilbène et de l'EGCG (**Figure IV.11**) montre :

Une Bande à 700 cm^{-1} → Déformation des C-H du cycle aromatique

Une bande très intense à 1010 cm^{-1} → C-O.

Bande à 1490 cm^{-1} → C=C aromatique.

2 bandes à $[2800-2900]\text{ cm}^{-1}$ → =C-H

Une bande à 3300 cm^{-1} → O-H.

On note la disparition des bandes du carbonyle de l'ester de l'EGCG (1670), de la double liaison de pont éthylène (1600 cm^{-1}) et l'augmentation de l'intensité de la bande C-O.

Ceci permet de conclure que la réaction a eu lieu au niveau de ces sites, ce qui est en faveur de la formation d'un époxyde de stilbène.

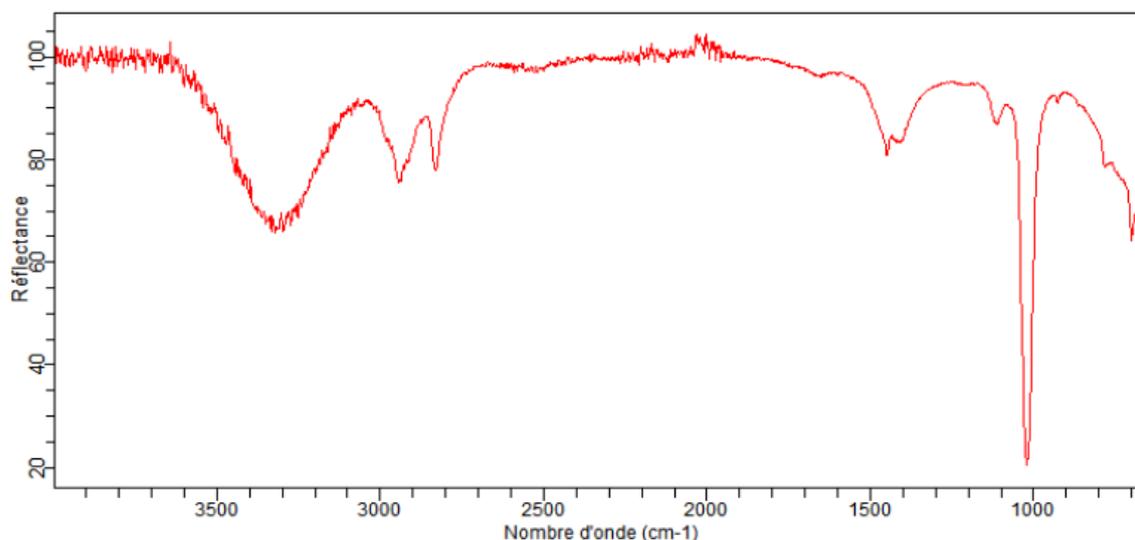


Figure IV.11 : Spectre infrarouge du produit de réaction du cis stilbène avec l'EGCG

IV. 5 Etude par modélisation moléculaire

Dans cette partie, on cherche à déterminer les mécanismes les plus probables de la réaction de l'EGCG avec le cis stilbène et de déterminer de la structure la plus stable des composés formés.

Pour cela, on procède d'abord à l'optimisation des molécules d'intérêt dans le même solvant utilisé pour leur dissolution dans l'étude expérimentale, à savoir, le méthanol (**tableau IV.7**).

Puis différents mécanismes ont été envisagés :

Tableau IV.7 : Energies des réactifs optimisées par DFT au niveau B3LYP (6-311) de la théorie

	Energie (Hartree)	Energie (Kcal/mol)
Le cis stilbène parent	-540,83	-339379,30
Le cis stilbène radicalaire	-540,16	-338958,59
L'EGCG	-1677,14	-1052423,84
H radical	-0,502	-315,18

IV.5.1 Mécanisme 1 : Transfert d'atome d'hydrogène

Le pouvoir antioxydant de l'EGCG a déjà été mis en évidence aussi bien expérimentalement que théoriquement. Selon des calculs par DFT, l'un des mécanismes d'anti-oxydation est le transfert du proton au radical pour le neutraliser. Donc dans cette partie on suppose que sous certaines conditions, on a le cis stilbène radicalaire, et que l'EGCG lui a cédé un proton pour le neutraliser. Après optimisation on a approché le radical cis stilbène du proton. La transformation du cis stilbène en trans, a été observée.

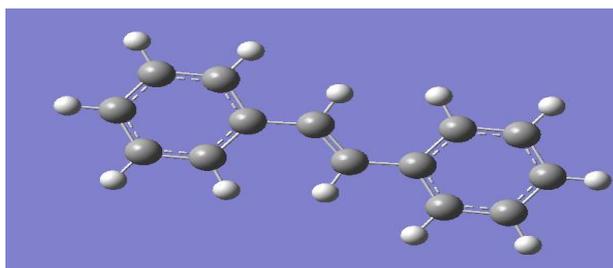


Figure IV.12 : trans stilbène obtenue par rapprochement du radical cis stilbène de l'atome H

IV.5.2 Mécanisme 2 : Mise en contact de l'EGCG et du cis stilbène

Les structures les plus stables du cis stilbène et de l'EGCG ont été rapprochées à une distance de Van Der Waals. Plusieurs positions ont été choisies. La première a été sélectionnée sur la base de résultats publiés stipulant que le 4'-OH des flavonoïdes est responsable de son activité antioxydante. Le résultat de cette simulation est la formation d'un adduit ou complexe où le cis stilbène s'est transformé en trans et s'est lié par liaison covalente (C-C) entre le carbone

portant le 4'OH de l'EGCG et celui du pont éthylène du cis stilbène. Le OH lui-même est substitué au même carbone du pont éthylène (**Figure IV.13**).

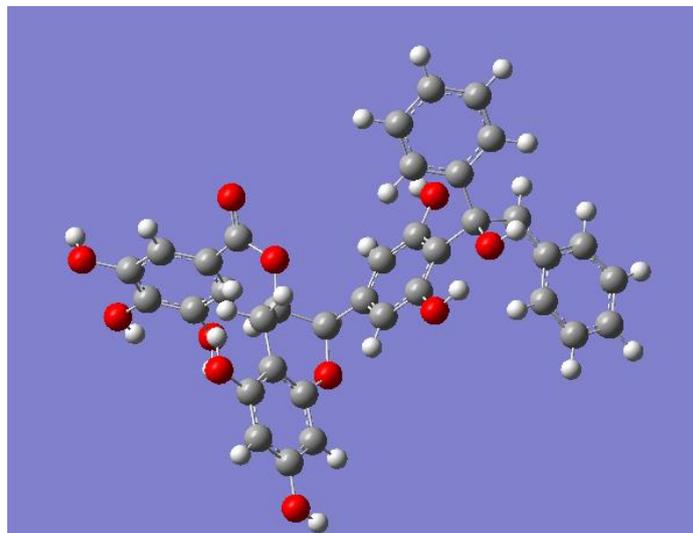


Figure IV.13 : Complexe A (trans)

La deuxième position est le 4''-OH de la partie gallate qui a été reportée comme meilleur site de transfert d'atome d'hydrogène pour la molécule d'EGCG. Dans ce cas une liaison C-O covalente a été formée entre le carbone du pont éthylène et l'oxygène du groupement 4 ''-OH du gallate avec transfert d'hydrogène sur le même carbone du pont éthylène. La double liaison du pont éthylène a bien évidemment été rompue et la conjugaison aussi. La forme de la partie stilbène est entre le cis et le trans, c'est ce qu'on appelle un twist (**Figure IV.14**).

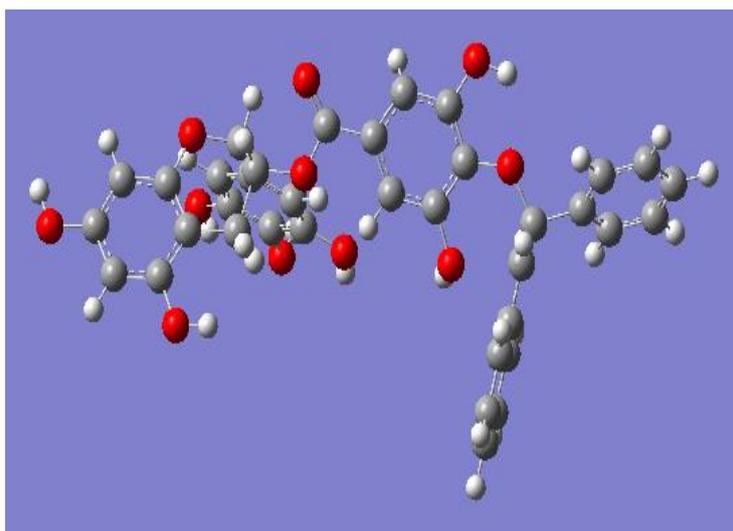


Figure IV.14 : complexe B (cis)

La troisième configuration est dans laquelle le stilbène a capté l'oxygène de l'hydroxyle 4'-OH pour former un époxyde (**Figure IV.15**) c'est le 2,3-diphényloxirane. C'est un produit qui existe réellement (cas [17619-97-5](#)).

Il y avait d'autres mécanismes dans lesquels le cis stilbène s'est scindé en deux entités. Alors dans certains cas c'est l'EGCG en entier qui piège le pro-oxydant et dans d'autres cas l'EGCG cède un H ou groupement OH pour neutraliser le radical.

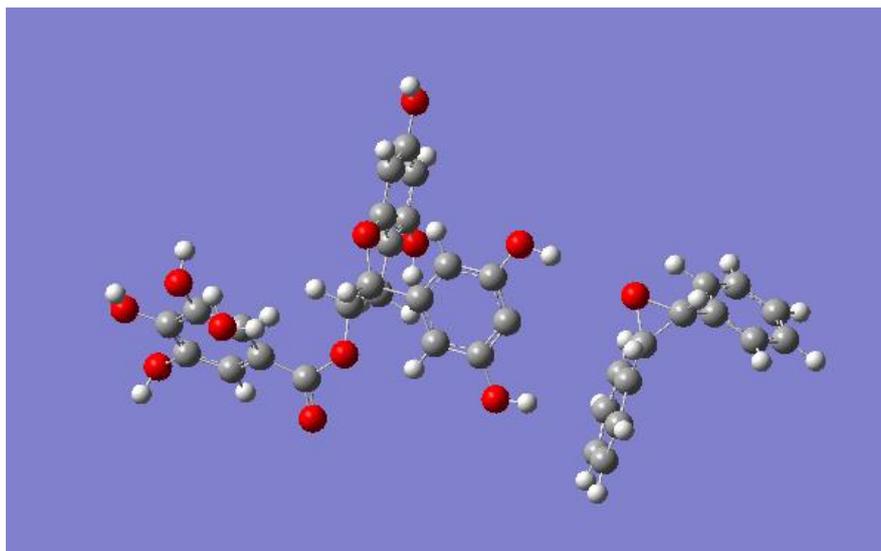


Figure IV.15 : Formation d'un stilbène époxyde

Pour savoir lequel des mécanismes cités ci-dessus, est le plus probable, on compare les énergies des structures optimisées les plus stables. D'après les résultats du **tableau IV.8**, on remarque que les trois composés issus du piégeage total du pro-oxydant cis stilbène, ont des énergies voisines et beaucoup plus faible que celles où l'EGCG cède d'abord un proton au milieu qui sera ensuite capté par le cis stilbène pour se transformer en trans stilbène plus stable thermodynamiquement.

Tableau IV.8 : Energies des produits optimisés par DFT au niveau B3LYP (6-311) de la théorie

produit	Energie (Hartree)	Energie (Kcal/mol)
(trans stilbène)	-540.85	-339390.62
Complexe A Trans	-2216.09	-1390620.83
Complexe B cis	-2216.10	-1390623.80
Epoxyde de stilbène ou 2,3-diphenyloxirane	-2215.97	-1390540.92

Le produit ayant une énergie plus basse est le plus stable.

E (complexe A cis) < E (complexe B trans) < E (produit époxyde de stilbène) < E (trans stilbène).

IV.5.3

Un autre critère qui permettra de classer les mécanismes est l'état de transition, pour cela, un calcul par DFT a été fait et les résultats sont présentés dans la **figure IV. 16**. Le mécanisme avec un gap énergétique le plus bas entre l'état de transition et le réactif donnerait le produit de réaction le plus stable. Donc, dans notre cas, c'est le mécanisme 3.

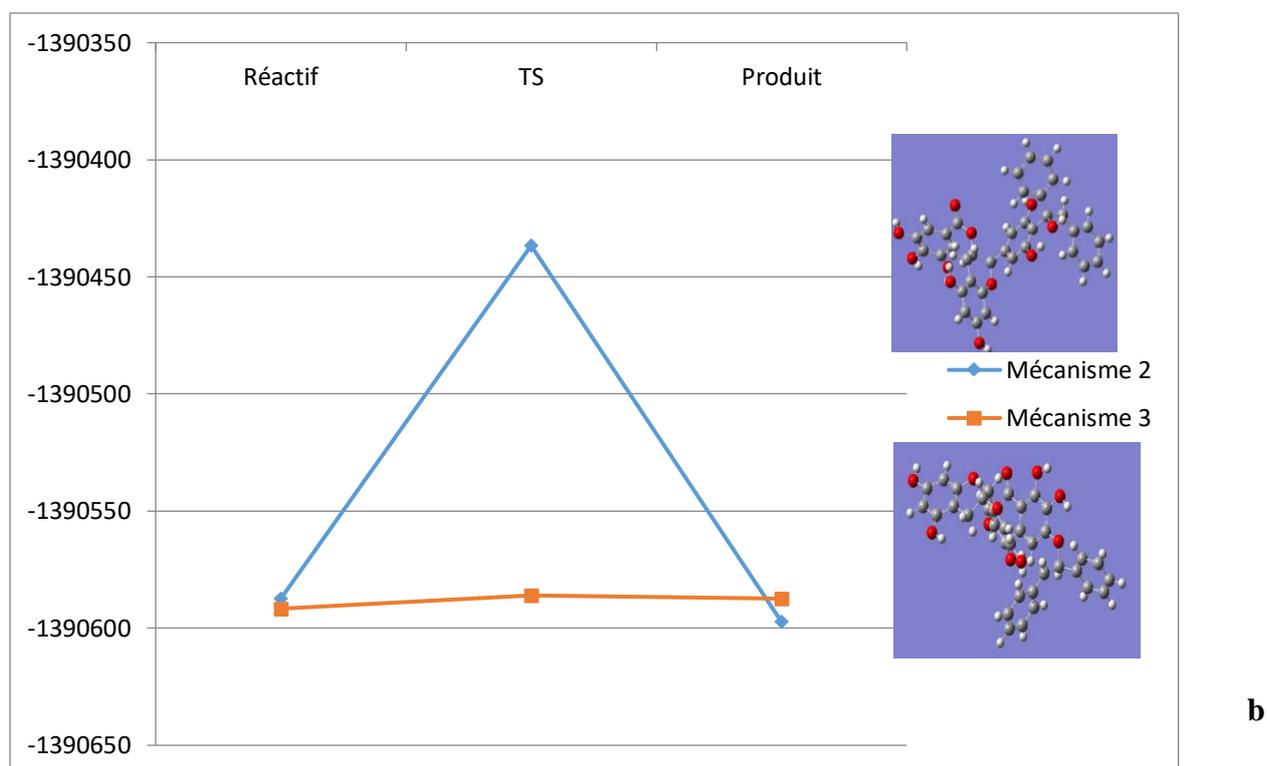
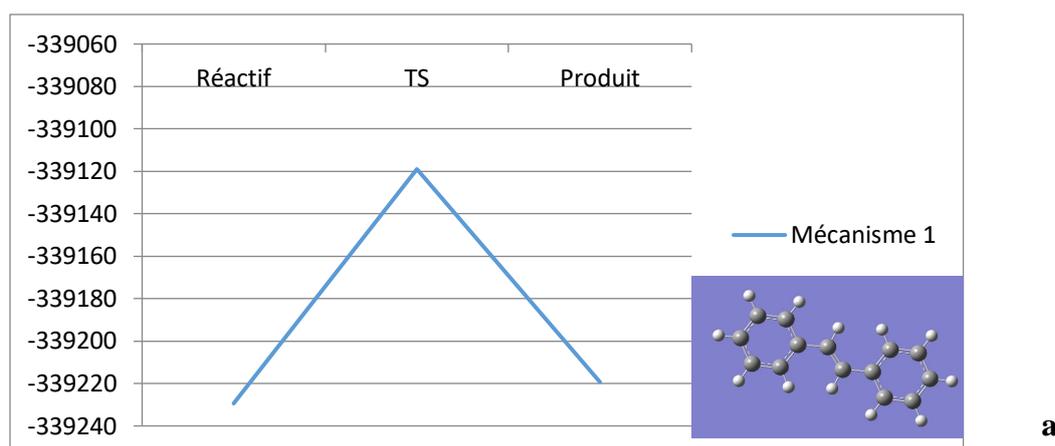


Figure IV.16 : Etats de transition des produits de réaction obtenus par modélisation moléculaire (TS-QST3), a : Mécanisme, b : Mécanisme 2 et 3

IV.5.4 Orbitales frontières HOMO et LUMO :

Les orbitales HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) et LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) sont parmi les paramètres les plus importants de la structure électronique moléculaire. Selon la théorie des orbitales frontières, en DFT [6], plus l'énergie HOMO d'une molécule est élevée, plus elle perd des électrons facilement et plus la réaction de don d'électrons est favorisée. D'autre part, l'énergie LUMO plus faible d'une molécule indique sa

capacité à accepter des électrons. Donc, plus le gap énergétique ($\text{gap} = E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$) est faible plus la molécule est réactive. Dans notre cas les 2 molécules A et B ont des gaps très proches, mais le composé A possède une E_{LUMO} plus grande, il est donc le plus stable. Par ailleurs, on remarque que pour le cis stilbène (**Figure IV.17**), la HOMO et la LUMO sont distribuées sur toute la molécule ceci indique la grande réactivité de cette molécule ; par contre pour l'EGCG, la HOMO est distribuée sur les trois cycles A, B, C alors que la LUMO est localisée sur le gallate. Pour ce qui est des produits de réaction, **pour le composé A**, la HOMO est située sur le cycle B de l'EGCG et sur les doubles liaisons et les OH du cycle A et le O de cycle C alors que la LUMO est localisée sur l'un des phényles, l'éthène du stilbène et les oxygènes des groupes hydroxyles du cycle B.

Pour le produit B, La HOMO est distribuée sur les cycles A, C et B de l'EGCG et La LUMO sur l'un des phényles et l'éthène du stilbène et les doubles liaisons du deuxième phényle et sur le O de gallate qui le relie avec le stilbène.

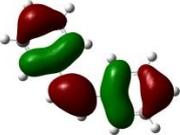
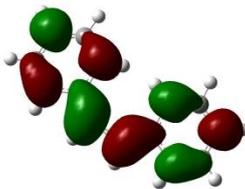
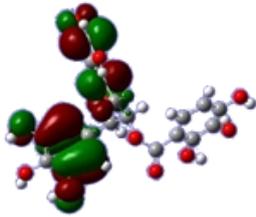
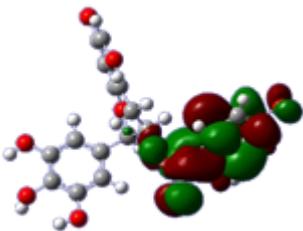
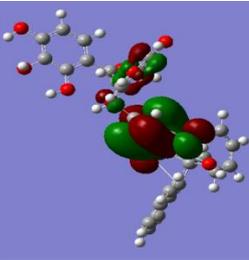
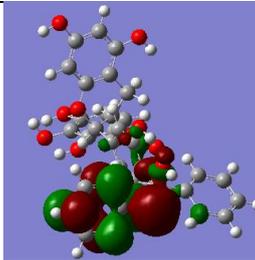
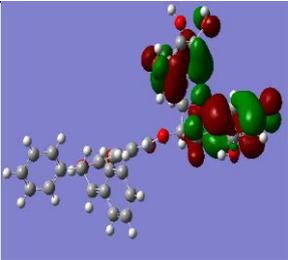
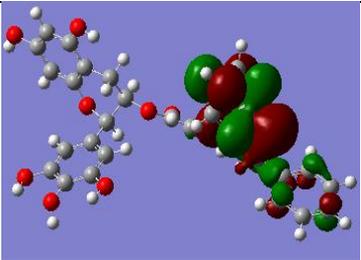
HOMO	LUMO	HOMO	LUMO
			
Cis stilbène		EGCG	
HOMO	LUMO	HOMO	LUMO
			
-5,96 ev	-2,422 ev	-6,07	-2,57 ev
Gap ^a = 3,54 ev		Gap= 3,50 ev	
Produit A		Produit B	

Figure IV.17 : Orbitales frontières des réactifs et produits de réaction. ^a $gap = E_{HOMO} - E_{LUMO}$

IV.5.5 Potentiel électrostatique moléculaire et densité de spin

Le potentiel électrostatique moléculaire (MEP) en un point donné $p(x, y, z)$ à proximité d'une molécule est la force agissant sur une charge de test positive (un proton) située au point p , à travers le nuage de la charge électrique généré à travers les électrons et les noyaux des molécules. Le MEP est généralement visualisé en cartographiant ses valeurs sur la surface reflétant les limites des molécules. Ce dernier peut être généré par des algorithmes calculant la surface accessible au solvant de la molécule, ou par une valeur constante de densité électronique. Le MEP d'une molécule sert à évaluer la réactivité des molécules envers les réactifs nucléophiles ou électrophiles, en d'autres termes, il permet de déterminer les sites attractifs et répulsifs d'une molécule vis-à-vis d'une autre molécule ou une charge.

Dans ce cas particulier, les couleurs ont été choisies de telle sorte que les régions de potentiel attractif apparaissent en rouge et celles de potentiel répulsif apparaissent en bleu (les autres couleurs c'est pour des réactivités intermédiaires).

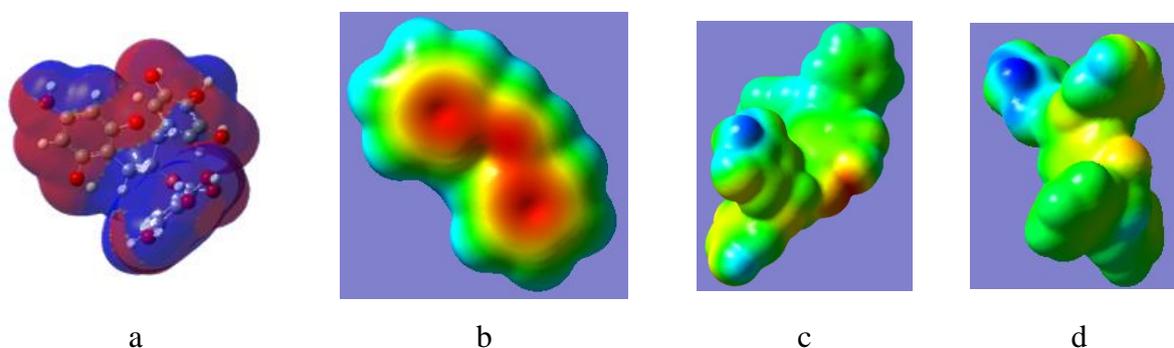


Figure (IV. 18) : Potentiel électrostatique(MEP) des molécules **a** : EGCG **b** : cis stilbène, **c**-Produit A, **d** : Produit B

Le MEP global résultant de l'EGCG montre que la partie gallate est électrophile alors que les groupes OH sont nucléophiles (**Figure IV .18**). Le cis stilbène comprenant un pont éthylène et deux phényles, peut subir une addition d'un électrophile et d'un nucléophile (exemple addition du di-brome) ; le MEP montre une région nucléophile et le reste est plutôt entre les deux (mauvais nucléophile/électrophile). Donc la réaction entre les deux molécules peut se faire à différents niveaux pour l'EGCG mais uniquement au niveau du pont éthylène pour le cis stilbène.

Venant maintenant aux produits de la réaction entre l'EGCG et le cis stilbène, on remarque que les MEPs montrent de très faibles régions nucléophile et électrophile ce qui est synonyme de la faible réactivité de ces produits et c'est ce qui est demandé.

Densité de spin

Si nous examinons de plus près les images de la **Figure IV.19**, nous constatons que pour le produit 4'OH, la densité de spin est plus délocalisée que celle du produit 4''OH, ce qui indique que ce dernier est moins stable.

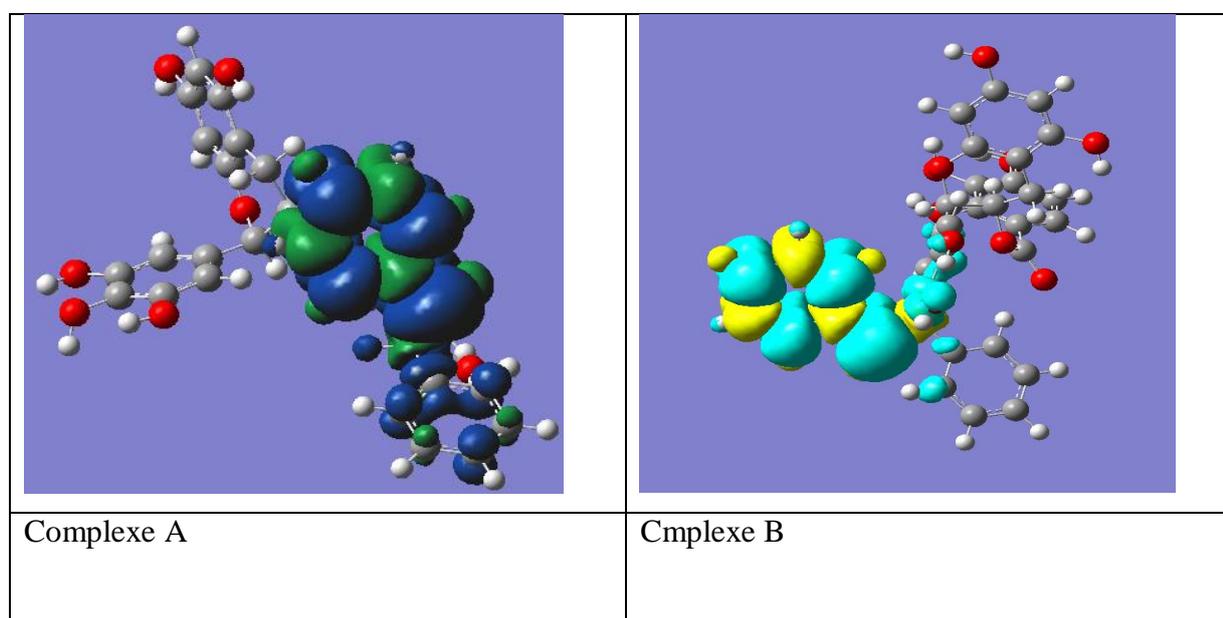


Figure.IV.19 : Contours de densité de spin

Référence

- [1] **Mistry.B-D.** 2009. A Handbook of Spectroscopic Data CHEMISTRY (UV, JR, PMR, JCNMR and Mass Spectroscopy), Oxford Book Company, Jaipur, India ISBN: 978-81-89473-86-0
- [2] **SMAIL.K.**2016. Etude théorique et expérimentale des activités biologiques de quelques composés de la famille des flavonoïdes (thèse de doctorat). P11.
- [3] **Atomasa.T, Gholap.A.V.** 2014. Characterization and determination of Catechins in green tea leaves using UV-Visible spectrometer, J. Eng. Technol. Res.
- [4] **Sarkar D., Dasa S. and PramanikaA.**2014. A solution spectroscopy study of tea polyphenol and cellulose: effect of surfactants, RSC Advances, 2014, **4**, 36196-36205
- [5] **Kinal A., Güreşci M., AlRabiah H., Abdel-Aziz H. A., Mostafa G. A. E.,** (2019) Synthesis, Spectroscopic characterization and structural investigation of new charge-transfer complexes of piroxicam with 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone and chloranilic acid: Experimental and Theoretical studies, Materials Express, 2158-5849/2019/9/203/010.
- [6] **Sadasivam. K, Kumarisan. R.**2011. Theoretical investigation on the antioxidant behavior of chrysoeriol and hispidulin flavonoid compounds—A DFT study, Comput Theor Chem963:227–235.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le travail présenté dans ce mémoire a été consacré à l'étude des interactions moléculaires entre un pro-oxydant, le cis- stilbène et un antioxydant potentiel l'EGCG.

Nous avons suivi la réaction par HPLC en analysant d'abord les produits purs puis le mélange des deux composés pour confirmer que des interactions entre eux ont eu lieu. Les changements observés sur les temps de rétention et les intensités des pics chromatographiques ainsi que l'effet bathochrome observé sur les spectres UV-visible générés par le détecteur DAD, confirme la formation de deux nouveaux composés (ou complexes) par réaction des deux réactifs, EGCG et cis stilbène.

Pour mieux connaître la nature des interactions, et avoir une idée sur la stabilité des adduits formés, on a procédé à une étude paramétrique lors de laquelle on a fait varier la concentration de l'antioxydant et on a trouvé qu'elle n'influe que sur l'absorbance des produits formés alors que la variation de la température de la colonne, affecte aussi bien l'absorbance que le temps de rétention .

L'analyse par HPLC du produit de la réaction, après 2 et 4 jours, donne les mêmes résultats (temps de rétention, intensité de pics chromatographiques) à quelques différences près, ceci nous renseigne sur la grande stabilité des composés formés et permet de conclure que l'EGCG peut piéger le cis stilbène de façon irréversible.

L'analyse par spectroscopie Infrarouge confirme la formation de nouveaux composés par la disparition des bandes (C=O) et (C=C) éthylénique, et ça nous permet de dire que les composés formés sont probablement des complexes formés par liaison covalente entre l'oxygène du carbonyle de l'EGCG et l'un des carbones du pont éthylène du cis stilbène, donc un éther ou un époxyde de stilbène.

L'étude théorique a été faite pour renforcer les résultats obtenus expérimentalement, en nous permettant de proposer des mécanismes réactionnels. Trois mécanismes ont été proposés, l'étude de l'état de transition nous mène à conclure que le mécanisme ayant donné un éther ouvert est le plus probable. Les paramètres électroniques tels que les orbitales frontières HOMO et LUMO et les potentiels électrostatiques moléculaires (MEP) des composés purs et des produits de réaction nous ont permis de déterminer les sites nucléophiles et électrophiles

Conclusion générale

de chaque molécule et ont mis en évidence la grande réactivité des réactifs mais une plus grande stabilité des produits de réaction .

Les analyses par HPLC-DAD et spectroscopie infrarouge doivent être complétées par d'autres techniques de caractérisation telle que la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 (^1H et ^{13}C RMN) pour déterminer les structures exactes des produits obtenus.